

# Uloga polimorfizama kandidatskih gena za kardiovaskularne bolesti u dugovječnosti: antropološki pristup

---

Zajc Petranović, Matea

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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:217:413621>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Matea Zajc Petranović

**ULOGA POLIMORFIZAMA  
KANDIDATSKIH GENA ZA  
KARDIOVASKULARNE BOLESTI U  
DUGOVJEČNOSTI: ANTROPOLOŠKI  
PRISTUP**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

**FACULTY OF SCIENCE  
DIVISION OF BIOLOGY**

Matea Zajc Petranović

**THE ROLE OF POLYMORPHISMS IN  
CANDIDATE GENES FOR  
CARDIOVASCULAR DISEASES IN  
LONGEVITY: ANTHROPOLOGICAL  
APPROACH**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Institutu za antropologiju, pod vodstvom dr. sc. Tatjane Škarić-Jurić, znanstvene savjetnice, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## Zahvale

Ova disertacija izrađena je pod vodstvom prof. dr. sc. Tatjane Škarić-Jurić na Institutu za antropologiju u Zagrebu u okviru znanstvenog projekta „Kompleksna obilježja i zdravlje stanovništva od djetinjstva do duboke starosti“ (MZOŠ RH 196-1962766-2747, 2007-2013) voditeljice prof. dr. sc. Nine Smolej Narančić.

Prije svega, veliko hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Tatjani Škarić-Jurić, na smirenosti i strpljenju te iznimnom trudu i vremenu koje je uložila u ovaj naš zajednički uradak, vrlo često i na uštrb svojeg slobodnog vremena. Draga Tanja, da nije bilo Vaše podrške i savjeta, znajte da bih bila još na početku i muku mučila s outlier-ima :)

Još jedno veliko hvala voditeljici našeg znanstvenog projekta, prof. dr. sc. Nini Smolej Narančić. Hvala na podršci, lekcijama o korištenju SPSS-a, ideji o provođenju meta-analiza i prvoj analizi pomoću Revman-a. Hvala što ste zajedno s Tanjom imali povjerenja u Željku i mene da se odvažimo u avanturu s multiplex PCR-om. Željki hvala što je odradila "rudarski posao" određivši početnice za MPX PCR i SnaPShot te što je genotipizirala MTHFR polimorfizam.

Zadovoljstvo što sam dio upravo ovog projekta nije vezano samo uz izradu doktorata: prijateljsko, poticajno okruženje te marljivost, trud i požrtvovnost svih suradnica na projektu motiviraju me da budem što bolja i produktivnija.

Naravno, tu su i suradnici s naša dva najbliža prijateljska projekta. Jasni, koja je prije bila na našem projektu, hvala što me naučila kako se rade antropometrijska mjerenja te što je, uz sudjelovanje na terenskom istraživanju, sa svima nama unosila prikupljene podatke u bazu. Marijani zahvaljujem na velikom optimizmu i pomoći u laboratoriju - njeno umijeće pokretanja ama baš svakog laboratorijskog protokola u rangu je superjunakinje; Ani i Branki hvala što su sudjelovale na terenskom istraživanju u domovima i što su "supportive".

Članovima komisije, doc. Ani Galov i dr. sc. Krunoslavu Brčić-Kostić, zahvaljujem na pomoći, susretljivosti i ljubaznosti.

Veliko hvala i svim kolegama, i sadašnjima i bivšima, i prijateljima s Instituta koji su pratili ovu "Odiseju" i navijali za mene. Hvala Maji na uloženom trudu i savjetima. Hvala Dubravki, Ani P-L, Nini J, Ani V, grupi za psihološku potporu s 2. kata (Lucija, Mirna, Olja i Josip), a i onoj s 3. kata (Ana B, Jelena, Petra, Zrinka, Tena, Hrvoje), Jošku na stručnim savjetima vezanim uz linearnu regresiju.

Hvala prim. dr. sc. Spomenki Tomek-Roksandić, voditeljici Centra za gerontologiju Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, i njenim suradnicima, što su zajedno s nama osmislili i proveli ovaj projekt.

Iskreno hvala svim sudionicima istraživanja što su nam omogućili da saznamo više o dugovječnosti.

Silna, potpuna i nesebična podrška koju su mi pružili svi članovi obitelji omogućila mi je da izradu i pisanje ove disertacije privedem kraju. Hvala mami, tati i Ivanu što me vole i vjeruju u mene. Veliko HVALA svima koji su se angažirali oko čuvanja Paole (mama, tata, Jadranka, Silvio, Darko, teta, teček).

Goranu hvala na ljubavi, razumijevanju i toleranciji - da nisi posljednjih barem godinu dana preuzeo ulogu i mame i tate našoj kćeri, ovo ne bi bilo izvedivo.

## **ULOGA POLIMORFIZAMA KANDIDATSKIH GENA ZA KARDIOVASKULARNE BOLESTI U DUGOVJEČNOSTI: ANTROPOLOŠKI PRISTUP**

MATEA ZAJC PETRANOVIĆ

Institut za antropologiju, Gajeva 32, Zagreb

Kardiovaskularne su bolesti (KVB) glavni uzročnik pobola i smrtnosti diljem svijeta, a podložnost razvoju bolesti povećava interakcija okolišnih, biokemijskih i genetičkih čimbenika rizika. Kako dugovječnost nije ništa drugo nego izbjegavanje smrtnog ishoda, provedena je analiza povezanosti četiriju polimorfizama kandidatskih gena za KVB (*ACE*, *APOE*, *eNOS*, *MTHFR*) s negenetičkim čimbenicima rizika u uzorku osoba starijih od 80 godina. Logistička regresija je pokazala da kombinacija genotipova *ACE-DD* i *MTHFR-CC* smanjuje šansu doživljenja duboke starosti ( $\geq 90$  g.) prema modelu koji objašnjava čak 27,5% varijance. Meta-analiza učestalosti javljanja ispitivanih alela kod opće populacije u odnosu na osobe starije od 80 godina, koja je provedena korištenjem literaturnih podataka za Europske populacije, je pokazala da su D alel *ACE* gena i E2 alel *APOE* gena češći su kod osoba starih 80+ godina, dok je E4 alel češći kod opće populacije. Istraživanje je ukazalo na prisutnost selektivnog mortaliteta kod nosioca E4 alela *APOE* gena kao i na zavisne od dobi, pleiotropne učinke *ACE I/D* polimorfizma.

Rad ima: 201 stranica, 12 slika, 32 tablice, 528 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4,  
10000 Zagreb

Ključne riječi: dugovječnost, kandidatski geni, polimorfizmi, kardiovaskularne bolesti, populacija 80+, meta-analiza

Mentor: dr. sc. Tatjana Škarić-Jurić, znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: dr. sc. Krunoslav Brčić-Kostić, viši znanstveni suradnik  
doc. dr. sc. Ana Galov

Rad prihvaćen: 08. svibnja 2013. godine

**THE ROLE OF POLYMORPHISMS IN CANDIDATE GENES FOR  
CARDIOVASCULAR DISEASES IN LONGEVITY: ANTHROPOLOGICAL  
APPROACH**

MATEA ZAJC PETRANOVIĆ

Institute for Anthropological Research, Gajeva 32, Zagreb

Cardiovascular diseases (CVDs) are the major cause of morbidity and mortality worldwide, and the susceptibility to developing CVD is increased by the interaction of several environmental, biochemical and genetic risk factors. Since longevity is nothing but avoiding death, the association analysis of polymorphisms in four candidate genes for CVDs (*ACE*, *APOE*, *eNOS*, *MTHFR*) with non-genetic risk factors was performed in a sample of people aged 80 years and over. Logistic regression analysis showed that the combination of *ACE*-DD and *MTHFR*-CC genotypes reduced the chance of survival into nonagenarian age, in a model explaining as much as 27.5% of the variance. The meta-analysis, carried out using published data for the European populations, tested the frequency of the investigated alleles between general and 80+ population, and showed that *ACE* D allele and *APOE* E2 allele were more common in elderly, while E4 allele was more common in general population. This research indicated the existence of selective mortality in *APOE* E4-carriers, as well as the age-dependent, pleiotropic effects of the *ACE* I/D polymorphism.

Thesis consists of: 201 pages, 12 figures, 32 tables, 528 references

Original in: Croatian

Thesis deposited in National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4,  
10000 Zagreb

Keywords: longevity, candidate genes, polymorphisms, cardiovascular diseases, population  
80+, meta-analysis

Supervisor: Tatjana Škarić-Jurić, PhD, Research Professor

Reviewers: Krunoslav Brčić-Kostić, PhD, Senior Research Associate  
Ana Galov, PhD, Assistant Professor

Thesis accepted: May 8<sup>th</sup> 2013

<b>Sadržaj</b>	<b>str.</b>
SAŽETAK	
SAŽETAK NA ENGLLESKOM JEZIKU	
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	<b>3</b>
2.1. Životni vijek i dugovječnost	4
2.2. Biološki aspekti starenja i dugovječnosti	6
2.2.1. Evolucijske teorije starenja	7
2.2.2. Biološke teorije starenja	10
2.2.2.1. Teorije starenja uzrokovanog stohastičkim događajima	12
2.2.2.2. Teorije programiranog starenja	14
2.2.3. Geni i metabolički signalni putevi koji utječu na starenje	16
2.2.3.1. Inzulin/IGF-1/FOXO signalni put	17
2.2.3.2. “Target of rapamycin” (TOR) signalni put	19
2.2.3.3. Sirtuini	20
2.2.3.4. Progerije	22
2.2.3.5. Ostali geni	23
2.2.4. Kalorijska restrikcija	24
2.3. Genetske studije dugovječnosti u ljudi	26
2.3.1. Varijacije u ljudskom genomu	27
2.3.1.1. Tipovi polimorfizama	28
2.3.2. Tipovi genetičkih studija	29
2.3.3. Rezultati studija dugovječnosti u ljudi	31
2.4. Kardiovaskularne bolesti	32
2.4.1. Promjenjivi i nepromjenjivi čimbenici rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti	33
2.4.2. Genska podloga kardiovaskularnih bolesti	38
2.4.3. Kandidatski geni odabrani za ovo istraživanje	39
2.4.3.1. Gen za angiotenzin-pretvarajući enzim ( <i>ACE</i> )	39
2.4.3.2. Gen za apolipoprotein E ( <i>APOE</i> )	40
2.4.3.3. Gen za endotelnu sintazu dušičnog oksida ( <i>eNOS</i> )	41
2.4.3.4. Gen za metilentetrahidrofolat reduktazu ( <i>MTHFR</i> )	41



<b>3. ISPITANICI I METODE</b>	43
3.1. Uzorak	43
3.2. Varijable korištene u istraživanju	44
3.3. Laboratorijske analize	51
3.3.1. Biokemijske analize	51
3.3.2. Izolacija DNK iz pune krvi	51
3.3.3. Genotipizacija	52
A) Detekcija polimorfizma Alu I/D ACE gena	53
B) Detekcija polimorfizma C667T MTHFR gena (rs1801133)	53
C) Detekcija polimorfizma VNTR eNOS gena	54
D) Detekcija dvaju polimorfizama unutar eksona 4 APOE gena (rs429358 i rs7412)	54
3.4. Statistička obrada	56
3.4.1. Učestalost alela	56
3.4.2. Hardy-Weinbergova ravnoteža	56
3.4.3. Univarijatne i multivarijatne analize negenetičkih čimbenika rizika	56
3.4.4. Logistička regresija	56
3.4.5. Meta-analiza	57
<b>4. REZULTATI</b>	60
4.1. Kvantitativne analize	60
4.2. Kvalitativne analize	77
4.2.1. Učestalost alela i genotipova	77
4.2.2. Odnos ispitivanih polimorfizama s čimbenicima kardiovaskularnog rizika	79
4.3. Mješovite kvantitativno-kvalitativne analize: logistička regresija	87
4.4. Međupopulacijska usporedba učestalosti alela i genotipova izučavanih polimorfizama	103
<b>5. RASPRAVA</b>	127
5.1. Ciljna skupina ovog istraživanja - osobe duboke starosti	128
5.2. Osobe duboke dobi prema spolu i starosti	129
5.3. Negenetički čimbenici rizika za KVB u uzorku osoba dobi 80 i više godina	131

5.4.	I/D polimorfizam gena za angiotenzin-pretvarajući enzim ( <i>ACE</i> )	134
5.5.	Polimorfizam gena za apolipoprotein E ( <i>APOE</i> )	136
5.6.	VNTR polimorfizam gena za endotelnu sintazu dušičnog oksida ( <i>eNOS</i> )	137
5.7.	Polimorfizam gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (C667T)	138
5.8.	Interakcija istraživanih genetičkih i negenetičkih čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti u populaciji osoba dobi 80 i više godina	139
5.9.	Rezime	141
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>143</b>
<b>7.</b>	<b>POPIS LITERATURE</b>	<b>145</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>197</b>

## 1. UVOD

Dugovječnost ili produženi životni vijek je složeno obilježje određeno mnoštvom gena i čimbenika okoliša. Brojne studije dugovječnosti pokušavaju odrediti kako okolišne tako i genske čimbenike koji doprinose dostizanju izuzetno duboke starosti u nekih pojedina. Na temelju dosadašnjih istraživanja procjenjuje se da doprinos nasljedne komponente duljini životnog vijeka iznosi 15-30% (Herskind i sur., 1996; Ljungquist i sur., 1998; Skyttthe i sur., 2003; Hjelmborg i sur., 2006), pri čemu je nasljednost trajanja života to jača što je kohorta starija. Rezultati istraživanja koje je uključivalo i jednojajčane i dvojajčane blizance, pokazali su da je do dobi od 60 godina genetski učinak minimalan, no od 60. do 85. godine života primijećen je umjeren genetski doprinos trajanju životnog vijeka. Kod jednojajčanih blizanaca životni se vijek produljio za 0,40 godina kod muškaraca i 0,35 godina kod žena za svaku dodatnu godinu koju je doživio njihov ko-blizanac (Hjelmborg i sur., 2006). Međusobna zavisnost trajanja života dvojajčanih blizanaca bila je nešto niža: u dobi između 60. i 85. godine života zabilježeno je produljenje života od 0,20 godina za muškarce i 0,25 godina za žene za svaku dodatnu godinu života njihova ko-blizanca.

Istraživanje genetičkih uzroka varijabilnosti u trajanju života može ići u smjeru traženja «gena dugovječnosti», odnosno onih gena koji osiguravaju mehanizme uspješnog popravka oštećenja nastalih stohastičkim okolišnim događajima. Takva istraživanja usmjerena su ka potrazi za ljudskim homolozima gena i bioloških puteva koji su u različitim životinjskim modelima prepoznati kao «čimbenici dugovječnosti», a dokazano je da mogu odgoditi proces starenja i produžiti trajanje života.

Međutim, kako dugovječnost naprosto predstavlja izbjegavanje smrtnog ishoda, istraživanja također mogu biti usmjerena ka istraživanju utjecaja onih gena za koje su prethodna istraživanja pokazala da neke njihove varijacije predstavljaju rizik obolijevanja od kroničnih bolesti koje nose znatan dio dobno-vezanog mortaliteta (Drenos i Kirkwood, 2010). Naime, najčešće kronične bolesti današnjice mogu se smatrati dijelom procesa starenja jer u njihovoj patofiziologiji dominiraju degenerativni procesi te osjetljivost ili otpornost na njihov nastanak ima snažan utjecaj na duljinu života. Među najvažnije od njih ubrajamo kardiovaskularne bolesti (KVB), koje su glavni uzročnik pobola i smrtnosti u svijetu, zatim bolesti koštano-mišićnog sustava, neurodegenerativne bolesti te karcinome.

Za temu ove disertacije odabrano je upravo istraživanje uloge polimorfizama nekih od najšire istraživanih kandidatskih gena za KVB — *ACE*, *APOE*, *eNOS* i *MTHFR* — te negenetičkih čimbenika rizika u dugovječnosti populacije Hrvatske. Potencijalno uočena međugeneracijska različitost distribucije alela i genotipova testirat će se i u ostalim populacijama Europe korištenjem literaturnih podataka. U tu svrhu odredit će se učestalost najšire istraživanih polimorfizama navedenih gena u uzorku 325 osoba oba spola starih 80 i više godina, a dobiveni rezultati usporediti s onima za opću populaciju Hrvatske. Utjecaj genotipa na fenotip ispitat će se asocijacijskom studijom, a međugeneracijske razlike populacijskom meta-analizom. Antropološki pristup omogućit će interpretaciju međupopulacijskih razlika kao i međugeneracijskih trendova u svjetlu evolucijskih sila koje su oblikovale utvrđene učestalosti ispitivanih polimorfizama.

Osnovna hipoteza od koje se polazi je da osobe srednje i duboke starosti zbog selektivnog preživljenja nose genske varijante koje imaju protektivno djelovanje te da stoga imaju drugačije učestalosti rizičnih alela i/ili genotipova od opće populacije. Očekivano, divlje varijante tih gena trebale bi biti povezane s manjim rizikom za razvoj bolesti, a time i s dugovječnošću. Premda se odabrani polimorfizmi primarno vežu uz KVB, važno je istaknuti da postoje dokazi o njihovim pleiotrofnim učincima, kao i to da su često i negenetički čimbenici rizika isti za različite kardiovaskularne fenotipove. Prema utvrđenim učestalostima alela i genotipova odabranih polimorfizama, moći će se sa cjeloživotne perspektive ocijeniti stvarni doseg rizičnosti najčešće korištenih i najšire testiranih polimorfizama kandidatskih gena za KVB. Rezultati ove disertacije mogli bi ukazati na ulogu nekih novih, dosad neprepoznatih bioloških puteva, koji su u podlozi samog procesa starenja.

## 2. PREGLED LITERATURE

Ukoliko izraze „starost“ i „staračka dob“ promatramo u kulturno-povijesnom kontekstu, očito je da se radi o relativnim pojmovima podložnim promjenama te npr. dob od 65 godina, koja se smatra granicom za starost te danas u većini zemalja zapadnog svijeta kao i u Hrvatskoj određuje vrijeme za odlazak u mirovinu, za stanovništvo Afrike ostaje nedostižna s obzirom da njihovo prosječno trajanje života iznosi svega 45-55 godina (Population Reference Bureau, 2012). Osim prema kronološkoj dobi (65+ godina) i socijalnom statusu (npr. nakon umirovljenja), starost se može definirati i prema funkcionalnom statusu (npr. nakon određenog stupnja opadanja psiho-fizičkih sposobnosti).

Unatoč razlikama u očekivanom trajanju života između stanovnika razvijenih i nerazvijenih zemalja svijeta, prosječno trajanje života čovjeka se produljuje. Za djecu rođenu u razdoblju 1950.-1955. godine, očekivano trajanje života bilo je 66 godina u razvijenim zemljama i 42 godine u manje razvijenim zemljama, da bi danas očekivano trajanje života za djecu rođenu 2010.-2015. doseglo čak 78 u razvijenim, odnosno 67 godina u nerazvijenim zemljama svijeta (Population Reference Bureau, 2012). Od suvremenih populacija najdulje očekivano trajanje života imaju Japanci i stanovnici San Marina (83 god.), a slijede ih stanovnici Signapura, Španjolske, Švicarske, kneževine Monako, Italije, Islanda, Izraela i Australije (82 god.) (WHO, 2013). Trenutno je prema udjelu osoba starih 65 i više godina u dobnoj piramidi stanovništva najstariji kontinent Europa. U narednih 50 godina očekuju se još dramatičnije promjene: predviđa se da će se do 2060. godine broj Europljana starih 65 i više godina gotovo udvostručiti, a starih 80 i više godina porasti za čak 177,3% (Ageing Report, 2009).

Produljenje prosječne životne dobi populacija utječe na sve stanovnike svijeta time što dovodi do potrebe za promjenom u organizaciji društva, odnosno, potrebe za izmjenom tradicionalnih socio-kulturnih uloga. Također dovodi u pitanje održivost dosadašnjeg zdravstvenog, a i mirovinskog sustava, čime se nameće i kao socio-ekonomski problem te dodatno naglašava potrebu što boljeg razumijevanja dobno-vezanih fizioloških promjena.

## 2.1. Životni vijek i dugovječnost

Najstariji podaci o izuzetno dugom trajanju života i tumačenja starenja zadržani su u mitovima iz pradavnih vremena. Tako se, primjerice, navodi da je prvih osam sumeranskih kraljeva vladalo ukupno 241200 godina (Jacobsen, 1939), a i u starogrčkoj mitologiji pronalazimo informacije o Hiperborejcima, ljudima miljenicima bogova, koji su živjeli u izobilju do prosječne dobi od tisuću godina (Zamarovsky, 1985).

Evolucijski gledano, ljudska vrsta je u dva navrata doživjela udvostručenje očekivanog prosječnog trajanja života. Prvo se u razdoblju od 5 milijuna godina nakon odvajanja od zajedničkog pretka ljudi i čovjekolikih majmuna životni vijek *Homo sapiens* produljio s 20 na 40 godina, da bi ostao više-manje na toj razini sve do posljednjih 200 godina, otkad se prosječno trajanje života dodatno udvostručilo. Prvi pomak prema dugovječnosti povezuje se s povećanjem udjela mesa u prehrani, kao i promjenama u gustoći populacije i prelasku na sjedilački način života, pri čemu je izloženost patogenima iz sirovog mesa i ljudskih izlučevina dovela do selekcije genskih varijanti koje pospješuju imunološki odgovor. Za drugo pak produljenje životnog vijeka, smatra se da je rezultat poboljšanih higijensko-sanitarnih uvjeta odnosno smanjenja smrtnosti novorođenčadi i djece, ali i kvalitetnije prehrane, obrazovanja te primjene znanstveno-tehnoloških otkrića u medicini, što dovodi do izrazitog produljenja života u postreproduktivnoj dobi (Fogel i Costa, 1997; Kaplan i sur., 2009; Finch, 2007). Naprimjer, u 17. je stoljeću u Engleskoj prosječni životni vijek iznosio svega 35 godina, i to ponajviše stoga što je preko 2/3 djece umiralo prije navršene 4. godine (Rorabaugh i sur., 2004). S Industrijskom je revolucijom i povećanjem proizvodnje u poljoprivredi došlo do redovitije opskrbe hranom, što je u kombinaciji s primjenom novih saznanja iz područja medicine i javnog zdravstva dovelo do drastičnog smanjenja stope smrtnosti novorođenčadi i djece: 1730.-1749. godine u Londonu je prije navršene pet godina umiralo 74,5% djece, dok je 1810.-1829. godine smrtnost djece iste dobi smanjena na 31,8% (Buer, 1926).

Uz prosječno trajanje života, kroničari su kroz prošlost sporadično bilježili i slučajeve izuzetne dugovječnosti, npr. postojanje stogodišnjaka. Međutim, urednici monografije „Validation of Exceptional Longevity“ smatraju da su se, zbog fascinacije dubokom starošću, glasine prenosile nekritički te da je svega nekolicina ljudi, ako uopće itko, mogla prije 1800. godine doživjeti duboku starost od 100 i više godina (Jeune i Vaupel, 1999). S obzirom na nepouzdanost navoda koji se nalaze u Maticama rođenih i umrlih, tek se od XIX. stoljeća

nadalje možemo zaista pouzdati u demografske podatke. Prema njima je gospođa Jeanne Calment, Francuskinja preminula 1997. godine u dobi od 122 godine i 164 dana, najdulje živeća osoba ikada. No postavlja se pitanje je li ta dob podložna dodatnom produljenju ili je njome dosegnut biološki maksimum naše vrste? Ukoliko se radi o biološkom maksimumu, je li on jednak za oba spola s obzirom da čak  $\frac{3}{4}$  populacije osoba duboke starosti čine žene?

U prirodi, među divljim životinjama, zaista rijetko možemo zateći stare jednike. Doseći biološki maksimum u prirodnim uvjetima je praktički nemoguće zbog visokog mortaliteta uzrokovanog bolestima, predatorima, nesretnim slučajevima te borbama za hranu i teritorij. Iz tog razloga, najpouzdanije informacije o maksimalnoj duljini života pojedinih vrsta dobijaju se iz zooloških vrtova gdje životinje žive u uvjetima gotovo idealnima za produljenje života. Općenito govoreći, čini se da veće, krupnije životinje žive dulje nego njihovi mali rođaci; naravno, uz iznimke. U odnosu na ostale sisavce, ljudi mogu dostići drugu po redu najdulju životnu dob: veću životnu dob koja iznosi barem 130 godina mogu doživjeti samo Grenlandski glatki kitovi, *Balaena mysticetus* (George i Bockstoce, 2008). Ptice žive čak i dulje od većine sisavaca - labud može doseći dob od 102 godine, sup strvinar *Cathartes aura* čak 118 godina, a neki gmazovi žive najdulje od svih. Tako je 2006. godine u Alipore Zoološkom vrtu u Kalkuti u dobi od 255 godina uginuo mužjak divovske kornjače, *Aldabrachelys gigantea*. Kod toplokrvnih i hladnokrvnih organizama utvrđene su metaboličke razlike za koje se smatra da utječu na brzinu i tijek starenja pojedinih vrsta.

U biljnom je svijetu duljina trajanja života pojedinih vrsta tolika da su brojke praktički neusporedive s ljudima i životinjama: Metuzalem, kako je ime danas najstarijem živućem pravom tisućljetnom boru vrste *Pinus longaeva* (<http://www.rmtrr.org/oldlist.htm>), živi već preko 4789 godina u Kaliforniji (Inyo County, Kalifornija, SAD), dok je bor Prometej - iste vrste ali na drugoj lokaciji (Wheeler Peak, Nevada, SAD), 1964. godine kada je posjećen bio još stariji – 4844 godine (Currey, 1965). Ova vrsta bora raste samo u SAD-u i to u ekstremnim uvjetima: vjetroviti planinski obronci, slabo hranjivo tlo i mala količina oborina. S obzirom na to, njegov rast je vrlo spor: u stotinu godina povećava opseg za svega jedan centimetar. Također, svaka borova iglica živi čak 40 godina prije nego što izraste nova.

Pozitivan učinak izuzetno dobrih životnih uvjeta (redovita hrana, izoliranost od predatora) na produljenje prosječnog života životinja u zatočeništvu, primijećen je i kod ljudi. Naime, na nekoliko lokacija diljem svijeta nazvanima „plave zone“ utvrđeno je postojanje relativno zatvorenih zajednica s karakterističnim obrascem ponašanja (osobe uglavnom žive

bez stresa, paze na prehranu, pobožni su), koje žive ne samo dulje već i zdravije od populacija koje ih okružuju (Buettner, 2008). S druge strane, prije spomenuta gđa Calment je do dobi od 120 godina bila težak pušač i redovito pila žestoka pića.

Dakle, ljudi se međusobno ne razlikuju u općim obilježjima starenja, ali postoji velika interindividualna varijabilnost u mnogim specifičnim osobinama na razini stanica, organa i organizma kao cjeline, što potvrđuje kompleksnost ovog svojstva. Brojni čimbenici okoliša također utječu na senescenciju, i to nejednakim učinkom na pojedince u različitim ekološkim, društvenim i kulturnim uređenjima (Arking, 2006). Ipak, slični trendovi utvrđeni u različitim populacijama pojačavaju pritisak za otkrivanjem uzročnika promjena koji su pozadina senescencije i/ili bolesti.

## **2.2. Biološki aspekti starenja i dugovječnosti**

Na pitanje zašto ljudi stare i umiru te koji biološki procesi vode ka starenju teško je dati sveobuhvatan odgovor, tim više što po tom pitanju ni ne postoji apsolutna suglasnost u znanstvenom svijetu, no neke poglede na biološke aspekte starenja ću ipak navesti. Kod nekolicine je životinjskih vrsta utvrđeno da proces starenja započinje nakon faze sazrijevanja i reprodukcije, ubrzanim propadanjem osnovnih fizioloških funkcija. Kod ljudi postreproduktivnu fazu karakteriziraju fiziološke promjene poput gubitka elastičnosti pluća, smanjenja mišićne i koštane mase, promjena u kardiovaskularnom sustavu te promjene u hormonskom signaliziranju (Roth, 1995; Lakatta, 2000; Grounds, 2002; Chan i Duque, 2002; Taylor i Johnson, 2010). Povrh toga, starenje kod ljudi često biva praćeno bolestima poput kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze, demencije, dijabetesa tip 2, Alzheimerove bolesti i karcinoma.

Ono što karakterizira starenje na staničnoj razini su, među ostalim, smanjenje broja staničnih dioba, promijenjen odgovor na unutarstanične i vanstanične podražaje te promjene u ekspresiji gena. Smatra se da je ishodište ovih staničnih promjena u akumuliranim mutacijama i lezijama u genomu uz smanjenje stabilnosti DNK, što dovodi do nastajanja modificiranih i oštećenih proteina (Guarente i sur., 2008). Ove i ostale dobno-vezane promjene kao i biološki, molekularni i biokemijski mehanizmi koji su im u pozadini već desetljećima intrigiraju znanstvenike koji pokušavaju odgovoriti na pitanje zašto dolazi do propadanja mehanizama koji održavaju homeostazu te kako te promjene utječu na fenotipove starenja i pojavu dobno-



vezanih bolesti. Postavlja se i pitanje kako neki ljudi dožive duboku starost uz očuvane tjelesne i kognitivne funkcije, a drugi ne?

### **2.2.1. Evolucijske teorije starenja**

Filogenetski gledano, starenje je široko rasprostranjeno, ali ne i univerzalna pojava. Među prvim pokušajima odgovora na pitanje zašto uopće dolazi do starenja, evolucijski biolozi su pretpostavili da je unatoč negativnom utjecaju starenja na adaptivnu vrijednost jedinke, ono korisno ili čak neophodno na nivou vrste kako bi se, primjerice, spriječila prenaseljenost. Prema toj ideji starenje je genetički programirano sredstvo ograničavanja veličine populacije.

**Teorija programiranog ili adaptivnog starenja** pripisuje se Augustu Weismannu (1889), ali su je kasnije zastupali i drugi znanstvenici koji su starenje tretirali kao adaptaciju organizma na promjene u životnoj sredini. Kako bi objasnio točan biološki mehanizam za svoju teoriju, Weismann je pretpostavio limit u broju dioba somatskih stanica koji bi bio specifičan za svaku vrstu, a određen već u embrionalnim stanicama. Iako su prvi pokusi s kulturama stanica upućivali na mogućnost neograničeno dugog kultiviranja, Swim je 1959. godine objavio suprotno (Swim, 1959). Njegove nalaze je još detaljnije 1961. obradio Hayflick pa je limit u broju dioba stanica nazvan Weismann-Swim-Hayflickov limit.

Ova teorija podrazumijeva postojanje “gena za starenje” koji bi utjecali na sam proces. Međutim, činjenica da jedinke u prirodnim populacijama rijetko imaju priliku ostariti te samo starenje ne utječe na kontrolu brojnosti populacije, važan je kontra-argument ovakvom pokušaju objašnjenja fenomena starenja. Također, s obzirom da životinje u prirodi umiru mlade, prirodna selekcija ne može direktno utjecati na sam proces starenja zbog čega je teško zamisliti postojanje gena za starenje. Hipotetski gen za starenje, s očito štetnim utjecajem na jedinku koja ga ima, ukoliko inaktiviran mutacijom, tu bi jedinku doveo u prednost nad ostalim članovima populacije i očekivano bi bilo da se proširi, što bi izostalo jedino ukoliko bi dobrobit vrste ili populacije prevagnula u odnosu na individualnu (Nešić i sur., 2005). Pred kraj života sam je Weismann shvatio neodrživost svoje teorije o programiranoj smrti organizama i priklonio se mišljenju da je smrt starijih organizama zapravo nebitna i u načelu neutralna za određenu vrstu.

Peter Medawar (1952) autor je **Teorije akumuliranja mutacija** koja pojašnjava starenje sisavaca. Njegova je teza da ne postoji selekcijski pritisak na svojstvo koje bi produljivalo životni vijek kad ionako gotovo sve životinje koje žive u prirodnim uvjetima umiru od bolesti ili nesretnim slučajem, ili ih pak ubiju predatori puno prije dostizanja starosti. Predloženi mehanizam djelovanja uključuje mutirane gene koji se nakupljaju kroz generacije i aktiviraju tek u dubokoj dobi, tako da na njih, za razliku od ostalih štetnih mutacija, ne djeluje prirodna selekcija. Suvremeni genetičari ipak smatraju da, s obzirom na vremenski i prostorno određenu regulaciju ekspresije gena u svrhu pravilnog rasta i razvoja organizma, ova teorija implicira postojanje gena koji nose mutaciju i aktiviraju se isključivo u kasnoj životnoj dobi te postavljaju pitanje koja bi bila svrha kasnoživotne ekspresije nekog gena?

Ono što je ipak bitno u Medawarovoj ideji, i što su prihvatili autori gotovo svih teorija koje su slijedile s obzirom da se uklapa u opažanja o trajanju životnog vijeka, dobi nastupanja spolne zrelosti i prestanku reprodukcije brojnih sisavaca, je teza da starenje počinje postreproduktivno: nakon što prestane reproduktivno razdoblje nekog organizma, gubi se potreba za održavanjem fizioloških funkcija nužnih za reprodukciju. Prema ovoj tezi, ne očekuje se da dolazi do selekcije genskih varijanti koje potiču dugovječnost. Naime, na osobine koje bi smanjile reproduktivni potencijal nekog organizma djelovala bi prirodna selekcija, no ukoliko bi se štetne karakteristike ispoljile tek nakon razdoblja reprodukcije, imale bi nikakav ili vrlo malen učinak na prenošenje gena u iduću generaciju te bi time bile i manje pod utjecajem selekcije.

Medawarovu teoriju dalje je razvijao George C. Williams, zaključivši da starenje povećava smrtnost čak i kada životinje ne umiru “od duboke starosti”. Neka životinja, primjerice, u ranoj starosti postaje sporija od mlađe jedinke iste vrste te time i lakši plijen za predatora. Jednako tako, ako joj oslabi imunološki sustav, starija jedinka može uginuti od infekcije. Ovu teoriju potvrdile su kasnije studije koje su proučavale demografiju u prirodnom okolišu što je bacilo sumnju na Medawarovu tezu, a koju su dodatno opovrgnuli rezultati analiza genoma različitih organizama (pivskog odnosno pekarskog kvasca, nematodnog crva oblića, voćne mušice, miša) provedeni krajem 90-ih godina 20. stoljeća jer se pokazalo da geni koji uzrokuju starenje nisu mutirani već postoje u svih eukariota.

Williamsova **Teorija antagonističke pleiotropije** (1957) sugerira učinak jednog te istog gena na dva ili više fenotipova, pri čemu je barem jedan koristan, a ostali mogu biti

korisni ili štetni. Ukoliko evoluciju shvatimo kao utrku da se što prije ima što više potomaka, tada bi neka genska varijanta koja poboljšava fertilitet imala selektivnu prednost čak i ukoliko u post-reproduktivnom periodu uzrokuje smrt (engl. *genetic trade-off*). Ova teorija je još uvijek najrasprostanjenija jer su u raznim organizmima zaista pronađeni geni uključeni u starenje za koje se smatra da i poboljšavaju fertilitet ili na neki drugi način osiguravaju prednost jedinke. Tako, naprimjer, pojačana proizvodnja i posljedično visoka koncentracija testosterona povećavaju evolucijsku spremnost (fitness) mladih muškaraca, no kasnije u životu povećavaju vjerojatnost razvoja karcinoma prostate (Hyde i sur., 2012), odnosno smanjuju fitness. Međutim, pronađeni su i geni uključeni u starenje za koje nema nikakvih dokaza da su blagotvorni u mlađoj dobi (Chen i Wagner, 2012; Mockett i sur., 2012). Druga poteškoća s antagonističkom pleiotropijom i drugim teorijama koje drže da je starenje nepovoljna nuspojava neke korisne funkcije je da bi očekivana povezanost između korisnih i štetnih učinaka trebala biti kruta u smislu da se evolucijski koristan proces ne bi mogao razviti bez ostvarenja i suprotnog efekta, što eksperimenti ne potvrđuju, već se pokazalo da je kroz evoluciju došlo do promjena odnosno prilagodbe pojedinačnih karakteristika organizama (Torday i Rehan, 2012).

**Teoriju neinvestiranja u somatske stanice/Teoriju jednokratnog tijela** (engl. *disposable soma theory*) predložio je 1977. Thomas Kirkwood. Njegova ideja je bila da, s obzirom na limitiranu opskrbu hranom, samo tijelo pri odluci kako raspodijeliti ukupnu raspoloživu energiju čini kompromis i daje veću prednost osnovnim biološkim funkcijama i reprodukciji, što za posljedicu ima manjak energije za popravak akumuliranih oštećenja i održavanje somatskih stanica te dugoročno uzrokuje propadanje tijela. Ova teorija, čija je osnova na tragu ideje da su organizmi samo mediji (engl. *survival machines*) “sebičnog gena” (Dawkins, 1976), zbog svoje je jasnoće bila vrlo brzo široko prihvaćena međutim postoje kontra-argumenti. Teorija jasno definira nestašicu hrane kao razlog starenja, a pokusi kalorijske restrikcije, koji se npr. na štakorima provode kontinuirano od 1935., pokazuju da životinje žive dulje ukoliko im se smanji unos hrane (McCay i sur., 1989; Everitt i sur., 2010). Također je uočeno da je pri kalorijskoj restrikciji kod voćnih mušica smanjen i fertilitet, što opet ne odbacuje u potpunosti ovu teoriju (Chapman i Partridge, 1996; Rogina, 2009). Najveća zapreka prihvaćanju ove teorije je to što je energija potrebna za popravak i održavanje organizma mnogo manja u odnosu na energiju koju taj isti organizam treba uložiti tijekom gestacijskog perioda za stvaranje novog bića kao i tijekom laktacije. Međutim, ukoliko prihvatimo ovu teoriju, tada pretpostavljamo da je dugovječnost predodređena genima

selekcijiranim zbog reproduktivne prednosti (Rose i sur., 2008), a dobno-vezani otklon u funkcioniranju nastaje zbog stohastičkih događaja tijekom razvoja i reproduktivne faze (Finch i Kirkwood, 2000).

Glavna kritika svih ovih teorija starenja, utemeljenih na klasičnim evolucijskim procesima, je tvrdnja da je starenje nespecifičan proces u koji je uključen velik broj gena: otkrića mutiranih pojedinačnih gena koji dovode do značajnog produljenja maksimalnog životnog vijeka ukazuju da mehanizmi starenja mogu uključivati manji broj gena i biti vrlo specifični (Longo i sur., 2012).

### **2.2.2. Biološke teorije starenja**

U engleskom jeziku postoje dva pojma za starenje ljudi; jedan je *ageing* (ili *aging*), a drugi *senescence*. Pojam *ageing* odnosi se na proces koji započinje rođenjem i završava smrću, a odnosi se na akumulaciju promjena kod neke osobe kroz vrijeme. Kod ljudi je to multidimenzionalan proces fizičkih, psiholoških i društvenih promjena, s time da neke od navedenih dimenzija rastu i povećavaju se kako prolazi vrijeme, dok druge propadaju. Pojam *senescence*, koji prevodimo i kao senescenciju ili biološko starenje, odnosi se pak na promjene u ponašanju i opadanje tjelesnih funkcija koje slijedi nakon razdoblja zrelosti (30+ god.), čime se mijenja i sposobnost organizma za preživljavanje u danom okolišu (Kirkwood i Holliday, 1986). Senescencijom se povećava rizik oboljenja od dobno-vezanih kroničnih degenerativnih bolesti poput karcinoma i KVB, koje su i najčešći uzročnici smrtnosti, te se smrt može definirati kao konačna posljedica senescencije.

Proces biološkog starenja objašnjavan je ovisno o stupnju znanstvene spoznaje i disciplinama koje su ga proučavale, tako da danas ne postoji jedna već gotovo 300 teorija (Medvedev, 1990). Među mnogim teorijama postoji visoki stupanj podudarnosti i međusobnog nadopunjavanja, ali nijedna nije obuhvatila sve aspekte starenja. Ipak, postalo je jasno da funkcioniranje organizma treba gledati kao interakciju mnogobrojnih procesa jer fokusiranjem na samo jedan aspekt dobivamo iskrivljenu sliku.

Ugrubo, teorije biološkog starenja možemo svrstati u dvije skupine od kojih svaka sadrži nekoliko podskupina;

1. Teorije stohastičkog starenja
  - teorija slobodnih radikala
  - teorija genske nestabilnosti (oštećenje molekule DNK)
  - teorija nakupljanja „smeća“ u stanici
  - teorija promjene metabolizma
  - teorija nakupljanja štetnih proteina
  
2. Teorije programiranog starenja
  - neuroendokrinološka teorija starenja
  - imunološka teorija starenja

Teorije programiranog starenja objašnjavaju senescenciju kao posljedicu intrinzičnih promjena stanične regulacije, odnosno da promjene u homeostazi vode ka pogoršanju vitalnih funkcija organizma. Promjene u ekspresiji gena uključenih u održavanje, popravak i obranu stanice regulirane su biološkim satom: tako, npr., promjene u ekspresiji gena odgovornih za izlučivanje spolnih hormona do kojih dolazi ulaskom u menopauzu povećavaju rizik za pojavu osteoporoze, metaboličkih poteškoća i KVB (Dessapt i Gourdy, 2012), a propadanje imunološkog sustava, koje počinje involucijom timusa već nakon rođenja, čini starije jedinke podložnijima infekcijama i komorbiditetu (Shanley i sur., 2009). Stohastičke teorije smatraju da starenje uzrokuju čimbenici staničnog okoliša čije promjene induciraju kumulativna oštećenja na svim razinama organizacije – indikatori promjena su primarno endogeni ili sekundarno vanjski. Interindividualne razlike u brzini i „tipu“ starenja (zdravo vs. bolesno) kao i u duljini životnog vijeka čak i kod osoba koje dijele isti okoliš potvrđuju složenost senescencije. Pokušaji identifikacije uzročnika i principa senescencije su brojni i uključuju razne organizme kao i razine organizacije, a u posljednje vrijeme se prepoznala potreba za sistemskom biologijom čiji pristup u npr. razumijevanju principa staničnog (replikativnog) starenja, otkriva interakciju između poremećaja u radu mitohondrija, skraćivanja telomera i oštećenja DNK (Kirkwood, 2011).

### 2.2.2.1. Teorije starenja uzrokovanog stohastičkim događajima

**Teoriju slobodnih radikala** izložio je 1956. Denham Harman – slobodni radikali kisika, koji su zbog nesparenog 1 ili 2 elektrona u valentnoj ljusci vrlo reaktivni, vežu se za ostale molekule u stanici i uništavaju ih, a ta kumulativna oštećenja posljedično dovode do pogoršanja funkcionalnosti organizma i konačno smrti (Harman, 1956). 1972. godine Harman je modificirao početnu teoriju, a daljnja nadogradnja 1980. godine rezultirala je onim što je danas poznato kao Mitohondrijska teorija starenja slobodnim radikalima (Miquel i sur., 1980; Harman, 2009). Teorija u svom trenutnom obliku predlaže da visokoreaktivni superoksidni i peroksidni anioni, koji nastaju nepotpunom redukcijom u 2-3% molekula kisika u zadnjoj fazi oksidativne fosforilacije, uzrokuju oštećenja (mutacije) makromolekula poput lipida, proteina, kao i same mitohondrijske DNK, a te mutacije dodatno povećavaju proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva (engl. ROS=*reactive oxygen species*) i akumulaciju slobodnih radikala u stanici što značajno pridonosi procesu starenja stanice (Nohl i Hegner, 1978; Baehner i sur., 1975; Valko i sur., 2004; Gruber i sur., 2008; Jang i Remmen, 2009). ROS nastaju i u mnoštvu drugih staničnih procesa u kojima dolazi do oksidacije, a mogu ih inducirati i egzogeni izvori poput UV zračenja. Oštećenja uzrokovana ROS-om pogoršavaju funkcioniranje stanice što se u konačnici odražava na razini organa i organizma i posljedično dovodi do starenja (Harman, 1991).

Obrana organizma od kisikovih radikala temelji se na djelovanju enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze i glutation-peroksidaze, no ukoliko dođe do poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu, pri čemu je pomak ravnoteže usmjeren prema oksidaciji, to se stanje naziva oksidacijski stres. Osim enzima, antioksidativna svojstva imaju i molekule koje može proizvesti sam organizam, ali se mogu unijeti i hranom, poput askorbinske kiseline (vitamina C), glutationa, vitamina A i E i sl. (Schafer i Buettner, 2001; Kohen i Nyska, 2002).

Oksidacijski stres je obilježje i uzročnik nastanka brojnih poremećaja poput KVB, infektivnih i autoimunih bolesti, a i kroničnih bolesti povezanih sa starenjem poput artritisa, ateroskleroze, Alzheimerove bolesti, nekih vrsta karcinoma i dijabetesa (Clancy i Birdsall, 2012). Primjerice, kada reakcija inducirana slobodnim radikalima zahvati barem dva različita lokusa na DNK, svejedno radi li se o istom ili različitim lancima, ta molekula DNK se spaja i „umrežuje“ (engl. *cross-linking*) što onemogućava njenu daljnju replikaciju (Crean i sur., 2008). Ovo i slična ireverzibilna oštećenja DNK izazvana slobodnim radikalima etiološki su

čimbenici brojnih bolesti uključujući karcinome (Dizdaroglu i Jaruga, 2012). Također, nedavno su pronađeni dokazi koji sugeriraju da slobodni radikali u kombinaciji s nekim reaktivnim metabolitima dušika pokreću i pojačavaju mehanizme programirane smrti stanica poput apoptoze i nekroze (Chatterjee i sur., 2011).

Iako se čini da poremećaj ravnoteže proteina mitohondrija zaista ima važnu ulogu u mnogim neurodegenerativnim poremećajima, posebno onima koji se javljaju kasnije u životu, još uvijek se vode oštre debate za i protiv uloge slobodnih radikala u biološkom starenju (Alexeyev, 2009; Perez i sur., 2009; Hekimi i Lapointe, 2010; Douglas i Dillin, 2010; Ristow i Schmeisser, 2011; Kitazoe i sur., 2011; Przedborski i Schon, 2011). A javljaju se i suprotne teorije, da oksidativni stres zapravo potiče dugovječnost: rezultati studije iz 2007. pokazali su da oksidativni stres kod crva oblića, *C. elegans*, inducira sekundarni odgovor na povišenu razinu ROS-a, tzv. mitohormezu odnosno mitohondrijsku hormezu, koja dovodi do produljenog životnog vijeka (Schulz i sur., 2007). Hormeza (lat. *Hormezis*) se odnosi na fenomen prilikom kojeg inače štetan agens, npr. zračenje ili kemijske tvari, primijenjen u niskom intenzitetu ili koncentraciji, mijenja svoju ulogu i postaje koristan. Epidemiološka meta-analiza potvrdila je mitohormezu i u ljudi, a autori su čak izložili ideju da pokušaj snižavanja razine ROS-a pojačanim uzimanjem antioksidansa hranom, umjesto prevencije, vodi ka većoj prevalenciji bolesti (Bjelakovic i sur., 2007; Ristow i Schmeisser, 2011).

**Teoriju da se genska nestabilnost povećava s dobi**, odnosno, da oštećenja molekule DNK vode ka starenju predložio je Alexander (1967). Zaista, više oštećenih molekula DNK ima u stanicama starih nego u stanicama mladih donora (Hamilton i sur., 2001), a oštećenja mogu nastati spontano kao i egzogeno (Lindahl, 1993; Finette i sur., 1994). U svakoj stanici postoje brojni mehanizmi popravka oštećene DNK, međutim smatra se da starenjem dolazi do promjena u tim mehanizmima (Engels i sur., 2007), a akumuliranje oštećenja direktno ili indirektno inducira starenje (Best, 2009). Postojanje progerijskih sindroma koje uzrokuju mutacije u genima za proteine uključene u popravak DNK, kao i otkriće da je neadekvatan popravak oštećenja DNK otkriven kod osoba s kognitivnim oštećenjima kao i s Alzheimerovom bolesti, podupire ovu teoriju (Bohr i sur., 2005; Weissman i sur., 2007).

**Teorija nakupljanja „smeća“ u stanicama** (Hirsh, 1978) predlaže da se, kako starimo, u našim stanicama nakupljaju otpadni produkti nastali normalnim metaboličkim procesima u stanicama, te da taj toksičan „mulj“ ometa normalno funkcioniranje stanice. Ovu teoriju dovode u pitanje dugoživuće postmitotičke stanice, poput miocita i kortikalnih neurona, u kojima je

pronađeno puno više „otpada“ nego u kratkoživućih postmitotičkih stanica koje se brzo troše i nadomještavaju diferencijacijom matičnih stanica, poput stanica epitela crijeva i krvnih stanica.

#### **2.2.2.2. Teorije programiranog starenja**

**Skraćivanje telomera** odnosno stanično starenje također dovodi do nestabilnosti genoma. Fenomen staničnog starenja prvi je uočio već spomenuti Leonard Hayflick: u suprotnosti s dotad uvriježenom tvrdnjom o mogućnosti neograničenog broja dioba stanica u kulturi, ustvrdio je da se, bez obzira na idealne uvjete uzgoja, diferencirane stanice fibroblasta u kulturi mitotički dijele najviše 50-60 puta. Hayflick je opisao tri faze u životu staničnih kultura; primarnu kulturu je nazvao faza I, 10-mjesečnu fazu bujnog rasta i diobe stanica fazom II te period u kojem se mitotička aktivnost stanica smanjila i u konačnici prestala fazom III, ali nije mogao točno odrediti uzrok prestanka dijeljenja (Hayflick i Moorhead, 1961). Ipak, iznio je dvije, međusobno kontradiktorne, pretpostavke: prva je bila da možda stanične promjene povezane sa zaustavljenjem mitotičke diobe dovode do degenerativnih promjena koje su neizostavan dio starenja, a druga da je senescencija način na koji organizmi suprimiraju razvoj tumora *in vivo* (Campisi, 2011).

Ruski teoretičar biologije Alexei Olovnikov 1973. je godine zaključio da kromosomi ne mogu u potpunosti replicirati svoje krajeve te je, uzevši u obzir Hayflickovu i Moorheadovu ideju o ograničenoj mitotičkoj diobi, predložio ideju, kasnije potvrđenu, da se prilikom svake diobe gube krajevi kromosoma sve dok ne dođe do kritičnog stupnja kada se stanica više ne može dijeliti (Olovnikov, 1973; Wong i Collins, 2003). Strukturu telomera odnosno heksanukleotidni ponavljajući slijed koji se prilikom svake mitoze skraćuje otkrila je 1978. godine Elizabeth Blackburn proučavajući jednostaničnu protozou *Tetrahymena*, a Nobelovu je nagradu podijelila s Carol Greiger za otkriće i izolaciju enzima telomeraze koji može te iste telomere ponovo produljiti (Blackburn i Gall, 1978; Greider i Blackburn, 1985). Dodatkom telomeraze i humane je stanice u kulturi moguće učiniti praktički besmrtnima (Bodnar i sur., 1998).

Duljina telomera stanica kože (Lindsey i sur., 1991) i bijelih krvnih stanica ljudi (Slagboom i sur., 1994) obrnuto je proporcionalna dobi ispitanika, a osobe s kraćim telomerama imaju i veći rizik obolijevanja od dobno-vezanih bolesti (Shay i Woodring, 2008). Osim toga, rezultati danske studije blizanaca sugeriraju da skraćena duljina telomera



leukocita predviđa ranu smrt (Kimura i sur., 2008), a rezultati studije provedene u populaciji Amiša pokazali su da se duljina telomera nasljeđuje prema ocu, moguće preko mehanizma „utiskivanja“ (engl. *imprinting*), te da je povezana s duljinom trajanja života oca (Njajou i sur., 2007). 2010. godine Judy Campisi i suradnici objavili su mnoštvo teoretskih i pokusom potvrđenih dokaza kako ograničeni životni vijek humanih stanica ima funkciju supresije tumora, ali i da akumulirane senescentne stanice *in vivo* istovremenim lučenjem velike količine citokina, mioгена i enzima koji mijenjaju vanstanični matriks, aktivno potiču starenje okolnih stanica i tkiva, pa čak i tumorigenezu (Coppe i sur., 2010; Campisi, 2011).

Unatoč mitotički programiranom skraćivanju telomera, otkriveno je da i stohastički događaji poput izloženosti stresu kod odraslih, ali i intrauterino, značajno utječu na razlike u duljini telomera leukocita, krvnih stanica čija je dioba među učestalijima u ljudskom tijelu (Entringer i sur., 2011). Danas je poznato da stanice koje se zbog izrazito skraćenih telomera više ne mogu dijeliti ulaze u programiranu staničnu smrt, apoptozu. Apoptoza je evolucijski star mehanizam uklanjanja neželjenih stanica iz organizma: sama stanica aktivno, uz utrošak energije i sintezu ciljanih proteina koji uništavaju esencijalne strukturne komponente i dovode do specifičnih promjena poput kondenzacije kromatina, pucanja DNK, pupanja dijelova membrane i formiranja apoptotskih tjelešaca, pokreće vlastitu smrt, da bi konačno fragmentirana apoptotska tjelešca fagocitozom “tiho” nestala iz organizma ne izazivajući upalu (Alberts i sur., 2008). Javlja se kao sastavni dio fizioloških procesa: npr., do razdvajanja prstiju na rukama i nogama tijekom embrionalnog razvoja čovjeka dolazi zahvaljujući apoptozi stanica koje se nalaze između, a apoptoza je i obrambeni mehanizam kada stanice zbog oštećenja nastalih bolešću ili toksičim agensima postanu opasne i/ili nekorisne za organizam (Elmore, 2007).

**Neuroendokrinološka teorija starenja** tumači da do starenja dolazi zbog promjena u hipotalamo-hipofizno-adrenalnoj osovini (HPA), koju čine kompleksne hormonalne interakcije hipotalamusa, hipofize i nadbubrežne žlijezde, a koja s dobi mijenja prag osjetljivosti (Finch, 2007). Konačni produkt ovog signalnog puta je glukokortikoid kortizol, glavni regulator tjelesnog odgovora na svaki oblik stresa, međutim trajno povišena koncentracija kortizola uzrokuje fiziološke promjene u regulaciji metabolizma, krvnog tlaka, upalnih reakcija i imunološkog odgovora. Već je dugo poznato da kortizol može uzrokovati inzulinsku rezistenciju (Rizza i sur., 1982), koja vodi ka pojavi brojnih dobno-vezanih kroničnih bolesti poput dijabetesa tip 2, hipertenzije, dislipidemije, koronarne bolesti srca i sl.

(Reaven, 1988). I upravo je inzulin/inzulinski faktor rasta-1/hormon rasta (inzulin/IGF-1/GH) signalni put, o kojem ću detaljnije nešto kasnije, u brojnih modelnih organizama kao i kod ljudi prepoznat kao jedan od glavnih kandidatskih puteva za dugovječnost.

Prvotna **Imunološka teorija starenja** (Walford, 1964) temeljila se na pretpostavci da je starenje uzrokovano smanjenom sposobnošću razlikovanja vlastitih od tuđih antigena, koja posljedično dovodi do nastanka antitijela na vlastite antigene. Suvremene teze, koje bi se bolje mogle opisati kao **neuroendokrino-imunološka teorija starenja**, fokusirane su na ulogu imunološkog sustava i njegovo međudjelovanje s neuroendokrinološkim u procesu starenja (Franceschi i sur., 2000).

### **2.2.3. Geni i metabolički signalni putevi koji utječu na starenje**

Unatoč očitim razlikama u npr. brzini starenja kod različitih vrsta, do unazad posljednjih nekoliko desetljeća nije se smatralo da je starenje rezultat aktivne regulacije. Danas znamo da regulacija klasičnih signalnih puteva poput inzulin/IGF-1 signalnog puta, mTOR i AMPK signalnih puteva, djeluje kao „okidač“ na mnoštvo mehanizama koji produljuju životni vijek. Činjenica da slične intervencije kod evolucijski divergiranih vrsta nekih od najčešćih modelnih organizama produljuju životni vijek sugerira da je starenje evolucijski konzerviran proces (Powers i sur., 2006). Modelni organizmi koji se najčešće koriste u studijama dugovječnosti su pivski kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, crv oblič *Caenorhabditis elegans*, vinska mušica *Drosophila melanogaster* i kućni miš *Mus musculus*. Ovi organizmi imaju brojne prednosti temeljem kojih su odabrani za studije starenja; relativno kratak životni vijek, dobro poznatu biologiju i potpuno sekvencirani genom, što je omogućilo brz napredak u otkriću staničnih puteva koji su podloga za dugovječnost. Također, populacijom genski uniformnih organizama lako se može genetički manipulirati, naprimjer, u testiranju životinja kod kojih je izvršen *knock-out* nekog gena ili pak inducirana pretjerana ekspresija, lakše je utvrditi posljedicu takve intervencije, a i životinje je lako držati u identičnom, kontroliranom okolišu. Ljudski geni homologni genima dugovječnosti identificiranim u modelnim organizmima predstavljaju relevantne kandidatske gene za studije dugovječnosti u ljudi.

### 2.2.3.1. Inzulin/IGF-1/FOXO signalni put

Prvi signalni put za kojeg je utvrđeno da produljuje životni vijek bio je već spomenuti inzulin/IGF-1 metabolički signalni put, evolucijski visoko konzerviran: za mutacije mnogih gena uključenih u ovaj signalni put potvrđena je povezanost s trajanjem života sisavaca, od kojih neki, poput varijante polimorfizma jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) gena *FOXO3a*, utječu i na dugovječnost u ljudi (Flachsbart i sur., 2009; Kenyon, 2011). Ovo i neka druga zanimljiva otkrića pronađeni su prilikom genetskih istraživanja crva oblića, *C. elegans*, koji je zbog relativno malog genoma ( $9,7 \times 10^7$  parova baza), visoke homologije s ljudskim genima (35% gena crva ima ljudske homologe) te laganog uzgoja i kratkog životnog vijeka (2-3 tjedna), jedan od danas najčešćih modelnih organizama za istraživanje starenja.

Kasnih 1970-ih je Michael Klass, nakon što je utvrdio da *Caenorhabditis elegans* izložen dijetarnoj restrikciji živi dulje i daje manje potomaka, kao i da dulje živi na nižoj nego na višoj temperaturi, krenuo u potragu za genima koji utječu na starenje (Klass, 1977). Iako je uspio izolirati dugoživuće crve, nije uspio odrediti gene odgovorne za dugovječnost te je zaključio da su „specifični geni koji produljuju životni vijek izuzetno rijetki ili je možda dugovječnost poligenско svojstvo“ (Klass, 1983). Johnson i Friedman uspjeli su mapirati prvi gen dugovječnosti, *age-1*, za kojeg su utvrdili da ovisno o nižoj ili višoj sobnoj temperaturi produljuje životni vijek crva za 40% odnosno 65% (Friedman i Johnson, 1988). Cynthia Kenyon je pronašla mutante u još dva gena, *daf-2* i *daf-16*, za koje je utvrdila da sudjeluju u istom signalnom putu kao i *age-1* te da pozitivno utječu na produljenje životnog vijeka (Kenyon i sur., 1993).

*age-1* gen je kloniran 1996. godine: utvrđeno je da kodira katalitičku podjedinicu proteina fosfatidil inozitol-3 kinaze (PI3-kinaza) (Morris i sur., 1996). Već iduće godine, isti je laboratorij odredio sekvencu gena *daf-2* te su predložili da se možda radi o homologu inzulinskih i IGF-1 receptora kod ljudi (Kimura i sur., 1997). Iako se tada već znalo da inzulin/IGF-1 signalni put aktivira, uz ostale puteve, i PI3-kinazne puteve, nitko nije imao ideju kako bi točno oni mogli utjecati na dugovječnost, a skeptičnost je izazivao i podatak da disfunkcionalnost ovih metaboličkih puteva dovodi do dijabetesa (Kenyon, 2011). Kloniranje *daf-16* gena koje je uslijedilo nedugo nakon razriješilo je misteriju: ovaj gen kodira DAF-16 protein, transkripcijski faktor obitelji „glave viljuške“ (engl. *forkhead-family*, FOXO), što ga zaista povezuje sa djelovanjem inzulinskog i IGF-1 signalnog puta (IIS) u sisavaca.

Fosforilirani DAF-16 protein je neaktivan, no kod *age-1* i/ili *daf-2* mutanata, kao i kod crva kod kojih je na neki drugi način reducirana aktivnost IIS puta, DAF-16 se ne fosforilira čime mu je omogućen ulazak u jezgru gdje pokreće transkripcijski program koji produljuje životni vijek crva (Lin i sur., 1997; Ogg i sur., 1997; Lee i sur., 2001; Murphy i sur., 2003; Kaletsky i Murphy, 2010).

Od tada do danas, istraživanja uloge IIS signalnog puta u starenju postala su predmetom interesa brojnih istraživača diljem svijeta. Danas se smatra da inzulin/IGF-1 signaliranje produljuje životni vijek barem dijelom time što u uvjetima koje prepoznaje kao stresne organizmu odašilje ‘signal opasnosti’ i usmjerava fiziološke reakcije ka umanjivanju stresa odnosno zaštiti i održavanju strukture i funkcije stanice (Kaletsky i Murphy, 2010). Ono što je posebno zanimljivo je otkriće da IIS ovisi i o nutijentima odnosno da pri kalorijskoj restrikciji, o kojoj će biti govora nešto kasnije, također dolazi do smanjenja aktivnosti ovog signalnog puta, što dovodi do produljenja životnog vijeka (Powers i sur., 2006).

Osim kod crva, pokazalo se da mutacije koje smanjuju aktivnost ovog metaboličkog putu utječu i na dugovječnost vinskih mušica i patuljastih miševa, pri čemu su posljednji osobito interesantni jer pokazuju spolne razlike i upućuju na složenost organizama sisavaca: mutacija u *Igf1r* genu, ali samo kod ženki miša, produljuje životni vijek, dok kod mužjaka *knock-out Insr* gena skraćuje životni vijek, no ukoliko je *Insr* gen ”izbačen“ samo u adipoznom tkivu, miševi imaju produljen životni vijek (Clancy i sur., 2001; Tatar i sur., 2001; Holzenberger i sur., 2003; Okamoto i Accili, 2003; Bluher i sur., 2003; Bartke i Brown-Borg, 2004). Kod ljudi su učestale mutacije gena za IGF-1 receptor pronađene kod stogodišnjih Aškenazi Židova (Suh i sur., 2008), a različite varijante *FOXO* gena kod osoba s iznimnom dugovječnosti: Havajaca japanskog porijekla, kao i Nijemaca, Talijana, Engleza i Kineza (Kenyon, 2011). Pokazalo se da i neki drugi transkripcijski faktori poput „heat-shock” faktora HSF-1, faktora ksenobiotičkog odgovora SKN-1/NRF i X-box vezujućeg proteina XBP-1 pridonose dugovječnosti *daf-2* mutanata. I za druge je signalne puteve, uključene u metabolizam hrane, regulaciju stresa i potrošnju energije, a od kojih se mnogi isprepliću s inzulin/IGF-1 putem, dokazano da utječu na starenje u crva i viših životinja, no na prvom je mjestu TOR signalni put.

### 2.2.3.2. „Target of rapamycin“ (TOR) signalni put

Signalni put mTOR otkriven je 1994. godine, nedugo nakon što su u stanicama kvasca *S. cerevisiae* detektirani geni *TOR1* i *TOR2*, čije mutante su se pokazale rezistentnima na rapamicin (Hay i Sonenberg, 2004). Inače, kvasac je najčešći model za izučavanje starenja kod višestaničnih eukariota stoga što istovremeno omogućava promatranje dva tipa starenja: 1) replikativno starenje, koje se definira kroz broj staničnih dioba mitotički aktivnog tkiva (engl. *replicative life span*, RLS), te 2) kronološko starenje, definirano kao razdoblje kroz koje post-mitotička tkiva ostaju vijabilna (engl. *chronological life span*, CLS) (Powers i sur., 2006).

Rapamicin, neantibiotski makrolid kojeg proizvodi mikroorganizam *Streptomyces hygroscopicus*, slučajno je izoliran 1975. godine iz uzorka zemlje porijeklom s Uskršnjeg otoka. Ubrzo nakon otkrića, pokazalo se da ima antifungicidne, imunosupresivne, a i antiproliferativne karakteristike te je počela njegova klinička primjena. Princip djelovanja rapamicina u eukariota je da se veže uz unutarstanični receptorski protein, FKBP12, prisutan u svakoj stanici, nakon čega kompleks rapamicin-FKBP12 veže evolucijski konzervirane TOR (kratica od engl. *target of rapamycine* = cilj/meta za rapamicin) proteine i inhibira njihovo daljnje djelovanje (Hay i Sonenberg, 2004). Molekula mTOR (m je oznaka za engl. *mammalian*) je serin/treonin protein kinaza koja pripada proteinskoj obitelji fosfatidil-inozitol-3 kinaza (PI3K) povezanim kinazama (PIKKs) i središnji je element u signalnom putu uključenom u regulaciju staničnog rasta i proliferacije putem sinteze proteina (Wullschleger i sur., 2006).

2006. godine je otkriveno da rapamicin preko inhibicije mTOR signalnog puta produljuje kronološko starenje kvasca (Powers i sur., 2006). Osim tretiranjem rapamicinom, inhibicija aktivnosti TOR signalnog puta kod kvasaca se može inducirati i delecijom u *TOR1* genu, pri čemu se produljuje i RLS i CLS kvasca (Kaeberlein i Kennedy, 2011). Osim kod kvasca, smanjena aktivnost TOR puta produljuje životni vijek i kod crva oblića, voćne mušice i miša (Jia i sur., 2004; Kapahi i sur., 2004; Harrison i sur., 2009). Posebno su zanimljivi rezultati istraživanja djelovanja rapamicina na životni vijek miša; naime, do trenutka kad su članovi tri neovisna laboratorija uključena u to istraživanje razvili prikladan vektor za oralnu primjenu rapamicina, kohorta genetički heterogenih miševa na kojoj su ga planirali testirati već je bila stara 20 mjeseci, što je ekvivalent dobi od 60 godina kod ljudi. Ipak, unatoč starijoj dobi miševa odlučili su primijeniti vektor te otkrili značajan porast broja miševa koji žive

dulje od kontrole (ženke 14%, a mušjaci 9%), i produljenje najduljeg životnog vijeka u odnosu na kontrolne miševе (Harrison i sur., 2009). S obzirom da su glavni uzročnici smrti miševa tumori, posebno limfomi, a kako je poznato da rapamicin djeluje antiproliferativno, vjerojatno je do produljenja životnog vijeka došlo usporavanjem brzine rasta neoplazmi u miševa. Što se tiče ljudi, hiperaktivnost mTOR signalnog puta pronađena je u mozgu osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti (Li i sur., 2005; Chano i sur., 2007), a sve je više indicija da bi terapija rapamicinom i inhibiranje mTOR puta kalorijskom restrikcijom jednoga dana mogli pomoći u liječenju pretilosti, dijabetesa tip 2, hipertrofije srca, karcinoma i drugih degenerativnih bolesti (Rosner i sur., 2008; Stanfel i sur., 2009; Hasty, 2010).

### **2.2.3.3. Sirtuini**

Priča o sirtuinima počela je 1995. godine kada je laboratorij Leonarda Guarentea pronašao da neomorfna poludominantna mutacija *SIR4-42* produljuje životni vijek kvasca za 30% (Kennedy i sur., 1995). Isti je laboratorij uskoro otkrio da u osnovi postoje dva različita mehanizma koji odgađaju starenje: jedan je pod kontrolom proteinskog kompleksa Sir2/3/4, kodiranog istoimenim genima, a drugi je pod direktnim utjecajem *SIR2* gena, pri čemu jedino potonji ima homologe u sisavaca (Kennedy i sur., 1997; Kaeberlein i sur., 1999). Sirtuini su porodica nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) – ovisnih protein deacetilaza klase III i/ili ADP-riboziltransferaza koje upravljaju “utišavanjem” transkripcije određenih regija genoma kvasca (Imai i sur., 2000; Li i Kazgan, 2011). Linije kvasca s mutiranim *SIR2* genom imaju gotovo 50% skraćen životni vijek, dok pojačana ekspresija poput one u divljim linijama (engl. *wild-type*) kvasca u koje je ugrađena još jedna kopija ovog gena, produljuje životni vijek gotovo 30% (Kaeberlein i sur., 1999). Ortolozi *SIR2* gena koji usporavaju starenje pronađeni su u brojnim organizmima, a sedam sirtuina, SIRT1-SIRT7, pronađeno je i kod ljudi (Tissembaum i Guarente, 2001; Rogina i Helfand, 2004; Viswanathan i sur., 2005). Izuzetno zanimljivim se pokazao SIRT1 jezgreni protein, produkt istoimenog gena, koji je uključen u mnoge centralne metaboličke puteve, jer je utvrđeno da njegova genski ili farmakološki potaknuta aktivacija ublažava brojne metaboličke bolesti u raznim mišjim modelima, posebno dijabetesu, a povezan je i sa kalorijskom restrikcijom (Guarente, 2011).

Kod kvasca se pokazalo da produljenje života pomoću kalorijske restrikcije, osim o Sir2 proteinu, ovisi i o unutarstaničnoj koncentraciji oksidiranog NAD-a (Lin i sur., 2000). NAD u stanici dolazi i u oksidiranom i u reduciranom obliku, no enzimatsku aktivnost sirtuina pojačava samo oksidirani NAD, čija koncentracija se pak povećava prilikom

kalorijske restrikcije (Lin i sur., 2002; Anderson i sur., 2003). S obzirom na ovo otkriće, ispitivana je uloga i drugih molekula za koje se pretpostavljalo da bi mogle aktivirati sirtuine, pri čemu se kao najpotentniji aktivator pokazao resveratrol, 3,5,4`-trihidroksistiliben, polifenol biljnog porijekla koji se nalazi u vinu. Tako je, npr., kod istraživanih sredovječnih pretilih miševa na visokokalorijskoj dijeti uvođenjem resveratrola u prehranu došlo do poboljšanja zdravstvenog stanja i produljenja životnog vijeka u odnosu na kontrolne miševe (Baur i sur., 2006). U nekim pak drugim studijama pokazalo se da resveratrol niti potiče pojačanu ekspresiju *SIRT1* gena, niti da utječe na dugovječnost genetički heterogenih miševa testiranih na dvije doze resveratrola u tri neovisna laboratorija (Pacholec i sur., 2010; Miller i sur., 2011). SIRT3 protein je također zanimljiv – čini se da suprimira ROS u mitohondrijima, a neke studije kod ljudi su pokazale da su polimorfizmi promotora *SIRT3* gena povezani s izuzetnom dugovječnošću u populaciji Italije (Rose i sur., 2003; Bellizzi i sur., 2007).

2011. godine u časopisu Nature objavljeni su rezultati studije provedene u 3 neovisna laboratorija u kojoj je ponovljeno ispitivanje utjecaja pojačane ekspresije SIR2 proteina na dugovječnost crva *C. elegans* i *Drosophile*. Ova grupa znanstvenika je, povratnim križanjem dugoživućeg soja *C. elegans* sa divljim tipom, poništila razlike u trajanju života crva unatoč tome što su se sirtuini i dalje pojačano ekspimirali. U dugoživućim linijama je pronađena i Dyf mutacija, čiji nosioci često dulje žive, no kada su dizajnirani sojevi bez Dyf mutacije, duljina života tih crva je ostala ista kao i kod divljeg tipa unatoč pojačanoj ekspresiji sirtuina. Testiranja provedena na transgenom soju voćne mušice koji je korišten u originalnim eksperimentima (Rogina i Helfand, 2004), kod kojeg je pomoću određenog genskog “prekidača” pojačana ekspresija sirtuina što je povezano s produljenjem života, pokazala su da produženi životni vijek *Drosophile* nije posljedica pojačane ekspresije sirtuina, nego genskih efekata vezanih uz transgen (Burnett i sur., 2011). Usprkos kontradiktornim rezultatima, još uvijek se istražuje uloga sirtuina u produljenju životnog vijeka, kao i “zdravom” starenju (engl. *healthspan*) (Naiman i sur., 2012; Maxwell i sur., 2012).

#### 2.2.3.4. Progerije

Osim gena uključenih u metaboličke puteve, na proces starenja utječu i pojedinačni geni bitni za održavanje i popravak DNK. Bolesti preuranjenog starenja (progerije) važan su pokazatelj mutacija jednog gena koje dovode do ubrzanog i prijevremenog starenja i posljedično ranog umiranja u ljudi. 1886. godine Jonathan Hutchinson je prezentirao slučaj dječaka dobi 6 godina koji je izgledao kao starac. Isti sindrom neovisno je predstavio Hastings Gilford, te je bolest njima u čast nazvana Hutchinson-Gilfordov progerijski sindrom (HGPS). Osobe koje HGPS pogađa po rođenju i u dojenačkoj dobi izgledaju i razvijaju se normalno, međutim, već nakon dobi od 18-24 mjeseci, usporava im se rast i javljaju se prvi znakovi ubrzanog starenja. Počinje s gubitkom kose, stanjivanjem kože lica i usnica, izrazitim boranjem kože prošarane staračkim pjegama kao i gubitkom potkožne masti i mišićne mase, da bi se nešto kasnije javili i oslabljeni vid, osteoporoza, otkazivanje rada bubrega te ubrzana ateroskleroza karotidnih i koronarnih arterija. Smrtnost oboljelih je vrlo rana, već tijekom prvog ili drugog desetljeća života, a do danas je opisano preko 130 sličnih slučajeva. Smatralo se da do ove bolesti dolazi zbog promjena u aktivnosti hipofize (Thomson i Forfar, 1950).

Uzročnik HGPS-a otkriven je 2003. godine: točkasta stop mutacija gena LMNA koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 1, 1q21.1-1q21.3, a prenosi dominantno (Eriksson i sur., 2003). Protein lamin A, kojeg taj gen kodira, određuje strukturu jezgrine ovojnice i bitan je za održavanje stabilnosti jezgre i sintezu DNA i RNA, a 50 aminokiselina kraći protein progerin, koji nastaje translacijom skraćenog mRNA transkripta mutiranog *LMNA* gena, destabilizira jezgrinu ovojnicu i progresivno oštećuje jezgru (Kudlow i sur., 2007). No, čini se da progerin ima ulogu i u „normalnom“ starenju: otkriveno je da se progerin tijekom starenja nakuplja u tkivima zdravih ljudi, a i da, u kombinaciji s disfunkcionalnim telomerama, sudjeluje u iniciranju staničnog starenja u zdravim ljudskim fibroblastima (Cao i sur., 2011).

Osim Hutchinson-Gilfordovog progerijskog sindroma, u progerije spadaju i Wernerov sindrom, Downov sindrom, Cockayneov sindrom i Ataksija telangiektazija, a svim ovim sindromima je zajedničko da uzrokuju preuranjenu pojavu karakteristika koje se inače povezuju s podmaklom životnom dobi. Ono što je posebno zanimljivo je da osobe s različitim progerijama razvijaju i različite bolesti povezane sa starenjem; npr. oboljeli od HGPS-a ne razvijaju tumore, katarakte ili senilnost, dok oboljeli od Wernerovog sindroma obično umiru od infarkta miokarda ili karcinoma.



### 2.2.3.5. Ostali geni

Osim gena dugovječnosti pronađenih u modelnim organizmima, osnove biologije starenja ljudi upućuju nas i na postojanje nekih drugih gena koji utječu na životni vijek. Kako je poznato da npr. osobe koje se dobro nose sa stresom i koje su kognitivno zdrave žive zdravije i dugovječnije, a većinu stresora prvo opaža središnji živčani sustav (CNS) dok odgovor na stres koordinira mozak, geni koji su uključeni u CNS i periferne odgovore na stres također bi mogli imati važnu ulogu u određivanju trajanja životnog vijeka (Mattson i sur., 2002). Predloženo je i da se istraži uloga genskih varijanti povezanih s učinkovitom obranom organizma od različitih zaraznih bolesti - prepoznavanjem i odstranjivanjem patogena iz tijela - te s upalnim procesima (Vasto i sur., 2007). Iako glavnina istraživanja uključuje gene jezgrene DNK, identificirana je i uloga nekih gena mtDNK u dugovječnosti. Tako je utvrđeno da polimorfizam I7T mtDNK gena *CYTB*, koji kodira citokrom b protein, kod osoba podvrgnutih kalorijskoj restrikciji i koje imaju mitohondrijsku haplogrupu H, produljuje životni vijek (Beckstead i sur., 2009).

Osim navedenog, istraživanja se mogu usmjeriti i prema polimorfnim lokusima koji predstavljaju rizik obolijevanja od kroničnih bolesti koje nose znatan dio dobnovezane mortaliteta (Drenos i Kirkwood, 2010). Naime, najčešće kronične bolesti današnjice mogu se smatrati dijelom procesa starenja jer u njihovoj patofiziologiji dominiraju degenerativni procesi te osjetljivost ili otpornost na njihov nastanak ima snažan utjecaj na duljinu života. Među najvažnije ubrajamo kardiovaskularne bolesti (KVB), koje su glavni uzrok pobola i smrtnosti u svijetu, kao i bolesti koštano-mišićnog sustava, neurodegenerativne bolesti te karcinome. Uglavnom, postoji velik broj kandidatskih gena za dugovječnost koji tek čekaju da ih se testira ili potvrdi u ljudskim populacijama, a razumijevanje uloge specifičnih genetskih čimbenika u varijabilnosti trajanja životnog vijeka, ključno je za razumijevanje procesa starenja i dugovječnosti.

#### 2.2.4. Kalorijska restrikcija (KR)

Pokusi u kojima se proučavao učinak restriktivne prehrane na životinjama počeli su početkom 20. stoljeća (Osborne i sur., 1917; Sherman i Campbell, 1928, 1935). Ovo i slična istraživanja bavila su se problematikom tog razdoblja koje je na svjetskoj razini bilo obilježeno ratovima i nestašicom hrane, te su primarno bila fokusirana na proučavanje utjecaja pothranjenosti na usporavanje rasta i razvoja i kasnog spolnog sazrijevanja. Prekretnica je bio rad McCaya i suradnika u kojem je prvi puta pokazano da smanjeni unos hrane, ali koji isključuje pothranjenost, odnosno kalorijska restrikcija (engl. *calorie restriction*, CR), usporava rast te produljuje prosječan i maksimalan životni vijek štakora u odnosu na kontrolu kojoj je na raspolaganju bilo neograničeno mnogo hrane (McCay i sur., 1935).

Umjesto izraza "kalorijska restrikcija" danas se predlaže korištenje izraza "dijetalna restrikcija" jer se pokazalo da ne utječu sve komponente prehrane jednako na zdravlje i dugovječnost: tako, primjerice, ograničenje unosa samo metionina dovodi do poboljšanja zdravstvenog stanja i produljenja života testiranih miševa (Miller i sur., 2005; Masoro, 2009). Osim samog unosa hrane, bitan je i vremenski razmak između obroka: kod miševa na intermitentnoj prehrani (engl. *intermittent fasting*, IF), koja podrazumijeva gladovanje svaki drugi dan, utvrđene su metaboličke promjene slične onima koje pokazuju miševi na svakodnevnoj KR (Anson i sur., 2003; Mattson i sur., 2003).

Unatoč tome što neki evolucijski biolozi smatraju da KR, osim redukcijom pretilosti, ne utječe na produljenje životnog vijeka ljudi, u velikom broju životinjskih vrsta, od kvasaca do sisavaca, zabilježeno je produljenje života (Le Bourg, 2010; Everitt i sur., 2010; Fontana i sur., 2010). Kao izuzetno dobar model za određivanje utjecaja KR na duljinu i kvalitetu života sisavaca koriste se glodavci. Redukcija dnevnog unosa kalorija od 30% do 60%, ukoliko je započeta rano u životu, dovodi do proporcionalnog produljenja maksimalnog životnog vijeka glodavaca za 30% do 60%, no nema učinka ako se počne primjenjivati nakon 550.-og dana starosti (Masoro, 2005). Osim produljenja života, ovi glodavci imaju promijenjene i neke fiziološke osobine (niža im je tjelesna temperatura), fenotipski su manji i rjeđe obolijevaju od dobno-vezanih bolesti. Usporeno starenje zabilježeno u svim organskim sustavima glodavaca podvrgnutim KR sugerira da starenje ima multifaktorsku podlogu (McDonald i Ramsey, 2010). Ipak, tek je nedavno započelo sistematsko istraživanje koje uključuje različite čiste linije miševa kojima je smanjen unos energije za 40% i do sada su zabilježena produljenja, ali

i, neočekivano, skraćanja životnog vijeka različitih linija, s time da dulje žive oni koji bolje zadržavaju adipozno tkivo (Liao i sur., 2010; Nelson i sur., 2011).

Studije KR na primatima, od kojih su većina *Rhesus* majmuni, provode se već preko dva desetljeća na tri lokacije; National Institute of Aging (NIA), Maryland, University of Maryland i University of Wisconsin. Medijan životnog vijeka *Rhesus* majmuna iznosi 26 godina, a najdulji životni vijek u zatočeništvu iznosio je 40 godina (Colman i Anderson, 2011). Dakle, iako podaci o najduljem životnom vijeku nakon 20 godina studije još nisu mogli biti poznati, neinvazivne metode poput biokemijskih analiza krvi, određivanje sastava tijela, tolerancije na glukozu i sl. pokazale su odgodu starenja sličnu onoj u glodavaca (Mattison i sur., 2007). Skupina sa University of Wisconsin objavila je da u trenutku kad je 50% majmuna hranjenih *ad libidum* bilo živo, isto je vrijedilo za čak 80% majmuna na KR, koji su i fenotipski izgledali mlađe (Colman i sur., 2009). Osim samog produljenja životnog vijeka, pokazalo se da kalorijska restrikcija ublažava dobno-vezane bolesti poput dijabetesa, KVB, pojave tumora i demencije (Fontana i sur., 2010; Trepanowski i sur., 2011). Ipak, nedavno je objavljeno da režim kalorijske restrikcije, implementiran *Rhesus* majmunima dobi 1-17 godina u istraživačkom centru NIA u Marylandu kroz 25-godišnje razdoblje, nije pozitivno utjecao na produljenje životnog vijeka tih majmuna, već da su za dugovječnost bitniji genetička podloga te uzgoj životinja i sastav hrane (Mattison i sur., 2012). Inače, za razliku od glodavaca koji toleriraju veći raspon restrikcije unosa energije hranom, najveća KR u majmuna može iznositi 30% - ne mogu preživjeti ukoliko im se unos hrane smanji 40%.

Unatoč limitiranom broju znanstvenih rezultata o učinku KR na ljude (Rochon i sur., 2011), sve više osoba prakticira kalorijsku restrikciju. Međunarodno udruženje *Caloric Restriction Society International*, koje broji preko 7000 članova, potiče ljude da unose 25% manje kalorija no što je preporučljivo kako bi živjeli zdravije i dulje, a bitno je da konzumirana hrana bude bogata hranjivim tvarima (Caloric Restriction Society International, 2012). Također, može se birati između nekoliko metoda „dijetalne terapije“ kako bi se postigla dugovječnost: (1) svakodnevna KR; (2) intermitentna KR (gladovanje svaki drugi dan); (3) stvaranje energetskog deficita kombinacijom smanjenog unosa kalorija i pojačane potrošnje energije tjelesnom aktivnošću.

Iako još uvijek nije definitivno potvrđen mehanizam djelovanja kalorijske restrikcije, većina istraživača su pobornici dviju ideja: (1) KR kroz smanjeni unos hranjivih tvari mijenja energetiku stanice što pozitivno utječe na dugovječnost (McDonald i Ramsey, 2010); ili da (2)

KR, kao stresor niskog intenziteta, aktivira neuroendokrini odgovor preživljenja u organizmu koji neutralizira štetne čimbenike (Masoro, 2007). Naime, u plazmi miševa i štakora na KR utvrđeno je povećanje koncentracije slobodnih kortikosteroida, koji imaju značajan protuupalni, antialergijski i antitumorski učinak (Klebanov i sur., 1995). Na staničnoj i molekularnoj razini KR može inducirati pojačanu ekspresiju gena koji stanice štite od štetnih agenasa (Heydari i sur., 1993). Pronađeno je i da KR pojačava autofagiju i mehanizme endogene enzimske i neenzimske antioksidativne zaštite (Cho i sur., 2003; Cuervo i sur., 2005). Kao što je već napomenuto prije, KR također suprimira mTOR signalni put i smatra se da ova inhibicija ima fundamentalnu ulogu u pozitivnim efektima KR, uključujući odgodu starenja i neurodegeneracije (Stanfel i sur., 2009).

### **2.3. Genetičke studije dugovječnosti u ljudi**

S obzirom na razlike u brzini i „tipu“ starenja (zdravo vs. bolesno), kao i duljini životnog vijeka čak i kod osoba koje dijele isti okoliš, postavlja se pitanje koliko i koji točno geni utječu na životni vijek? Temeljem dosadašnjih istraživanja doprinos nasljedne komponente duljini životnog vijeka procijenjen je na 25-32% (Herskind i sur., 1996; Hjelmborg i sur., 2006; Christensen i sur., 2006). Varijacije u rasponu mogućeg utjecaja genotipa na fenotip starenja razumljive su stoga što se istraživanja provode primjenom različitih metoda: istražuju se razni tipovi genskih varijacija, različiti metabolički procesi u kojima sudjeluju enzimi na koje varijacije utječu, razlike u utjecaju okoliša (vanjskog i unutarnjeg) kao ni trajanje tog utjecaja ne mogu se uvijek kontrolirati, a često niti ustanoviti, i stoga se, u biti, u istraživanjima primijenjuju različiti pristupi.

### 2.3.1. Varijacije u ljudskom genomu

Ljudski genom sastoji se od otprilike  $3 \times 10^9$  parova baza raspoređenih u 23 para kromosoma: unatoč brojnosti nukleotida, dvije slučajno odabrane osobe dijele čak 99,9% genoma, dok sa najbližim primatima, čimpanzama i bonobo majmunima, dijelimo čak 98,7% genoma (Prüfer i sur., 2012). Ovakav visoki stupanj sličnosti među ljudima objašnjava se time što smo se tek relativno nedavno odvojili od ostalih primata te što je tijekom većeg dijela svoje povijesti ljudska vrsta bila brojčano mala (Harpending i sur., 1998). Upravo nam znanje o evoluciji čovjeka i širenju ljudske vrste po modelu "Out-of-Africa" omogućuje istraživanje i identifikaciju genetskih varijacija koje su u podlozi fenotipa zajedničkog i ne-blisko srodnim osobama (McEvoy i sur., 2011).

Genetska raznolikost među najčešće je istraživanim obilježjima genoma, a varijacije se mogu javljati u većem ili manjem obimu, od velikih promjena ljudskog kariotipa do promjena u samo jednom nukleotidu. Ukratko, veće genetske varijacije poput promjena u strukturi kromosoma zbog rearanžmana ili translokacija, ne smatraju se bitnima pri istraživanju genske podloge kompleksnih poligenih svojstava poput dugovječnosti. S druge strane, kraće varijacije poput varijacija u broju kopija, varijacije u broju nasumičnih ponavljanja (engl. *variable number tandem repeat*, VNTR), insercije/delecije određenog bloka nukleotida i varijacije u polimorfizmu jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) se smatraju relevantnima za ovaj fenotip (Kidd i sur., 2008). Pojam „polimorfizam“ opisuje pojavu više od jednog alela na genskom lokusu, a u populaciji se mora javljati s učestalošću jednakom ili većom od 1%, dok sve alele s manjom učestalošću nazivamo rijetkim mutacijama (Harris, 1980). Populacijske razlike u učestalosti polimorfizama posljedica su djelovanja evolucijskih sila koje oblikuju genetičko nasljeđe i često se koriste kao metoda za identifikaciju osoba te kao biljezi u istraživanjima koja se provode u populacijskoj genetici i mapiranju gena. Naime, genski polimorfizmi nekog zadanog gena, za koje se zna da ne utječu direktno na funkcionalnost proteina kojeg kodira taj gen, mogu se nalaziti u neravnoteži vezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*, LD) s mogućim uzročnim polimorfizmom (engl. *causal variant*) te se mogu koristiti kao njegovi biljezi (Goldstein i Weale, 2001).

Neravnoteža vezanosti gena (LD) neslučajna je asocijacija alela na različitim lokusima. LD nastaje kao posljedica povijesnih mutacija, migracija, učinka uskog grla ili drugih populacijsko-genetičkih događaja (Lander i Schork, 1994). Kada mutacija odgovorna

za neko fenotipsko svojstvo prvi puta "uđe" u populaciju kroz "novo-mutiranog" pojedinca, ona je u LD-u sa čitavim genomom te osobe. Ukoliko se ta mutacija prenese u iduću generaciju, aleli na lokusima koji se nalaze neposredno uz lokus koji nosi mutaciju prenose se na potomke zajedno s mutacijom, dok se aleli dalje od mutiranog lokusa zamjenjuju rekombinacijom, čime se LD blok skraćuje (Page i Amos, 1999). Rekombinacijska stopa nije ravnomjerno raspoređena u genomu: postoje regije s ograničenom mogućnošću rekombinacije pa lokusi u ovim regijama pokazuju veći LD (Nachman, 2002). Načelo LD-a se lako može izučavati zahvaljujući HapMap konzorciju: u sklopu velikog internacionalnog projekta sakupljena je zbirka milijuna polimorfizama, prikupljenih i određenih u različitim ljudskim populacijama. Ovi podaci, koji se svakodnevno dopunjuju, javno su dostupni te znanstvenicima omogućuju brzu identifikaciju većine genetskih varijacija u promatranoj genomskoj regiji, a i pojednostavljaju usporedbu sličnih studija u istim ili različitim populacijama (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>).

### **2.3.1.1. Tipovi polimorfizama**

Mikrosatelitska DNK, nazvana i DNK kratkih uzastopnih ponavljanja (engl. *short tandem repeats*, STR), sastoji se od jednostavnih ponavljajućih slijedova nukleotida veličine najčešće 1-4 parova baza, koji se ponavljaju više puta, ali ukupna veličina ponavljajuće jedinice ne prelazi 100 parova baza. Ovi biljezi, koji se raspršeni po svim kromosomima javljaju svakih otprilike 10000 nukleotida, izuzetno su nestabilni i imaju visoku stopu mutacije. Minisatelitne ili VNTR (engl. *variable number of tandem repeats* – varijabilni broj nasumičnih ponavljanja) polimorfizme karakterizira ponavljanje nukleotidnih slijedova duljine 6 parova baza u telomerama, odnosno 9 do 64 parova baza u subtelomernim regijama unutar eukromatina, a nalaze se na svim kromosomima. Veličina minisatelitne jedinice je 0,1-20 kilobaza (kb) (Strachan i Read, 2011).

Najčešća vrsta genskoga polimorfizma koji se određuje u populacijskoj genetici je polimorfizam jedne baze, SNP (engl. *single nucleotide polymorphism*) pri čemu dolazi do supstitucije jednoga nukleotida na određenom lokusu unutar molekule DNK. Prednost SNP-ova je da su stabilniji od ostalih polimorfizama, a i relativno se brzo i jednostavno detektiraju (Strachan i Read, 2011). Prema rezultatima metode cjelogenomskog sekvenciranja (engl. *whole- ili full-genome sequencing*) provedene na uzorku od 179 osoba iz četiri različite populacije, SNP se javlja jednom u svakih 200-1000 nukleotida, odnosno ukupno je određeno

14,4 milijuna SNP-ova (Kidd i sur., 2008), no manje od 1% ih se nalazi u kodirajućim regijama.

Alu insercija je najistaknutiji član retrotranspozonske skupine kratkih ispremiješanih elemenata (engl. *short interspersed elements*, SINEs): javlja se prosječno češće nego jednom u svakih 3 kb, što znači da u genomu ima 1,1 milijun Alu jedinica (Bennett i sur., 2008). Dok ostale SINE elemente nalazimo u brojnim sisavcima, Alu jedinice možemo naći samo kod primata. Alu jedinica duga je oko 280 pb i sastoji se od dva nasumična, asimetrična ponavljanja, svako duljine od oko 120 pb, nakon kojih slijedi kratka  $A_n/T_n$  sekvenca (Strachan i Read, 2011).

S obzirom da se retrotranspozicija nekih Alu jedinica još uvijek odvija, one nisu fiksirane odnosno njihova insercija na određenim mjestima u genomu je polimorfna. To ih čini upotrebljivim biljezima pri analizama populacijske strukture, pri čemu se zna da je ancestralno stanje odsutnost Alu jedinice (Barbalić i sur., 2004).

### 2.3.2. Tipovi genetičkih studija

U traženju povezanosti između fenotipa i genotipskih varijacija, istraživači uglavnom primjenjuju asocijacijske studije, analize vezanosti gena (engl. *linkage analyses*, LA) i longitudinalne kohortne studije. U **analizama vezanosti gena**, geni za koje se smatra da određuju neki fenotip ili bolest traže se unutar veće skupine bliskih srodnika: najčešće se radi o više generacija neke obitelji poznatog rodoslovlja, u kojoj se istraživano svojstvo javlja češće nego li u općoj populaciji. Ukoliko se primjenom ove analize utvrdi da biljezi na odabranom lokusu prilikom mejoze segregiraju rjeđe nego što se očekuje za slučajne događaje odnosno u manje od 50% slučajeva, zaključuje se da nisu neovisni nego da se nasljeđuju "vezano" (Luo i Wu, 2001). Kod "vezanih" lokusa dalje se ispituje moguća povezanost biljega i regije koju "pokriva" sa fenotipom koji nas interesira, te eventualno možemo dobiti grubu lokaciju gena uzročnika fenotipa (Terwilliger i Weiss, 1998). Analize vezanosti gena pokazale su se uspješnima u određivanju gena-uzročnika monogenских bolesti poput Huntingtonove bolesti (Gusella i sur., 1983) i cistične fibroze (Kerem i sur., 1989), no zbog poteškoća s procjenom parametara potrebnih da bi neku obitelj mogli ocijeniti reprezentativnom i s prikupljanjem obiteljskog uzorka, rjeđe se koriste za ispitivanje genske podloge kompleksnih bolesti.

**Asocijacijske studije** se češće koriste pri istraživanju kompleksnih svojstava za koje se vjeruje da imaju poligenSKU podlogu. Funkcioniraju na principu istraživanja povezanosti polimorfniH varijanti kandidatskog gena poznate sekvence i položaja unutar genoma, s odabranim fenotipom u čije je fiziološke procese kandidatski gen uključen; npr., uspoređuju se učestalosti alela između dvije skupine osoba s time da se na početku istraživanja utvrdi da ispitivana skupina (engl. *cases*) posjeduje/pokazuje odabrani fenotip, a kontrolna skupina ga nema (engl. *case-control study*). Druga opcija je da se analizira asocijacija između odabranog alela i kontinuiranog fenotipa poput kognitivniH funkcija, krvnog tlaka, koncentracije biokemijskih biljega u serumu itd.

Ovakve studije su relativno brze i jeftine, no česta je zamjerka što su u njih uključeni samo geni za koje već unaprijed znamo da sudjeluju u fiziološkom mehanizmu te u rezultatima ne dobijamo podatke o drugim genima koji možda još značajnije utječu na istraživani fenotip. Zbirka HapMap konzorcija i razvoj tehnika cjelogenomskog genotipiziranja uveli su promjene u koncepciji genskih asocijacijskih studija: danas se provode cjelogenomske asocijacijske studije (engl. *genome-wide association study*, GWAS), pomoću kojih se traže asocijacije s fenotipom u čitavom genomu ispitanika, a ne samo u kandidatskom genu.

**Kohortne ili longitudinalne studije** (engl. *prospective cohort study*), uključuju skupinu ljudi (kohortu) koju se kontinuirano "prati", pregledava i prikupljaju se podaci u pravilnim vremenskim razmacima, čime se omogućava određivanje u kojoj se dobi javlja neko svojstvo, koje ne postoji na početku istraživanja, te se prate promjene koje ono uzrokuje. Nakon što se utvrdi izloženost mogućem uzroku pojave, ispitanici se dijele u dvije skupine (ispitna skupina (izložena) i kontrolna skupina (neizložena)) i te se skupine prate kroz neko vrijeme, kada se registriraju daljnji slučajevi nastanka pojave, tj. njene incidencije u skupinama. Ovakva istraživanja imaju prednost utoliko što se u njima izbjegava učinak kohorte, moguće je istovremeno proučavati više fenotipova, a zbog dugog perioda "praćenja" zdravstvenog stanja ispitanika, na kraju su poznati svi ljudi kod kojih se razvilo ispitivano svojstvo, kao i oni koji su zbog selektivnog mortaliteta nestali iz uzorka. Nedostatak kohortnim studijama je što su tehnički izuzetno teške za provođenje (zbog npr. migracija uzorka), dugotrajne i izuzetno skupe (Christensen i sur., 2006).



### 2.3.3. Rezultati studija dugovječnosti u ljudi

Na trajanje života ljudi utječu brojne determinante koje uključuju različite okolišne i genetske čimbenike: iako se pokazalo da su negenetski čimbenici poput prehrane, kalorijske restrikcije, tjelesne aktivnosti i dr. izuzetno bitni, procijenjeno je i da je barem 25-32% ukupne varijabilnosti za trajanje životnog vijeka nakon navršenih 60 godina života objašnjivo razlikama u genetskim polimorfizmima među pojedincima (Christensen i sur., 2006; Bishop i Guarente, 2007). Dokaze za genetski doprinos dugovječnosti pružile su blizanačke studije, analize vezanosti gena dugovječnih obitelji, "case-control" asocijacijske studije kandidatskih gena, kao i longitudinalne studije poput npr. *Danish 1905 birth cohort* (Christensen i sur., 2006; Slagboom i sur., 2011). Naravno, nepobitan dokaz snažnog utjecaja gena na starenje i životni vijek su i već spomenute progerije.

U nekim obiteljima postoji jaka povezanost između genetskih čimbenika i očekivane duljine trajanja života: u odnosu na ostale vršnjake rođene 1900. godine u SAD-u, pokazalo se da su braća i sestre stogodišnjaka i sami imali veću šansu da dožive dob od sto godina – sestre 8x, a braća čak 17x (Perls i sur., 2002). Rezultati studija provedenih na jednojajčanim i dvojajčanim blizancima procjenjuju da 25-30% varijacije u trajanju životnog vijeka uzrokuju genetske razlike (Herskind i sur., 1996; Gudmundsson i sur., 2000; Skytthe i sur., 2003; Hjelmberg i sur., 2006; Christensen i sur., 2006).

Sumarno se kod dugovječnih, zdravih ljudi, obično ne javljaju najčešće kronične bolesti današnjice poput kardiovaskularnih bolesti, moždanog udara, karcinoma, kronične opstruktivne bolesti pluća, Alzheimerove bolesti, osteoporoze, šećerne bolesti itd., a uz to dugovječne osobe obično i fizički i mentalno dobro funkcioniraju (Willcox i sur., 2006). Osim kandidatskih gena uključenih u patofiziološke mehanizme najčešćih kroničnih bolesti današnjice, potencijalni kandidatski geni za dugovječnost su i ljudski homolozi gena za koje je u modelnim organizmima dokazano da utječu na trajanje života, poput gena *AKT*, *FOXO1A*, *FOXO3A*, *GHI*, *IGF1* i *IGF1R*, uključenih u već spomenuti IIS signalni put (Chung i sur., 2010; Kenyon, 2011). GenAge baza podataka momentalno broji 288 kandidatskih gena povezanih sa starenjem i preko stotinu gena testiranih na dugovječnost u različitim populacijama i s različitom statističkom značajnošću (GenAge Database 2013). Ipak, do danas je pronađen samo jedan gen za kojeg je u brojnim studijama kandidatskih gena, provedenima u različitim populacijama, definitivno potvrđeno da utječe na trajanje života ljudi: to je apolipoprotein E (APOE) (Murabito i sur., 2012; Ganna i sur., 2013).

Uloga APOE gena u dugovječnosti potvrđena je i u cjelogenomskim asocijacijskim studijama (GWAS) (Deelen i sur., 2011; Nebel i sur., 2011; Sebastiani i sur., 2012). Međutim, unatoč tome što je u GWAS studijama identificirano preko 2000 SNP-ova povezanih s više od 250 najčešćih bolesti današnjice (<http://www.genome.gov/26525384/>), nijedan lokus osim APOE nije se pokazao statistički značajnim ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) za izuzetnu dugovječnost (Newman i sur., 2010; Deelen i sur., 2011), a niti da postoje determinante različite starosti-pri-smrti (engl. *age-at-death*) (Walter i sur., 2011). Odnosno, dva su lokusa unutar *APOC1* i *TOMM40* gena pokazala statističku značajnost, no ispostavilo se da su bili u LD-u s APOE genom (Murabito i sur., 2012). Neka od ponuđenih objašnjenja zašto je teško naći lokuse povezane s dugovječnošću su da je to zbog izuzetno kompleksne podloge dugovječnosti ili pak zbog slabe snage korištenih statističkih testova (Newman i sur., 2010).

#### **2.4. Kardiovaskularne bolesti**

Kardiovaskularne su bolesti (KVB) glavni uzročnik smrtnosti i pobola i u razvijenim i u nerazvijenim zemljama svijeta (Lopez i sur., 2006). Ovim pojmom obuhvaćene su brojne bolesti srca, mozga i periferne cirkulacije, poput koronarne bolesti srca (uključujući infarkt miokarda), cerebrovaskularnog inzulta, arterijske hipertenzije, ateroskleroze i dr. Najčešći uzroci smrti su infarkt srca i moždani udar, a smrtnost od posljedica KVB čini čak 30% ukupnog mortaliteta u svijetu (WHO, 2011). U Republici Hrvatskoj je taj postotak čak i veći: bolesti kardiovaskularnog sustava prepoznate su kao uzročnik smrti kod 53% osoba preminulih 2003. godine (Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2004).

Iako su ranije smatrane prirodnom posljedicom starenja, današnje je mišljenje kako su KVB u najvećoj mjeri uvjetovane životnim stilom. Rezultati brojnih istraživanja pokazali su da okolišni i biokemijski čimbenici rizika, ali i genetska predispozicija, utječu na podložnost razvoju KVB (Stegmayr i sur., 1997; Kuulasmaa i sur., 2000; Agarwal, 2001; Mayer i sur., 2007). Rezultati longitudinalnih kohortnih studija pokazali su da niže vrijednosti negenetskih čimbenika rizika za KVB izmjerene u srednjoj životnoj dobi ili ranoj starosti omogućavaju predviđanje preživljenja i zdravog preživljenja do 85. godine života (Terry i sur., 2005; Willcox i sur., 2006) pa i dulje (Yates i sur., 2008; Dutta i sur., 2011). Kod većine oboljelih utvrđeno je istovremeno postojanje više čimbenika rizika, a rjeđe pretežni utjecaj samo jednog čimbenika. Vrlo često se radi o kombinaciji genetskog predisponirajućeg čimbenika i rizičnog ponašanja poput npr. pušenja (Armani i sur., 2010). Prisutnost čimbenika rizika za KVB kod neke osobe statistički povećava vjerojatnost razvoja bolesti, ali ne znači da će osoba sigurno

oboljeti i/ili umrijeti od neke od kardiovaskularnih bolesti. Jednako tako osobe kod kojih nema rizičnih čimbenika za KVB ipak mogu oboljeti ili umrijeti od istih (Black i sur., 1999).

Čimbenici rizika dijele se na promjenjive i nepromjenjive. Nepromjenjivi, kako im i samo ime kazuje, su čimbenici rizika na koje se ne može utjecati (spol, dob i genetsko nasljeđe), dok u promjenjive ubrajamo hipertenziju, hiperlipoproteinemiju, pušenje, diabetes mellitus, pretilost, nezdravu prehranu, stres i nedostatnu tjelesnu aktivnost, i sve njih možemo kontrolirati, liječiti i modificirati (World Heart Federation, 2012).

#### **2.4.1. Promjenjivi i nepromjenjivi čimbenici rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti**

Pojam "čimbenik rizika" u literaturi se počeo spominjati objavljivanjem rezultata longitudinalne studije *Framingham Heart Study*, čije provođenje je započelo 1948. godine u gradu Framinghamu, državi Massachusetts, u Sjedinjenim Američkim Državama. Studija je uključivala gotovo 2/3 odraslog stanovništva ovog grada, dobi 30-62 godine, a prvi rezultati, objavljeni 1961. godine, pokazali su da hipertenzija, povišene vrijednosti kolesterola u krvi te pušenje značajno povećavaju rizik oboljenja od KVB (Kannel i sur., 1961).

Hipertenzija (HT), sa prevalencijom u svijetu od oko 27%, najčešća je i najčešće proučavana KVB, prepoznata i kao glavni promjenjivi čimbenik rizika za razvoj srčanog i moždanog udara, najčešćih kroničnih bolesti današnjice (Hajjar i Kotchen, 2003). Prema smjernicama Europskog kardiološkog sruštva i Europskog društva za hipertenziju, hipertenzija se definira kao svaka vrijednost krvnog tlaka koja premašuje 140/90 mm Hg (Mancia i sur., 2007). Patofiziologija nastanka HT vrlo je kompleksna s obzirom na sudjelovanje mnoštva patofizioloških mehanizama među kojima su pojačana aktivnost simpatičkog živčanog sustava, pojačana proizvodnja aldosterona i noradrenalina, pojačano lučenje renina, smanjenje količine vazodilatatora poput dušičnog oksida i mnogi drugi (Oparil i sur., 2003). S obzirom na dosadašnja saznanja, može se reći da je hipertenzija kompleksna bolest koju zajednički određuju okolišni i genetski čimbenici te njihova interakcija (Kaplan, 1988). Hipertenzija se najčešće javlja zajedno s drugim kardiovaskularnim čimbenicima rizika poput pušenja, pretilosti, šećerne bolesti te povišenih vrijednosti koncentracije kolesterola i triglicerida u krvi.

Pušenje cigareta ima ključnu ulogu u preranoj pojavi koronarne bolesti srca, moždanog udara i periferne aterosklerotske bolesti (Khot i sur., 2003; Yusuf i sur., 2004; Shah i Cole, 2010). Pušenje djeluje na proces aterogeneze na više razina: kemijski oštećuje endotel, izaziva aglutinaciju trombocita i nastanak mikrotromba te snižava razinu dobrog HDL kolesterola, dok istovremeno povećava razinu štetnog LDL kolesterola (Čustović i sur., 1995). Pušenju kao direktnom čimbeniku štetnosti se, kroz bolesti srca i krvnih žila, pripisuje oko trećine smrtnih slučajeva godišnje (Chen i Boreham, 2002). Rizik od koronarne ateroskleroze razmjernan je broju popušanih cigareta dnevno (Yusuf i sur., 2004), no ukoliko bolesnici oboljeli od koronarne bolesti srca prestanu pušiti, kod njih dolazi do 36%-tnog sniženja relativnog rizika od sveukupne smrtnosti (Critchley i Capewell, 2003), s time da nije pronađeno da učinak ovisi ni o dobi niti o spolu.

Povišene razine kolesterola i triglicerida u krvnom serumu također su bitni promjenjivi čimbenici rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Tyroler, 1987; Kannel, 1995; Huxley i sur., 2002). Poremećaji metabolizma koji dovode do pojačane sinteze lipida i smanjenog uklanjanja lipoproteina iz seruma dovode do hiperlipoproteinemije odnosno dislipidemije, a iako su u najvećoj mjeri genetski uvjetovani, važnu ulogu u njihovu razvoju imaju i neadekvatna prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama, prekomjerna tjelesna težina te smanjena tjelesna aktivnost. S obzirom da su čestice lipida netopljive u vodi, njihov je transport krvlju moguć samo kada tvore komplekse s apoproteinima, pri čemu nastaju lipoproteini koje dijelimo u nekoliko skupina: lipoproteini velike gustoće (engl. *high-density lipoproteins*, HDL), lipoproteini male gustoće (engl. *low-density lipoproteins*, LDL), lipoproteini vrlo male gustoće (engl. *very low-density lipoproteins*, VLDL) i hilomikroni.

U studiji provedenoj na muškarcima srednje dobi, pokazano je da povišena razina ukupnog kolesterola povećava rizik oboljenja od kardiovaskularnih bolesti (Neaton i Wentworth, 1992). Uz to, utvrđena je linearna povezanost porasta ukupnog kolesterola za 1% i povećanog rizika za razvoj koronarne bolesti srca za 2%: ukupni kolesterol od 6,47 mmol/L dovodi do dvostrukog povećanja rizika u odnosu na razinu 5,15 mmol/L, dok razina od 7,77 mmol/L dovodi do čak trostrukog povećanja rizika razvoja bolesti (LaRosa i sur., 1990).

U podlozi osnovnog patofiziološkog procesa KVB-a nalazi se ateroskleroza. Odlaganjem lipoproteina (pogotovo LDL kolesterola i lipoproteina a) u *Tunicu intimu* arterija pokreće se mnoštvo reakcija: od oksidacije i drugih modifikacija lipoproteina na koje endotel reagira tvorbom pro-inflamatornih molekula, dolaska monocita iz krvne plazme na mjesto

akumulacije lipida, na kojem monociti proliferiraju i diferenciraju se u makrofage, pa do tvorbe tzv. pjenastih stanica (engl. *foam cells*), koje nastaju kad makrofagi "progutaju" lipide, a koje se uklanjaju apoptozom. Lipidni sadržaj pjenastih stanica, koji se oslobađa apoptozom, dovodi do nekrotičkih promjena matriksa. Glatke mišićne stanice, privučene citokinima i čimbenicima rasta koje izlučuju makrofagi, dalje povećavaju veličinu aterosklerotskog plaka migriranjem na mjesto lezije (Lusis, 2000). Plakovi mogu tvoriti mikrotrombe, no najčešće otežavaju protok krvi te smanjeni dotok kisika i hranjivih tvari u mozak i srce u konačnici dovodi do nastanka srčanog i moždanog udara (Stocker i Keaney, 2004). Terapija u smjeru snižavanja razine LDL kolesterola te istodobnog povišenja razine HDL kolesterola u krvnom serumu, danas se redovito primjenjuje u cilju smanjenja rizika oboljenja od KVB (De Backer i sur., 2003).

Pretilost, odnosno povećana količina masnog tkiva, definirana je preko indeksa tjelesne mase (BMI, prema engl. *body mass index*), kao najšire korištenog indikatora pretilosti koji se izračunava prema sljedećoj jednadžbi:  $BMI = \text{tjelesna težina} / \text{tjelesna visina}^2 \text{ (kg/m}^2\text{)}$ . Prevalencija pretilosti u značajnom je porastu u svijetu te gotovo poprima razmjere epidemije (Caballero, 2007). Prema standardu Svjetske zdravstvene organizacije, vrijednosti BMI-a u rasponu 25-29.99  $\text{kg/m}^2$  smatraju se prekomjernom tjelesnom težinom, a vrijednosti  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  pretilošću (WHO, 1997). Osim samog iznosa BMI-a, razlikujemo i dva tipa pretilosti; androidni/centralan (tzv. muški tip), gdje se masno tkivo pojačano nakuplja u području trbuha, i ginoidni (tzv. ženski tip), gdje se masno tkivo uglavnom nakuplja u području kukova i glutealne regije.

Problem s adipocitima je u tome što oni nisu inertna skladišta masti, već endokrino i metabolički aktivne stanice koje sintetiziraju hormone poput leptina, rezistina i adiponektina, koji zatim sudjeluju u fiziološkim i patofiziološkim procesima u organizmu (Yu i Ginsberg, 2005). Dakle, veći broj adipocita povećava rizik za razvoj KVB zbog toga što aktivno djeluje na hiperlipidemiju, hiperkolesterolemiju i hiperglikemiju. Osim toga, veći rizik postoji kod osoba koje imaju centralni oblik pretilosti jer je to masno tkivo osjetljivije na djelovanje lipolitičkih čimbenika - adipokina, od potkožne masti smještene drugdje na tijelu, a time i metabolički aktivnije (Wajchenberg, 2000). Lipolizom adipocita potkožnog masnog tkiva oslobađaju se slobodne masne kiseline (engl. *free fatty acids*) koje se izlučuju u krvnu plazmu, dok se slobodne masne kiseline oslobođene lipolizom visceralnih adipocita luče direktno u portalni krvotok (Eckel i sur., 2005) gdje onda one pogoduju glukoneogenezi,

sintezi VLDL kolesterola, smanjuju preuzimanje glukoze i uzrokuju sveopću inzulinsku rezistenciju. Inzulinska rezistencija (IR) označava stanje smanjene osjetljivosti stanica na inzulin i njegove smanjene učinkovitosti: već i najmanji porast glukoze u tijelu potiče izlučivanje inzulina, no kako ga stanice ne detektiraju, stalni podražaj na lučenje inzulina na kraju dovodi do hiperinzulinemije. Osim što povišene vrijednosti inzulina u krvi djeluju hipertenzivno i pridonose odlaganju kolesterola na endotel krvnih žila, kao i smanjenju odstranjenja viška kolesterola iz krvi, neliječena inzulinska rezistencija dovodi do intolerancije glukoze i s vremenom se razvija u dijabetes tip 2 (Festa i sur., 2006), još jedan čimbenik rizika za KVB (Grundy i sur., 1999).

Dob je jedan od najjačih nepromjenjivih prediktora razvoja KVB: starenje izuzetno povećava rizik od razvoja KVB. Prema rezultatima Framinghamske studije, incidencija koronarne bolesti srca u osoba dobi 30-34 godine iznosila je 1%, a kod osoba dobi 70-74 godine čak 25% (Wilson i sur., 1998). Osim prema dobi, značajne razlike u riziku razvoja KVB postoje i između spolova: u odnosu na predmenopauzalne žene, od KVB-a češće oboljevaju i umiru muškarci, no ulaskom žena u menopauzu, rizik se počinje izjednačavati, da bi u kasnijoj dobi, nakon 75. godine života, KVB bile češći uzrok pobola i smrti kod žena nego kod muškaraca (Reckelhoff, 2001; Tu i sur., 2009). Osim tradicionalnog tumačenja ovakvih nalaza zahvaljujući protektivnom djelovanju estrogena (Sullivan i Fowlkes, 1996), a s obzirom da se npr. krvni tlak ne povisuje za vrijeme tranzicijske faze iz perimenopauze u menopauzu (Luoto i sur., 2000), nego se hipertenzija kod žena pojavljuje 5-20 godina nakon ulaska u menopauzu (Burl i sur., 1995), vrlo je vjerojatno da postoje još neki protektivni čimbenici osim ženskih spolnih hormona (Reckelhoff, 2001).

Povećana incidencija KVB-a unutar pojedinih obitelji pomogla je pri identifikaciji brojnih genskih biljega za koje se smatra da su povezani s povećanim rizikom pojave KVB (Gibbons i sur., 2004). Naime, osobe s pozitivnom obiteljskom anamnezom za KVB imaju izražena fenotipska i genetska obilježja koja ih predisponiraju za razvoj KVB. Fenotipska obiteljska obilježja predisponirajuća za razvoj KVB su npr. obiteljska sklonost dislipidemiji (Hippe i sur., 1997), povišene vrijednosti nekih pokazatelja upale poput C-reaktivnog proteina (Margaglione i sur., 2000), poremećaji hemostatskih pokazatelja (Pankow i sur., 2001), hipertenzija, pretilost i šećerna bolest (van der Sande i sur., 2001). Točan utjecaj nasljednih obiteljskih čimbenika za razvoj KVB još nije utvrđen, no procjenjuje se da je, npr., nasljednost rizika za povišene vrijednosti krvnog tlaka na razini 30-40%, što znači da je kod

osoba s obiteljskom anamnezom rizik pojave KVB-a u ranijoj dobi veći od onoga u općoj populaciji.

Iako način djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, etička pripadnost također utječe na pojavu KVB. Tako, naprimjer, Afroamerikanci, u odnosu na američku populaciju europskog porijekla, imaju gotovo najveću prevalenciju hipertenzije u svijetu (44%), koja je uz to glavni razlog povećane incidencije moždanog udara u ovoj populaciji (Go i sur., 2013). Young i suradnici (2005) smatraju da je do razlike u sklonosti ka razvoju hipertenzije, a koja je utvrđena u različitim populacijama svijeta, došlo zbog selekcije koja se desila prije 50000 – 100000 godina, tijekom ekspanzije populacije iz Afrike (engl. *Out-of-Africa theory*). S obzirom na ancestralno afričko klimatološko podneblje koje odlikuje vruća i vlažna klima te oskudna dostupnost soli, pojačani apetit za soli i osiguravanje zaliha vode u organizmu zadržavanjem natrija bili su esencijalni za preživljenje. Zaista, moderne populacije iz vrućih i vlažnih podneblja sklonije su razvoju hipertenzije nego populacije koje žive u hladnim podnebljima.

Osim čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, treba naglasiti da postoje i zaštitni čimbenici kao što su povišene vrijednosti HDL kolesterola u krvi, redovita tjelesna aktivnost, estrogeni i umjerena konzumacija alkoholnih pića, naročito vina (Ruidavets i sur., 2002).

#### 2.4.2. Genska podloga kardiovaskularnih bolesti

Većina kardiovaskularnih bolesti nastaje kao rezultat međudjelovanja genetičkih čimbenika s okolišnim čimbenicima, no također postoje i monogeniski oblici KVB koji su mnogo rjeđi. Tako su pronađeni lokusi koji značajno pridonose specifičnim čimbenicima rizika za KVB, poput gena za obiteljsku hiperkolesterolemiju (mutirani *LDLR* gen) (Lehrman i sur., 1985), gena za obiteljski neispravan apolipoprotein B-100 (Innerarity i sur., 1987; Soria i sur., 1989) i sitosterolemiju (mutirani geni *ABCG5* i *ABCG8*) (Berge i sur., 2000; Lee i sur., 2001). Što se učestalosti monogeniskih bolesti tiče, npr., mutaciju *LDLR* gena nosi jedna od pet stotina osoba i jedna u milijun osoba je homozigot koji razvija tešku aterosklerozu te u ranoj dobi pretrpi infarkta miokarda (Nabel, 2003; Watkins i Farrall, 2006). Osobe oboljele od sitosterolemije su još rjeđe: 2001. je bilo poznato samo stotinjak slučajeva (Lee i sur., 2001). Među poremećaje koji povećavaju vjerojatnost pobola od KVB spada i mutacija u genu za faktor V Leiden, prisutna u 2-7% stanovnika sjeverne Europe: utvrđeno je da povećava rizik pojave infarkta miokarda, moždanog infarkta te posebno venske tromboembolije (Nabel, 2003), koja je češća i kod osoba oboljelih od homocistinurije (Naughten i sur., 1998). Otkrivene su i monogeniske bolesti koje uzrokuju povišeni krvni tlak (White i sur., 1997). Ova i slična otkrića pružila su vrijedne informacije o biološkim putevima i mehanizmima bolesti koji su u pozadini mnogo češćih, kompleksnih kardiovaskularnih bolesti.

U razvoju kompleksnih KVB istražuje se uloga kandidatskih gena među kojima su, primjerice, signalne molekule upalnih puteva uključenih u aterosklerozu, apolipoproteini te drugi geni uključeni u metabolizam lipida (Casas i sur., 2006; Watkins i Farrall, 2006). Među poznate gene uključene u etiologiju kompleksnih KVB spadaju apolipoproteinski geni, poput gena za apolipoprotein E (*APOE*) i apolipoprotein B (*APOB*), geni povezani s trombozom i hemostazom, poput fibrinogena, faktora V Leiden i protrombina, geni povezani s upalnim procesima, poput gena za interleukin-6 (*IL6*) i čimbenik nekroze tumora (*TNF*) i sl. S obzirom da su mnogi geni i signalni putevi koji doprinose razvoju i pojavi KVB povezani i s drugim bolestima, tako se istražuje i npr. uloga peroksisom proliferator aktiviranog receptora  $\gamma$  (*PPARG*) i čimbenika transkripcije *TF7L2*, koji su primarno uključeni u etiologiju dijabetesa tip 2 (Casas i sur., 2006; Cambien i Tiret, 2007; Arnett i sur., 2007).

Danas se genska podloga KVB najviše istražuje pomoću cjelogenomskih asocijacijskih studija (GWAS), koje uglavnom potvrđuju ulogu dosad otkrivenih kandidatskih gena za KVB, ali otkrivaju i neke nove lokuse (O'Donnell i Nabel, 2011). Tako je



korištenjem GWAS studija otkriveno preko 30 SNP-ova povezanih s infarktom miokarda i koronarnom bolesti arterija, od čega 13 novih, dotad nepoznatih SNP-ova za infarkt miokarda (Schunkert i sur., 2011) i 10 novih za koronarnu bolest arterija (Kathiresan i sur., 2009). Također je otkriveno 95 lokusa povezanih s barem jednom od tri skupine lipida (LDL kolesterol, HDL kolesterol i trigliceridi), od kojih pojedinačne varijante imaju mali učinak, ali kombinacija svih 95 SNP-ova objašnjava oko 25% varijance u razini LDL i HDL kolesterola (Teslovich i sur., 2010). Od ukupno 95 SNP lokusa za lipide, 59 je identificirano po prvi put. Skupina istraživača iz konzorcija *International Consortium for Blood Pressure* objavila je pronalazak 16 lokusa uključenih u regulaciju krvnog tlaka, od kojih je 6 već bilo poznato, no otkriveno je i 10 novih (Ehret i sur., 2011).

### **2.4.3. Kandidatski geni odabrani za ovo istraživanje**

Prije početka izrade ove doktorske disertacije, obavljena je temeljita pretraga literature i baza podataka kako bi se pronašli kandidatski geni uključeni u nastanak prvenstveno kardiovaskularnih bolesti i odabrala nekolicina čija je uloga potvrđena u neovisnim studijama. Među najšire istraživanim genima čija je uloga u nastanku KVB potvrđena u brojnim studijama spadaju *APOE*, *ACE*, *MTHFR* i *eNOS* gen.

#### **2.4.3.1. Gen za angiotenzin-pretvarajući enzim (*ACE*)**

Angiotenzin-pretvarajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme*, *ACE*) je drugi enzim u kaskadi renin-angiotenzin sustava (*RAS*), jedne od glavnih komponenti za regulaciju krvnog tlaka. Renin-angiotenzin sustav je koordinirana hormonalna kaskada koja kontrolira kardiovaskularne, bubrežne i adrenalne funkcije upravljajući ravnotežom tekućine i elektrolita te krvnim tlakom. *ACE* enzim katalizira hidrolizu angiotenzina I u fiziološki aktivan angiotenzin II (vazokonstriktor), kao i katalizu bradikinina (vazodilatator). Ovi peptidi kontroliraju krvni tlak i ravnotežu elektrolita tako što reguliraju tonus žila, funkciju endotela i proliferaciju glatkih mišića.

Pokazalo se da koncentracija *ACE* enzima u krvnom serumu i tkivima u velikoj mjeri varira ovisno o insercijsko/delecijskom (*I/D*) polimorfizmu veličine 287 pb na dijelu introna 16 na jednom ili oba alela (Rigat i sur., 1990), te da je *D* alel povezan s kardiovaskularnom patofiziologijom (Cambien i sur., 1992; Keavney i sur., 1995). Iako istraživanja koja su slijedila nisu potvrđena u svim populacijama, danas se *ACE* *DD* genotip povezuje s

hipertenzijom, koronarnom bolešću srca, moždanim udarom te dijabetičkom nefropatijom (Nawaz i Hasnain, 2008; Gard, 2010; Zhang i sur., 2012). Osim toga, nedavne su studije otkrile ulogu RAS sustava odnosno angiotenzina II u upalnim procesima, autoimunosti i starenju (Benigni i sur., 2010).

#### **2.4.3.2. Gen za apolipoprotein E (APOE)**

Apolipoprotein E (APOE) je polimorfan glikoprotein molekularne mase ~34 kDa sačinjen od 299 aminokiselina, član raznolike obitelji proteinskih nosača bitnih za tvorbu lipoproteinskih čestica, njihovo lučenje, transport, vezanje za ciljne stanice i metabolizam. Kao ligand posreduje u uklanjanju aterogenih ostataka VLDL i hilomikronskih lipoproteinskih čestica iz krvi omogućujući im vezivanje za specifične receptore u jetri nakon čega slijedi endocitoza. Sintetiziraju ga brojni organi poput jetre, mozga (primarno astrociti), kože, adipoznog tkiva i steroidogenih organa, no većina APOE proteina prisutnog u krvnoj plazmi potječe iz jetre (Patsch i Gotto, 1996; Hagberg i sur., 2000). Identificirane su 3 glavne izoforme, kodirane alelima E2, E3 i E4, te preko 30 sporednih, koje se uglavnom povezuju s bolestima. E2 alel označava da su 112. i 158. aminokiselina cisteini, E3 alel da je 112. aminokiselina cistein, a 158. aminokiselina arginin, dok E4 alel označava da su na oba lokusa arginini. Ovaj polimorfizam daje šest genotipova: tri homozigotna (E2/E2, E3/E3 i E4/E4) i tri heterozigotna (E2/E3, E2/E4 i E3/E4) (Rall i sur., 1982). Učestalost alela razlikuje se među populacijama, s tim da je E3 najčešće prisutan alel u općim populacijama (Mahley i sur., 2009).

Različiti aleli imaju različit afinitet te se tako E2 i E3 izoforme češće vežu uz HDL kolesterol, dok E4 izoforma ima veću sklonost za vezivanje VLDL čestica (Dong i sur., 1994), što dovodi do značajnih razlika u koncentraciji kolesterola u krvi. Nositelji alela E2, u odnosu na E3E3 homozigote, imaju niži ukupan kolesterol i LDL kolesterol, no veću koncentraciju apoE proteina u serumu, dok nositelji ε4 alela imaju veću koncentraciju ukupnog kolesterola i manju koncentraciju proteina od svih ostalih kombinacija. Kod nositelja različitih alela utvrđena je i razlika u incidenciji koronarne bolesti srca, ateroskleroze, Alzheimerove bolesti, moždanog infarkta pa čak i sposobnosti oporavka nakon traumatske ozljede mozga (Drenos i Kirkwood, 2010). Tako E4 varijanta pokazuje jaku povezanost s povećanim rizikom za koronarnu bolest srca i Alzheimerovu bolest, dok nositelji E2 alela imaju veću vjerojatnost doživjeti duboku starost.

### 2.4.3.3. Gen za endotelnu sintazu dušičnog oksida (*eNOS*)

Endotelne stanice, koje oblažu stijenke krvnih žila, nisu samo permeabilna barijera između krvi i stijenke žila, već lučenjem različitih vazokonstriktivnih i vazodilatativnih čimbenika, inhibitora i promotora rasta pomažu u održavanju homeostaze, a imaju i antiupalno djelovanje. Najjači endogeni vazodilatator je dušični oksid (engl. *nitric oxide*, NO), signalna molekula koja osim regulacije vaskularnog tonusa inhibira agregaciju trombocita, adheziju leukocita na stanice endotela i omogućava očuvanje funkcije prastanica endotela (engl. *endothelial progenitor cells*) (Puca i sur., 2012.) Osim toga dušični oksid modulira i metabolizam glukoze te sekreciju inzulina (Mehrab-Mohseni i sur., 2011).

Dušični oksid nastaje iz L-arginina i molekularnog kisika u procesu koji kataliziraju tri enzima - sintaze dušičnog oksida (engl. *nitric oxide synthase*, NOS) (Furchgott, 1990). Istraživana je uloga nekih varijanti alela endotelnog *NOS* (*eNOS*) gena u različitim bolestima poput dijabetesa tip 2, inzulinske rezistencije, hipertenzije, dislipidemije, pretilosti i metaboličkog sindroma, no dobiveni rezultati nisu konzistentni. VNTR polimorfizam introna 4 gena za *eNOS*, u kojem se sekvenca dužine 27 pb ponavlja četiri (alel a) ili pet puta (alel b), značajno je povezan s koncentracijom NO-a u krvi (Wang i sur., 1997), a utvrđena je i povezanost ovog polimorfizma s hipertenzijom, koronarnom bolesti srca i infarktom miokarda, koronarnim spazmom, dijabetičkom retinopatijom i dijabetičkom nefropatijom (Wang i Wang, 2000; Ezzidi i sur., 2008; Mehrab-Mohseni i sur., 2011).

### 2.4.3.4. Gen za metilentetrahidrofolat reduktazu (*MTHFR*)

Metilentetrahidrofolat reduktaza (*MTHFR*) važan je enzim u metabolizmu homocisteina koji katalizira demetilaciju 5,10-metilentetrahidrofolata u prevladavajući cirkulirajući oblik folata u krvi, 5-metiltetrahidrofolat. Osim u metabolizmu homocisteina, *MTHFR* je neophodan i u metabolizmu tetrahidrofolata, biosintezi S-adenozilmetionina i nukleinskih kiselina, neurotransmitera te za pravilan razvoj embrija (Klotz i sur., 2010). Točkasta mutacija C667T gena za *MTHFR* uzrokuje pad enzimske aktivnosti *MTHFR*-a i smanjenje remetilacije homocisteina (za koju je uz samu mutaciju zaslužan i nedostatak folne kiseline i vitamina B12) uslijed čega dolazi do nakupljanja serumskog homocisteina, tzv. hiperhomocisteinemije. Još je 1969. godine McCully prvi put povezo povišenu razinu homocisteina s patogeneom ateroskleroze, što su potvrdila i kasnija istraživanja te se danas polimorfizam 667TT smatra čimbenikom rizika za razvoj KVB (McCully i sur., 1969;

Rothenbacher i sur., 2002). Osim toga nađena je povezanost iste mutacije i s bolestima poput karcinoma prostate (Bai i sur., 2009), karcinoma želuca (Galvan–Portillo i sur., 2010), epilepsije (Dean i sur., 2008) te shizofrenije (van Winkel i sur., 2010). Prevalencija ovog polimorfizma je relativno visoka u općoj populaciji: u autohtonim europskim populacijama kreće se u rasponu od 5 do 16% (Brattstrom i sur., 1998a).

### **3. ISPITANICI I METODE**

Doktorska disertacija je izrađena na Institutu za antropologiju u sklopu projekta «Kompleksna obilježja i zdravlje stanovništva od djetinjstva do duboke starosti» (196-1962766-2747), voditeljice prof. dr. sc. Nine Smolej Narančić. U okviru navedenog projekta osmišljena su i, u suradnji s Centrom za gerontologiju Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, provedena terenska istraživanja osoba starosti 80 i više godina u 13 domova za starije i nemoćne osobe s područja Grada Zagreba i Zagrebačke županije, u razdoblju od rujna 2007. do siječnja 2009. godine. Svi ispitanici u studiji su sudjelovali dobrovoljno, dajući pri tome pisani informirani pristanak. Etičko povjerenstvo Instituta za antropologiju dalo je dopusnicu za provođenje istraživanja te odobrilo izradu ove disertacije baš kao i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Opći cilj ovih antropoloških i epidemioloških istraživanja bio je usmjeren ka proučavanju procesa starenja traženjem mogućih genetskih i okolišnih čimbenika koji doprinose zdravom starenju, odnosno, dostizanju duboke dobi uz održanu samostalnost i pokretnost te što manje zdravstvenih poteškoća.

#### **3.1 Uzorak**

U istraživanju su sudjelovale 344 osobe dobi 80 i više godina (srednja dob  $88,33 \pm 3,52$  god), od čega 87 muškaraca (25,2%) i 257 žena (74,8%). Omjer muškaraca prema ženama u našem uzorku iznosi 1:3, što je u skladu s rezultatima Popisa stanovništva iz 2001. godine za populaciju osoba dobi 80 i više godina. Prosječna dob muškaraca iznosila je  $88,51 \pm 3,70$  godina i nije se značajno razlikovala od prosječne dobi žena ( $88,26 \pm 3,46$  god.).

Sve osobe starije od 80 godina, koje su u razdoblju 2007.-2009. bili stanari 11 domova za starije i nemoćne osobe čiji je osnivač Grad Zagreb i dva privatna doma s područja Zagrebačke županije, pozvane su da sudjeluju u istraživanju. S obzirom da je 2009. usluge domova za starije i nemoćne koristilo 4583 korisnika starih 65 i više godina, ova studija je uključila 7,5% ukupnog domskog stanovništva (Tomek-Roksandić, 2009). S obzirom da na području Zagreba živi 7765 osoba starih 85 i više godina (Popis stanovništva, 2001), ova studija obuhvaća 4,4% svih građana Grada Zagreba te dobne skupine. Osobe duboke starosti (dob od 85 i više godina) čine 6,69% stanovništva Grada Zagreba dobi 65 i više godina. Kada bismo ovaj dobni omjer preslikali na stanare u domovima za starije i nemoćne, očekivali

bismo da 307 korisnika domova bude staro 85 i više godina, a naših je ispitanika te dobne skupine bilo čak 309.

Domovi čiji su štićenici uključeni u ovu studiju bili su:

- Dom za starije i nemoćne osobe Centar
- Dom za starije i nemoćne osobe Dubrava
- Dom za starije i nemoćne osobe Ksaver
- Dom za starije i nemoćne osobe Maksimir
- Dom za starije i nemoćne osobe Medveščak
- Dom za starije i nemoćne osobe Park
- Dom za starije i nemoćne osobe Peščenica
- Dom za starije i nemoćne osobe Sveta Ana
- Dom za starije i nemoćne osobe Sveti Josip
- Dom za starije i nemoćne osobe Trešnjevka
- Dom za starije i nemoćne osobe Trnje
- Caritas dom za starije i nemoćne Vrbovec
- Dom sestre Mace (Pojatno)

### **3.2 Varijable korištene u istraživanju**

Kod svakog ispitanika provedena su antropometrijska mjerenja (visina i težina tijela, opseg struka, opseg trbuha, kožni nabori, itd.), mjerenje krvnog tlaka, ultrazvučna denzitometrija petne kosti, biokemijske analize seruma (ukupni kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, trigliceridi, glukoza natašte) te molekularno-genetičke analize kandidatskih gena za kardiovaskularne bolesti.

U suradnji s Centrom za gerontologiju Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, razvijen je Upitnik za osobe duboke starosti, koji je obuhvatio pitanja o demografskim karakteristikama ispitanika, obiteljskim migracijama, stupnju obrazovanja, uvjetima i kvaliteti života, hobijima i navikama, kao i o radnom stažu, financijskoj situaciji, prehranbenim i pušačkim navikama, tjelesnoj aktivnosti, zdravstvenim problemima i upotrebi lijekova te o reproduktivnom statusu. Za procjenu stanja uhranjenosti u Upitnik za osobe duboke starosti uklobljen je standardni upitnik Minimalne procjene stanja uhranjenosti (*Mini Nutritional Assessment*) (Guigoz i sur., 1996; Guigoz i Vellas, 1997; Vellas i sur., 1999).

Većina ispitanika (92,7%) je bila bez jačih kognitivnih oštećenja, što je zaključeno prema rezultatu psihometrijskog testa *Mini Mental State Examination* (MMSE), tzv. Minimental skor (MMS) koji je iznosio 18 ili više bodova od maksimalno 30 (Folstein i sur., 1975; Tombaugh i McIntyre, 1992), no bez obzira na MMS, svi su ispitanici uključeni u ovu studiju. Kod 19 osoba (4 muškarca i 15 žena) nije bilo moguće izvaditi krv ili izolirati DNK za molekularno-genetičke analize te je finalni uzorak sadržavao 325 osoba.

Mjerenje krvnog tlaka provedeno je u sjedećem položaju od strane iskusnog i educiranog ispitivača upotrebom živinog tlakomjera. Drugo mjerenje krvnog tlaka uzeto je kao vjerodostojno i to nakon što je ispitanik prethodno sjedio 10-15 minuta. Mjerenje je provedeno u skladu sa smjernicama Europskog društva za hipertenziju (Mancia i sur., 2007). Tlak pulsa izmjeren u stanju mirovanja (engl. *resting pulse pressure*) veći od 40 mm Hg u kvalitativnim je varijablama tretiran kao čimbenik rizika za KVB s obzirom da se smatra štetnim jer je povezan sa suženim arterijama koje ubrzavaju starenje organa (Al-Omer, 2010).

Antropometrijsko mjerenje (tzv. «kratka antropometrija») provedeno je prema standardnom IBP protokolu (engl. *International Biological Programme*; Weiner i Lourie, 1981). Za 19 ispitanika, kod kojih nije bilo moguće vjerodostojno izmjeriti visinu tijela, ista je procijenjena iz duljine potkoljenice (Tomek-Roksandić, 2009) prema metodi koju je razvio Chumlea sa suradnicima (1985). Indeks tjelesne težine (engl. *body mass index*, BMI) izračunat je kao omjer težine u kilogramima (kg) i kvadrata visine tijela u metrima (m<sup>2</sup>). BMI, kao ni opseg struka, s obzirom na promjene koje se događaju starenjem (gubitak mišićne mase abdomena, a nakupljanje masnog tkiva u abdomenu, zadržavanje tekućine itd.) se ne smatraju dobrim pokazateljima pretilosti kod starijih osoba. Uz izuzetak pothranjenosti, u osoba duboke starosti se vrijednosti BMI-a do 30 kg/m<sup>2</sup> nisu pokazale zdravstveno-rizičnim čimbenikom (Tomek-Roksandić, 2009). Stoga je kao direktni pokazatelj pretilosti odabrana suma kožnih nabora pri čemu je u kvalitativnim analizama vrijednost iznad 66. percentila sume kožnih nabora tricepsa i subskapularno označena kao rizična.

Pušački status određen je kvalitativno (pušač, bivši pušač, nepušač).

Samo dio prikupljenih podataka korišten je za potrebe ove studije, a odabrane kvantitativne i kvalitativne varijable prikazane su u Tablici 3.1. Osim kratice i opisa varijabli te načina šifriranja kod kvalitativnih varijabli, prikazan je i način izračuna različitih indeksa kada se radilo o kvantitativnim varijablama.

**Tablica 3.1.** Lista korištenih kvantitativnih i kvalitativnih varijabli te indeksa: uz svaku varijablu navedeno je je li riječ o originalnoj (Tip =1) ili izvedenoj varijabli (Tip = 2) te je navedena kratica, pun naziv kao i način šifriranja varijable.

Tip	Kratica	Varijabla	Mjerna jedinica/šifra
1	Spol	Spol	1 = muškarci, 2 = žene
<b>DOB</b>			
2	deci_dob	Decimalna dob	= datum ispitivanja – datum rođenja
2	dob_90	Dob – 2 kategorije	1 = mlađi od 90 godina 2 = stari 90 i više godina
2	dob_95	Dob – 2 kategorije	1 = mlađi od 95 godina 2 = stari 95 i više godina
<b>KRVNI TLAK</b>			
1	sistol	Sistolički krvni tlak (mm Hg)	
1	dijastol	Dijastolički krvni tlak (mm Hg)	
2	tlak pulsa	Sistolički – Dijastolički krvni tlak	
1	tlak	Hipertenzija (prethodno liječena)	1= ne, 2= da
2	ht	Utvrđeno bilo koje od sljedećeg: Sistolički > 140 mm Hg i/ili Dijastolički > 90 mm Hg i/ili liječena hipertenzija	Sistolički > 140 ili Dijastolički > 90 ili liječena hipertenzija
2	puls_K	Tlak pulsa u 2 kategorije	1 = sistol-dijastol ≤ 40 mmHg 2 = sistol-dijastol > 40 mmHg
2	sist_140	Sistolički tlak > 140 mm Hg	1 = Sistolički ≤ 140 2 = Sistolički > 140
2	sist_160	Sistolički tlak > 160 mm Hg	1 = Sistolički ≤ 160 2 = Sistolički > 160
2	dija_90	Dijastolički tlak > 90 mm Hg	1 = Dijastolički ≤ 90 2 = Dijastolički > 90
2	dija_95	Dijastolički tlak > 95 mm Hg	1 = Dijastolički ≤ 95 2 = Dijastolički > 95



2	ht_4K		1 = Sistolički $\leq$ 120 i Dijastolički $\leq$ 80 2 = Sistolički 121-140 ili Dijastolički 81-90 3 = Sistolički 141-160 ili Dijastolički 91-100 4 = Sistolički $>$ 160 ili Dijastolički $>$ 100
2	ht_3K	Kao ht_4K samo što su 1. i 2. kategorija spojene u jednu	1 = Sistolički $\leq$ 140 i Dijastolički $\leq$ 90 2 = Sistolički 141-160 ili Dijastolički 91-100 3 = Sistolički $>$ 160 ili Dijastolički $>$ 100
2	real_ht	1 = manje vrijednosti tlaka od navedenih pod «2» uz neuzimanje lijekova za hipertenziju	2 = Sistolički $>$ 160 ili Dijastolički $>$ 95 ili liječena hipertenzija
2	ht160_95	1 = manje vrijednosti tlaka od navedenih pod «2»	2 = Sistolički $>$ 160 ili Dijastolički $>$ 95
2	ht140_90	1 = manje vrijednosti tlaka od navedenih pod «2»	2 = Sistolički $>$ 140 ili Dijastolički $>$ 90
2	ht120_80	1 = manje vrijednosti tlaka od navedenih pod «2»	2 = Sistolički $>$ 120 ili Dijastolički $>$ 80
<b>FENOTIPOVI ZA KARDIOVASKULARNE BOLESTI</b>			
1	Inzult	Zdravstvena anketa	1 = ne, 2 = da
1	Infarkt	Zdravstvena anketa	1 = ne, 2 = da
1	Angina pectoris	Zdravstvena anketa	1 = ne, 2 = da
2	Infarkt+Angina	Zdravstvena anketa – ispitanik boluje od infarkta miokarda ili od angine pectoris	1 = ne, 2 = da
2	Infarkt+Inzult	Zdravstvena anketa – ispitanik boluje od infarkta miokarda ili od moždanog inzulta	1 = ne, 2 = da
2	KVB	Zdravstvena anketa – ispitanik je bolovao ili boluje od bilo koje kardiovaskularne bolesti (infarkt miokarda i/ili moždani inzult i/ili angina pectoris)	1 = ne, 2 = da
<b>MORFOLOGIJA</b>			
1	Visina	Visina tijela (mm)	
1	Težina	Težina tijela (kg)	

1	Kn_tri	Kožni nabor tricepsa (0,1 mm)	
1	Kn_sub	Kožni nabor subskapularno (0,1 mm)	
1	Op_trb	Opseg trbuha (mm)	
1	Op_bok	Opseg bokova (mm)	
2	WaistHip	Opseg struka / Opseg bokova	
2	Suma_kn	Kožni nabor tricepsa + Kožni nabor subskapularno (mm)	
2	Sumakn_K	Postotak masnog tkiva u odnosu na 66. centil sume kožnih nabora	1 = ispod 66,4-tog percentila 2 = iznad 66,4-tog percentila
2	BMI	Težina / visina <sup>2</sup> (kg/m <sup>2</sup> )	
2	BMI_3K		1 = BMI ≤ 18,49 kg/m <sup>2</sup> 2 = BMI 18,50 – 29,99 kg/m <sup>2</sup> 3 = BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>
2	BMI_who	Vrijednosti BMI podijeljene u kategorije prema WHO standardu	1 = BMI ≤ 24,99 kg/m <sup>2</sup> 2 = BMI 25,00 - 29,99 kg/m <sup>2</sup> 3 = BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>
2	BMI_4K		1 = BMI < 18,5 kg/m <sup>2</sup> 2 = BMI 18,5 – 24,99 kg/m <sup>2</sup> 3 = BMI 25,00 - 29,99 kg/m <sup>2</sup> 4 = BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>
2	BMI_25		1 = BMI < 25 kg/m <sup>2</sup> 2 = BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup>
2	BMI_30		1 = BMI < 30 kg/m <sup>2</sup> 2 = BMI ≥ 30 kg/m <sup>2</sup>
2	WaistHip_K		1 = Waist/Hip < 0,80 2 = Waist/Hip ≥ 0,80
2	Struk_3K		Žene: 1 = Opseg struka < 80 cm 2 = Opseg struka 80 – 88 cm 3 = Opseg struka > 88 cm Muškarci: 1 = Opseg struka < 94 cm 2 = Opseg struka 94 – 102 cm 3 = Opseg struka > 102 cm
2	Struk_EU		Žene: 1 = Opseg struka < 80 cm 2 = Opseg struka ≥ 80 cm Muškarci: 1 = Opseg struka < 94 cm 2 = Opseg struka ≥ 94 cm

<b>BIOKEMIJA</b>			
1	Kolesterol	Ukupni kolesterol u krvi (mmol/L)	
1	HDL_kole	HDL kolesterol u krvi (mmol/L)	
1	LDL_kole	LDL kolesterol u krvi (mmol/L)	
1	Trigliceridi	Trigliceridi u krvi (mmol/L)	
1	Glukoza	Glukoza natašte u krvi (mmol/L)	
2	Index	Indeks ateroskleroze	= LDL/HDL
1	Vitamin B12	Koncentracija vitamina B12 u krvi	
1	Željezo	Koncentracija željeza u krvi	
2	Kolest_K		1 = kolesterol < 5,0 mmol/L 2 = kolesterol ≥ 5,0 mmol/L
2	HDL_K		Žene: 1 = HDL > 1,2 mmol/L 2 = HDL ≤ 1,2 mmol/L Muškarci: 1 = HDL > 1,0 mmol/L 2 = HDL ≤ 1,0 mmol/L
2	Triglic_K		1 = trigliceridi < 1,7 mmol/L 2 = trigliceridi ≥ 1,7 mmol/L
2	GUK_K		1 = glukoza ≤ 6,4 mmol/L 2 = glukoza > 6,4 mmol/L
2	LDL_K		1 = LDL < 3,0 mmol/L 2 = LDL ≥ 3,0 mmol/L
2	VitB12_K	1 = optimalne vrijednosti, 2 = nedostatak	1 = B12 ≥ 148 pmol/L 2 = B12 < 148 pmol/L
<b>GENETSKI PODACI</b>			
1	eNOS_VNTR		44 = aa 45 = ab 55 = bb
1	eNOS_4a		1 = 55 2 = 45, 44
1	eNOS_5b		1 = 44 2 = 45, 55
1	MTHFR_C667T		11 = CC 12 = CT 22 = TT

1	MTHFR_C		1 = TT 2 = CT, CC
1	MTHFR_T		1 = CC 2 = CT, TT
1	ACE_ID		1 = DD 2 = ID 3 = II
1	ACE_D		1 = II 2 = ID, DD
1	ACE_I		1 = DD 2 = ID, II
1	APOE_152	1 = C = Arg 2 = T = Cys	11 = CC 12 = CT 22 = TT
1	APOE_290	1 = C = Arg 2 = T = Cys	11 = CC 12 = CT 22 = TT
1	APOE genotipovi	44 = Arg(152) & Arg(290) 34 = ArgCys(152) & Arg(290) 24 = ArgCys(152) & ArgCys(290) 33 = Cys(152) & Arg(290) 23 = Cys(152) & ArgCys(290) 22 = Cys(152) & Cys(290)	44 = E2-0 & E3-0 & E4-1 34 = E2-0 & E3-1 & E4-1 24 = E2-1 & E3-0 & E4-1 33 = E2-0 & E3-1 & E4-0 23 = E2-1 & E3-1 & E4-0 22 = E2-1 & E3-0 & E4-0
1	E2_alel	E2 = Cys(152)+Cys(290)	2 = APOE_genotip 22 ili 23 ili 24, za ostale APOE genotipove = 1
1	E3_alel	E3 = Cys(152)+Arg(290)	2 = APOE_genotip: 23 ili 33 ili 34, za ostale APOE genotipove = 1
1	E4_alel	E4 = Arg(152)+Arg(290)	2 = APOE_genotip: 24 ili 34 ili 44, za ostale APOE genotipove = 1
<b>PUŠAČKI STATUS</b>			
2	Pusenje_2k	Pušač	1 = ne puši; 2 = puši
2	Pusenje_4k		1 = nikada nije pušio; 2= bivši pušač; 3 = puši; 4= povremeno puši

### 3.3 Laboratorijske analize

#### 3.3.1 Biokemijske analize

Biokemijska određivanja koncentracije glukoze, HDL kolesterola, LDL kolesterola, ukupnog kolesterola, triglicerida, folata i vitamina B12 u krvi ispitanika provedena su u akreditiranom medicinsko-biokemijskom laboratoriju. Koncentracije glukoze u krvi određene su metodom heksokinaze, koncentracije HDL kolesterola metodom indirektno imunoinhibicije, koncentracije ukupnog kolesterola enzimatskom metodom, koncentracije triglicerida GPO metodom, dok su vrijednosti LDL kolesterola izračunate računski. Ove korištene metode primjenjuju se prema preporukama Komore medicinskih biokemičara.

#### 3.3.2 Izolacija DNK iz pune krvi

Svakom ispitaniku izvađeno je 10 ml periferne krvi. Izolacija DNK iz leukocita izvršena je na Odjelu za molekularnu genetiku, forenzičnu antropologiju i analizu drevne DNA (laboratorij) Instituta za antropologiju primjenom metode isoljavanja (engl. *salting out*) koju su uveli Miller i suradnici (1988). Postupak izolacije odvija se u dvije faze.

*1. dan:* 10 ml pune krvi izliveno je u plastičnu epruvetu (*BD Falcon*) i nadopunjeno s 3 volumena pufera za hemolizu (1x). Sadržaj epruvete je promiješan laganim okretanjem epruvete, inkubiran 20 minuta na ledu (-20°C), a zatim centrifugiran 10 minuta na +4°C pri 4000 rpm (*Heraeus Multifuge 3L, Kendro*). Supernatant je pažljivo odličen kako bi na dnu epruvete ostao sačuvan sloj leukocita. Zatim je u epruvetu dodano 10 ml pufera za hemolizu (1x), nakon čega je talog udaranjem epruvete kartonskim tuljcima usitnjen (razmrvljen) u puferu. Epruveta s razmrvljenim leukocitima centrifugirana je 10 minuta na +4°C pri 4000 rpm, nakon čega je sterilnim jednokratnim pipetama odstranjen supernatant. U svaku epruvetu s talogom dodano je 3 ml SE-LIZA-pufera 1x NLB nakon čega je talog snažno izmiješan tijekom 2 sekunde. Mješavini je zatim dodano 200 ml pronaze, a potom 400 ml 10% SDS-a. Mješavina je inkubirana 2-5 dana na 37°C.

*2. dan:* Nakon dodavanja 1 ml zasićene otopine NaCl, pristupilo se snažnom miješanju (na *vortex* mješalici) u trajanju od 10-ak sekundi te centrifugiranju u trajanju od 10 minuta na 3000 rpm. Nakon centrifugiranja vodeni viskozni sloj (gornji sloj) prenesen je širokom Pasteurovom pipetom u čistu epruvetu. Potom su dodana dva volumena hladnog apsolutnog etanola (96%). Tijekom laganog rotiranja epruvete dolazi do precipitacije DNK. Precipitirana

DNK je Pasteurovom pipetom prenesena u mikroepruvetu u koju se dolilo par kapi hladnog etanola (70%), nakon čega je uslijedilo kratko centrifugiranje na 13000 rpm. Potom je alkohol izliven, a mikroepruveta ostavljena otvorena dok se DNK nije osušila. Nakon sušenja DNK je otopljena u 250 ml H<sub>2</sub>O. Potpuno otopljena DNK je pohranjena na +4°C. Prilikom izolacije DNK korištene su sljedeće otopine:

- 10x pufer za hemolizu (82,9 g 155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10,0 g 10 mM KHCO<sub>3</sub>; 3,72 g 1mM Na<sub>2</sub>EDTA; nadopunjeno s dH<sub>2</sub>O do 1 L, pH 7,4; čuvano na +4);
- SE-LIZA-PUFER 10X (12,1 g 10 mM TRIS-HCl; 43,83 g 75 mM NaCl; 89,33 g 24 mM Na<sub>2</sub>EDTA; nadopunjeno s dH<sub>2</sub>O do 1 L, pH 8,0; sterilizirano i čuvano na sobnoj temperaturi);
- zasićena otopina NaCl (35 g NaCl nadopunjeno do 100 ml sterilnom destiliranom vodom);
- PRONAZA *Boehringer* (na 1 g pronaze dodano je 50 ml H<sub>2</sub>O; autodigestija 2 sata na 37°C; alikvotirano po 1ml; čuvano na -20°C);
- 10% SDS (50g SDS nadopunjeno do 500 ml sterilne vode; čuvano na sobnoj temperaturi).

Koncentracija izolirane DNK određena je na *NanoDrop 1000* spektrofotometru u vlasništvu Katedre za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

### 3.3.3 Genotipizacija

Prije samog određivanja polimorfizama istraživanih lokusa, odabrani fragmenti DNK su umnoženi metodom lančane reakcije polimerazom (PCR – engl. *polymerase chain reaction*), na instrumentu *GeneAmp System 9600 (Applied Biosystems)* u volumenu od 15 µl prema sljedećim uvjetima:

#### a) PCR smjesa

PCR pufer ( <i>Solis Biodyne</i> )	1x
MgCl <sub>2</sub> ( <i>Solis Biodyne</i> )	2,5 mM
dNTP ( <i>Applied Biosystems</i> )	0,1 mM
Početnica 1	0,2 µM
Početnica 2	0,2 µM

Taq polimeraza ( <i>Solis Biodyne</i> )	0,05 U/ $\mu$ l
DNK	2ng/ $\mu$ l

b) uvjeti umnažanja

95°C	5 min.
94°C	1 min. $\gamma$
53°C	1 min. $\gamma$ 15 ciklusa
72°C	1 min. $\downarrow$
94°C	1 min. $\gamma$
50°C	1 min. $\gamma$ 15 ciklusa
72°C	1 min. $\downarrow$
72°C	10 min
4°C	$\infty$

Produkti umnoženi reakcijom PCR provjereni su na agaroznom gelu metodom elektroforeze, a veličina produkata je utvrđena usporedbom s alelnom ljestvicom (*Gene Ruler - 100 bp DNK Ladder, Fermentas*).

**A) Detekcija polimorfizma Alu ACE gena**

Početnica 1 (*MWG-Biotech*)

**5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'**

Početnica 2 (*MWG-Biotech*)

**5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'**

*ACE* Alu polimorfizam se ispoljava u obliku insercije ili delecije fragmenta veličine 300 parova baza, koji je detektiran elektroforezom (25 min, 80V) na 2%-tnom agaroznom gelu.

**B) Detekcija polimorfizma C667T *MTHFR* gena (rs1801133)**

Početnica 1 (*Invitrogen*)

**5' - TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA - 3'**

Početnica 2 (*Invitrogen*)

**5' - AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG - 3'**

Kod navedenog lokusa istraživana je polimorfizam jedne baze koji se detektira restrikcijom. Dobiveni PCR produkti veličine 198 pb podvrgnuti su djelovanju restriktivnog enzima *HinfI* (*Takara Bio Inc*) prema uputama proizvođača. Polimorfizam je određen prisutnošću restriktivnog mjesta (alel T), odnosno odsutnošću istog (alel C) što je detektirano elektroforezom (30 min, 80V) na 3%-tnom agaroznom gelu: kod nositelja alela T nakon djelovanja enzima *HinfI* na gelu se vidi fragment veličine 175 pb (manji fragment veličine 23 pb se ne vidi), dok se kod nositelja C vidi nepocijepani fragment veličine 198 pb.

### C) Detekcija polimorfizma VNTR *eNOS* gena

Početnica 1 (*Applied Biosystems*)

**5' FAM –AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT -3'**

Početnica 2 (*Invitrogen*)

**5'- TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC -3'**

Navedeni polimorfizam se ispoljava kao promjena u broju ponavljajućih jedinica veličine 27 parova baza. Dobiveni PCR produkti detektirani su na aparatu *ABI Prism 310 DNK Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) prema sljedećem protokolu: za svakog ispitanika uzeto je 2 µl PCR produkta koji su pomiješani s 12 µl formamida (*Hi-Di Formamide - Applied Biosystems*) i 0,5 µl standarda za određivanje veličine fragmenta (*GeneScan-500 Rox Size Standard - Applied Biosystems*). Uzorci su podvrgnuti postupku denaturacije u trajanju od 5 minuta na 95°C, a zatim postupku smrzavanja u trajanju od 3 minute na -20°C; okomita kapilarna elektroforeza odvijala se pri 60°C, 15 kV, 8 µA i snazi lasera od 9.9 mW. Dužina alela određena je pomoću programa *GeneScan Analysis 3.7*.

### D) Detekcija dvaju polimorfizama unutar eksona 4 *APOE* gena (rs429358 i rs7412)

Početnica 1 (*Invitrogen*)

**5'– TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A -3'**

Početnica 2 (*Invitrogen*)

**5'- ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC -3'**

Unutar eksona 4 *APOE* gena na dva lokusa istraživani su polimorfizmi jedne baze, koji su detektirani metodom SNaPshot istovremeno sa još 8 polimorfnihih lokusa koji nisu uključeni u ovaj rad. U svaki je PCR produkt u omjeru 2:5 dodana smjesa enzima *ExoI* i *SAP* te su pročišćeni u instrumentu *GeneAmp System 9600*: 60 minuta na 37°C i 15 minuta na



75°C. Nakon toga je pomoću reagensa *SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems)*, prema uputama proizvođača, napravljena SNaPshot reakcijska smjesa. U SNaPshot smjesi početnica (10x primer mix) nalazilo se 10 početnica različite dužine, a koncentracija svake početnice iznosila je 0,2 pmol/μl.

Za lokus rs429358 korištena je početnica 5' – GCG CAG GCC CGG CTG GGC GCG GAC ATG GAG GAC GTG -3', a za lokus rs7412 početnica 5'- CCT CGC CTC CCA CTG CGC AAG CTG CGT AAG CGG CTC CTC CGC GAT GCC GAT GAC CTG CAG AAG - 3'. SNaPshot Multiplex Ready reakcijska smjesa sadržavala je sljedeće komponente:

SNaPshot Multiplex Reaction Mix	5 μl
PCR produkt	3 μl
10x primer MIX (c=0.2 pmol/μl)	1 μl
Deionizirana voda	1 μl

SNaPshot hibridizacija odvijala se u instrumentu *GeneAmp System 9600* po sljedećem protokolu:

96°C	10 sec
50°C	5 sec   25 ciklusa
60°C	30 sec
4°C	∞

Produkti hibridizacije pročišćeni su pomoću enzima SAP na 37°C u trajanju od 60 minuta, nakon čega su stavljeni 15 minuta na 75°C (*GeneAmp System 9600*). Na produkte hibridizacije je zatim dodano 9 μl formamida (*Hi-Di Formamide, Applied Biosystems*) i 0,5 μl *GeneScan-120 LIZ* standarda te su podvrgnuti denaturaciji u trajanju od 5 minuta na 95°C. Ovako priređeni produkti analizirani su kapilarnom elektroforezom na aparatu *ABI Prism 310 DNK Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* pri sljedećim uvjetima: 60°C, 15 kV i snazi lasera od 9.9 mW (*GeneScan Run Module E5*). Rezultati fragmentalne analize kapilarnom elektroforezom obrađeni su programom *GeneScan Analysis Software version 3.1 (Applied Biosystems)*.

### 3.3 Statistička obrada

#### 3.4.1 Učestalost alela

Učestalost alela na istraživanim lokusima dobivena je određivanjem (brojanjem) alela iz genotipskih vrijednosti.

#### 3.4.2 Hardy-Weinbergova ravnoteža

Pokoravanje Hardy-Weinbergovoj ravnoteži za bialelne lokuse provjereno je  $\chi^2$ -testom s dva stupnja slobode, usporedbom opaženog (O) i očekivanog (E) broja homozigota i heterozigota.

Očekivana učestalost homozigota i heterozigota izračunata je iz alelnih učestalosti:  $(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2 = 1$ , gdje su p i q alelne učestalosti,  $p^2$  i  $q^2$  učestalosti homozigota, a  $2pq$  učestalost heterozigota. Očekivani broj homozigota i heterozigota dobiven je množenjem učestalosti s ukupnom brojem ispitanika. Za izračun HW  $\chi^2$ -a korišten je program dostupan na <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>.

Pokoravanje Hardy-Weinbergovoj ravnoteži za *APOE* trialelni polimorfizam izračunato je Exact – testom pri čemu je korišten program Instituta za antropologiju.

#### 3.4.3 Univarijatne i multivarijatne analize negenetičkih čimbenika rizika

Karakteristike kvantitativnih varijabli prikazane su deskriptivno-statistički pri čemu su razlike između skupina testirane Studentovim t-testom i jednosmjernom ANOVA analizom. Odnosi između varijabli utvrđeni su izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije te multivarijatnom regresijskom analizom. Odnosi između kvalitativnih varijabli testirani su  $\chi^2$ -testom.

#### 3.4.4. Logistička regresija

Logistička regresija korištena je kako bi se istovremeno mogao procijeniti utjecaj kvantitativnih i kvalitativnih nezavisnih varijabli (dobi, spola, ispitivanih čimbenika rizika kardiovaskularnih bolesti kao i ispitivanih polimorfizama) na ciljnu zavisnu varijablu. Logistička regresija stavlja proporcije  $p_i$  zavisne varijable (tj. vjerojatnost da je zavisna varijabla  $Y = 1$ , odnosno  $Y = 0$ ) u odnos s nezavisnom varijablom X prema sljedećem

modelu:  $p = e^{a+bX}/1+e^{a+bX}$  i  $1-p = 1/1+e^{a+bX}$ , gdje je  $e$  baza prirodnog logaritma, a  $a$  i  $b$  parametri modela.

Omjer ovih dviju proporcija, tj. vjerojatnost da će se određeni događaj dogoditi ( $Y = 1$ ) i vjerojatnost da se neće dogoditi ( $Y = 0$ ) daje šansu (engl. *odds*) određenog događaja:  $p/1-p = e^{a+bX}$ , odnosno  $\ln(p/1-p) = a+bX$ . Dakle, izraz  $\ln(p/1-p)$  koji se zove logit( $p$ ) je vezan uz varijablu  $X$  jednostavnom linearnom regresijom.

Omjer šanse (engl. *odds ratio*) predstavlja vrijednost kojom se šansa određenog događaja povećava, odnosno smanjuje kad se vrijednost nezavisne varijable poveća za 1 i dakle, predstavlja omjer šansi vrijednosti  $X = n$  i  $X = n+1$  nezavisne varijable.

Za određivanje parametara ( $a$  i  $b$ ) u logističkoj regresiji koristi se metoda najveće vjerojatnosti (engl. *maximum-likelihood method*), koja podrazumijeva brojna ponavljanja izračuna vjerojatnosti dok ne rezultira vrijednostima parametara koji čine opažene vrijednosti podataka najvjerojatnijim. Značajnost parametara je testirana testom omjera vjerojatnosti,  $S = -2 \ln(L_0/L_1)$ , u kome je  $L_1$  maksimalna vjerojatnost modela, a  $L_0$  maksimalna vjerojatnost modela koji nije uzimao u obzir podatke varijable  $X$ . Ova statistika slijedi  $\chi^2$  distribuciju.

Sve ove univarijatne i multivarijatne statističke analize kao i analize logističke regresije provedene su korištenjem SPSS 7.5 programskog paketa.

### 3.4.5 Meta-analiza

Meta-analiza je statistička analiza rezultata većeg broja pojedinačnih istraživanja, kojoj je cilj iste integrirati kako bi se dobio zaključak (Glass, 1976). Ova metoda, koja se već 30-ak godina koristi u medicini i industriji, može se primjenjivati samo na empirijskim (iskustvenim) rezultatima istraživanja, a ne na teoretskim radovima. U većini disciplina statistička analiza može obrađivati završne točke kao što su, primjerice, veličina prosječnog učinka (engl. *mean effects*), stopa odgovora (engl. *response rates*), omjeri šanse (engl. *odds ratio*, OR), korelacije (engl. *correlations*) i slično (Bartolucci, 2009). U ovom istraživanju međugeneracijska meta-analiza je provedena korištenjem objavljenih podataka različitih europskih populacija, pri čemu je svaka populacija tretirana kao jedna studija. Naime, ukoliko je unutar iste populacije pronađeno više studija koje su odgovarale zadanim kriterijim, učestalost učinka testiranih alela na dugovječnost unutar iste populacije dobivena je ponderiranjem pojedinačnih rezultata.

Meta-analitički pristup koji je primijenjen uključio je:

- a) formuliranje istraživačkog pitanja “Kolika je učestalost alela istraživanih polimorfizama u “mladim” (18-79 god) i “starim” (80+ god) uzorcima europskih populacija?”,
- b) sustavno pretraživanje baza podataka,
- c) odabir radova za pregled,
- d) kritičku prosudbu odabrane literature.

Pretraživanjem elektroničkih baza podataka (Pubmed, MedLINE, Science Direct, CROSB, PERO) pronađeni su podaci o učestalosti polimorfizama istraživanih gena u hrvatskoj populaciji i drugim europskim populacijama. Ključne riječi koje su bile korištene u traženju su ime ili kratica gena te naziv polimorfizma, kao i pojmovi *ageing*, *longevity*, *80+ population* i *senescence*. Pretraživanjem je izlistan velik broj studija, no uključene su samo europske populacije za koje postoji barem jedna publikacija o učestalosti istraživanog polimorfizma u osoba starih 80 i više godina.

Rezultati “case-control” studija dihotomnog ishoda, u našem slučaju omjer šanse, OR, za doživjeti duboku starost, najčešće se testiraju pomoću Mantel-Haenszel metode odnosno jednadžbe  $OR_{MH} = \frac{\sum (a_i d_i / n_i)}{\sum (b_i c_i / n_i)}$ ,  $i=1, 2, \dots, k$ , u kojoj, za našu studiju, vrijednosti  $a$  i  $c$  predstavljaju broj osoba u jednoj populaciji koje su doživjele duboku starost, pri čemu osobe  $a$  nose ispitivani alel, a osobe  $c$  ne nose. Vrijednosti  $b$  i  $d$  predstavljaju broj pripadnika opće populacije koji nose ( $b$ ) odnosno ne nose ( $c$ ) ispitivani alel. Ukupan broj ispitanika u svakoj uključenoj populaciji označava oznaka  $n$ , a suma  $\sum$  je zbroj svih ispitanika uključenih u meta-analizu,  $\sum = n_1 + n_2 + \dots + n_i$  (Mantel i Haenszel, 1959). Mantel-Haenszel metoda podrazumijeva model fiksnog učinka (engl. *fixed effect*), odnosno, da se radi o skupini neovisnih studija provedenih na sličan način u istoj ili sličnoj populaciji (npr. autohtona europska populacija) te da se OR značajno ne razlikuje među uključenim studijama. Ova pretpostavka se testira testom heterogenosti i ukoliko on rezultira niskom  $p$  vrijednosti ( $p < 0,05$ ), to je indikator da model fiksnog učinka nije najbolji odabir za meta-analizu.

Heterogenost među populacijama testirana je korištenjem Cochranove  $Q$  statistike bazirane na  $\chi^2$  testu sa  $n-1$  stupnjeva slobode ( $n$  je ukupan broj populacija) (Petiti, 1994) i korištenjem indeksa inkonzistencije (nedosljednosti),  $I^2$  (Higgins i sur., 2003). Jednadžba pomoću koje se testira heterogenost je  $Q = \sum [W_i \times (\ln OR_{MH} - \ln OR_i)^2]$ , pri čemu je  $Q$

heterogenost,  $W_i = 1/\text{varijanca}$ ,  $\text{varijanca}_i = n_i/(b_i \times c_i)$ , a  $OR_i = (a_i \times d_i)/(b_i \times c_i)$  (Ponnuraja, 2010). Indeks inkonzistencije računa se pomoću jednadžbe  $I^2 = [100\% \times (Q - df)]/Q$  (df je broj stupnjeva slobode) (Higgins i Thompson, 2002; Higgins i sur., 2003).

Metoda nasumičnog učinka (engl. *random effect*), poznata i kao metoda DerSimonian-Laird, u meta-analizu uključuje slučajne (nasumične) varijacije unutar svake populacije kao i varijacije između različitih populacija (studija) (DerSimonian i Laird, 1986), tako da se primjenjuje kad model fiksnog učinka nije prikladan. Jednadžbu za primjenu DerSimonian-Laird metode u sumiranju studija u kojima je učinak izražen pomoću OR-a dali su Fleiss i Gross (1991),  $\ln OR_{DL} = \sum (W_i^* \times \ln OR_i) / \sum (W_i^*)$ , u kojoj je  $OR_{DL}$  ukupan OR određen po metodi DerSimonian-Laird,  $W_i^*$  je čimbenik težine po DerSimonian-Lairdu, a  $OR_i$  je čimbenik učinka za svaku od  $i$  studija ( $i=1, 2, \dots$ ).

I metode fiksnog i nasumičnog učinka daju ukupni omjer šanse unutar 95%-tnog intervala pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI): ukoliko se broj jedan (1) ne nalazi unutar 95%-tnog intervala pouzdanosti, omjer šanse je statistički značajan ( $p < 0,05$ ).

Procjena publikacijske pristranosti (engl. *bias*) ili neke druge pristranosti svojstvene malim studijama izvršena je korelacijskom metodom po Beggu i Mazumdaru, a regresijska metoda za model fiksnog učinka metodom po Eggeru (Begg i Mazumdar, 1994; Egger i sur., 1997). Kako bi se provjerilo postoji li potencijalna studija snažnog (jačeg) utjecaja koja bi utjecala na ukupni OR i njegovu značajnost, meta-testiranja se ponavljaju više puta i to tako da u svakom izračunu bude isključena druga populacija te se provjerava ukupna statistička značajnost i eventualna promjena heterogenosti. S obzirom na raznoliku strukturu uzorka u europskim populacijama uključenima u ovu studiju, kumulativna i meta-regresijska analiza nisu mogle biti provedene.

Sva testiranja uključena u meta-analizu, a koja su istovremeno obuhvatila i opću i staračku populaciju Hrvatske i drugih europskih zemalja, izvršena su korištenjem statističkog softvera STATA 11.0 (*StataCorp LP, College Station, Texas, USA*).

## 4. REZULTATI

### 4.1. KVANTITATIVNE ANALIZE

U Tablici 4.1. prikazana je deskriptivna statistika za ispitane kvantitativne negenetičke čimbenike kardiovaskularnog rizika: dob, krvni tlak, pušački status te osnovne biokemijske i antropometrijske značajke. Usporedba muškaraca i žena pokazala je da postoje statistički značajne razlike u nekim antropometrijskim obilježjima i biokemijskim pokazateljima zdravstvenog stanja: u odnosu na žene, muškarci su viši i teži, imaju veću visinu koljena, širinu lakta, veći im je opseg struka i imaju veći omjer struk/bokovi. Žene, pak, imaju značajno veći kožni nabor tricepsa. Što se biokemijskih pokazatelja tiče, žene u odnosu na muškarce imaju statistički značajno više vrijednosti ukupnog kolesterola, HDL i LDL kolesterola te triglicerida, dok muškarci imaju veću razinu željeza u krvi u odnosu na žene.

Ako uzorak podijelimo na mlađu (<90 god.) i stariju (90+ god.) dobnu skupinu i usporedimo iste kvantitativne negenetičke čimbenike kardiovaskularnog rizika, vidimo da je mlađa podskupina osoba duboke starosti viša, teža, ima veći indeks tjelesne mase (BMI), veću visinu koljena, veći opseg struka i opseg bokova (Tablica 4.2.). Mlađi također imaju veći opseg nadlaktice, potkoljenice, veću širinu lakta i veće kožne nabore tricepsa i subskapularno. Od biokemijskih pokazatelja, statistički značajne razlike postoje samo u koncentraciji triglicerida, koja je veća kod osoba mlađih od 90 godina. Kada mlađi i stariji poduzorak analiziramo prema spolu, vidimo da su mlađi muškarci (<90 god.) statistički značajno viši i imaju veću visinu potkoljenice te da imaju manji indeks ateroskleroze od starijih muškaraca. Žene se razlikuju u više ispitanih antropometrijskih varijabli: mlađe žene (<90 god.) su od starijih (90+ god.) više, teže, imaju veći BMI, veću visinu koljena, veći opseg struka i opseg bokova, kao i veći opseg nadlaktice, potkoljenice, veće kožne nabore tricepsa i subskapularno i širinu lakta. Od ispitanih biokemijskih pokazatelja, statistički značajne razlike postoje samo u koncentraciji triglicerida u krvi, koja je također viša u mlađih žena. Relacija krvnog tlaka i dobi prikazana je na Slici 4.1. za muškarce i Slici 4.2. za žene: statistički je značajna samo negativna povezanost dijastoličkog krvnog tlaka s dobi kod žena.

Ukoliko uzorak podijelimo na hipertenzivne (65,4%) i nehipertenzivne (34,6%) osobe, osim povišenih sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka kao i tlaka pulsa kod hipertenzivnih osoba, statistički značajne razlike postoje i u omjeru struk/bokovi, koji je veći kod nehipertenzivnih osoba u ukupnom uzorku u odnosu na hipertenzivne (Tablica 4.3.). Unutar

spolova, osim vrijednosti sistoličkog tlaka te tlaka pulsa, hipertenzivni muškarci u odnosu na one nehipertenzivne su značajno viši, dok nehipertenzivni muškarci imaju veći omjer struk/bokovi. Kod žena, osim razlike u sistoličkom i dijastoličkom tlaku te tlaku pulsa, nema statistički značajnih razlika u ispitivanim varijablama.

Spolne i dobne razlike očite su i kada se promotri učestalost kardiovaskularnih čimbenika rizika koji prelaze kritične vrijednosti (Tablica 4.4.). U ukupnom je uzorku relativno visoka učestalost hipertenzivnih osoba (65,4%), osoba koje imaju BMI veći ili jednak  $25 \text{ kg/m}^2$  (68,0%), osoba čiji je ukupni kolesterol veći ili jednak vrijednosti  $5 \text{ mmol/L}$  (65,5%) te osoba čiji je LDL kolesterol veći ili jednak vrijednosti  $3 \text{ mmol/L}$  (61,7%), a izuzetno je visoka učestalost (81,0%) osoba koje imaju velik opseg struka prema EU standardima (koji su  $\geq 80 \text{ cm}$  za žene i  $\geq 94 \text{ cm}$  za muškarce), osoba koje imaju razliku sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka (tlak pulsa) veću od  $40 \text{ mm Hg}$  (85,8%) te onih koje imaju omjer struk/bokovi  $\geq 0,80$  (91,6%). Gledano prema spolu i statističkoj značajnosti, žene češće od muškaraca imaju  $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , veći opseg struka prema EU standardima, sumu kožnih nabora iznad 66. percentila i razliku pulsa  $>40 \text{ mm Hg}$ . Žene također češće imaju povišen ukupni i LDL kolesterol, kao i trigliceride. Muškarci češće imaju samo povišenu koncentraciju glukoze u krvi (jednaku ili veću od  $6,4 \text{ mmol/L}$ ).

Kada ukupan uzorak podijelimo na dvije dobne skupine,  $<90 \text{ god.}$  i  $\geq 90 \text{ god.}$ , i dalje postoje statistički značajne razlike među spolovima: žene mlađe od 90 godina češće imaju  $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ,  $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , opseg struka veći od EU standarda, sumu kožnih nabora iznad 66. percentila, tlak pulsa  $>40 \text{ mm Hg}$ , povišen ukupan i LDL kolesterol te trigliceride, dok muškarci mlađi od 90 godina, u odnosu na žene iz iste dobne skupine, imaju češće koncentraciju glukoze u krvi  $\geq 6,4 \text{ mmol/L}$ . Kod osoba dobi  $\geq 90 \text{ godina}$ , statistički značajne razlike među spolovima postoje u kategorijskim varijablama ukupnog kolesterola i LDL kolesterola – povišene vrijednosti, koje se smatraju rizičnima za KVB, češće nalazimo kod žena. Razlike u učestalosti kardiovaskularnih čimbenika rizika koji prelaze kritične vrijednosti testirane su za svaki spol zasebno unutar navedenih dviju dobnih skupina: u sve četiri kategorijske varijable za koje su pronađeni statistički značajni rezultati ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ,  $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , suma kožnih nabora i trigliceridi), veća učestalost testiranog čimbenika pronađena je u ženskih osoba  $<90 \text{ godina}$ , u odnosu na žene dobne skupine  $\geq 90 \text{ godina}$ .

Relacija između svih mjerenih pokazatelja kardiovaskularnog rizika međusobno (krvni tlak, pušački status, biokemijski i antropometrijski pokazatelji prehranbenog statusa) ispitana

je izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije za svaki spol odvojeno. U Tablicama 4.5. (žene) i 4.6. (muškarci) prikazan je segment korelacijske matrice koji u stupcima izdvaja varijable koje se najčešće koriste kao prediktori kardiovaskularnog rizika, a to su: dob, indeks tjelesne mase, opseg struka, omjer struka i bokova, sistolički i dijastolički krvni tlak, tlak pulsa i indeks ateroskleroze.

Kod žena uočavamo statistički značajnu negativnu povezanost dobi s gotovo svim pokazateljima prehranbenog statusa. Od biokemijskih je pokazatelja signifikantna samo negativna povezanost dobi s trigliceridima, dok s krvnim tlakom nema povezanosti. Pokazatelji prehranbenog statusa značajno su povezani s lipidima u krvi (ukupni kolesterol, HDL i LDL kolesterol, trigliceridi i indeks ateroskleroze) i glukozom, od čega je samo s HDL kolesterolom povezanost negativna. Krvni tlak kod žena signifikantno je pozitivno povezan s nekolicinom pokazatelja prehranbenog statusa (težina, BMI, opsezi nadlaktice i potkoljenice, kožni nabori), a dijastolički krvni tlak i s lipidima u krvi (ukupni kolesterol, LDL i HDL). Indeks ateroskleroze signifikantno je pozitivno povezan s pokazateljima prehranbenog statusa. Ovi nalazi upućuju na postojanje povezanosti između vrijednosti krvnog tlaka, pokazatelja prehranbenog statusa i lipidnog statusa u populaciji žena starih 80 i više godina.

Dob kod muškaraca pokazuje povezanost (negativnu) samo s nekim pokazateljima prehranbenog statusa, no ne i s krvnim tlakom ili s biokemijskim pokazateljima. Kod muškaraca, za razliku od žena, uz iznimku dijastoličkog krvnog tlaka i opsega bokova, nema statistički značajne povezanosti krvnog tlaka s pokazateljima prehranbenog statusa, no krvni je tlak povezan s lipidima (ukupni kolesterol i trigliceridi). Pokazatelji prehranbenog statusa pozitivno su povezani s glukozom i lipidima u krvi (ukupni kolesterol, trigliceridi, indeks ateroskleroze i LDL kolesterol). Indeks ateroskleroze pozitivno je povezan s većinom antropometrijskih pokazatelja prehranbenog statusa.

Kako bismo istovremeno testirali ulogu utvrđenih korelata, odstranili njihovu međuzavisnost te tako izlučili prediktore koji imaju najznačajniji utjecaj na vrijednosti krvnog tlaka, varijable su testirane multivarijatno, potpunim modelom višestruke regresije (model Enter). Regresijska je analiza napravljena odvojena za muškarce i odvojeno za žene, pri čemu je zavisna varijabla bila sistolički odnosno dijastolički krvni tlak. S obzirom da su u regresijsku jednadžbu uključene varijable izražene u različitim mjernim jedinicama, iste su standardizirane te su u analizu ušle standardizirane kvantitativne varijable. U analizu nisu uključene one varijable koje su izvedenica istih varijabli ili kada se radilo o varijablama u



snažnoj međuzavisnosti. Prema tome, iz nezavisnih su varijabli isključeni tlak pulsa, drugi tlak (sistolčki ako je zavisna varijabla bila dijastolički i obrnuto) te visina i težina tijela, s obzirom da je u jednadžbi prisutna varijabla indeks tjelesne mase.

U Tablici 4.7. prikazani su rezultati potpunog modela višestruke regresije za sistolički krvni tlak kod žena: u regresiju je ušlo 12 varijabli od kojih nijedna pojedinačno nije prepoznata kao signifikantan prediktor, a ni ukupan model nije se pokazao kao statistički značajan. U regresijski model dijastoličkog krvnog tlaka, koji objašnjava 11,8% varijance kod žena ( $p < 0,01$ ) ušlo je također 12 varijabli, od kojih su tri, poimence, koncentracija glukoze u krvi, koncentracija LDL kolesterola i indeks ateroskleroze, prepoznate kao signifikantni prediktori (Tablica 4.8.). Rezultati potpunog modela višestruke regresije kod muškaraca nisu pokazali statističku značajnost modela za objašnjenje varijance sistoličkog krvnog tlaka (Tablica 4.9.), ali je zato u regresiju koja objašnjava gotovo 35% varijance dijastoličkog krvnog tlaka ( $p < 0,01$ ) ušlo 12 varijabli, od čega su signifikantni prediktori bili koncentracija triglicerida i koncentracija HDL kolesterola (Tablica 4.10.). Kod oba spola rezultati višestruke regresije nisu pokazali statistički značajnu prediktivnu vrijednost antropometrijskih i biokemijskih varijabli za sistolički krvni tlak, ali jesu za dijastolički krvni tlak. Dobiveni rezultati pokazuju da, iako se spolovi razlikuju u prediktornim varijablama za dijastolički krvni tlak, u oba su se spola značajnima pokazali samo biokemijski pokazatelji.

Tablica 4.1. Deskriptivna statistika za dob, osnovne biokemijske i antropometrijske varijable određene u osoba dobi 80 i više godina. Razlike u srednjim vrijednostima među spolovima testirane su t-testom, a statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) otisnute su masnim slovima.

Varijable	UKUPNO (N=325)					MUŠKARCI (N=83)		ŽENE (N=242)		t-test
	N	Min	Max	X	SD	X	SD	X	SD	p
dob (god)	325	80	101	88,28	3,49	88,42	3,73	88,24	3,42	0,684
visina (mm)	325	1330	1920	1562,97	95,50	1680,70	74,60	1522,59	62,91	<b>0,000</b>
visina koljena (mm)	324	400	617	495,40	33,12	530,94	26,42	483,17	25,50	<b>0,000</b>
tezina (kg)	325	30,50	110,50	67,63	14,11	77,32	13,28	64,31	12,82	<b>0,000</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	325	14,43	44,39	27,59	4,79	27,36	4,37	27,66	4,94	0,625
ops_struk (mm)	311	690	1300	939,55	113,20	1000,96	111,08	918,99	106,47	<b>0,000</b>
ops_bok (mm)	299	790	1392	1060,58	93,42	1054,33	73,47	1062,71	99,36	0,436
struk_bok omjer	299	0,72	1,15	0,89	0,07	0,95	0,07	0,87	0,06	<b>0,000</b>
ops_nadl (mm)	325	171	378	273,90	34,65	271,61	30,06	274,69	36,11	0,487
ops_potkolj (mm)	324	213	481	346,27	38,03	351,30	35,96	344,54	38,64	0,163
kn_triceps (0,1 mm)	324	24	483	157,53	76,60	106,24	57,41	175,19	74,48	<b>0,000</b>
kn_subskap (0,1 mm)	322	50	510	179,09	79,61	183,10	73,80	177,74	81,57	0,601
sirina_lakta (mm)	323	51	81	65,70	5,71	71,53	4,01	63,69	4,74	<b>0,000</b>
sistol_tlak (mm Hg)	323	55	195	136,46	23,26	133,90	23,95	137,32	23,01	0,251
dijast_tlak (mm Hg)	324	45	115	72,69	12,15	70,79	11,61	73,33	12,29	0,103
puls (mm Hg)	323	10	115	63,89	20,00	63,11	21,50	64,15	19,50	0,685
glukoza (mmol/L)	322	2,81	21,01	6,97	2,79	7,44	2,94	6,80	2,72	0,071
uk_kolest (mmol/L)	322	2,30	8,70	5,47	1,13	4,80	0,91	5,70	1,10	<b>0,000</b>
hdl_kolest (mmol/L)	322	0,60	2,62	1,38	0,35	1,23	0,32	1,43	0,35	<b>0,000</b>
ldl_kolest (mmol/L)	321	1,19	5,92	3,35	0,93	2,95	0,77	3,48	0,94	<b>0,000</b>
trigliceridi (mmol/L)	321	0,50	5,40	1,63	0,86	1,36	0,64	1,72	0,91	<b>0,000</b>
indeks_at	321	0,80	5,50	2,55	0,86	2,53	0,87	2,56	0,85	0,840
vit_B12 (nmol/L)	115	78	1349	301,57	201,07	272,08	119,02	317,31	232,59	0,252
željezo (μmol/L)	322	2	38	13,67	5,91	15,10	7,00	13,17	5,41	<b>0,024</b>

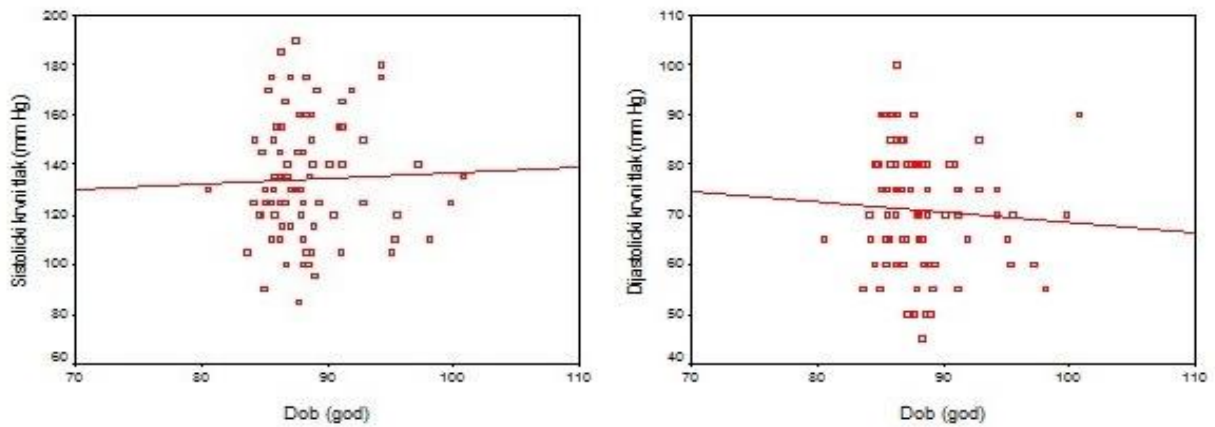
Tablica 4.2. Kvantitativne varijable u osoba <90 god i ≥90 god testirane t-testom. Statistički značajne razlike (p<0,05) otisnute su masnim slovima.

Varijable	SVI					MUŠKARCI					ŽENE				
	<90 god (N=248)	≥90 (N=77)	t-value	df	p	<90 (N=63)	≥90 (N=20)	t-value	df	p	<90 (N=185)	≥90 (N=57)	t-value	df	p
visina (mm)	1573,60	1528,71	3,671	323	<b>0,000</b>	1691,71	1646,00	2,460	81	<b>0,016</b>	1533,38	1487,56	5,046	240	<b>0,000</b>
vis_kolj (mm)	497,92	487,34	2,467	322	<b>0,014</b>	534,84	518,65	2,460	81	<b>0,016</b>	485,28	476,35	2,330	239	<b>0,021</b>
težina (kg)	69,56	61,44	4,541	323	<b>0,000</b>	78,76	72,78	1,776	81	0,079	66,42	57,46	4,826	240	<b>0,000</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28,03	26,17	3,001	323	<b>0,003</b>	27,50	26,92	0,516	81	0,608	28,20	25,91	3,124	240	<b>0,002</b>
ops_struk (mm)	947,54	913,00	2,285	309	<b>0,023</b>	1007,12	980,44	0,892	76	0,375	927,58	890,52	2,262	231	<b>0,025</b>
ops_bok (mm)	1071,98	1023,97	3,869	297	<b>0,000</b>	1054,03	1055,28	-0,062	74	0,950	1078,10	1013,34	4,303	221	<b>0,000</b>
WaistHip	0,89	0,89	-0,305	297	0,761	0,95	0,93	1,261	74	0,211	0,86	0,88	-1,366	221	0,173
ops_nadl (mm)	278,90	257,79	4,828	323	<b>0,000</b>	274,13	263,70	1,358	81	0,178	280,53	255,72	4,732	240	<b>0,000</b>
ops_potkolj (mm)	349,23	336,64	2,544	322	<b>0,011</b>	353,13	345,55	0,819	81	0,415	347,90	333,46	2,475	239	<b>0,014</b>
kn_tric (0,1 mm)	165,05	132,99	3,239	322	<b>0,001</b>	106,57	105,20	0,093	81	0,927	184,96	142,91	3,804	239	<b>0,000</b>
kn_sbsk (0,1 mm)	186,17	156,14	2,908	320	<b>0,004</b>	184,98	177,35	0,399	79	0,691	186,57	148,57	3,109	239	<b>0,002</b>
sir_lakta (mm)	66,18	64,16	2,726	321	<b>0,007</b>	71,83	70,60	1,195	81	0,236	64,24	61,86	3,370	238	<b>0,001</b>
sistol (mm Hg)	136,23	137,17	-0,306	321	0,760	132,62	138,16	-0,882	80	0,380	137,47	136,84	0,180	239	0,857
dijastol (mm Hg)	72,86	72,11	0,475	322	0,635	70,79	70,79	0,001	80	0,999	73,57	72,54	0,549	240	0,583
puls (mm Hg)	63,52	65,07	-0,588	321	0,557	61,83	67,37	-0,985	80	0,328	64,10	64,30	-0,066	239	0,948
glukoza (mmol/L)	6,99	6,90	0,247	320	0,805	7,57	7,04	0,706	81	0,482	6,79	6,85	-0,146	237	0,884
kolesterol (mmol/L)	5,49	5,40	0,636	320	0,525	4,88	4,57	1,348	81	0,181	5,70	5,69	0,049	237	0,961
HDL (mmol/L)	1,36	1,43	-1,423	320	0,156	1,22	1,28	-0,675	81	0,501	1,41	1,48	-1,146	237	0,255
LDL (mmol/L)	3,37	3,32	0,309	319	0,758	3,01	2,76	1,268	81	0,208	3,47	3,52	-0,291	236	0,771
trigliceridi (mmol/L)	1,69	1,43	2,65	319	<b>0,009</b>	1,43	1,16	1,649	81	0,103	1,78	1,53	2,099	236	<b>0,038</b>
indeks_at	2,58	2,45	1,182	319	0,238	2,63	2,22	2,438	81	<b>0,018</b>	2,56	2,53	0,255	236	0,799
vit B12 (nmol/L)	277,39	337,85	-1,408	113	0,164	271,74	272,77	-0,025	38	0,980	281,02	363,48	-1,423	73	0,162
željezo (μmol/L)	13,56	14,03	-0,605	320	0,546	14,40	17,30	-1,633	81	0,106	13,27	12,86	0,497	237	0,620

Tablica 4.3. Kvantitativne varijable u hipertenzivnih i normotenzivnih osoba testirane t-testom. Kod osoba okarakteriziranih kao hipertenzivne, utvrđena je prisutnost jednog ili više svojstava; sistolički tlak >140 mm Hg i/ili dijastolički tlak >90 mm Hg i/ili prethodno dijagnosticirana hipertenzija odnosno uzimanje antihipertenziva. Statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) otisnute su masnim slovima.

Varijable	SVI					MUŠKARCI					ŽENE				
	ZDRAVI (N=112)	HT (N=212)	t-value	df	p	ZDRAVI (N=34)	HT (N=48)	t-value	df	p	ZDRAVI (N=78)	HT (N=164)	t-value	df	p
deci_dob (god)	88,29	88,26	0,076	322	0,940	87,88	88,71	-0,992	80	0,324	88,47	88,13	0,725	240	0,469
visina (mm)	1564,36	1561,90	0,220	322	0,826	1661,88	1695,02	-2,011	80	<b>0,048</b>	1521,85	1522,94	-0,126	240	0,900
vis_kolj (mm)	497,43	494,13	0,853	321	0,394	529,53	531,79	-0,378	80	0,707	483,44	483,04	0,113	239	0,910
težina (kg)	67,57	67,62	-0,035	322	0,972	78,09	76,78	0,433	80	0,666	62,98	64,94	-1,114	240	0,266
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,49	27,63	-0,254	322	0,800	28,39	26,61	1,839	80	0,070	27,10	27,93	-1,231	240	0,219
ops_struk (mm)	946,66	935,37	0,831	308	0,407	1026,72	981,56	1,774	75	0,080	911,56	922,38	-0,718	231	0,473
ops_bok (mm)	1049,94	1065,62	-1,357	296	0,176	1050,60	1056,24	-0,322	73	0,748	1049,64	1068,32	-1,289	221	0,199
WaistHip	0,90	0,88	2,123	296	<b>0,035</b>	0,97	0,93	2,612	73	<b>0,011</b>	0,86	0,87	-0,034	221	0,973
ops_nadl (mm)	272,46	274,59	-0,526	322	0,599	275,47	268,50	1,031	80	0,306	271,14	276,37	-1,053	240	0,293
ops_potk (mm)	344,77	347,09	-0,521	321	0,603	355,62	345,48	0,880	80	0,382	339,97	346,69	-1,259	239	0,209
kn_tric (0,1 mm)	151,34	160,65	-1,035	321	0,301	113,09	99,79	1,039	80	0,302	168,23	178,46	-0,664	239	0,321
kn_sbsk (0,1 mm)	178,93	179,29	-0,039	319	0,969	192,94	177,17	0,931	78	0,355	173,10	179,91	-0,604	239	0,547
sir_lakta (mm)	65,98	65,54	0,659	320	0,510	71,32	71,73	-0,448	80	0,656	63,62	63,72	-0,144	238	0,886
sistol (mm Hg)	122,46	143,89	-10,36	321	<b>0,000</b>	120,29	143,54	-5,358	80	<b>0,000</b>	123,40	143,99	-8,749	239	<b>0,000</b>
dijastol (mm Hg)	69,15	74,55	-4,236	322	<b>0,000</b>	68,53	72,40	-1,497	80	0,138	69,42	75,18	-3,895	240	<b>0,000</b>
puls (mm Hg)	53,30	69,50	-8,359	321	<b>0,000</b>	51,76	71,15	-4,807	80	<b>0,000</b>	53,97	69,02	-6,737	239	<b>0,000</b>
glukoza (mmol/L)	6,98	6,95	0,087	319	0,931	7,69	7,23	0,686	80	0,495	6,66	6,87	-0,533	237	0,595
kolesterol (mmol/L)	5,32	5,55	-1,691	319	0,092	4,58	4,95	-1,851	80	0,068	5,65	5,72	-0,462	237	0,645
HDL (mmol/L)	1,34	1,40	-1,313	319	0,190	1,23	1,24	-0,101	80	0,920	1,39	1,44	-1,074	237	0,284
LDL (mmol/L)	3,22	3,41	-1,776	318	0,077	2,78	3,07	-1,672	80	0,098	3,42	3,52	-0,784	236	0,434
trigliceridi (mmol/L)	1,68	1,60	0,740	318	0,460	1,26	1,42	-1,075	80	0,285	1,86	1,66	1,607	236	0,109
indeks_at	2,53	2,56	-0,326	318	0,745	2,42	2,61	-0,964	80	0,338	2,58	2,55	0,242	236	0,809
vit B12 (nmol/L)	314,89	297,94	0,417	112	0,678	291,29	267,96	-0,590	37	0,559	329,91	312,08	0,300	73	0,765
željezo (μmol/L)	13,50	13,69	-0,277	319	0,782	14,44	15,27	-0,537	80	0,593	13,08	13,22	-0,184	237	0,854

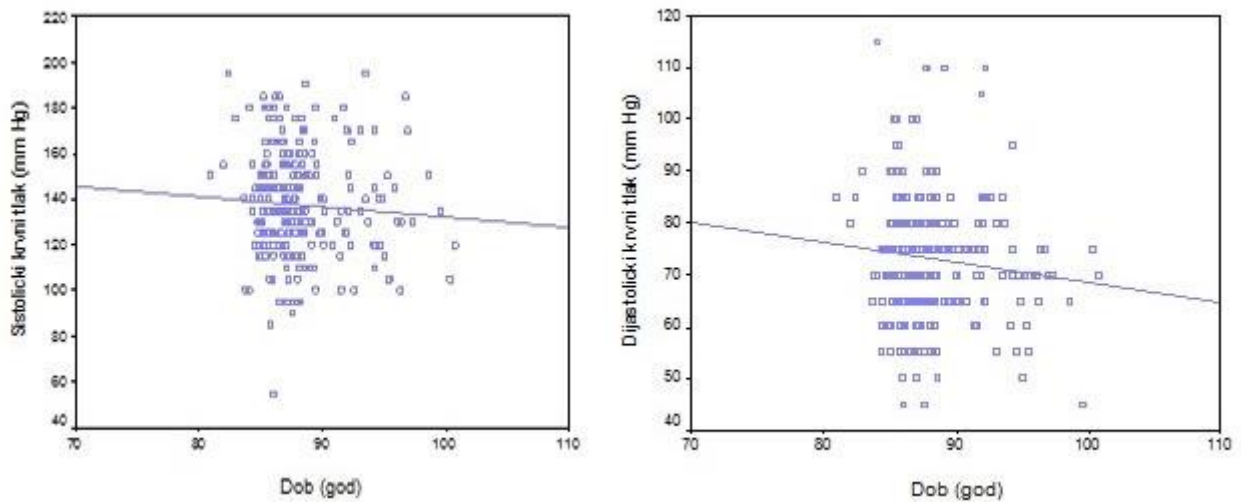
Slika 4.1. Odnos vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka i dobi prikazan za muškarce stare 80 i više godina.



$$r^2 = 0,001 ; r = 0,034 ; p = 0,382 ; y_{SIST} = 114,788 + 0,216x$$

$$r^2 = 0,004 ; r = -0,063 ; p = 0,286 ; y_{DIIA} = 88,254 - 0,198x$$

Slika 4.2. Odnos vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka i dobi prikazan za žene stare 80 i više godina.



$$r^2 = 0,004 ; r = -0,066 ; p = 0,155 ; y_{SIST} = 176,357 - 0,442x$$

$$r^2 = 0,011 ; r = -0,106 ; p = 0,050 ; y_{DIIA} = 107,066 - 0,382x$$

Tablica 4.4. Učestalost kardiovaskularnih čimbenika rizika u ukupnom uzorku i u uzorku osoba mlađih i starijih od 90 godina. Spolne razlike testirane su  $\chi^2$  – testom, a statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (\*). Fenotipovi osjenčani tamnije češći su kod muškaraca, dok su svi ostali češći kod žena. U zadnjem stupcu, razlike su testirane za svaki spol zasebno i u sva 4 statistički značajna rezultata, veća učestalost testiranog čimbenika rizika za KVB pronađena je u ženskih osoba <90 godina.

	svi (N= 325)	<90 god (N=248)	≥90 god (N=77)	p (<90 vs ≥90 god)
HT (BP>140/90 i/ili lijek) (%)	65,4	66,1	63,2	ns
BMI≥25 (%)	68	72,2*	54,5	***
BMI≥30 (%)	28,3*	32,7*	14,3	**
struk_eu (%)	81,0*	82,8**	75	ns
struk/bok_K (%)	91,6	92,5	93	ns
sumakn_K (iznad 66. percentila) (%)	33,9***	39,0***	17,1	***
puls > 40 (%)	85,8*	85,1*	88,2	ns
pušači (%)	3,4	4,5	0	ns
glukoza ≥ 6,4 (%)	42,2*	40,2*	48,7	ns
kolesterol ≥ 5 (%)	65,5 ***	66,3***	63,2*	ns
HDL ≤1 (M); ≤1,2 (Ž) (%)	25,2	25,6	23,7	ns
LDL ≥3 (%)	61,7 ***	61,6**	61,8**	ns
trigliceridi ≥1,7 (%)	38,8 **	42,3**	27,6	*
vit B12 <148 (%), N=115	13,9	10,1	19,6	ns
preboljeli inzult (%)	10,2	11,3	6,5	ns
infarkt (%)	4,3	3,6	6,5	ns
angina (%)	4	4,8	1,3	ns
cvd razno (%)	45,8	47,6	40,3	ns

\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001

Tablica 4.5. Žene – korelacijska matrica dobi, indeksa tjelesne mase, opsega struka, omjera struk/bokovi, sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka, razlike između sistoličkog i dijastoličkog tlaka te indeksa lipida s biokemijskim i antropometrijskim pokazateljima zdravstvenog statusa osoba duboke dobi (80+ godina). Značajne korelacije ( $p < 0,05$ ) otisnute su masnim slovima.

	dob	BMI	ops_str	WaistHip	sist	dijast	puls	ind_at
dob	1,0000	-0,2613	-0,1773	0,1074	-0,0658	-0,1062	-0,0119	-0,0365
p	,	<b>0,000</b>	<b>0,007</b>	0,110	0,309	0,099	0,855	0,575
visina	-0,2646	0,0743	0,0809	-0,1872	0,0626	0,0611	0,0334	-0,1111
p	<b>0,000</b>	0,250	0,219	<b>0,005</b>	0,333	0,344	0,606	0,087
vis_kolj	-0,0940	0,1370	0,1751	0,0384	0,0298	0,0256	0,0112	-0,0819
p	0,146	<b>0,034</b>	<b>0,007</b>	0,570	0,646	0,692	0,863	0,209
težina	-0,3400	0,9101	0,7777	0,1519	0,1491	0,1435	0,0886	0,1249
p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,023</b>	<b>0,021</b>	<b>0,026</b>	0,171	0,054
BMI	-0,2613	1,0000	0,8322	0,2458	0,1467	0,1374	0,0910	0,1958
p	<b>0,000</b>	,	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,023</b>	<b>0,033</b>	0,159	<b>0,002</b>
ops_struk	-0,1773	0,8322	1,0000	0,5683	0,0544	0,0618	0,0242	0,2691
p	<b>0,007</b>	<b>0,000</b>	,	<b>0,000</b>	0,410	0,348	0,714	<b>0,000</b>
ops_bok	-0,3112	0,8676	0,8126	-0,0143	0,0752	0,0901	0,0305	0,1429
p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,831	0,265	0,180	0,652	<b>0,035</b>
WaistHip	0,1074	0,2458	0,5683	1,0000	0,0069	-0,0789	0,0577	0,2229
p	0,110	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	,	0,919	0,241	0,393	<b>0,001</b>
ops_nadl	-0,3479	0,8528	0,7430	0,2094	0,1383	0,1034	0,0982	0,1563
p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,032</b>	0,109	0,128	<b>0,016</b>
ops_potkolj	-0,2245	0,7638	0,5360	-0,0102	0,1297	0,0783	0,1135	-0,0023
p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,880	<b>0,045</b>	0,226	0,079	0,972
kn_tric	-0,2779	0,6382	0,5362	0,1263	0,2219	0,0936	0,2001	0,1879
p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,060	<b>0,001</b>	0,148	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>
kn_subskap	-0,2486	0,6614	0,6577	0,2307	0,1695	0,0980	0,1334	0,1568
p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,009</b>	0,129	<b>0,039</b>	<b>0,016</b>
suma_kn	-0,2970	0,7355	0,6813	0,2053	0,2200	0,1086	0,1868	0,1945
p	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	0,092	<b>0,004</b>	<b>0,003</b>
sir_lakta	-0,1614	0,3468	0,3344	0,0886	0,1141	0,0616	0,0944	-0,0430
p	<b>0,012</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,188	0,078	0,342	0,146	0,511
sistol	-0,0658	0,1467	0,0544	0,0069	1,0000	0,5311	0,8510	-0,0153
p	0,309	<b>0,023</b>	0,410	0,919	,	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,815
dijastol	-0,1062	0,1374	0,0618	-0,0789	0,5311	1,0000	0,0071	0,0069
p	0,099	<b>0,033</b>	0,348	0,241	<b>0,000</b>	,	0,913	0,915
puls	-0,0119	0,0910	0,0242	0,0577	0,8510	0,0071	1,0000	-0,0269
p	0,855	0,159	0,714	0,393	<b>0,000</b>	0,913	,	0,680
glukoza	-0,0038	0,1482	0,2281	0,1288	-0,0077	-0,0816	0,0390	0,0648
p	0,954	<b>0,022</b>	<b>0,000</b>	0,056	0,906	0,209	0,549	0,319
kolesterol	0,0029	0,1883	0,1708	0,0969	0,1013	0,1978	-0,0186	0,5789
p	0,965	<b>0,003</b>	<b>0,009</b>	0,152	0,119	<b>0,002</b>	0,775	<b>0,000</b>

	dob	BMI	ops_str	WaistHip	sist	dijast	puls	ind_at
HDL_kolest	0,1196	-0,1447	-0,2294	-0,2070	0,0622	0,1465	-0,0282	-0,5527
p	0,065	<b>0,025</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	0,339	<b>0,024</b>	0,665	<b>0,000</b>
LDL_kolest	0,0241	0,1364	0,1439	0,0883	0,0659	0,1563	-0,0328	0,7203
p	0,712	<b>0,035</b>	<b>0,029</b>	0,193	0,313	<b>0,016</b>	0,615	<b>0,000</b>
trigliceridi	-0,1405	0,3223	0,3255	0,2299	0,0638	0,0497	0,0436	0,3657
p	<b>0,030</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	0,328	0,446	0,504	<b>0,000</b>
indeks_at	-0,0365	0,1958	0,2691	0,2229	-0,0153	0,0069	-0,0269	1,0000
p	0,575	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	0,815	0,915	0,680	,
željezo	-0,0509	0,0594	-0,0576	-0,1386	0,0003	0,0279	-0,0330	-0,0671
p	0,434	0,361	0,384	<b>0,040</b>	0,997	0,668	0,613	0,303
vit B12	0,1920	0,1163	0,1296	0,0215	-0,0501	0,0219	-0,0720	-0,0961
p	0,099	0,321	0,281	0,861	0,670	0,852	0,539	0,415



Tablica 4.6. Muškarci – korelacijska matrica dobi, indeksa tjelesne mase, opsega struka, omjera struk/bokovi, sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka, razlike između sistoličkog i dijastoličkog tlaka te indeksa lipida s biokemijskim i antropometrijskim pokazateljima zdravstvenog statusa osoba duboke dobi (80+ godina). Značajne korelacije ( $p \leq 0,05$ ) otisnute su masnim slovima.

	dob	BMI	ops_str	WaistHip	sist	dijast	puls	ind_at
dob	1,0000	-0,1492	-0,1544	-0,1634	0,0336	-0,0634	0,0717	-0,1830
p	,	0,178	0,177	0,158	0,764	0,572	0,522	0,098
visina	-0,2907	-0,1241	0,0959	-0,0182	0,1137	0,0855	0,0805	0,2986
p	<b>0,008</b>	0,264	0,403	0,876	0,309	0,445	0,472	<b>0,006</b>
vis_kolj	-0,2167	0,0850	0,2501	0,1244	-0,0492	-0,1088	0,0039	0,3398
p	<b>0,049</b>	0,445	<b>0,027</b>	0,284	0,660	0,330	0,972	<b>0,002</b>
težina	-0,2871	0,8461	0,8327	0,4215	0,0387	0,1915	-0,0603	0,3523
p	<b>0,009</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,730	0,085	0,590	<b>0,001</b>
BMI	-0,1492	1,0000	0,8573	0,4808	-0,0323	0,1653	-0,1252	0,2046
p	0,178	,	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,773	0,138	0,262	0,064
ops_struk	-0,1544	0,8573	1,0000	0,7779	-0,0202	0,1278	-0,0917	0,3141
p	0,177	<b>0,000</b>	,	<b>0,000</b>	0,862	0,268	0,428	<b>0,005</b>
ops_bok	-0,0607	0,8284	0,7390	0,1536	0,0147	0,2308	-0,1086	0,2278
p	0,602	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,185	0,900	<b>0,046</b>	0,354	<b>0,048</b>
WaistHip	-0,1634	0,4808	0,7779	1,0000	-0,0266	0,0071	-0,0338	0,2506
p	0,158	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	,	0,821	0,952	0,773	<b>0,029</b>
ops_nadl	-0,2555	0,7983	0,7182	0,3651	0,0146	0,1497	-0,0646	0,3200
p	<b>0,020</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	0,896	0,179	0,564	<b>0,003</b>
ops_potkolj	-0,2050	0,7626	0,6832	0,3580	0,0158	0,1615	-0,0696	0,0284
p	0,063	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	0,888	0,147	0,534	0,799
kn_tric	-0,0135	0,6470	0,6067	0,2915	0,0745	0,2044	-0,0274	0,2184
p	0,903	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,011</b>	0,506	0,065	0,807	<b>0,047</b>
kn_subskap	-0,0872	0,6134	0,5498	0,3001	-0,0246	0,1026	-0,0835	0,1782
p	0,439	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,008</b>	0,828	0,365	0,461	0,111
suma_kn	-0,0644	0,7124	0,6546	0,3378	0,0168	0,1734	-0,0756	0,2231
p	0,568	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	0,883	0,124	0,505	<b>0,045</b>
sir_lakta	-0,2186	0,2616	0,3000	0,1071	-0,0685	-0,1312	-0,0054	0,2218
p	<b>0,047</b>	<b>0,017</b>	<b>0,008</b>	0,357	0,541	0,240	0,961	<b>0,044</b>
sistol	0,0336	-0,0323	-0,0202	-0,0266	1,0000	0,4427	0,8748	0,1103
p	0,764	0,773	0,862	0,821	,	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,324
dijastol	-0,0634	0,1653	0,1278	0,0071	0,4427	1,0000	-0,0471	0,0745
p	0,572	0,138	0,268	0,952	<b>0,000</b>	,	0,674	0,506
puls	0,0717	-0,1252	-0,0917	-0,0338	0,8748	-0,0471	1,0000	0,0827
p	0,522	0,262	0,428	0,773	<b>0,000</b>	0,674	,	0,460
glukoza	-0,0443	0,2420	0,2964	0,2206	-0,0455	-0,0666	-0,0147	-0,1313
p	0,691	<b>0,028</b>	<b>0,008</b>	0,056	0,685	0,552	0,896	0,237
kolesterol	-0,2029	0,2213	0,2691	0,2737	0,2459	0,3020	0,1107	0,5243
p	0,066	<b>0,044</b>	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,026</b>	<b>0,006</b>	0,322	<b>0,000</b>

	dob	BMI	ops_str	WaistHip	sist	dijast	puls	ind_at
HDL_kolest	-0,0096	-0,1165	-0,1852	-0,0585	0,0781	0,1820	-0,0113	-0,6033
p	0,931	0,294	0,105	0,616	0,485	0,102	0,920	<b>0,000</b>
LDL_kolest	-0,1779	0,1879	0,2660	0,2396	0,1670	0,2007	0,0776	0,7275
p	0,108	0,089	<b>0,019</b>	<b>0,037</b>	0,134	0,071	0,488	<b>0,000</b>
trigliceridi	-0,1630	0,3298	0,3133	0,2570	0,2332	0,2181	0,1420	0,3779
p	0,141	<b>0,002</b>	<b>0,005</b>	<b>0,025</b>	<b>0,035</b>	<b>0,049</b>	0,203	<b>0,000</b>
indeks_at	-0,1830	0,2046	0,3141	0,2506	0,1103	0,0745	0,0827	1,0000
p	0,098	0,064	<b>0,005</b>	<b>0,029</b>	0,324	0,506	0,460	,
željezo	0,0376	0,0893	-0,0777	-0,1032	0,1028	0,2067	0,0028	-0,1131
p	0,736	0,422	0,499	0,375	0,358	0,062	0,980	0,309
vit B12	-0,1185	-0,2321	-0,1912	-0,0786	0,2376	-0,0164	0,2643	-0,0707
p	0,467	0,149	0,257	0,649	0,145	0,921	0,104	0,665

Tablica 4.7. Potpuni model višestruke regresije (model ENTER) za sistolički krvni tlak kao zavisnu varijablu kod žena dobi 80 i više godina. Nezavisne varijable čine dob te ispitivani biokemijski (LDL i HDL kolesterol, trigliceridi, indeks ateroskleroze i glukoza) i antropometrijski (BMI, opseg struka, bokova i nadlaktice, kožni nabor tricepsa i subskapularno) pokazatelji prehrambenog statusa, dok varijable visina, težina, dijastolički krvni tlak i tlak pulsa nisu ušle u jednadžbu. Značajne korelacije ( $p \leq 0,05$ ) označene su masnim slovima.

	B	Std. Error	t	p
(Constant)	0,04698	0,07448	0,63075	0,52890
Zscore: LDL_kol	0,38159	0,19885	1,91904	0,05637
Zscore: indeks_at	-0,45904	0,24476	-1,87545	0,06215
Zscore: kn_triceps	0,15088	0,08974	1,68133	0,09422
Zscore: kn_subskap	0,11851	0,09020	1,31385	0,19036
Zscore: HDL_kol	-0,21222	0,16993	-1,24887	0,21314
Zscore: ops_nadl	-0,11746	0,12923	-0,90893	0,36446
Zscore: glukoza	-0,06539	0,07355	-0,88912	0,37498
Zscore: dob	-0,05944	0,07096	-0,83767	0,40319
Zscore: ops_bokova	-0,06762	0,12542	-0,53917	0,59036
Zscore: BMI	0,08823	0,16684	0,52882	0,59750
Zscore: ops_struk	0,01341	0,13973	0,09596	0,92364
Zscore: triglic	0,00220	0,07036	0,03125	0,97510

$R = 0,265$ ;  $R^2 = 0,070$ ; Adjusted  $R^2 = 0,016$ ; Std.Error: 0,9133556;  $F(12;205) = 1,294$ ;  $p = 0,224$

Tablica 4.8. Potpuni model višestruke regresije (model ENTER) za dijastolički krvni tlak kao zavisnu varijablu kod žena dobi 80 i više godina. Nezavisne varijable čine dob te ispitivani biokemijski (LDL i HDL kolesterol, trigliceridi, indeks ateroskleroze i glukoza) i antropometrijski (BMI, opseg struka, bokova i nadlaktice, kožni nabor tricepsa i subskapularno) pokazatelji prehrambenog statusa. Varijable visina, težina, sistolički krvni tlak i tlak pulsa nisu ušle u jednadžbu, a značajne korelacije ( $p \leq 0,05$ ) označene su masnim slovima.

	B	Std. Error	t	p
(Constant)	-0,02474	0,07901	-0,31316	0,75448
Zscore: glukoza	-0,18480	0,07814	-2,36516	<b>0,01895</b>
Zscore: LDL_kol	0,49764	0,21131	2,35507	<b>0,01946</b>
Zscore: indeks_at	-0,51168	0,25985	-1,96915	<b>0,05028</b>
Zscore: dob	-0,12308	0,07543	-1,63176	0,10426
Zscore: BMI	0,21267	0,17660	1,20426	0,22987
Zscore: triglic	0,08317	0,07479	1,11205	0,26741
Zscore: HDL_kol	-0,14565	0,18016	-0,80845	0,41976
Zscore: ops_struk	-0,10664	0,14846	-0,71829	0,47339
Zscore: ops_nadl	-0,08161	0,13733	-0,59426	0,55299
Zscore: kn_subskap	0,02081	0,09567	0,21746	0,82806
Zscore: ops_bokova	0,02680	0,13330	0,20103	0,84087
Zscore: kn_triceps	-0,00724	0,09535	-0,07595	0,93953

$R = 0,343$ ;  $R^2 = 0,118$ ; Adjusted  $R^2 = 0,066$ ; Std.Error: 0,9708356;  $F(12;206) = 2,288$ ;  $p = 0,009$

Tablica 4.9. Potpuni model višestruke regresije (model ENTER) za sistolički krvni tlak kao zavisnu varijablu kod muškaraca dobi 80 i više godina. Nezavisne varijable čine dob te ispitivani biokemijski (LDL i HDL kolesterol, trigliceridi, indeks ateroskleroze i glukoza) i antropometrijski (BMI, opseg struka, bokova i nadlaktice, kožni nabor tricepsa i subskapularno) pokazatelji prehrambenog statusa, dok varijable visina, težina, dijastolički krvni tlak i tlak pulsa nisu ušle u jednadžbu. Značajne korelacije ( $p \leq 0,05$ ) označene su masnim slovima.

	B	Std. Error	t	p
(Constant)	0,24253	0,27099	0,89499	0,37426
Zscore: triglic	0,47831	0,20551	2,32744	<b>0,02322</b>
Zscore: BMI	-0,61643	0,37193	-1,65736	0,10250
Zscore: ops_bokova	0,42740	0,29453	1,45110	0,15179
Zscore: HDL_kol	0,52273	0,39440	1,32537	0,18991
Zscore: dob	0,16648	0,13067	1,27409	0,20739
Zscore: kn_subskap	-0,15651	0,17625	-0,88798	0,37798
Zscore: indeks_at	0,46442	0,54693	0,84914	0,39907
Zscore: LDL_kol	-0,25277	0,51166	-0,49401	0,62304
Zscore: kn_triceps	0,09720	0,22759	0,42707	0,67080
Zscore: ops_nadl	0,11050	0,26634	0,41487	0,67967
Zscore: ops_struk	0,07846	0,25877	0,30321	0,76275
Zscore: glukoza	-0,03446	0,13628	-0,25285	0,80122

$R = 0,441$ ;  $R^2 = 0,194$ ; adjusted  $R^2 = 0,038$ ; Std.Error: 1,0275366;  $F(12;62) = 1,246$ ;  $p = 0,274$

Tablica 4.10. Potpuni model višestruke regresije (model ENTER) za dijastolički krvni tlak kao zavisnu varijablu kod muškaraca dobi 80 i više godina. Nezavisne varijable čine dob te ispitivani biokemijski (LDL i HDL kolesterol, trigliceridi, indeks ateroskleroze i glukoza) i antropometrijski (BMI, opseg struka, bokova i nadlaktice, kožni nabor tricepsa i subskapularno) pokazatelji prehrambenog statusa. Varijable visina, težina, sistolički krvni tlak i tlak pulsa nisu ušle u jednadžbu, a značajne korelacije ( $p \leq 0,05$ ) označene su masnim slovima.

	B	Std. Error	t	p
(Constant)	0,41419	0,22400	1,84908	0,06922
Zscore: triglic	0,48013	0,16987	2,82647	<b>0,00633</b>
Zscore: HDL_kol	0,88924	0,32601	2,72768	<b>0,00829</b>
Zscore: ops_bokova	0,41472	0,24346	1,70349	0,09349
Zscore: ops_struk	-0,34252	0,21390	-1,60131	0,11439
Zscore: indeks_at	0,66973	0,45209	1,48142	0,14356
Zscore: BMI	0,37939	0,30744	1,23406	0,22184
Zscore: kn_subskap	-0,16398	0,14569	-1,12554	0,26470
Zscore: glukoza	-0,10877	0,11265	-0,96559	0,33800
Zscore: LDL_kol	-0,39272	0,42293	-0,92855	0,35672
Zscore: dob	-0,04824	0,10801	-0,44660	0,65672
Zscore: ops_nadl	-0,05401	0,22015	-0,24534	0,80700
Zscore: kn_triceps	0,02106	0,18812	0,11193	0,91124

$R = 0,591$ ;  $R^2 = 0,349$ ; adjusted  $R^2 = 0,223$ ; Std. Error: 0,8493463;  $F(12;62) = 2,772$ ;  $p = 0,004$

## 4.2. KVALITATIVNE ANALIZE

### 4.2.1. Učestalost alela i genotipova

Razdioba genotipova i alela za četiri izučavana polimorfizma – *ACE ID*, *MTHFR C667T*, *eNOS VNTR* i *APOE* – prikazana je u Tablicama 4.11. i 4.12. Dani su podaci o broju osoba u uzorku kod kojih je određen genotip pojedinog polimorfizma, dok su u zagradama navedeni udjeli pojedinog genotipa i alela u postocima. Zbog različite uspješnosti laboratorijskog postupka, broj genotipiziranih osoba (N) nije jednak za sve polimorfizme. Prema laboratorijski određenim genotipovima, za svaki je polimorfizam izračunata učestalost alela.

Učestalost D alela u uzorku osoba starih 80 i više godina iznosila je 61,0%, a alela I 39,0% (Tablica 4.11.). Genotip ID utvrđen je kod 36,7% ispitanika, II kod 20,7% ispitanika, dok je genotip DD bio najučestaliji – određen je kod čak 42,7% ispitanika. Razdioba genotipova ovog polimorfizma nije bila u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Kod *eNOS VNTR* polimorfizma, učestalost alela 5 u uzorku iznosila je 79,5%, a učestalost alela 4, 20,5%. Genotip 55 je bio i najučestaliji (65,3%), a slijedili su ga genotip 45, prisutan u 28,4% ispitanika, i genotip 44, prisutan u 6,3% ispitanika (Tablica 4.11.). Distribucija ovog genotipa također nije bila u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom.

Učestalost C alela kod polimorfizma *MTHFR C667T* iznosila je 64,5%, a T alela 35,5%. Heterozigotni genotip CT bio je najučestaliji (45,9%), a slijedili su ga genotipovi CC, pronađen u 41,6% ispitanika, i TT, prisutan u 12,5% ispitanika. Distribucija *MTHFR* genotipova bila je u skladu s Hardy-Weinbergovim očekivanjima.

Što se polimorfizama *APOE* gena tiče, u populaciji osoba dobi 80 i više godina, najzastupljeniji je alel E3 (85,4%), dok su ostali aleli podjednako zastupljeni; E2 7,2%, a E4 7,4% (Tablica 4.12.). Shodno navedenom, genotip E3E3 je i najzastupljeniji u ovoj populaciji, s učestalošću od 73,2%. Nakon njega po učestalosti slijede E3E4 (12,6%) i E2E3 (11,7%), dok su preostali genotipovi zastupljeni svaki u manje od 1% uzorka: E4E4 (0,6%), E2E2 (0,9%) i E4E4 (0,9%). Četvrtina uzorka je bila heterozigotna za *APOE* alele (25,2%). Rezultati Exact – testa pokazali su da su distribucije genotipova u skladu s Hardy-Weinbergovim pretpostavkama.

Tablica 4.11. Učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama *ACE*, *eNOS* i *MTHFR* gena. Podudarnost učestalosti genotipova s očekivanjima Hardy-Weinbergove ravnoteže ispitana je  $\chi^2$  – testom.

Polimorfizam	Genotipovi			Aleli		HWE	
	DD (%)	ID (%)	II (%)	D (%)	I (%)	$\chi^2$	p
<i>ACE</i> ID							
N=300	128 (42,7)	110 (36,7)	62 (20,7)	366 (61,0)	234 (39,0)	15,783	<0,001
<i>eNOS</i> VNTR							
N=320	44 (6,3)	91 (28,4)	209 (65,3)	131 (20,5)	509 (79,5)	5,126	0,024
<i>MTHFR</i> C667T							
N=303	126 (41,6)	139 (45,9)	38 (12,5)	391 (64,5)	215 (35,5)	0,001	0,972

Tablica 4.12. Učestalost genotipova i alela ispitivanog polimorfizma *APOE* gena. Podudarnost učestalosti genotipova s očekivanjima Hardy-Weinbergove ravnoteže ispitano je Exact – testom.

Genotipovi	Izmjerena učestalost		Očekivana učestalost		HWE $\chi^2$ p= 0,751
	N	%	N	%	
E2E2	3	0,92	1,7	0,52	
E2E3	38	11,69	40,13	12,35	
E2E4	3	0,92	3,47	1,07	
E3E3	238	73,23	236,94	72,91	
E3E4	41	12,62	40,98	12,61	
E4E4	2	0,62	1,77	0,55	
Ukupno	325	100	325	100	
Heterozigotnost	82	25,23	84,58	26,03	
Homozigotnost	243	74,77	240,42	73,97	
Aleli					
E2	47	7,23			
E3	555	85,38			
E4	48	7,39			
Ukupno	650	100			



#### 4.2.2. Odnos ispitivanih polimorfizama s čimbenicima kardiovaskularnog rizika

Kako bi se ispitala moguća povezanost ispitivanih polimorfizama s kardiovaskularnim čimbenicima rizika, korištenjem  $\chi^2$ -testa testirane su učestalosti alela i genotipova s negenetičkim čimbenicima rizika, pri čemu su negenetički čimbenici prikazani kao kvalitativne varijable. Granične vrijednosti koje su korištene kao prag iznad kojeg sve vrijednosti predstavljaju povećani rizik oboljenja od kardiovaskularnih bolesti, odabrane su temeljem rezultata brojnih epidemioloških studija.

Osim prema granici rizika za razvoj KVB, neke od kvantitativnih varijabli, poput npr. vrijednosti krvnog tlaka, prikazane su na više načina. Naime, osim standardne definicije hipertenzije (vrijednost sistoličkog krvnog tlaka  $>140$  mmHg i/ili vrijednost dijastoličkog krvnog tlaka  $>90$  mm Hg i/ili terapija antihipertenzivima), u medicinskoj se praksi vrijednosti krvnog tlaka dijele u četiri kategorije: normalan krvni tlak, predhipertenzija, stadij 1 hipertenzije i stadij 2 hipertenzije. Kako je u ovom istraživanju bila namjera ispitati i postoje li neki učinci ispitivanih polimorfizama koji se javljaju samo kod povišenih vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka, no ne i dijastoličkog (i obrnuto), ili pak učinci koji se javljaju samo kod izuzetno visokih vrijednosti krvnog tlaka kao i eventualna protektivna uloga nekih genotipova koja određuje vrlo niske vrijednosti krvnog tlaka, tako je lista testiranih negenetičkih čimbenika rizika proširena. Sumarni rezultati su prikazani u Tablici 4.13., a popis relacija je dan u Tablici 4.14.

Statistički značajnu povezanost s *ACE* I/D polimorfizmom pokazao je opseg struka, a od ostalih antropometrijskih pokazatelja prehranbenog statusa, ustanovljena je povezanost sume kožnih nabora s *eNOS* polimorfizmom i omjera struka i bokova s *APOE* E4 alelom (Tablica 4.13.). E4 alel *APOE* gena pokazao je povezanost i s dobi, a E2 alel istog gena s LDL kolesterolom. Također, *APOE* polimorfizam pokazao je povezanost s dijastoličkim krvnim tlakom, a *MTHFR* polimorfizam sa željezom.

Statistički značajne razlike između alela i genotipova ispitivanih *ACE*, *eNOS*, *MTHFR* i *APOE* polimorfizama i učestalosti javljanja ispitivanih kvalitativnih obilježja s detaljnim opisom relacija prikazane su u Tablici 4.14. Pokazalo se da nositelji I alela *ACE* gena češće imaju opseg struka veći od vrijednosti definiranih kao rizične za pojavu KVB ( $\geq 80$  cm za žene i  $\geq 94$  cm za muškarce) (struk\_eu;  $p=0,019$ ). Shodno tome, osobe s *ACE* DD genotipom češće imaju opseg struka manji od vrijednosti definiranih kao rizične za pojavu KVB ( $< 80$  cm

(Ž) odnosno <94 cm (M)), u odnosu na osobe s II i ID genotipom (struk\_eu; p=0,050). Isti nalaz dobivamo i kada ACE ID genotipove testiramo unutar 3 kategorije za opseg struka (struk\_3k): osobe s ACE DD genotipom češće imaju opseg struka ispod granice rizika za KVB (p=0,019) te istovremeno rjeđe imaju opseg struka u rasponu 80-88cm (za žene), odnosno 94-102 cm (za muškarce), u odnosu na osobe s ID i II genotipom (p=0,004).

Genotip 44 *eNOS* gena pokazao je značajnu povezanost samo sa sumom kožnih nabora većom od 66. percentila (p=0,031).

Alel E4 *APOE* gena pokazao je povezanost s omjerom struka i bokova većim ili jednakim od 0,80 (waist/hip\_ratio; p=0,034): sve osobe s alelom E4 imale su omjer  $\geq 0,80$ . Isti alel pokazao je povezanost i s dobi budući da su sve osobe s E4 alelom bile mlađe od 95 godina (dob\_95; p=0,034). Neki *APOE* genotipovi pokazali su povezanost s vrijednostima dijastoličkog krvnog tlaka: samo su osobe s genotipovima 33, 34 i 44 imale dijastolički krvni tlak iznad 90 mmHg (dija\_90; p=0,033), dok su samo 33 i 44 osobe imale dijastolički krvni tlak iznad 95 mmHg (dija\_95; p=0,005). Još jedan alel *APOE* gena, ovoga puta E2, pokazao je povezanost s vrijednostima LDL kolesterola ispod granice rizika za KVB (LDL\_kol; p=0,047).

Genotipovi *MTHFR* polimorfizma nisu pokazali značajnu povezanost s niti jednim ispitivanim fenotipom, nego je samo alel T *MTHFR* gena (genotipovi CT i TT) pokazao povezanost sa sniženim vrijednostima željeza u krvi (željezo; p=0,030).

Tablica 4.15. daje prikaz povezanosti različitih kombinacija četiriju ispitivanih polimorfizama s ispitivanim negenetičkim čimbenicima rizika za kardiovaskularne bolesti. U prikaz su uključene samo značajne relacije utvrđene na uzorku od barem 5 osoba, a rezultati su prikazani prema rastućim p vrijednostima. Najistaknutija se relacija odnosi na kombinaciju genotipa DD *ACE* gena i 55 *eNOS* gena s pojavom angine pectoris (p=0,004), iako nije pronađena povezanost ovog fenotipa s nijednim pojedinačnim genotipom. S obzirom na rezultate povezanosti predstavljene u Tablici 4.15., napravljen je probir genotipova za multivarijatnu logističku regresiju četiri odabrana fenotipa.

Tablica 4.13. Sumarna tablica rezultata  $\chi^2$  – testa učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama *ACE*, *eNOS*, *MTHFR* i *APOE* gena i negenetičkih čimbenika kardiovaskularnog rizika. Prikazani su samo statistički značajni rezultati ( $p \leq 0,05$ ).

Varijable	<i>ACE</i> ID	<i>ACE</i> D	<i>ACE</i> I	<i>eNOS</i> VNTR	<i>eNOS</i> 4	<i>eNOS</i> 5	<i>MTHFR</i> C667T	<i>MTHFR</i> C	<i>MTHFR</i> T	<i>APOE</i> 152	<i>APOE</i> 290	<i>APOE</i> genotip	E2	E3	E4
	II vs ID vs DD	II vs ID, DD	DD vs ID, II	44 vs 45 vs 55	55 vs 45, 44	44 vs 45, 55	CC vs CT vs TT	TT vs CT, CC	CC vs CT, TT	CC vs CT vs TT	CC vs CT vs TT	22 vs 23 vs 24 vs 33 vs 34 vs 44	22, 23, 24 vs 33, 34, 44	23, 33, 34 vs 22, 24, 44	24, 34, 44 vs 22, 23, 33
HT															
real HT															
spol															
dob_90															
dob_95															<b>0,034</b>
bmi_25															
bmi_30															
bmi_who															
bmi_3k															
bmi_4k															
waist/hip ratio															<b>0,034</b>
struk_3k	<b>0,019</b>		<b>0,004</b>												
struk_eu	<b>0,050</b>		<b>0,019</b>												
suma_kn				<b>0,013</b>		<b>0,031</b>									
sistol_140															
sistol_160															
dija_90										<b>0,017</b>		<b>0,033</b>			
dija_95										<b>0,002</b>		<b>0,005</b>			
pulse_k															
ht120_80															

Varijable	<i>ACE</i> ID	<i>ACE</i> D	<i>ACE</i> I	<i>eNOS</i> VNTR	<i>eNOS</i> 4	<i>eNOS</i> 5	<i>MTHFR</i> C667T	<i>MTHFR</i> C	<i>MTHFR</i> T	<i>APOE</i> 152	<i>APOE</i> 290	<i>APOE</i> genotip	E2	E3	E4
	II vs ID vs DD	II vs ID, DD	DD vs ID, II	44 vs 45 vs 55	55 vs 45, 44	44 vs 45, 55	CC vs CT vs TT	TT vs CT, CC	CC vs CT, TT	CC vs CT vs TT	CC vs CT vs TT	22 vs 23 vs 24 vs 33 vs 34 vs 44	22, 23, 24 vs 33, 34, 44	23, 33, 34 vs 22, 24, 44	24, 34, 44 vs 22, 23, 33
ht140_90															
ht160_95															
ht_3kat															
ht_4kat															
glukoza_2k															
tot_kolesterol															
hdl_kolest															
ldl_kolest													<b>0,047</b>		
triglic															
vit_b12															
željezo									<b>0,030</b>						
inzult															
infarkt															
angina															
inf_ang															
inf_inz															
cvd_razno															

Tablica 4.14. Tablica statistički značajnih razlika ( $p \leq 0,05$ ) utvrđenih  $\chi^2$ -testom između alela i genotipova *ACE*, *eNOS*, *MTHFR* i *APOE* gena i učestalosti javljanja ispitivanih kvalitativnih obilježja s detaljnim opisom relacija.

Br	Tip varijable	Varijabla	N	Alel ili genotip	Opis relacije	$\chi^2$	df	p
1	Antropometrija	struk_3k	30	<i>ACE</i> ID genotip	Osobe s <i>ACE</i> DD genotipom češće imaju opseg struka <80 cm (Ž) odnosno <94 cm (M), u odnosu na osobe s II i ID genotipom	11,747	4	0,019
2	Antropometrija	struk_eu	30	<i>ACE</i> ID genotip	Osobe s <i>ACE</i> DD genotipom češće imaju opseg struka <80 cm (Ž) odnosno <94 cm (M), u odnosu na osobe s II i ID genotipom	5,992	2	0,050
3	Antropometrija	struk_3k	30; 18	<i>ACE</i> I alel	Osobe koje imaju <i>ACE</i> DD genotip najčešće imaju najmanji opseg struka (M<94 cm, Ž<80cm) u odnosu na osobe s II i ID genotipom, a rjeđe imaju srednji opseg struka (Ž=80-88cm, M=94-102 cm)	11,137	2	0,004
4	Antropometrija	struk_eu	141	<i>ACE</i> I alel	Osobe s I alelom (genotipovi ID i II) češće imaju opseg struka veći od europskih standarda (Ž≥80cm, M≥94 cm), u odnosu na osobe koje nemaju I alel (DD genotip)	5,882	1	0,019
5	Antropometrija	suma_kn	10	<i>eNOS</i> VNTR genotip	Osobe s 44 genotipom češće imaju sumu kožnih nabora iznad 66. percentila, u odnosu na osobe s genotipovima 45 i 55	8,734	2	0,013
6	Antropometrija	suma_kn	10	<i>eNOS</i> 5 alel	Osobe s alelom 5 (genotipovi 45 i 55) češće imaju sumu kožnih nabora ispod 66. percentila, u odnosu na osobe koje nemaju alel 5 (genotip 44)	6,070	1	0,031
7	Antropometrija	waist/hip ratio	44	<i>APO</i> E4 alel	Sve osobe s alelom E4 (genotipovi 24, 34, 44) imaju omjer struka i bokova ≥0,80	4,727	1	0,034
8	Biokemija	željezo	38	<i>MTHFR</i> T alel	Kod osoba s T alelom (CT i TT genotipovi) češće su utvrđene snižene vrijednosti željeza (<8 μmol/L kod žena, <11 μmol/L kod muškaraca) za razliku od osoba koje nemaju T alel (CC genotip)	7,044	2	0,030
9	Biokemija	LDL_kol	21	<i>APO</i> E2 alel	Osobe koje imaju E2 alel (genotipovi 22, 23, 24) rjeđe imaju povišen LDL kolesterol	4,127	1	0,047
10	Tlak	dija_90	14	<i>APOE</i> genotip	Samo osobe s genotipovima 33, 34 i 44 imaju dijastolički krvni tlak >90 mm Hg (sve osobe s E2 alelom imaju dijastolički tlak <90 mm Hg, N=309)	12,149	5	0,033
11	Tlak	dija_95	11	<i>APOE</i> genotip	Samo osobe s genotipovima 33 i 44 imaju dijastolički krvni tlak >95 mm Hg	16,638	5	0,005
12	Dob	dob_95	45	<i>APO</i> E4 alel	Sve osobe s E4 alelom (genotipovi 24, 34, 44) mlađe su od 95 godina	4,181	1	0,034

Tablica 4.15. Sumarna tablica statistički značajnih razlika ( $p \leq 0,05$ ) utvrđenih  $\chi^2$  – testom između kombinacije genotipova ispitivana četiri polimorfizma (*ACE*, *eNOS*, *MTHFR* i *APOE*) i učestalosti javljanja ispitivanih kvalitativnih obilježja.

Broj	Geni	Tip varijable	N	Varijabla	Kombinacija genotipova	Opis	$\chi^2$	df	p
1	<i>ACE+ENOS</i>	KVB fenotip	7	Angina pectoris	DD_55	Osobe koje imaju kombinaciju DD_55 češće obolijevaju od angine pectoris (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	9,984	1	0,004
2	<i>ACE+ENOS+APOE</i>	KVB fenotip	7	Angina pectoris	DD55E3	Osobe s DD55E3 kombinacijom češće obolijevaju od angine pectoris (u odnosu na osobe bez DD55E2 kombinacije)	10,16	1	0,004
3	<i>ACE+APOE</i>	antropometrija	29; 18	struk_3k	DD_E3	Osobe s DD_E3 kombinacijom češće imaju opseg struka <80 cm za žene i <94 cm za muškarce, a rjeđe opseg stuka unutar raspona 80-88 cm za žene i 94-102 cm za muškarce (u odnosu na osobe bez DD_E3 kombinacije)	9,922	2	0,007
4	<i>MTHFR+ENOS</i>	antropometrija	5	suma kn	CC_44	Osobe s CC_44 kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	8,925	1	0,008
5	<i>ACE+APOE</i>	spol	17	spol	DD_E2	Sve osobe s DD_E2 kombinacijom su žene (u odnosu na osobe bez DD_E2 kombinacije)	6,461	1	0,008
6	<i>MTHFR+ENOS+APOE</i>	antropometrija	5	suma kn	CC44E3	Osobe s CC44E3 kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	9,05	1	0,008
7	<i>ACE + MTHFR</i>	antropometrija	35	w/h ratio	DD_CC	Osobe s DD_CC kombinacijom rjeđe imaju omjer opsega struka i bokova $\geq 0,80$ (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	7,824	1	0,011
8	<i>ACE+MTHFR+APOE</i>	antropometrija	8	w/h ratio	DDCCE3	Osobe s DDCCE3 kombinacijom češće imaju opseg struka <0,80 (u odnosu na osobe bez DDCCE3 kombinacije)	7,757	1	0,011
9	<i>ACE+MTHFR+ENOS</i>	KVB fenotip	10	cvdrazno	DDTT55	Osobe s DDTT55 kombinacijom rjeđe obolijevaju od KVB (u odnosu na osobe bez DDTT55 kombinacije)	6,485	1	0,012
10	<i>ACE+MTHFR+ENOS+APOE</i>	KVB fenotip	10	cvdrazno	DDTT55E3	Osobe s DDTT55E3 kombinacijom rjeđe obolijevaju od KVB (u odnosu na osobe bez DDTT55E3 kombinacije)	6,424	1	0,012
11	<i>ACE+ENOS</i>	antropometrija	19	suma kn	II_55	Osobe koje imaju kombinaciju II_55 češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	6,334	1	0,017
12	<i>APOE+ENOS</i>	antropometrija	10	suma kn	E3_44	Osobe s E3_44 kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	6,125	1	0,018
13	<i>ACE+MTHFR</i>	dob	41	dob_90	DD_CC	Osobe s DD_CC kombinacijom češće su mlađe od 90 godina (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	5,649	1	0,019

Broj	Geni	Tip varijable	N	Varijabla	Kombinacija	Opis	$\chi^2$	df	p
14	<i>ACE+MTHFR+APOE</i>	dob	41	dob_90	DDCCE3	Osobe s DDCCE3 kombinacijom češće su mlađe od 90 godina (u odnosu na osobe bez DDCCE3 kombinacije)	5,704	1	0,019
15	<i>MTHFR+ENOS</i>	KVB fenotip	6	cvdrazno	TT_55	Osobe s TT_55 kombinacijom rjeđe obolijevaju od KVB (u odnosu na osobe bez TT_55 kombinacije)	5,388	1	0,022
16	<i>ACE+APOE</i>	tlak	0;6	ht_3k	II_E2	Od osoba s II_E2 kombinacijom, nitko nema krvni tlak >160/100 mm Hg, već II_E2 osobe najčešće imaju vrijednosti krvnog tlaka 141-160/91-100 mm Hg (u odnosu na osobe bez II_E2 kombinacije)	7,66	2	0,022
17	<i>MTHFR+ENOS+APOE</i>	KVB fenotip	19	cvdrazno	TT55E3	Osobe s TT55E3 kombinacijom rjeđe obolijevaju od KVB (u odnosu na osobe bez TT55E3 kombinacije)	5,305	1	0,022
18	<i>MTHFR+ENOS</i>	zdravlje	5	lijek_2k	TT_55	Osobe s TT_55 kombinacijom češće ne uzimaju nikakve lijekove (u odnosu na osobe bez TT_55 kombinacije)	6,855	1	0,023
19	<i>ACE+ENOS+APOE</i>	biokemija	8	glukoza_k	DD55E2	Nijedna osoba s DD55E2 kombinacijom nema povišenu razinu glukoze u serumu (u odnosu na osobe bez DD55E2 kombinacije)	5,752	1	0,023
20	<i>MTHFR+ENOS+APOE</i>	zdravlje	5	lijek_2k	TT55E3	Osobe s TT55E3 kombinacijom češće ne piju nikakve lijekove (u odnosu na osobe bez TT55E3 kombinacije)	6,81	1	0,023
21	<i>ACE+ENOS+APOE</i>	antropometrija	18	suma kn	II55E3	Osobe s II55E3 kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	5,38	1	0,026
22	<i>ACE+APOE</i>	antropometrija	29	struk_eu	DD_E3	Osobe s DD_E3 kombinacijom češće imaju opseg struka manji od 80 cm za žene i manji od 94 cm za muškarce (u odnosu na osobe bez DD_E3 kombinacije)	4,861	1	0,030
23	<i>ACE+ENOS+APOE</i>	tlak	9	puls_k	DD55E4	Osobe s DD55E4 kombinacijom rjeđe imaju tlak pulsa >40 mm Hg (u odnosu na osobe bez DD55E4 kombinacije)	5,552	1	0,035
24	<i>ACE+MTHFR</i>	biokemija	17	glukoza_k	DD_TT	Osobe s DD_TT kombinacijom češće imaju razinu glukoze u serumu unutar referentnih vrijednosti (u odnosu na osobe bez DD_TT kombinacije koje su češće hiperglikemične)	4,925	1	0,037
25	<i>ACE+MTHFR+APOE</i>	tlak	43	Ht_160/95	DDCCE3	Osobe s DDCCE3 kombinacijom češće imaju krvni tlak <160/95 mm Hg (u odnosu na osobe bez DDCCE3 kombinacije)	4,576	1	0,038
26	<i>ACE+MTHFR+ENOS+APOE</i>	antropometrija	5	suma kn	IITT55E3	Osobe s IITT55E3 kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	5,021	1	0,039
27	<i>ACE+MTHFR+APOE</i>	antropometrija	5	suma kn	IITTE3	Osobe s IITTE3 kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	4,956	1	0,040
28	<i>MTHFR+APOE</i>	biokemija	14	željezo_k	CC_E3	Osobe s CC_E3 kombinacijom rjeđe imaju koncentraciju željeza u krvi ispod referentnih vrijednosti (u odnosu na osobe bez CC_E3 kombinacije)	6,386	2	0,041

Broj	Geni	Tip varijable	N	Varijabla	Kombinacija	Opis	$\chi^2$	df	p
29	<i>ACE+MTHFR+ENOS</i>	antropometrija	5	suma kn	IIT55	Osobe s IIT55 kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	4,918	1	0,041
30	<i>ACE+MTHFR</i>	antropometrija	5	suma kn	II_TT	Osobe s II_TT kombinacijom češće imaju sumu kožnih nabora u gornjih 34 percentila (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	4,856	1	0,042
31	<i>ACE+MTHFR+ENOS</i>	KVB fenotip	5	inf+ang	DDCC55	Osobe s DDCC55 kombinacijom češće obolijevaju od angine pectoris i infarkta miokarda (u odnosu na osobe bez DDCC55 kombinacije)	4,927	1	0,043
32	<i>ACE+APOE</i>	tlak	0;6	ht_4k	II_E2	Od osoba s II_E2 kombinacijom, nitko nema krvni tlak >160/100 mmHg, II_E2 osobe najčešće imaju vrijednosti krvnog tlaka 141-160/91-100 mm Hg (u odnosu na osobe bez II_E2 kombinacije)	8,123	3	0,044
33	<i>ACE+ENOS+APOE</i>	KVB fenotip	10	inf+ang	DD55E3	Osobe s DD55E3 kombinacijom češće obolijevaju od infarkta miokarda i angine pectoris (u odnosu na osobe bez DD55E3 kombinacije)	4,469	1	0,044
34	<i>ACE+MTHFR+ENOS+APOE</i>	KVB fenotip	5	inf+ang	DDCC55E3	Osobe s DDCC55E3 kombinacijom češće obolijevaju od infarkta miokarda i/ili angine pectoris (u odnosu na osobe bez DDCC55E3 kombinacije)	4,888	1	0,044
35	<i>ACE+ENOS</i>	KVB fenotip	10	inf+ang	DD_55	Osobe koje imaju kombinaciju DD_55 češće obolijevaju od infarkta miokarda i angine pectoris (u odnosu na osobe koje nemaju tu kombinaciju)	4,327	1	0,046
36	<i>MTHFR+APOE</i>	KVB fenotip	7	inzult	CC_E3	Osobe s CC_E3 kombinacijom rjeđe obolijevaju od moždanog infarkta (u odnosu na osobe bez CC_E3 kombinacije)	4,089	1	0,050
37	<i>ACE+MTHFR+ENOS</i>	starost	26	dob_90	DDCC55	Osobe s DDCC55 kombinacijom češće su mlađe od 90 godina (u odnosu na osobe bez DDCC55 kombinacije)	4,104	1	0,053
38	<i>ACE+MTHFR+ENOS+APOE</i>	dob	26	dob_90	DDCC55E3	Osobe s DDCC55E3 kombinacijom češće su mlađe od 90 godina (u odnosu na osobe bez DDCC55E3 kombinacije)	4,138	1	0,053



### 4.2.3. Mješovite kvantitativno-kvalitativne analize: Logistička regresija

U Tablicama 4.16. do 4.23. dan je prikaz rezultata logističke regresije. Analize su provedene za odabrane četiri varijable, pokazatelje dugovječnosti (dob 90+ godina), kardiovaskularnog rizika (hipertenzija (HT) i pretilost izražena pomoću sume kožnih nabora (kn\_66)) te realiziranih kardiovaskularnih bolesti (CVD\_razno). Kod svih navedenih testiranih varijabli odsustvo ispitivanog obilježja ima vrijednost «0», a prisustvo vrijednost «1». Za sve četiri varijable rezultati logističke regresije prikazani su u dvije tablice, od kojih prva daje sumarni pregled svih testiranih modela, dok druga daje detaljan prikaz modela odabranog kao najboljeg. Varijabla "spol" prisutna je u svim testiranim modelima. Nezavisne varijable su testirane i kao kvantitativne i kao kvalitativne te je varijanta koja se pokazala značajnijom korištena u izgradnji drugih modela dotične zavisne varijable.

Rezultati logističke analize za dugovječnost (dob 90+) kao zavisne varijable, prikazani su u Tablici 4.16., a u Tablici 4.17. prikazan je najbolji model. Varijabla "spol" nije bila značajan prediktor u svim modelima. Model koji sadrži spol i kombinaciju genotipova DD\_CC, iako statistički značajan, nije pokazao jaku snagu modela, dok nakon uključivanja antropometrijskih i biokemijskih varijabli, značajno raste snaga modela i postotak varijance koju modeli objašnjavaju. Varijabla visine se pokazala kao najsnažniji prediktor ( $p < 0,001$ ), a u kombinaciji sa spolom ( $p < 0,05$ ), kombinacijom genotipova DD\_CC ( $p < 0,05$ ), varijablama BMI30 ( $p < 0,05$ ) i suma kožnih nabora te glukoza\_k ( $p < 0,05$ ) i željezo ( $p < 0,05$ ), HDL kolesterol i triglic\_k, dobijamo model koji je pokazao da od svih testiranih modela objašnjava i najveći postotak varijance (27,5%). Taj model, broj 50 iz Tablice 4.16., prikazan je zasebno u Tablici 4.17. Prema ovom modelu, prisutnost kombinacije genotipova ACE-DD i MTHFR-CC smanjuje vjerojatnost dostizanja dobi od 90 i više godina (OR 0,194; CI 0,053-0,717) u odnosu na osobe koje nemaju ovu kombinaciju genotipova. Veću šansu dostizanja duboke dobi od 90 i više godina imaju muškarci (OR=0,237; CI 0,077-0,728), osobe koje su niže rastom (OR=0,988; CI 0,982-0,993), osobe koje imaju BMI<30 kg/m<sup>2</sup> (OR=0,340; CI 0,119-0,974) te osobe s većom koncentracijom željeza u krvi (OR=1,068; CI 1,011-1,128) i s vrijednostima glukoze iznad 6,4 mmol/L (OR=2,021; 1,031-3,964).

Tablica 4.18. daje sumarni prikaz modela koji su testirani u svrhu probira prediktorskih varijabli za hipertenziju (varijabla HT) putem logističke regresije. Niti jedan genotip se nije samostalno pokazao značajnim prediktorom za HT, no kombinacija genotipova MTHFR-CT i APOE-E2E3 se pokazala kao najbolja unatoč tome što u

kombinaciji sa spolom objašnjava svega 4,5% varijance (model 8). Među navedenim kombinacijama, najsnažnijim se prediktorom pokazala kombinacija u modelu 50, koja uz spol, dob  $\geq 95$  godina i CT\_E2E3 genotip sadržava BMI te tri lipidne komponente; ukupni kolesterol, HDL i LDL, i glukozu u krvi, iako i ovaj model objašnjava relativno malo varijance — svega 7,4% (Tablica 4.18).

U modelu broj 50, detaljno prikazanom u Tablici 4.19, jedina statistički značajna varijabla je upravo kombinacija genotipova: osobe s CT\_E2E3 kombinacijom imaju čak 5,829 puta (s 95%-tnim intervalom pouzdanosti, CI 1,314-25,867) veću šansu da obole od hipertenzije, u odnosu na osobe koje nemaju navedenu kombinaciju genotipova.

Tablica 4.20 daje sumarni prikaz testiranih modela za varijablu CVD\_razno koja uključuje više bolesti; infarkt miokarda, anginu pectoris i cerebrovaskularni inzult. Rezultati  $\chi^2$ -testa upućivali su na moguću vezu genotipova ACE-DD, MTHFR-TT i eNOS-55 s pojavom kardiovaskularnih bolesti i unatoč tome što se nijedan pojedinačni genotip nije pokazao značajnim prediktorom, kombinacija sva tri genotipa objašnjava 3,9% varijance (model 9). Varijabla BMI, u kombinaciji s DDTT55, dobi i spolom, pokazala se kao najsnažniji prediktor nastupa kardiovaskularnih bolesti, a taj model objašnjava 10,5% varijance (model 28). Kada u prethodni model uključimo dijastolički krvni tlak kao kvantitativnu varijablu, postotak objašnjene varijance raste na 11,6% (model 37).

Prema najboljem modelu (br. 47) osobe s višim vrijednostima BMI-a imaju veću šansu (OR=1,122; CI 1,038-1,214), dok osobe s kombinacijom genotipova DDTT55 imaju manju šansu obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti (OR=0,099; CI 0,012-0,797), što DDTT55 čini zaštitnim čimbenikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Tablica 4.21).

Sumarni prikaz testiranih modela za varijablu kn\_66 kao indikatora pretilosti prikazan je u Tablici 4.22. Spol se u svim modelima pokazao kao prediktivan. U početku se više pojedinačnih genotipova pokazalo dobrim (statistički značajnim) prediktorima pretilosti, no kako su dodavane različite antropometrijske i biokemijske varijable, signifikantnost se uglavnom gubila. Tako se, npr., kombinacija CC44, koja se u početku zajedno sa spolom pokazala prediktornom za čak 10,3% varijance (model 11) izgubila, dok je kombinacija koja je ostala do kraja — IIID\_4455 — u početku objašnjavala samo 8,3% varijance (model 8). Najbolji model (br. 52) objašnjava 21,7% varijance i uz kombinaciju genotipova IIID\_4455 sadrži varijable spol, visinu, sistolički i dijastolički tlak, dob90, glukozu te četiri lipidne

varijable. Prema ovom modelu (Tablica 4.23.), žene imaju veću šansu biti pretile (OR=4,603; CI 1,657-12,789), kao i osobe s IIID\_4455 kombinacijom genotipova (OR=2,021; CI 1,156-3,532) te osobe s povišenom razinom triglicerida u krvi (OR=1,452; CI 1,029-2,050). Dob se pokazala protektivnom: osobe starije od 90 godina imaju manju šansu da postanu pretile (OR=0,310; CI 0,141-0,683), u odnosu na one mlađe od 90 godina.

Tablica 4.24 daje sumarni prikaz rezultata povezanosti ispitivanih polimorfizama s testirane četiri varijable. Kombinacija *ACE-DD* i *MTHFR-CC* genotipova smanjuje šansu doživljenja dobi od 90 i više godina, no istodobno *ACE-DD* genotip, ovoga puta u kombinaciji sa *MTHFR-TT* i *eNOS 55* genotipovima, smanjuje šansu pojave kardiovaskularnih bolesti. Kod osoba koje imaju *ACE II* ili *ID* genotip u kombinaciji s *eNOS 44* ili *55* genotipom, veća je šansa da budu pretile. Genotip *CT MTHFR* gena u kombinaciji s *E2E3* genotipom *APOE* gena kod nositelja povećava šansu pojave hipertenzije.

Tablica 4.16. Sumarni prikaz rezultata logističke regresije za varijablu dobi ( $\geq 90$  god) kao zavisnu varijablu. Obavezna nezavisna varijabla u svim modelima je spol, a masnim slovima su označeni najbolji modeli za svaki broj nezavisnih varijabli kao i statistički značajne varijable.

Broj analize	Obav.	Antropometrija	Biokemija	Tlak	Genotip	Broj nezav. varijabli	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
1	Spol				E3	2	0,002	0,003
2	Spol				CC	2	0,003	0,004
3	Spol				CCE3	2	0,003	0,005
4	Spol				DDE3	2	0,005	0,007
5	Spol				DD	2	0,005	0,008
6	Spol				E4	2	0,011	0,016
7	Spol				DDCC55	2	0,019	0,029
8	Spol				<b>DDCC</b>	<b>2</b>	0,024	0,036
9	Spol				<b>DDCCE3</b>	2	0,024	0,036
10	Spol		željezo_K		<b>DDCC</b>	3	0,023	0,035
11	Spol		kolesterol		<b>DDCC</b>	3	0,024	0,036
12	Spol		LDL		<b>DDCC</b>	3	0,023	0,036
13	Spol			sistol	<b>DDCC</b>	3	0,024	0,036
14	Spol			sist140	<b>DDCC</b>	3	0,026	0,040
15	Spol			dija90	<b>DDCC</b>	3	0,026	0,040
16	Spol		željezo		<b>DDCC</b>	3	0,029	0,044
17	Spol			dijastol	<b>DDCC</b>	3	0,029	0,045
18	Spol		HDL		<b>DDCC</b>	3	0,031	0,048
19	Spol		trigliceridi		<b>DDCC</b>	3	0,037	0,056
20	Spol	struk_eu			<b>DDCC</b>	3	0,038	0,059
21	Spol		<b>triglic_k</b>		<b>DDCC</b>	3	0,040	0,061
22	Spol	<b>suma_kn_k</b>			<b>DDCC</b>	3	0,056	0,085
23	Spol	<b>ops_struk</b>			<b>DDCCE3</b>	3	0,058	0,089
24	Spol	<b>ops_struk</b>			<b>DDCC</b>	3	0,059	0,090
25	Spol	<b>BMI</b>			<b>DDCC</b>	3	0,062	0,094
26	Spol	<b>BMI30</b>			<b>DDCC</b>	3	0,066	0,100
27	Spol	<b>suma_kn</b>			<b>DDCCE3</b>	3	0,076	0,115
28	<b>Spol</b>	<b>visina</b>			DDCC	3	0,090	0,138
29	<b>Spol</b>	<b>visina</b>			DDCCE3	3	0,093	0,142
30	Spol	<b>suma_kn</b>			<b>DDCC</b>	<b>3</b>	0,077	0,177
31	Spol		LDL, HDL		<b>DDCC</b>	4	0,032	0,049
32	Spol		<b>triglic_k,</b> glukoza_k		<b>DDCC</b>	4	0,047	0,071
33	Spol	<b>suma_kn_k</b>	HDL_kat		DDCCE3	4	0,055	0,084
34	Spol	<b>suma_kn_k</b>	triglic_k		<b>DDCCE3</b>	<b>4</b>	0,066	0,100

Broj analize	Obav.	Antropometrija	Biokemija	Tlak	Genotip	Broj nezav. varijabli	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
35	Spol		<b>triglic_k,</b> LDL_k, HDL_k		<b>DDCCE3</b>	5	0,040	0,060
36	Spol		<b>trigliceridi,</b> LDL, HDL		<b>DDCC</b>	5	0,040	0,061
37	Spol		<b>triglic_k,</b> LDL_k, HDL_k		<b>DDCC</b>	5	0,040	0,061
38	Spol		<b>triglic_k,</b> LDL_k, HDL_k, glukoza_k		<b>DDCC</b>	6	0,046	0,070
39	Spol	<b>visina, ops_struk,</b> <b>suma_kn_k</b>	triglic_k, LDL_k, HDL_k		<b>DDCC</b>	7	0,133	0,203
40	<b>Spol</b>	<b>visina, suma_kn</b>	triglic_k, LDL_k, HDL_k		<b>DDCC</b>	7	0,135	0,205
41	<b>Spol</b>	<b>suma_kn, ops_str</b>	triglic_k, LDL_k, HDL_k, željezo		<b>DDCC</b>	8	0,136	0,208
42	<b>Spol</b>	<b>visina,</b> <b>suma_kn_k</b>	<b>triglic_k,</b> LDL_k, HDL_k, <b>željezo</b>		<b>DDCC</b>	8	0,149	0,227
43	<b>Spol</b>	<b>visina, suma_kn</b>	triglic_k, LDL_k, HDL_k, <b>željezo</b>		<b>DDCC</b>	8	0,156	0,237
44	<b>Spol</b>	<b>visina, suma_kn</b>	triglic_k, HDL_k, <b>željezo,</b> <b>glukoza_k</b>		<b>DDCC</b>	8	0,167	0,255
45	<b>Spol</b>	<b>visina, BMI30</b>	<b>triglic_k, HDL,</b> <b>željezo,</b> glukoza_k		<b>DDCC</b>	8	0,171	0,261
46	<b>Spol</b>	<b>visina, ops_struk,</b> <b>suma_kn_k</b>	<b>triglic_k,</b> LDL_k, HDL_k, <b>željezo</b>		<b>DDCC</b>	9	0,15	0,230
47	<b>Spol</b>	<b>visina, ops_struk,</b> <b>suma_kn</b>	triglic_k, LDL_k, HDL_k, <b>željezo</b>		<b>DDCC</b>	9	0,154	0,236
48	<b>Spol</b>	<b>visina, BMI30,</b> ops_struk, suma_kn	triglic_k, HDL, <b>željezo</b>		<b>DDCC</b>	9	0,166	0,255
49	<b>Spol</b>	<b>visina, suma_kn,</b> <b>BMI30</b>	triglic_k, HDL, <b>željezo, glukoza</b>		<b>DDCC</b>	9	0,171	0,261
50	<b>Spol</b>	<b>visina, suma_kn,</b> <b>BMI30</b>	triglic_k, HDL, <b>željezo,</b> <b>glukoza_k</b>		<b>DDCC</b>	9	0,180	0,275

Tablica 4.17. Multivarijantni probir prediktorskih varijabli za dob\_90 putem logističke regresije (Model broj 50 iz Tablice 4.16).

Kodiranje: 1 – osobe mlađe od 90 godina; 2 – osobe dobi 90 i više godina.

Kratice: OR – omjer šanse (engl. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*).

Prediktorske varijable	OR (95% CI)	p
Visina (mm)	– 0,988 (0,982-0,993)	0,0000
Spol (muškarci su referentni)	1.00 0,237 (0,077-0,728)	0,0119
DD_CC (osobe koje nemaju kombinaciju ACE-DD_MTHFR-CC su referentne)	1.00 0,194 (0,053-0,717)	0,0139
Željezo (μmol/L)	– 1,068 (1,011-1,128)	0,0190
Glukoza_K (vrijednosti ≤6,4 mmol/L su referentne)	1.00 2,021 (1,031-3,964)	0,0406
BMI30 (osobe koje imaju BMI <30 kg/m <sup>2</sup> su referentne)	1.00 0,340 (0,119-0,974)	0,0445
Triglic_K (vrijednosti <1,7 mmol/L su referentne)	1.00 0,489 (0,227-1,056)	0,0686
Suma_kn (mm)	– 0,998 (0,995-1,001)	0,1922
HDL kolesterol (mmol/L)	– 1,139 (0,435-2,982)	0,7909

-2 Log Likelihood	242,850
Goodness of Fit	288,456
Cox & Snell – R <sup>2</sup>	0,180
Nagelkerke - R <sup>2</sup>	0,275

Tablica 4.18. Sumarni prikaz rezultata logističke regresije za varijablu hipertenzija (HT) kao zavisnu varijablu. Obavezna nezavisna varijabla u svim modelima je spol, a masnim slovima su označeni najbolji modeli za svaki broj nezavisnih varijabli kao i statistički značajne varijable.

Broj analize	Obav.	Antropometr.	Biokemija	Dob	Genotip	Broj nezav. varijab.	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
1	Spol				E3	2	0,008	0,011
2	Spol				CC	2	0,010	0,013
3	Spol				CT	2	0,009	0,013
4	Spol				DD	2	0,011	0,016
5	Spol				E2	2	0,018	0,024
6	Spol				E2E3	2	0,019	0,026
7	Spol				DD_E2E3	2	0,020	0,028
8	Spol				<b>CT_E2E3</b>	<b>2</b>	0,032	0,045
9	Spol			dob95	E2E3	3	0,023	0,032
10	Spol			dob95	<b>CT_E2E3</b>	<b>3</b>	0,036	0,050
11	Spol		folna	dob95	CT_E2E3	4	0,014	0,019
12	Spol	suma_kn_kat		dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,033	0,046
13	Spol	suma kn		dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,034	0,047
14	Spol		glukoza	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,036	0,049
15	Spol	ops_struk		dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,035	0,049
16	Spol	struk_eu		dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,035	0,049
17	Spol		indeks at	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,036	0,049
18	Spol		trigl_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,036	0,049
19	Spol	BMI30		dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,036	0,050
20	Spol	BMI		dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,037	0,051
21	Spol		glukoza_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,037	0,052
22	Spol		trigliceridi	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,038	0,052
23	Spol		HDL_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,041	0,056
24	Spol		HDL	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,041	0,057
25	Spol	ops_struk	kolesterol		<b>CT_E2E3</b>	4	0,042	0,058
26	Spol		kolest_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,043	0,059
27	Spol		kolesterol	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,045	0,062
28	Spol		LDL	dob95	<b>CT_E2E3</b>	4	0,042	0,062
29	Spol		LDL_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	<b>4</b>	0,047	0,064
30	Spol	ops_struk	HDL	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,039	0,054
31	Spol	ops_struk	trigliceridi	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,039	0,054
32	Spol	suma_kn	kolesterol	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,041	0,057
33	Spol	ops_struk	kolesterol	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,042	0,059
34	Spol	BMI	HDL	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,043	0,059
35	Spol	BMI	kolesterol	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,045	0,062

Broj analize	Obav.	Antropometr.	Biokemija	Dob	Genotip	Broj nezav. varijab.	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
36	Spol	ops_struk	LDL_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,045	0,063
37	Spol	BMI	LDL_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	5	0,047	0,065
38	Spol	ops_struk, suma kn	LDL_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	6	0,047	0,066
39	Spol	ops_struk	LDL_k, HDL	dob95	<b>CT_E2E3</b>	6	0,048	0,067
40	Spol	BMI	kolesterol, glukoza_k, trigl		<b>CT_E2E3</b>	6	0,049	0,067
41	Spol	BMI	LDL_k, glukoza_k,	dob95	<b>CT_E2E3</b>	6	0,049	0,067
42	Spol	BMI	LDL_k, trigl	dob95	<b>CT_E2E3</b>	6	0,050	0,069
43	Spol	BMI	LDL, HDL	dob95	<b>CT_E2E3</b>	6	0,050	0,070
44	Spol	BMI	LDL_k, HDL	dob95	<b>CT_E2E3</b>	6	0,052	0,072
45	Spol	ops_struk	LDL, HDL, trigl	dob95	<b>CT_E2E3</b>	7	0,049	0,068
46	Spol	BMI	LDL_k, HDL, trigl, kolesterol		<b>CT_E2E3</b>	7	0,050	0,069
47	Spol	BMI	LDL, HDL, trigl	dob95	<b>CT_E2E3</b>	7	0,052	0,071
48	Spol	BMI	LDL_k, HDL, kolesterol	dob95	<b>CT_E2E3</b>	7	0,052	0,072
49	Spol	BMI	LDL_k, HDL, trigl, kolesterol, glukoza_k		<b>CT_E2E3</b>	8	0,051	0,072
50	Spol	BMI	LDL_k, HDL, kolesterol, glukoza_k	dob95	<b>CT_E2E3</b>	8	0,053	0,074



Tablica 4.19. Multivarijatni probir prediktorskih varijabli za hipertenziju putem logističke regresije (Model broj 50 iz Tablice 4.18).

Kodiranje: 1 – normalan krvni tlak; 2 – hipertenzija.

Kratice: OR – omjer šanse (engl. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*).

Prediktorske varijable	OR (95% CI)	p
CT_E2E3 (osobe koje nemaju kombinaciju <i>MTHFR</i> -CT_ <i>APOE</i> -E2E3 su referentne)	1.00 5,829 (1,314-25,867)	0,0204
LDL_K (vrijednosti <3 mmol/L su referentne)	1.00 1,525 (0,725-3,210)	0,2663
Dob 95 (mlađi od 95 god. su referentni)	1.00 1,762 (0,639-4,858)	0,2735
HDL (mmol/L)	– 1,568 (0,696-3,536)	0,2779
Spol (muškarci su referentni)	1.00 1,211 (0,665-2,204)	0,5308
Glukoza_K (vrijednosti ≤ 6,4 mmol/L su referentne)	1.00 0,860 (0,517-1,430)	0,5605
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	– 1,014 (0,960-1,072)	0,6133
Kolesterol (mmol/L)	– 1,011 (0,709-1,442)	0,9505

-2 Log Likelihood	366,313
Goodness of Fit	292,911
Cox & Snell - R <sup>2</sup>	0,053
Nagelkerke - R <sup>2</sup>	0,074

Tablica 4.20. Sumarni prikaz rezultata logističke regresije za varijablu CVD\_razno koja uključuje različite kardiovaskularne bolesti (infarkt, anginu, inzult) kao zavisnu varijablu. Obavezna nezavisna varijabla u svim modelima je spol, a masnim slovima su označeni najbolji modeli za svaki broj nezavisnih varijabli kao i statistički značajne varijable.

Broj anal.	Obav.	Antropometr.	Biokemija	Dob	Tlak	Genotip	Broj nezav. varijab.	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
1	Spol					DD	2	0,004	0,005
2	Spol					55	2	0,006	0,007
3	Spol					TT	2	0,007	0,009
4	Spol					TTE3	2	0,009	0,012
5	Spol					DD55	2	0,010	0,013
6	Spol					DDTT	2	0,013	0,017
7	Spol					<b>TT55</b>	2	0,021	0,028
8	Spol					<b>TT55E3</b>	2	0,021	0,028
9	Spol					<b>DDTT55</b>	2	0,029	0,039
10	Spol					<b>DDTT55E3</b>	2	0,029	0,039
11	Spol		glukoza			<b>DDTT55</b>	3	0,029	0,039
12	Spol		HDL			<b>DDTT55</b>	3	0,029	0,039
13	Spol		triglic			<b>DDTT55</b>	3	0,030	0,039
14	Spol		triglic_k			<b>DDTT55</b>	3	0,030	0,040
15	Spol		kolest			<b>DDTT55</b>	3	0,031	0,041
16	Spol		kolest_k			<b>DDTT55</b>	3	0,033	0,044
17	Spol			dob		<b>DDTT55</b>	3	0,034	0,045
18	Spol		HDL_k			<b>DDTT55</b>	3	0,034	0,046
19	Spol			dob90		<b>DDTT55</b>	3	0,035	0,047
20	Spol		glukoza_k			<b>DDTT55</b>	3	0,036	0,048
21	Spol			dob95		<b>DDTT55</b>	3	0,037	0,049
22	Spol		triglic_k	dob95		<b>DDTT55</b>	4	0,037	0,048
23	Spol		glukoza	dob95		<b>DDTT55</b>	4	0,036	0,049
24	Spol		glukoza_k	dob95		<b>DDTT55</b>	4	0,043	0,058
25	Spol	struk_eu		dob95		<b>DDTT55</b>	4	0,051	0,068
26	Spol	<b>suma_kn</b>		dob95		<b>DDTT55</b>	4	0,056	0,074
27	Spol	<b>ops_str</b>		dob95		<b>DDTT55</b>	4	0,063	0,085
28	Spol	<b>BMI</b>		dob95		<b>DDTT55</b>	4	0,078	0,105
29	Spol	visina	glukoza_k	dob95		<b>DDTT55</b>	5	0,045	0,060
30	Spol	<b>suma_kn</b>	trigliceridi	dob95		<b>DDTT55</b>	5	0,052	0,070
31	Spol	<b>ops_str</b>	trigliceridi	dob95		<b>DDTT55</b>	5	0,058	0,077
32	Spol	<b>suma_kn</b>		dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	5	0,061	0,082
33	Spol	<b>ops_str</b>	glukoza	dob95		<b>DDTT55</b>	5	0,064	0,085
34	Spol	<b>BMI</b>	trigliceridi	dob95		<b>DDTT55</b>	5	0,071	0,095
35	Spol	<b>BMI</b>	glukoza	dob95		<b>DDTT55</b>	5	0,075	0,101

Broj anal.	Obav.	Antropometr.	Biokemija	Dob	Tlak	Genotip	Broj nezav. varijab.	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
36	Spol	<b>BMI</b>	glukoza_k	dob95		<b>DDTT55</b>	5	0,077	0,103
37	Spol	<b>BMI</b>		dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	5	0,087	0,116
38	Spol	<b>visina</b>	HDL_k	dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	6	0,049	0,065
39	Spol	suma_kn, visina		dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	6	0,062	0,083
40	Spol	visina, <b>ops_str</b>	glukoza_k	dob95		<b>DDTT55</b>	6	0,066	0,088
41	Spol	<b>BMI</b> , suma_kn	HDL_k	dob95		<b>DDTT55</b>	6	0,079	0,105
42	Spol	<b>BMI</b> , visina	HDL_k	dob95		<b>DDTT55</b>	6	0,081	0,108
43	Spol	<b>BMI</b> , suma_kn		dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	6	0,088	0,117
44	Spol	<b>BMI</b> , visina		dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	6	0,089	0,119
45	Spol	suma_kn, ops_str, visina		dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	7	0,075	0,100
46	Spol	<b>BMI</b> , visina	HDL_k, glukoza	dob95		<b>DDTT55</b>	7	0,078	0,104
47	Spol	suma_kn, visina, <b>BMI</b>		dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	7	0,091	0,121
48	Spol	suma_kn, visina, <b>BMI</b>	trigliceridi	dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	8	0,083	0,111
49	Spol	<b>BMI</b> , visina	HDL_k, glukoza	dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	8	0,088	0,118
50	Spol	suma_kn, visina, <b>BMI</b>	glukoza	dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	8	0,088	0,118
51	Spol	suma_kn, visina, <b>BMI</b>	HDL_k	dob95	dijast	<b>DDTT55</b>	8	0,091	0,121

Tablica 4.21. Multivarijantni probir prediktorskih varijabli za kardiovaskularne bolesti putem logističke regresije (Model broj 47 iz Tablice 4.20).

Kodiranje: 1 – osoba nikada nije bolovala od KVB; 2 – osoba bolovala od KVB.

Kratice: OR – omjer šanse (engl. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*).

Prediktorske varijable	OR (95% CI)	p
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	– 1,122 (1,038-1,214)	0,0040
DDTT55 (osobe koje nemaju kombinaciju ACE-DD_MTHFR-TT_eNOS-55 su referentne)	1.00 0,099 (0,012-0,797)	0,0298
Dijastolički krvni tlak (mmHg)	– 0,984 (0,963-1,005)	0,1418
Visina (mm)	– 1,002 (0,998-1,006)	0,3207
Dob 95 (mlađi od 95 god. su referentni)	1.00 0,616 (0,223-1,700)	0,3495
Suma_kn (mm)	– 0,9993 (0,997-1,002)	0,6081
Spol (muškarci su referentni)	1.00 1,048 (0,433-2,534)	0,9174

-2 Log Likelihood	359,197
Goodness of Fit	275,676
Cox & Snell - R <sup>2</sup>	0,091
Nagelkerke - R <sup>2</sup>	0,121

Tablica 4.22. Sumarni prikaz rezultata logističke regresije za pretilost, izraženu preko vrijednosti 66. percentila sume kožnih nabora tricepsa i subskapularno, kao zavisnu varijablu. Obavezna nezavisna varijabla u svim modelima je spol, a masnim slovima su označeni najbolji modeli za svaki broj nezavisnih varijabli kao i statistički značajne varijable.

Broj anal.	Obav.	Antropometr.	Biokemija	Dob	Tlak	Genotip	Broj nezav. varij.	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
1	<b>Spol</b>					ID	2	0,045	0,062
2	<b>Spol</b>					II44	2	0,045	0,062
3	<b>Spol</b>					ID55	2	0,045	0,062
4	<b>Spol</b>					II+ID	2	0,049	0,068
5	<b>Spol</b>					CC	2	0,053	0,074
6	<b>Spol</b>					II55	2	0,054	0,076
7	<b>Spol</b>					44+55	2	0,056	0,078
8	<b>Spol</b>					<b>IID_4455</b>	2	0,059	0,083
9	<b>Spol</b>					<b>ID44</b>	2	0,060	0,084
10	<b>Spol</b>					44	2	0,062	0,086
11	<b>Spol</b>					<b>CC44</b>	2	0,074	0,103
12	<b>Spol</b>				ht	<b>IID_4455</b>	3	0,059	0,082
13	<b>Spol</b>				ht	<b>CC44</b>	3	0,073	0,101
14	<b>Spol</b>			<b>dob</b>		<b>IID_4455</b>	3	0,100	0,140
15	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	3	0,107	0,150
16	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>		<b>CC44</b>	3	0,113	0,156
17	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>	ht	<b>IID_4455</b>	4	0,106	0,147
18	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>	dijastol	<b>IID_4455</b>	4	0,108	0,151
19	<b>Spol</b>		HDL	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	4	0,109	0,152
20	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>	ht	<b>CC44</b>	4	0,111	0,154
21	<b>Spol</b>		HDL	<b>dob90</b>		<b>CC44</b>	4	0,113	0,156
22	<b>Spol</b>	visina		<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	4	0,112	0,156
23	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>	dijastol	<b>CC44</b>	4	0,115	0,158
24	<b>Spol</b>		LDL	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	4	0,116	0,161
25	<b>Spol</b>		index_at	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	4	0,116	0,161
26	<b>Spol</b>	visina		<b>dob90</b>		<b>CC44</b>	4	0,118	0,164
27	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>	sistol	<b>IID_4455</b>	4	0,118	0,164
28	<b>Spol</b>		<b>kolesterol</b>	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	4	0,120	0,167
29	<b>Spol</b>		<b>glukoza</b>	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	4	0,122	0,170
30	<b>Spol</b>		index_at	<b>dob90</b>		<b>CC44</b>	4	0,124	0,171
31	<b>Spol</b>		LDL	<b>dob90</b>		<b>CC44</b>	4	0,125	0,173
32	<b>Spol</b>			<b>dob90</b>	sistol	<b>CC44</b>	4	0,125	0,173
33	<b>Spol</b>		<b>glukoza</b>	<b>dob90</b>		CC44	4	0,127	0,175
34	<b>Spol</b>		<b>kolesterol</b>	<b>dob90</b>		CC44	4	0,129	0,179
35	<b>Spol</b>		<b>glukoza</b>	<b>dob90</b>	ht	<b>IID_4455</b>	5	0,121	0,168

Broj anal.	Obav.	Antropometr.	Biokemija	Dob	Tlak	Genotip	Broj nezav. varij.	R <sup>2</sup> - Cox	R <sup>2</sup> - Nagel
36	<b>Spol</b>	visina	<b>glukoza</b>	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	5	0,125	0,175
37	<b>Spol</b>		<b>glukoza, kolesterol</b>	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	5	0,133	0,186
38	<b>Spol</b>		<b>glukoza, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	5	0,135	0,189
39	<b>Spol</b>		<b>glukoza, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>		CC44	<b>5</b>	0,140	0,194
40	<b>Spol</b>		<b>glukoza, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	ht	<b>IID_4455</b>	6	0,135	0,188
41	<b>Spol</b>	visina	<b>glukoza, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>		<b>IID_4455</b>	6	0,141	0,196
42	<b>Spol</b>	visina	<b>trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	sistol	<b>IID_4455</b>	6	0,141	0,197
43	<b>Spol</b>		<b>glukoza, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	sistol	<b>IID_4455</b>	<b>6</b>	0,144	0,201
44	<b>Spol</b>		<b>glukoza, kolesterol, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	sistol	<b>IID_4455</b>	7	0,148	0,206
45	<b>Spol</b>	visina	<b>glukoza, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	sistol	<b>IID_4455</b>	<b>7</b>	0,148	0,206
46	<b>Spol</b>		<b>glukoza, kolesterol, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	sistol, dijastol	<b>IID_4455</b>	8	0,148	0,207
47	<b>Spol</b>	visina	<b>glukoza, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	sistol, dijastol	<b>IID_4455</b>	<b>8</b>	0,148	0,207
48	<b>Spol</b>	visina	<b>glukoza, trigliceridi, LDL_K, HDL_K</b>	<b>dob90</b>	ht	<b>IID_4455</b>	9	0,151	0,210
49	<b>Spol</b>	visina	<b>glukoza, kolesterol, trigliceridi</b>	<b>dob90</b>	sistol, dijastol	<b>IID_4455</b>	9	0,152	0,212
50	<b>Spol</b>		<b>glukoza, trigliceridi, HDL, LDL_K</b>	<b>dob90</b>	sistol, dijastol	<b>IID_4455</b>	<b>9</b>	0,153	0,212
51	<b>Spol</b>		<b>glukoza, kolesterol, trigliceridi, HDL, LDL_K</b>	<b>dob90</b>	sistol, dijastol	<b>IID_4455</b>	10	0,153	0,212
52	<b>Spol</b>	visina	<b>glukoza, trigliceridi, LDL_K, HDL_K</b>	<b>dob90</b>	sistol, dijastol	<b>IID_4455</b>	<b>10</b>	0,156	0,217

Tablica 4.23. Multivarijantni probir prediktorskih varijabli za pretilost, izraženu kao vrijednosti iznad 66. percentila sume kožnih nabora tricepsa i subskapularno, putem logističke regresije (Model broj 52 iz Tablice 4.22).

Kodiranje: 1 – osoba čija je suma kožnih nabora ispod 66. percentila; 2 – osoba čije su vrijednosti sume kožnih nabora iznad 66. percentila.

Kratice: OR – omjer šanse (engl. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*).

Prediktorske varijable	OR (95% CI)	p
Spol (muškarci su referentni)	1.00 4,603 (1,657-12,789)	0,0034
Dob90 (osobe koje su mlađe od 90 god su referentne)	1.00 0,310 (0,141-0,683)	0,0036
IID_4455 (osobe koje nemaju kombinaciju ACE-II/ID_eNOS-44/55 su referentne)	1.00 2,021 (1,156-3,532)	0,0136
Trigliceridi (mmol/L)	– 1,452 (1,029-2,050)	0,0337
Glukoza (μmol/L)	– 1,078 (0,978-1,189)	0,1318
LDL_K (vrijednosti <3 mmol/L su referentne)	1.00 1,532 (0,850-2,762)	0,1563
Sistolički krvni tlak (mm Hg)	– 1,008 (0,994-1,022)	0,2554
Visina (mm)	– 1,003 (0,998-1,007)	0,2611
HDL_K (vrijednosti >1,2 mmol/L za žene, odnosno >1,0 mmol/L za muškarce su referentne)	1.00 0,780 (0,390-1,561)	0,4824
Dijastolički krvni tlak (mm Hg)	– 1,000 (0,974-1,027)	0,9766

-2 Log Likelihood	316,945
Goodness of Fit	329,792
Cox & Snell - R <sup>2</sup>	0,156
Nagelkerke - R <sup>2</sup>	0,217

Tablica 4.24. Sumarni prikaz rezultata logističke regresije povezanosti ispitivanih polimorfizama s testiranim fenotipovima: dugovječnost (dob veća ili jednaka 90 godina), čimbenici kardiovaskularnog rizika (hipertenzija i pretilost definirana pomoću sume kožnih nabora iznad 66. percentila) te povijesti oboljenja od kardiovaskularnih bolesti iz zdravstvene ankete.

Fenotip	Kombinacije genotipova	Šansa razvoja fenotipa	Postotak varijance (%) koji objašnjavaju kombinacija genotipova i spol	Postotak varijance (%) koji objašnjava najbolji model za svaki fenotip
dugovječnost	<i>ACE</i> DD u kombinaciji s <i>MTHFR</i> CC genotipom	smanjena	3,6	27,5
pretilost	Genotipovi <i>ACE</i> II i ID u kombinaciji s genotipovima <i>eNOS</i> 44 i 55	povećana	8,3	21,7
KV bolesti	<i>ACE</i> DD genotip u kombinaciji s <i>MTHFR</i> TT i <i>eNOS</i> 55 genotipovima	smanjena	3,9	12,1
hipertenzija	<i>MTHFR</i> CT genotip u kombinaciji s <i>APO</i> E2E3 genotipom	povećana	4,5	7,4



#### 4.2.4. Međupopulacijska usporedba učestalosti alela i genotipova istraživanih polimorfizama

Kako bi se ustanovilo postoji li razlika između učestalosti alela i genotipova polimorfnih gena određenih u ovoj disertaciji (*ACE* I/D, *MTHFR* C667T, *eNOS* VNTR i *APOE*) u populaciji osoba dobi 80 i više godina u odnosu na opću populaciju Republike Hrvatske, te je li ustanovljena razlika prisutna i u drugim europskim populacijama, napravljen je opsežan pregled literaturnih podataka korištenjem elektroničkih baza podataka. Meta-analiza je provedena za *ACE*, *APOE* i *MTHFR* polimorfizme s obzirom da je pronađen dovoljno velik broj podataka o učestalosti alela u općoj populaciji i u segmentu osoba duboke starosti. Budući da je za polimorfizam VNTR gena *eNOS* pronađena samo jedna publikacija koja je odgovarala traženim kriterijima (Alvarez R i sur., 1999 - J Neurol Neurosurg Psychiatry 67: 733-6), za taj polimorfizam nije mogla biti provedena meta-analiza. S obzirom da je najveći broj radova iz kojih su korišteni podaci temeljen na asocijacijskim studijama u kojima su proučavani raznovrsni fenotipovi, uglavnom bolesti, u obzir su uzete samo učestalosti alela kontrolnih skupina. U slučajevima kada je unutar iste populacije pronađeno više studija koje su odgovarale zadanim kriterijim, učestalost testiranih alela dobivena je ponderiranjem pojedinačnih rezultata.

U Tablici 4.25. prikazana je učestalost alela D i I *ACE* gena u Republici Hrvatskoj te u 9 europskih država za koje su bili dostupni podaci za ciljane dobne skupine. Distribucija *ACE* D alela u Republici Hrvatskoj značajno se razlikovala između opće populacije i osoba starih 80 i više godina: učestalost D alela je veća kod starijih osoba (61,1% vs 49,4%,  $p < 0,001$ ) te se DD genotip javlja dvostruko češće kod starijih nego kod mladih osoba ( $p < 0,00001$ ) (Tablica 4.26.). Izvršena je meta-analiza međugeneracijskih razlika svih 10 populacija prikazanih u Tablici 4.25., a rezultati su prikazani na Slici 4.01. U devet od deset populacija, pronađena je veća učestalost D alela kod starijih osoba (80+ god.) u odnosu na opću populaciju, pri čemu se jedinu iznimku predstavljali Španjolci (ukupni OR=1,19; 95%-tni CI 1,08–1,31). S obzirom da su rezultati Cochrane Q testa pokazali nisku heterogenost ( $I^2 < 11\%$ ,  $p = 0,346$ ), podaci su analizirani pomoću modela fiksnog učinka odnosno prema Mantel-Haenszelu, koji je pokazao značajnost efekta  $p < 0,001$ . Korištenjem Beggova ( $p > 0,788$ ) i Eggerova testa ( $p > 0,799$ ), kao i vizualnim pregledom ljevkastog grafičkog prikaza (engl. *funnel plot*), nije utvrđena pristranost u objavljivanju učestalosti alela (Slika 4.02.). Kako bi se provjerilo postoji li, unatoč svim mjerama predostrožnosti, potencijalna studija snažnog (jačeg) utjecaja

koja je utjecala na ukupni OR i značajnost, provedena je meta-analiza utjecaja (engl. *influential analysis*) koja nije prepoznala niti jednu individualnu studiju kao više utjecajnu (Slika 4.03.).

Učestalost alela C i T polimorfizma C667T *MTHFR* gena u Republici Hrvatskoj i 8 europskih populacija za koje su bili dostupni podaci za ciljane dobne skupine prikazana je u Tablici 4.27. U populaciji Republike Hrvatske nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti *MTHFR* C667T genotipova i alela između opće populacije i osoba starih 80 i više godina (Tablica 4.28.). Podaci o učestalosti alela pronađeni pregledom literature u devet europskih populacija testirani su međugeneracijski meta-analizom, a rezultati su prikazani na Slici 4.04. Veća učestalost rizičnog T alela kod starijih (80+ god.) osoba u odnosu na opću populaciju, pronađena je u šest od devet populacija, no prema modelu fiksnog učinka razlike nisu bile statistički značajne (OR=1,03; CI 0,98–1,09,  $I^2 < 27\%$ ,  $p = 0,207$ ). Korištenjem Beggova ( $p > 0,677$ ) i Eggerova testa ( $p > 0,736$ ), kao i vizualnim pregledom ljevkastog grafičkog prikaza nisu nađeni dokazi publikacijske pristranosti (Slika 4.05.). Nije pronađena ni potencijalna studija jačeg utjecaja pomoću meta-analize utjecaja (Slika 4.06.).

U Tablici 4.29. prikazane su učestalosti alela E2, E3 i E4 *APOE* gena u 14 europskih populacija, uključujući populaciju Republike Hrvatske, za koje su bili dostupni podaci za ciljane dobne skupine. Distribucija E2 i E4 alela u Republici Hrvatskoj nije se značajno razlikovala između opće populacije i osoba starih 80 i više godina (Tablica 4.30.). Na Slici 4.07. grafičkim trakastim prikazom su prezentirani rezultati međugeneracijske meta-analize za E2 alel koji je u devet EU populacija češće zastupljen kod osoba starih 80 i više godina nego u općoj populaciji. S obzirom na visoku heterogenost ( $I^2 = 67,1\%$ ) korišten je DerSimonian-Laird model nasumičnog učinka prema kojem je ukupni OR=1,27 (CI 1,11-1,46), a razlika u učestalosti između mlađe i starije generacije je statistički značajna ( $p < 0,00001$ ). Suprotno alelu E2, alel E4 je češće zastupljen u općoj populaciji nego kod starijih osoba (Slika 4.10.). Kako je i u ovoj meta-analizi utvrđen visok stupanj heterogenosti ( $I^2 = 93,7\%$ ), prema DerSimonian-Lairdovom modelu nasumičnog učinka ukupni OR=0,65 (CI 0,51-0,82), a razlike su statistički značajne ( $p < 0,0001$ ). Korištenjem Beggova i Eggerova testa za E2 ( $p_{\text{Begg}} = 0,298$ ,  $p_{\text{Egger}} = 0,337$ ) odnosno E4 alel ( $p_{\text{Begg}} = 0,171$ ,  $p_{\text{Egger}} = 0,806$ ), a niti vizualnim pregledom ljevkastog grafičkog prikaza nisu nađeni dokazi publikacijske pristranosti ni za E2 alel (Slika 4.08.) niti za E4 alel (Slika 4.11.). Nisu pronađene ni potencijalne studije jačeg utjecaja pomoću meta-analize utjecaja za E2 (Slika 4.09.) odnosno E4 alel (Slika 4.12.).

Zaključno, možemo ustvrditi da unatoč tome što usporedba opće populacije i osoba dobi 80 i više godina u Hrvatskoj nije pokazala značajnu razliku, meta-analiza 14 europskih populacija pokazala je signifikantnu razliku u učestalosti i E2 alela i E4 alela između ovih dobnih skupina.

Učestalost genotipova i alela VNTR polimorfizma *eNOS* gena u Republici Hrvatskoj prikazana je u Tablici 4.31. Niti za učestalosti alela niti genotipova nisu pronađene statistički značajne razlike između opće populacije i osoba starih 80 i više godina.

Tablica 4.25. Karakteristike 44 studije uključene u ACE I/D meta-analizu, predstavljene po državama. Podaci o dobi nisu predstavljeni uniformno zbog toga što su različito definirani u različitim studijama: neki autori su preferirali dobni raspon, drugi srednju dob ( $\pm$ SD), a neki su samo izjavili da su ispitanici prešli određenu dob. Studije su podijeljene u dvije grupe: grupa jedan, u kojoj su osobe dobi 18-80 godina, te grupa dva, za one starije od 80 godina (ili ukoliko je srednja dob cijele skupine 80+ god). Svaka studija sastojala se i od žena i od muškaraca. Učestalost svakog genotipa prikazana je u apsolutnom broju.

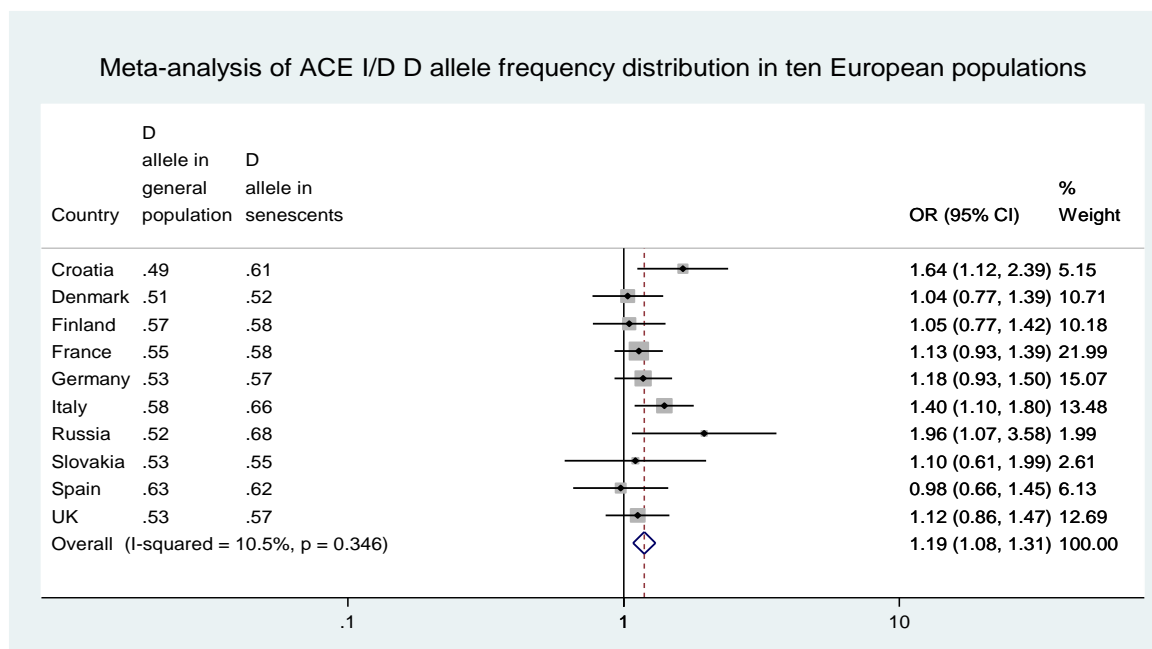
Država	Publikacija	Dob (godine)	Dobna skupina	Veličina uzorka	Spolna distribucija (m/ž)	Karakteristike ispitanika	Učestalost genotipova			Učestalost alela	
							DD	ID	II	D alel	I alel
Danska	Agerholm-Larsen i sur., 1997	43,1 $\pm$ 0,2	1	3191	1737/1454	Opća populacija grada Kopenhagena	nije naznačeno			0,52	0,48
	Bladbjerg i sur., 1999	20-64	1	199	124/75	Zdravi mladi donori krvi	51	102	46	0,51	0,49
	Hadjadj i sur., 2007	44,8 $\pm$ 11,0	1	382	nije naznačeno	EURAGEDIC studija	nije naznačeno			0,51	0,49
	Bladbjerg i sur., 1999	>100	2	185	47/141	Volonteri iz populacije stogodišnjaka	49	95	41	0,52	0,48
Finska	Fuentes i sur., 2002	35-55	1	454	167/288	FINRISK studija	nije naznačeno			0,57	0,43
	Islam i sur., 2006	34,35 $\pm$ 3,16	1	224	121/103	Studija "Cardiovascular Risk in Young Finns Study"	79	106	39	0,59	0,41
	Hadjadj i sur., 2007	44,8 $\pm$ 11,0	1	468	nije naznačeno	EURAGEDIC studija	nije naznačeno			0,56	0,44
	Myllykangas i sur., 2000	>85	2	203	40/163	Vantaa 85+ studija	65	105	33	0,58	0,42
Francuska	Marre i sur., 1997	44,0 $\pm$ 9,0	1	346	180/166	Opća populacija koja ne boluje od dijabetesa	117	154	75	0,56	0,44
	Hadjadj i sur., 2007	44,8 $\pm$ 11,0	1	273	nije naznačeno	EURAGEDIC studija	nije naznačeno			0,54	0,46
	Schachter i sur., 1994	>99	2	338	44/294	Populacija stogodišnjaka	134	148	56	0,62	0,33
	Blanche i sur., 2001	>100	2	560	94/466	Populacija stogodišnjaka	196	261	103	0,58	0,42
	Richard i sur., 2001	>80	2	152	nije naznačeno	Opća populacija	48	67	37	0,54	0,46
Hrvatska	Barbalić i sur., 2004	18-80	1	172	nije naznačeno	Zdrava opća populacija	38	94	40	0,49	0,51
	Ova studija	80-101	2	301	79/222	Populacija iz domova za stare i nemoćne s područja Grada Zagreba i Zg županije	129	110	62	0,61	0,39
Njemačka	Schunkert i sur., 1994	45-59	1	290	149/141	Opća populacija grada Augsburga	nije naznačeno			0,54	0,46

	Busjahn i sur., 1997	34±14	1	139	34/105	91 jednojajčani i 41 dvojajčani blizanac (uključen je po jedan član svakog para)	33	79	37	0,52	0,48
	Mondry i sur., 2005	41,24±12,7	1	719	419/399	Opća populacija grada Weisswassera	193	356	170	0,52	0,48
	Luft i sur., 1999	80+	2	349	nije naznačeno	Populacija grada Berlina starija od 80 godina	118	159	72	0,57	0,43
Italija Italija	Arbustini i sur., 1996	35±13	1	290	210/80	Zdravi donori krvi	120	124	46	0,63	0,37
	Paterna i sur., 2000	37,5±9,3	1	201	74/127	Zdrava kontrola za osobe koje boluju od migrene (bez povijesti KVB)	75	101	25	0,62	0,38
	Di Pasquale i sur., 2003	25-55	1	684	443/241	Zdravi volonteri (bez povijesti KVB)	225	335	124	0,57	0,43
	Paolisso i sur., 2001	>100	2	41	15/26	Zdrava populacija	15	20	6	0,61	0,39
	Panza i sur., 2003	100±2	2	82	20/62	Zdrava populacija iz južne Italije	38	34	10	0,67	0,33
	Nacmias i sur., 2007	102,4±4,6	2	111	23/88	Zdrava kontrola za oboljele od Alzheimerove bolesti (bez neuroloških smetnji)	57	40	14	0,69	0,31
	Corbo i sur., 2008	>77 (82,2±4,8)	2	151	73/78	Zdrave osobe postreproduktivne dobi: LONCILE studija (Salerno, južna Italija)	61	71	19	0,64	0,36
Rusija	Dolgikh i sur., 2001	25-64	1	945	603/342	WHO Monica (populacija Novosibirska)	nije naznačeno			0,52	0,48
	Miloserdova i sur., 2002	34,2±2,37	1	50	nije naznačeno	Nasumični uzorak populacije Moskve	nije naznačeno			0,56	0,44
	Nazarov i sur., 2001	32±10	1	449	269/180	111 studenata sa Sveučilišta u St. Petersburgu i 338 donora krvi (eur. i sibirskog porijekla)	nije naznačeno			0,50	0,50
	Miloserdova i sur., 2002	83,17±3,39	2	50	nije naznačeno	Nasumični uzorak populacije Moskve	nije naznačeno			0,68	0,32
Slovačka	Dankova i sur., 2009	40-60 (49,54)	1	167	45/122	Nasumično odabrani dobrovoljci sa različitih lokaliteta u Slovačkoj	47	82	38	0,53	0,47
	Sivakova i sur., 2009	82,85±2,68	2	61	nije naznačeno	Zdravi dobrovoljci iz različitih regija Slovačke	20	27	14	0,55	0,45
Španjolska	Riera-Fortuny i sur., 2005	60,2±9,5 (35-79 yrs)	1	182	127/55	Zdrava kontrola za koronarnu bolest srca i KVB faktore rizika	67	83	21	0,60	0,40
	Hernandez Ortega i sur., 2002	54±10	1	315	223/92	Nasumično odabrani dobrovoljci s otoka Gran Canaria, bez povijesti KVB	137	132	136	0,64	0,36
	Alia i sur., 2005	44	1	104	46/58	Zdrava kontrola za oboljele od sarkoidoze	34	51	19	0,57	0,43
	Villar i sur., 2007	18-75	1	364	182/182	Nasumično odabrana populacija Kanara (svih sedam otoka)	152	155	57	0,63	0,37

	Alvarez i sur., 1999	>85	2	117	nije naznačeno	Zdrava kontrola za oboljele od Alzheimerove bolesti	43	58	16	0,62	0,38
Velika Britanija	Samani i sur., 1996	20-77	1	537	299/238	Zdrava kontrola za koronarnu bolest srca iz Leicestera (N=237) i Sheffielda (N=300)	158	259	120	0,54	0,46
	Sharma i sur., 1997	41,4±11,9 (19-70)	1	146	59/87	Dobrovoljni davaoci krvi (Regional Blood Transfusion Service)	44	63	39	0,52	0,48
	Garrib i sur., 1998	38,2	1	100	nije naznačeno	Zdrava kontrola za oboljele od sarkoidoze	nije naznačeno			0,53	0,47
	Jackson i sur., 2000	18-65	1	478	nije naznačeno	Dobrovoljni davaoci krvi iz Cambridgea	135	241	102	0,53	0,47
	Galinsky i sur., 1997	>79	2	270	100/170	Populacija grada Cambridgea (longitudinalna studija kognitivnih funkcija i starenja)	87	128	55	0,56	0,44
	Visscher i sur., 2003	80+	2	530	nije naznačeno	Preživjeli sudionici kognitivne studije Scottish Mental Survey iz 1932	185	234	111	0,57	0,43
	Kehoe i sur., 1999	80,8±4,5	2	111	nije naznačeno	Zdrava kontrola za oboljele od Alzheimerove bolesti (iz Londona)	41	48	22	0,59	0,41

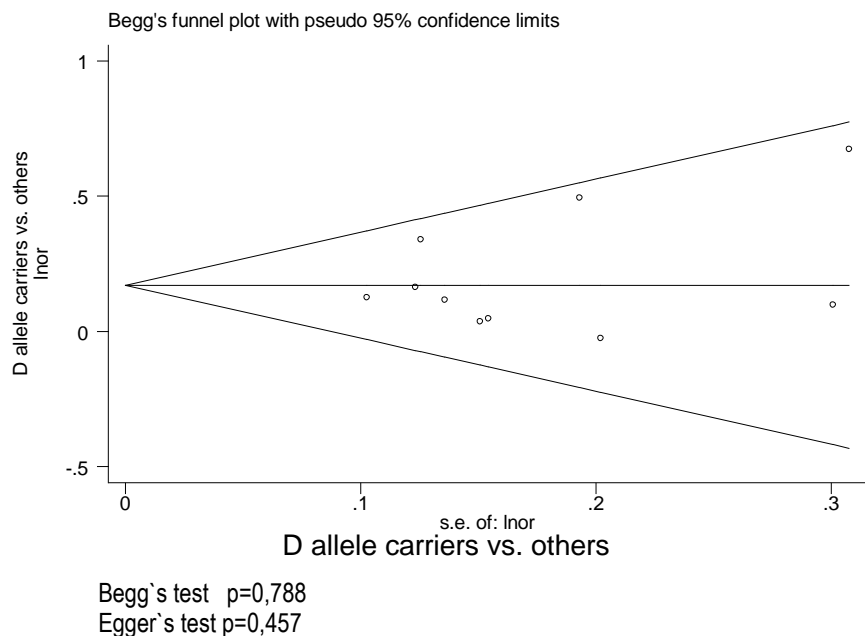
Tablica 4.26. Usporedba učestalosti ACE I/D genotipova i alela u općoj i starijoj (80-101 god) populaciji Hrvatske.

		Genotipovi (n)			Učestalost alela		Ukupno
		DD	ID	II	D	I	
Hrvatska – opća populacija (n=172)	N	38	94	40	170	174	344
	%	22,1	54,7	23,3	49,4	50,6	100
Hrvatska – 80+ populacija (n=301)	N	129	110	62	368	234	602
	%	42,8	36,5	20,5	61,1	38,9	100
		$\chi^2=22,045$ , d.f.=2 p<0,00001			$\chi^2=12,304$ , d.f.=1 p<0,001		

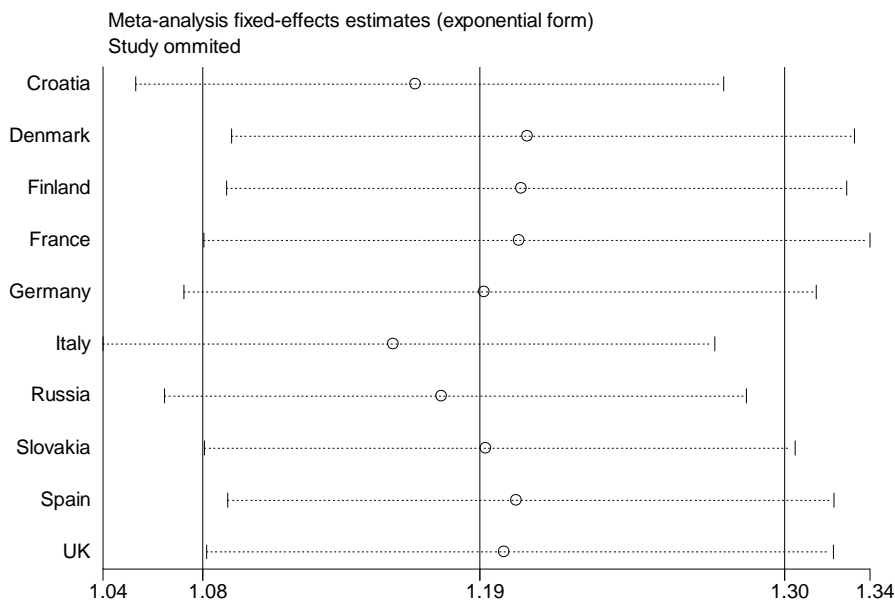


Heterogeneity chi-squared = 10,06 (d.f.=9)  
Test of OR=1, p=0,000

Slika 4.01. Grafički trakasti prikaz (engl. forrest plot) rezultata meta-analize distribucije ACE D alela u dvije dobne kohorte iz deset europskih zemalja na logaritamskoj skali. Podaci za svaku državu uključuju učestalosti D alela u općoj populaciji i populaciji osoba starih 80 i više godina, omjer šansi (OR) za svaku populaciju zasebno i zajednički OR, raspon 95%-tnog intervala pouzdanosti (CI), kao i doprinos svake subpopulacije ukupnom OR-u. Ukupan OR prema Mantel-Haenszelu je 1,19 (95% CI 1,08-1,31, p=0,0003). Paralelne linije na trakastom prikazu predstavljaju 95%-tni interval pouzdanosti za svaku studiju pojedinačno, dok veličina kvadrata odgovara “težini” studije u meta-analizi. Ravna okomita linija prikazuje OR kada iznosi 1, a isprekidana okomita linija odgovara ukupnom OR-u uzorka.



Slika 4.02. Ljevkašti grafički prikaz (engl. *funnel plot*) rezultata meta-analize nosioca D alela u odnosu na osobe koje ne nose taj alel. Grubo simetričan prikaz (engl. *roughly symmetrical*) sugerira da nema publikacijske pristranosti (engl. *bias*), niti ikakve druge pristranosti koja bi se mogla pojaviti u malim studijama. Rezultati Beggova i Eggerova testa također nisu ukazali na pristranost.



Slika 4.03. Grafički prikaz rezultata analize utjecaja studija uključenih u meta-analizu ACE D alela s prikazom procjena šansi (OR) dobivenih nakon isključivanja svaki puta druge populacije iz analize.



Tablica 4.27. Karakteristike 46 studija uključenih u *MTHFR* C667T meta-analizu, predstavljene po državama. Podaci o dobi nisu predstavljeni uniformno zbog toga što su različito definirani u različitim studijama: neki autori su preferirali dobni raspon, drugi srednju dob ( $\pm$ SD), a neki su samo izjavili da su ispitanici prešli određenu dob. Studije su podijeljene u dvije grupe: grupa jedan, u kojoj su osobe dobi 18-80 godina, te grupa dva, za one starije od 80 godina (ili ukoliko je srednja dob cijele skupine 80+ god). Svaka studija sastojala se i od žena i od muškaraca. Učestalost svakog genotipa prikazana je u apsolutnom broju. U publikacijama označenima zvjezdicom (\*), učestalost genotipova (N) originalno je dana u postocima.

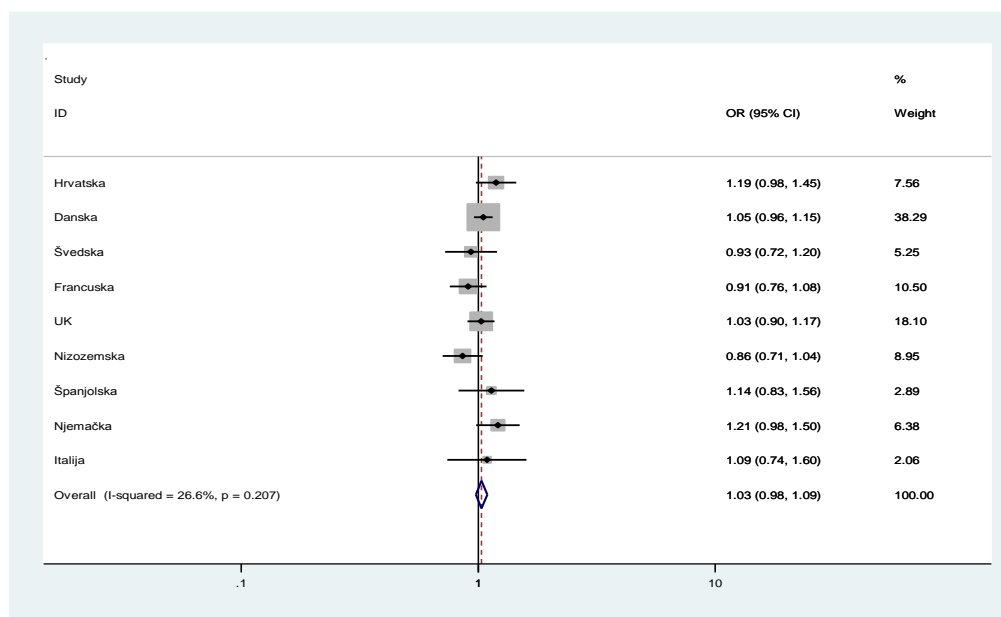
Država	Publikacija	Dob (godine)	Dobna skupina	Veličina uzorka	Spolna distribucija (m/ž)	Karakteristike ispitanika	Učestalost genotipova			Učestalost alela	
							CC	CT	TT	C alel	T alel
Danska	Bladbjerg i sur., 1999	20-64	1	201	126/75	Zdravi mladi donori krvi	96	86	19	0,69	0,31
	Husemoen i sur., 2003	30-60	1	2788	1349/1439	Volonteri - sudionici Inter99 studije	1361	1181	246	0,70	0,30
	Bethke i sur., 2008	51 $\pm$ 12	1	100	nije naznačeno	Interphone Study (zdrave osobe koje nisu oboljele od raka)	61	34	5	0,78	0,22
	Bladbjerg i sur., 1999	>100	2	186	nije naznačeno	Volonteri iz populacije stogodišnjaka	85	79	22	0,67	0,33
	Bathum i sur., 2007	93,1 $\pm$ 0,3	2	1570	439/1131	Danish 1905 Cohort	745	690	135	0,69	0,31
Francuska	Faure-Delaneuf i sur., 1997	20-70	1	374	191/183	Opća populacija iz različitih regija Francuske	140	165	69	0,59	0,41
	Falchi i sur., 2005	37 $\pm$ 0,04	1	100	60/40	Zdravi donori krvi s Korzike	42	54	4	0,69	0,31
	Faure-Delaneuf i sur., 1997	$\geq$ 90	2	106	nije naznačeno	Uključeni su 90+ godišnjaci koji imaju barem jednog 90+ godišnjeg sestru/brata	40	54	12	0,63	0,37
	Faure-Delaneuf i sur., 1997	$\geq$ 100	2	458	51/407	Stogodišnjaci iz različitih regija Francuske	189	208	61	0,64	0,36
Hrvatska	Žuntar i sur., 2003	30-62	1	298	nije naznačeno	Zdravi dobrovoljni davatelji krvi	134	146	18	0,69	0,31
	Lovričević i sur., 2004	19-64	1	228	175/53	Zdravi donori krvi	105	102	21	0,68	0,32
	Babić Božović i sur., 2011	33,4 $\pm$ 7,5	1	221	112/109	Zdravi donori krvi	101	97	23	0,68	0,32
	Ova studija	80-101	2	303	79/222	Populacija iz domova za stare i nemoćne s područja Grada Zagreba i Zagrebačke županije	126	139	38	0,65	0,35
Italija	Tosetto i sur., 1997	18-65	1	130	42/88	Sudionici VITA Projekta, koji ne boluju od venskog	42	71	17	0,60	0,40

						tromboembolizma						
	Motti i sur., 1998	20-69 (38,1±9,9)	1	155	86/69	Zdravo osoblje Centra za preventivnu medicinu, Sveučilište Tor Vergata, Rim	45	85	25	0,56	0,44	
	Girelli i sur., 1998	59,3±11,8	1	137	79/58	Zdrava kontrola za KVB iz Verone	42	70	25	0,56	0,44	
	Seripa i sur., 2003	22-64 (37,6±9,0)	1	1232	534/698	Opća populacija	370	627	235	0,55	0,45	
	Pezzini i sur., 2007	36,4±7,5	1	187	99/88	Zdravo osoblje Sveučilišne bolnice u Bresciji (osobe bez povijesti KVB)	73	87	27	0,62	0,38	
	Cigliero i sur., 2011	18-49	1	142	94/48	Zdravi volonteri sa sjevera Italije	48	69	25	0,58	0,42	
	Zuliani i sur., 2002	82,1±0,8	2	54	18/36	Osobe koje nisu dementne	17	25	12	0,55	0,45	
Nizozemska	Verhoef i sur., 1997	25-65 (49,9±6,9)	1	100	74/26	Opća populacija	45	48	7	0,69	0,31	
	Heijmans i sur., 1999	18-40	1	250	139/111	Stanovništvo Leidena nizozemskog porijekla	100	119	31	0,64	0,36	
	Gussekloo i sur., 1999	85+	2	641	185/456	Stanovništvo Leidena (Leiden 85+ study)	297	286	58	0,69	0,31	
Njemačka	Koch i sur., 1998	nije naznačeno	1	100	nije naznačeno	Zdravo stanovništvo Marburga	49	40	11	0,69	0,31	
	Reinhardt i sur., 1998*	51,9±15,8	1	104	70/34	Zdravi volonteri	49	46	9	0,68	0,32	
	Kolling i sur., 2004	60,8±12,4	1	617	296/321	Kontrolna populacija za oboljele od KVB	266	283	68	0,66	0,34	
	Wullner i sur., 2005	58±16	1	342	171/171	Kontrolni subjekti za osobe oboljele od Parkinsonove bolesti	168	130	44	0,68	0,32	
	Herrmann i sur., 1999	85-102	2	104	25/79	Osobe bez kliničke povijesti oboljenja od KVB	45	45	14	0,65	0,35	
	Geisel i sur., 2003*	82±6,5	2	118	nije naznačeno	Zdravi osamdesetgodisnjaci	44	56	18	0,61	0,39	
Španjolska	Palomino-Morales i sur., 2010*	49±15,1	1	865	221/644	zdrava kontrola za reumatoidni artritis (stanovnici Madrida)	371	345	149	0,63	0,37	
	Dulin i Guisasola, 2011	40-60	1	452	218/234	Volonteri, djelatnici Gregorio Maranon General University Hospital iz Madrida	166	188	98	0,58	0,42	

	Mayor-Olea i sur., 2008	80+	2	206	nije naznačeno	Stanovništvo Malage, južna Španjolska	81	102	23	0,64	0,36
Švedska	Kristensen i sur., 1999	35,5±6,5	1	41	20/21	zdrava kontrola za KVB iz regije Umea	24	14	3	0,76	0,24
	Strandhagen i sur., 2004	30-65	1	120	26/94	Volonteri iz Goteborga, pregledom utvrđeno da ne boluju od kroničnih bolesti	57	45	18	0,66	0,34
	Thogersen 2005, PhD Thesis	25-64	1	129	nije naznačeno	sudionici VIP i MONIKA studije kod kojih nije došlo do infarkta miokarda ili cerebralnog inzulta	71	51	7	0,75	0,25
	Bethke i sur., 2008	52±12	1	197	121/76	Interphone Study	103	77	17	0,72	0,28
	Brattström i sur., 1998b	80-108	2	222	nije naznačeno	Zdravi stogodišnjaci (bez prethodnih simptoma KVB, neoplazmi ili psihičkih poremećaja)	123	78	21	0,73	0,27
Velika Britanija i sjeverna Irska	Markus i sur., 1997	65,4±9,5	1	161	78/83	Zdrava kontrola za KVB	76	63	22	0,67	0,33
	Brown i sur., 2004	20-26	1	407	220/187	sudionici Young Hearts Projecta (Sjeverna Irska)	176	176	55	0,65	0,35
	Galinsky i sur., 1997	≥83	2	279	93/177	Stanovništvo grada Cambridgea	109	138	32	0,64	0,36
	Harmon i sur., 1997	80-104	2	323	106/217	Stanovništvo Belfasta, Irska	136	156	31	0,66	0,34
	Tysoe i sur., 1997	80+	2	129	nije naznačeno	Zdrava staračka populacija Cambridgea i Elyja	58	55	16	0,66	0,34
	Rea i sur., 2000	90+	2	101	32/69	Fizički i mentalno zdrave osobe koje su sudjelovale u Belfast Elderly Longitudinal free-living Aging studiji	42	48	11	0,65	0,35
	Visscher i sur., 2003	80+	2	528	nije naznačeno	Preživjeli sudionici kognitivne studije Scottish Mental Survey iz 1932	225	238	66	0,65	0,35
	Jennings i sur., 2010	muški srednja dob 84 god, žene 92 god	2	1616	1178/438	Uzorci dani na obradu za kompletnu krvnu sliku u Norfolk and Norwich University Hospital	692	755	169	0,66	0,34
	Schiepers i sur., 2011	>79	2	476	192/284	Stanovništvo Edinburgha	202	211	63	0,65	0,35

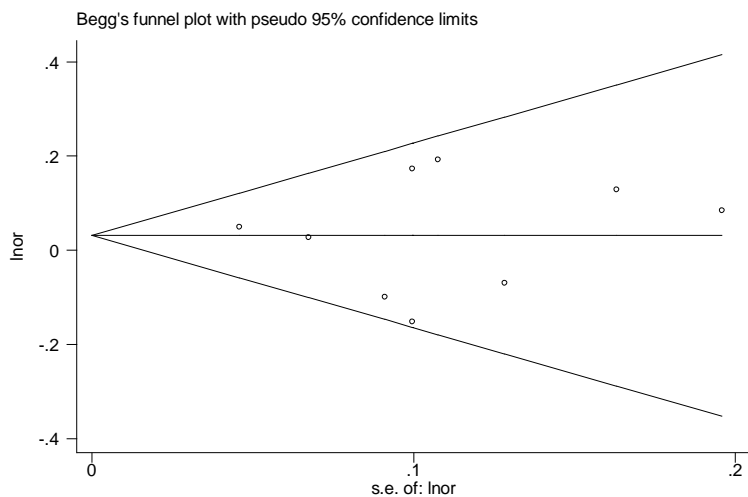
Tablica 4.28. Usporedba učestalosti *MTHFR* C667T genotipova i alela u općoj i starijoj (80-101 god) populaciji Hrvatske.

		Genotipovi			Učestalost alela		Ukupno
		CC	CT	TT	C	T	
Hrvatska – opća populacija (n=747)	N	340	345	62	1025	469	1494
	%	45,5	46,2	8,3	68,6	31,4	100
Hrvatska – 80+ populacija (n=303)	N	126	139	38	391	215	606
	%	41,6	45,9	12,5	64,5	35,5	100
		$\chi^2=4,827$ , d.f.=2 p=0,089			$\chi^2=3,278$ , d.f.=1 p=0,070		



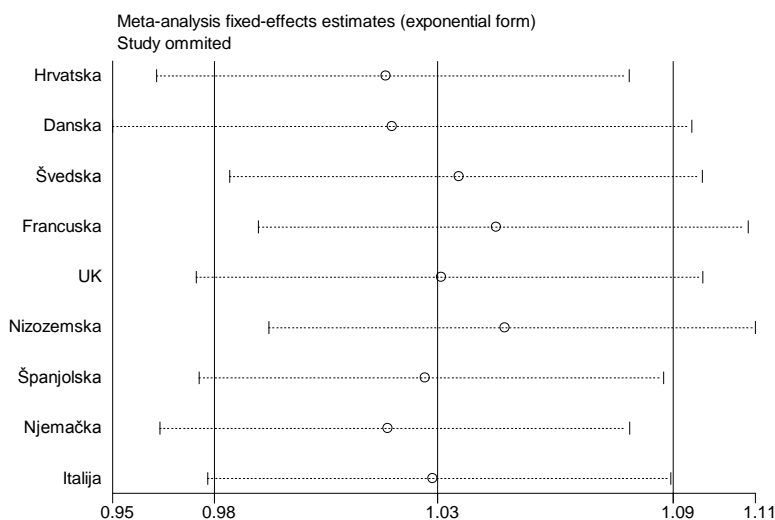
Heterogeneity chi-squared = 10,90 (d.f.=8)  
Test of OR=1, p=0,277

Slika 4.04. Grafički trakasti prikaz (engl. forrest plot) rezultata meta-analize distribucije *MTHFR* T alela u dvije dobne kohorte iz devet europskih zemalja na logaritamskoj skali. Podaci za svaku državu uključuju učestalosti T alela u općoj populaciji i populaciji osoba starih 80 i više godina, omjer šansi (*OR*) za svaku populaciju zasebno i zajednički *OR*, raspon 95%-tnog intervala pouzdanosti (*CI*), kao i doprinos svake subpopulacije ukupnom *OR*-u. Ukupan *OR* prema Mantel-Haenszelu je 1,03 (95% *CI* 0,98-1,09, p=0,277). Paralelne linije na trakastom prikazu predstavljaju 95%-tni interval pouzdanosti za svaku studiju pojedinačno, dok veličina kvadrata odgovara “težini” studije u meta-analizi. Ravna okomita linija prikazuje *OR* kada iznosi 1, a isprekidana okomita linija odgovara ukupnom *OR*-u uzorka.



Begg's test  $p=0,677$   
 Egger's test  $p=0,993$

Slika 4.05. Ljevkašti grafički prikaz (engl. *funnel plot*) rezultata meta-analize nosioca T-alela u odnosu na osobe koje ne nose taj alel. Grubo simetričan prikaz (engl. *roughly symmetrical*) sugerira da nema publikacijske pristranosti (engl. *bias*), niti ikakve druge pristranosti koja bi se mogla pojaviti u malim studijama. Rezultati Beggova i Eggerova testa također nisu ukazali na pristranost.



Slika 4.06. Grafički prikaz rezultata analize utjecaja studija uključenih u meta-analizu *MTHFR* T alela s prikazom procjena šansi (OR) dobivenih nakon isključivanja svaki puta druge populacije iz analize.

Tablica 4.29. Karakteristike 67 studija uključenih u *APOE* meta-analizu, predstavljene po državama. Podaci o dobi nisu predstavljeni uniformno zbog toga što su različito definirani u različitim studijama: neki autori su preferirali dobni raspon, drugi srednju dob ( $\pm$ SD), a neki su samo izjavili da su ispitanici prešli određenu dob. Studije su podijeljene u dvije grupe: grupa jedan, u kojoj su osobe dobi 18-80 godina, te grupa dva, za one starije od 80 godina (ili ukoliko je srednja dob cijele skupine 80+ god). Svaka studija sastojala se i od žena i od muškaraca. Učestalost svakog genotipa prikazana je u apsolutnom broju. Za publikaciju označenu zvjezdicom (\*) poznata je samo učestalost E4 alela.

Država	Publikacija	Dob (godine)	Dobna skupina	Veličina uzorka	Spolna distribucija (m/ž)	Karakteristike ispitanika	Učestalost APOE genotipova						Učestalost alela		
							22	23	24	33	34	44	E2	E3	E4
Češka	Hubacek i sur., 2010	45-69	1	6230	2866/3344	slučajni uzorak iz 7 čeških gradova: Jihlava, Havirov, Hradec Kralové, Karvina, Kromeriz, Liberec i Ustí nad Labem	42	708	122	4126	1155	77	0,07	0,81	0,12
	Snejdrlova i sur., 2011	80+	2	128	35/93	stanovnici doma za umirovljenike, osobe koje su se odazvale na poziv putem medija, osobe koje su 2-5 godina prije testiranja boravile na internističkom odjelu bolnice General University Hospital u Pragu	0	17	0	86	25	0	0,07	0,83	0,10
Danska	Baggio i sur., 1997	20-60	1	466	nije naznačeno	nije naznačeno							0,08	0,74	0,17
	Frikke-Schmidt i sur., 2000	57.5 $\pm$ 0.2	1	8938	4022/4916	opća populacija, sudionici Copenhagen City Heart Study	45	1126	232	5050	2244	241	0,08	0,75	0,17
	Baggio i sur., 1997	100+	2	165	nije naznačeno	osobe iz Danish Twin Registra stare 100 i više godina							0,11	0,81	0,08
	Gerdes i sur., 2000	99+	2	177	44/133	osobe s područja čitave Danske	0	37	8	106	25	1	0,13	0,77	0,10
	Bathum i sur., 2006	92-93	2	1616	462/1177 (23 otpalo)	Danish 1905 Birth Cohort	17	246	50	1002	281	20	0,10	0,78	0,12

Finska	Ehnholm i sur., 1986	18+	1	615	nije naznačeno	zaposlenici National Health Public Institute i dobrovoljni davatelji krvi	2	41	5	332	196	39	0,04	0,73	0,23
	Kervinen i sur., 1994	21-64	1	260	156/104	zdravi volonteri, djelatnici Oulu Sveučilišne bolnice i telekomunikacijske kompanije	1	13	5	149	80	12	0,04	0,75	0,21
	Rontu i sur., 2006	40	1	155	80/75	osobe srednje dobi iz Tampere regije							0,06	0,76	0,18
	Kervinen i sur., 1994	90+	2	95	8/87	stanovništvo grada Oulu	0	8	3	66	17	1	0,06	0,82	0,12
	Castro i sur., 1999	100-106	2	175	nije naznačeno	zdravi stogodišnjaci s područja čitave države	0	27	0	118	30	0	0,08	0,84	0,08
	Frisoni i sur., 2001	100+	2	179	28/151	stogodišnjaci detektirani uz pomoć nacionalnog registra Finske s područja čitave države	1	23	1	124	29	1	0,07	0,84	0,09
	Rastas i sur., 2004	85-104	2	505	107/398	stanovništvo grada Vantaa	2	62	14	294	126	7	0,08	0,77	0,15
	Rontu i sur., 2006	90+	2	291	68/223	stanovništvo okruga Tampere	1	38	6	198	47	1	0,08	0,83	0,09
Francuska	Couderc i sur., 1993	37.1±10	1	498	nije naznačeno	zdravi donori krvi	8	59	5	319	100	7	0,08	0,80	0,12
	Schachter i sur., 1994	20-70	1	161	nije naznačeno	zdrava opća populacija	0	18	4	110	26	3	0,07	0,82	0,11
	Blanché i sur., 2001	18-70 (51.2)	1	560	94/446	zdravi volonteri iz cijele Francuske	2	71	7	351	123	6	0,07	0,80	0,13
	Schachter i sur., 1994	100+	2	325	42/283	stogodišnjaci s područja čitave Francuske	4	71	4	216	30	0	0,13	0,82	0,05
	Bickeböller i sur., 1997	80+	2	552	103/449	zdravi supružnici oboljelih od AD ili zdravi donori krvi	5	72	18	301	143	13	0,09	0,74	0,17
	Blanché i sur., 2001	100+	2	560	94/446	zdravi stogodišnjaci	4	104	13	385	54	0	0,11	0,83	0,06
Grčka	Sklavounou i sur., 1997	19-64 (35,6±11)	1	216	146/70	zdravi donori krvi							0,05	0,88	0,07

	Stakias i sur., 2006	19-60	1	379	194/197	zdrave osobe iz Thessaly regije	2	30	3	288	50	6	0,05	0,86	0,09
	Stakias i sur., 2006	80-95	2	80	38/42	zdrave osobe iz Thessaly regije	2	3	1	70	4	0	0,05	0,92	0,03
Hrvatska	Žuntar i sur., 2006	nije naznačeno	1	60	nije naznačeno	zdravi volonteri iz Zagreba, kontrola za karotidnu stenozu	0	5	2	48	5	0	0,06	0,88	0,06
	Sertić i sur., 2009	20-35	1	105	47/58	zdrava opća populacija	2	15	2	48	12	0	0,10	0,83	0,07
	Mustapić i sur., 2012	77,4±5,4	1	456	186/270	zdravi mlađi starci	1	48	2	328	76	1	0,06	0,85	0,09
	ova studija	80+	2	325	83/242	ova studija	3	38	3	238	41	2	0,07	0,85	0,07
Italija	James i sur., 1993	43,0±11,4	1	365	296/69	donori krvi iz Ancone	3	43	4	257	51	7	0,07	0,83	0,09
	Cattin i sur., 1997	45-69 (53±7)	1	260	121/139	zdrave osobe iz Trsta (bez dijabetesa i KVB)							0,07	0,83	0,10
	Bader i sur., 1998	20-70 (53,7±16,6)	1	84	nije naznačeno	zdrave odrasle osobe s područja Val Vibrata, središnja Italija	1	10	1	67	5	0	0,08	0,89	0,03
	Carrieri i sur., 2001	50-79	1	179	114/65	zdravi volonteri	1	22	3	125	25	3	0,07	0,83	0,09
	Capurso i sur., 2004	19-73 (51±18)	1	122	44/78	zdrava opća populacija s područja Apulije							0,10	0,83	0,06
	Scacchi i sur., 1995	85,4±3,5	2	57	nije naznačeno	pacijenti bolnice San Giovanni Hospital, Rim, koji su se liječili zbog nekih drugih bolesti a ne od hipertenzije, dijabetesa i sl.	0	6	0	41	10	0	0,05	0,86	0,09
	Bader i sur., 1998	80+ (83,9±3,2)	2	93	nije naznačeno	zdrave osobe bez degenerativnih promjena (Val Vibrata)	2	4	1	73	13	0	0,04	0,88	0,07
	Carrieri i sur., 2001	100+	2	210	61/149	poduzorak iz studije Italian centenarians	1	21	1	171	16	0	0,06	0,90	0,04
	Zuliani i sur., 2002	65+ (79,4±6,7)	2	161	66/95	zdrava kontrola za KVB							0,04	0,88	0,08



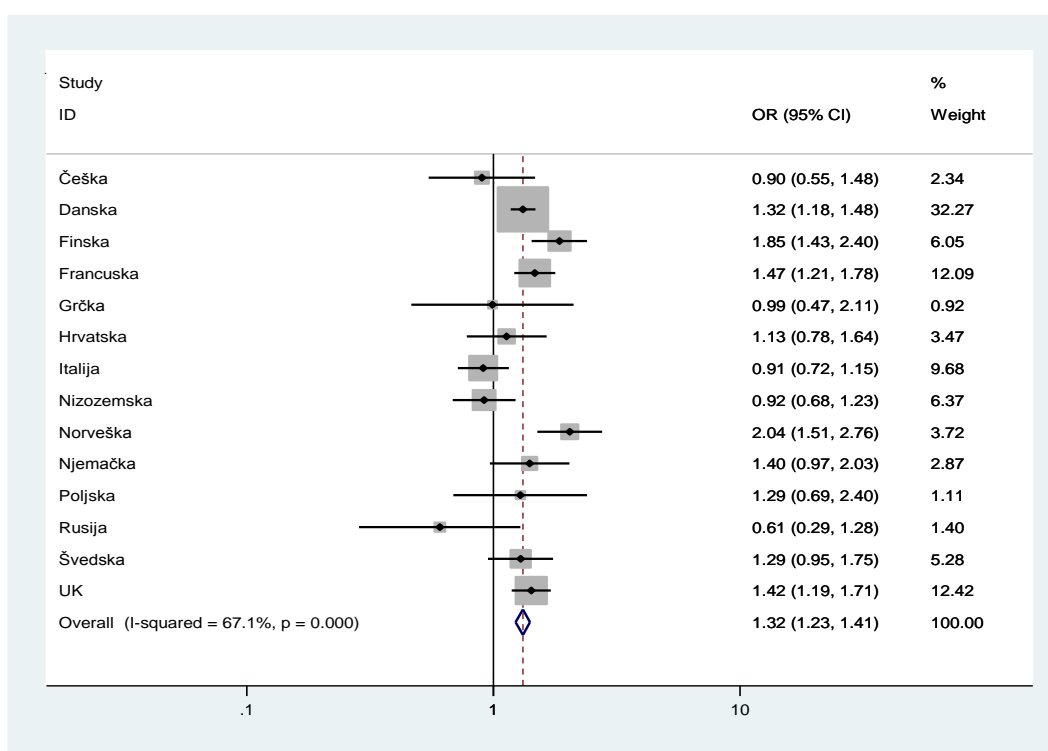
	Corbo i sur., 2004	82,7±5,3	2	160	67/93	postreproduktivno seosko stanovništvo sa juga Italije (Kampanija, okrug Salerno)	2	13	1	120	24	0	0,06	0,86	0,08
	Capurso i sur., 2004	100±2	2	81	19/62	zdravi stogodišnjaci iz Apulije bez demencije i KVB							0,13	0,85	0,02
	Napolioni i sur., 2011	88+	2	200	100/100	centralna Italija, zdrave osobe bez kroničnih bolesti i raka				148			0,12	0,84	0,04
Nizozemska	van Duijn i sur., 1995	<65	1	532	228/304	The Rotterdam Study	6	88	10	273	144	11	0,10	0,73	0,17
	Heijmans i sur., 2002	18-40	1	76	nije naznačeno	stanovnici Leidena čiji su svi djedovi i bake također rođeni u Leidenu	0	11	3	46	13	3	0,09	0,76	0,15
	Kurniawan i sur., 2012	85+	2	435	145/290	The Leiden 85-plus study	1	69	11	270	78	6	0,09	0,79	0,12
Norveška	Kumar i sur., 2002	<40	1	798	nije naznačeno	zdrava opća populacija							0,06	0,74	0,20
	Westyle i sur., 2011	50-80	1	97	34/61	zdrave osobe pozvane putem javnih glasila na sudjelovanje u longitudinalnom istraživanju kognitivnog starenja	0	6	2	56	26	7	0,04	0,74	0,22
	Hestad i sur., 2005	80-102	2	261	nije precizirano	osobe iz okruga Hedmark koje su bile u stanju ispravno ispuniti MMSE							0,90	0,73	0,18
	Sando i sur., 2008	80-99	2	146	nije precizirano	zdrava kontrola za demenciju iz centralne Norveške							0,13	0,73	0,14
Njemačka	Assmann i sur., 1984	20-60	1	1557	966/591	normolipidemični radnici tvornice u Münsteru	14	183	46	969	310	35	0,08	0,78	0,14

	Kessler i sur., 1997	62,6±14,0	1	225	108/117	osobe liječene u Ernst-Moritz-Arndt-University bolnici, ali bez KVB i AD	1	24	6	149	43	2	0,07	0,81	0,12
	Geßner i sur., 1997	85-103	2	159	nije naznačeno	sudionici Berlin Aging Study bez demencije	1	31	2	104	21	0	0,11	0,82	0,07
	Jessen i sur., 2007*	80,1±3,6	2	2299	860/1529 (90 otpalo)	sudionici German Study on Ageing, Cognition and Dementia in Primary Care Patients (AgeCoDe) s područja cijele Njemačke									0,10
Poljska	Maruszak i sur., 2012	70,36±5,9	1	305	83/222	zdrava neurološka kontrola za AD	4	35	7	204	52	3	0,08	0,81	0,11
	Maruszak i sur., 2012	98,45±1,7 2	2	68	nije naznačeno	stogodišnjaci iz Varšave, osobe bez AD	1	12	0	52	3	0	0,10	0,88	0,02
Rusija	Korovaitseva i sur., 2001	40-64 (54,0±7,6)	1	85	nije naznačeno	opća populacija, zdrava kontrola za demenciju	1	15	1	53	15	0	0,11	0,80	0,09
	Borinskaya i sur., 2007	opća populacija	1	326	nije naznačeno	osobe iz različitih regija (Kostroma, Rostov, Krasnodar kraj i Moskva)	1	49	9	211	52	4	0,09	0,80	0,11
	Dolgikh i sur., 2001	90-105 (92,9±2,8)	2	67	14/53	Stanovništvo Novosibirsk							0,06	0,85	0,09
Švedska	Eggertsen i sur., 1993	17-60	1	288	nije naznačeno	zdravi volonteri (studenti medicine i osoblje bolnice Huddinge University Hospital)							0,07	0,70	0,22
	Strandhagen i sur., 2004	29-65	1	121	27/94	zdravo stanovništvo Goteborga pozvano na sudjelovanje putem javnih glasila, bez kroničnih bolesti	2	9	2	69	36	3	0,06	0,76	0,18
	Skoog i sur., 1998	85+	2	303	nije naznačeno	sudionici Longitudinal Gerontological and Geriatric Population Studies iz Goteborga	1	62	4	121	102	13	0,11	0,67	0,22

	Guo i sur., 2001	75+ (80,97±4,7)	2	985	247/738	sudionici Kungsholmen projekta	3	130	19	571	239	23	0,08	0,77	0,15
Velika Britanija i sjeverna Irska	Weatherby i sur., 2000	45,6±12,8	1	159	64/95	zdrava kontrola uključena preko liječnika opće prakse (78) i zdravi donori krvi (81)	1	16	3	99	38	2	0,07	0,79	0,14
	Catto i sur., 2000	58-79	1	289	151/138	zdravo stanovništvo Leedsa bez KVB	0	37	7	170	69	6	0,08	0,77	0,15
	MacLeod i sur., 2001	77-78	1	225	94/105	sudionici Aberdeen Birth Cohort study	0	20	6	133	63	3	0,05	0,78	0,17
	Rea i sur., 2001	30-65	1	2071	nije naznačeno	sudionici MONICA projekta iz Belfasta							0,08	0,76	0,16
	Galinsky i sur., 1997	84+	2	276	100/182	staračko stanovništvo Cambridgea		36		177	57		0,08	0,80	0,12
	Rea i sur., 2001	90+	2	114	35/79	sudionici Belfast Elderly Longitudinal free-living Ageing Study (BELFAST)							0,12	0,80	0,07
	Deary i sur., 2004	79+	2	462	188/274	sudionici Scottish Mental Surveya iz 1932 (Lothian Birth Cohort)	2	66	16	274	101	3	0,09	0,77	0,13

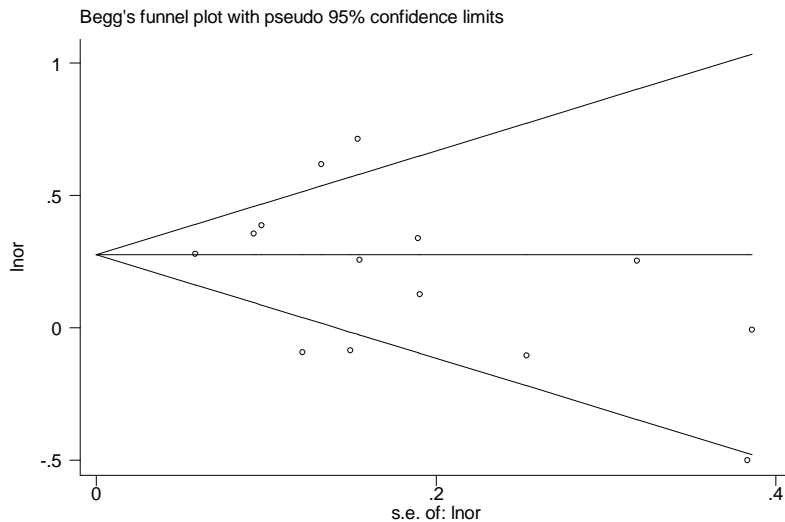
Tablica 4.30. Usporedba učestalosti *APOE* E2 i E4 alela u općoj i starijoj (80-101 god) populaciji Hrvatske.

Ukupno		Učestalost alela		Učestalost alela		
		E2	nonE2	E4	nonE4	
Hrvatska – opća populacija (n=621)	N	80	1162	101	1141	1242
	%	6,4	93,6	8,1	91,9	
	100					
Hrvatska – 80+ populacija (n=325)	N	47	603	48	602	650
	%	7,2	92,8	7,4	92,6	100
		$\chi^2=0,425, d.f.=1$ p=0,514		$\chi^2=0,329, d.f.=1$ p=0,566		



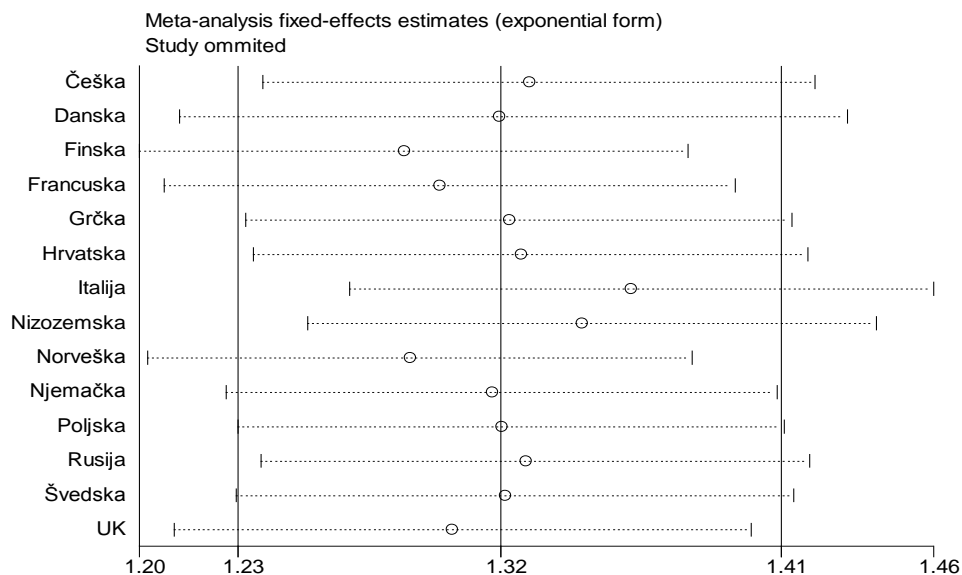
Heterogeneity chi-squared = 39,48 (d.f.=13)  
Test of OR=1, p=0,000

Slika 4.07. Grafički trakasti prikaz (engl. *forrest plot*) rezultata meta-analize distribucije *APOE* E2 alela u dvije dobne kohorte iz četrnaest europskih zemalja na logaritamskoj skali. Podaci za svaku državu uključuju učestalosti E2 alela u općoj populaciji i populaciji osoba starih 80 i više godina, omjer šansi (*OR*) za svaku populaciju zasebno i zajednički *OR*, raspon 95%-tnog intervala pouzdanosti (*CI*), kao i doprinos svake subpopulacije ukupnom *OR*-u. Ukupan *OR* prema DerSimonian-Lairdu je 1,274 (95% *CI* 1,11-1,46;  $p < 0,0001$ ). Paralelne linije na trakastom prikazu predstavljaju 95%-tni interval pouzdanosti za svaku studiju pojedinačno, dok veličina kvadrata odgovara “težini” studije u meta-analizi. Ravna okomita linija prikazuje *OR* kada iznosi 1, a isprekidana okomita linija odgovara ukupnom *OR*-u uzorka.

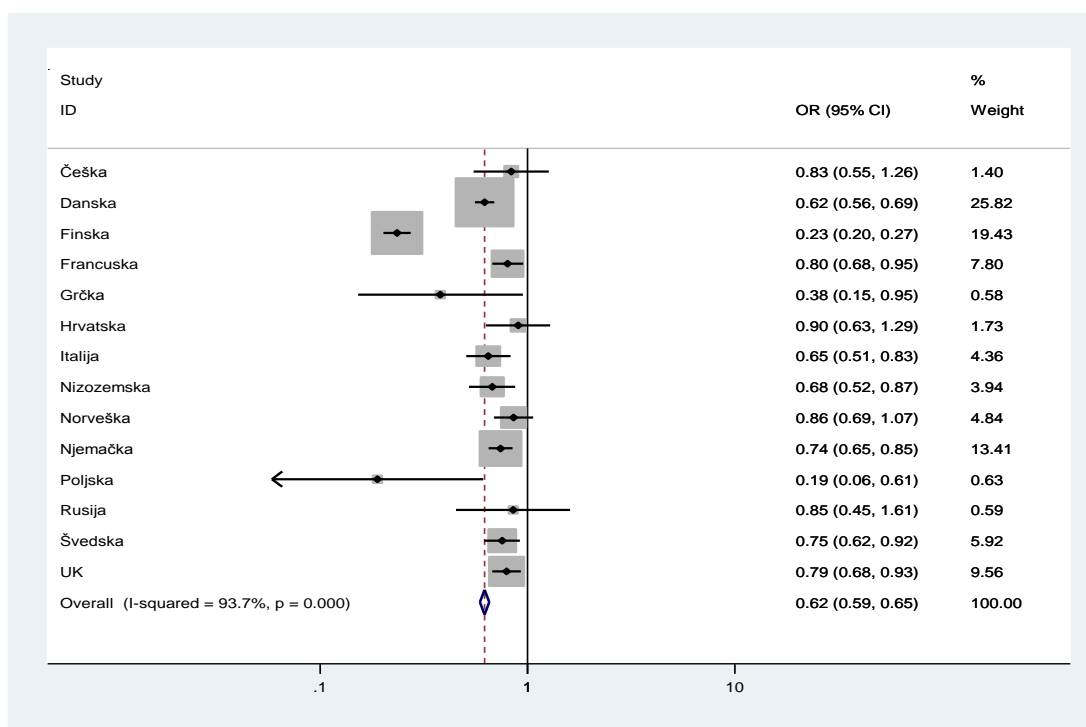


Begg's test  $p=0,298$   
 Egger's test  $p=0,337$

Slika 4.08. Ljevkasti grafički prikaz (engl. *funnel plot*) rezultata meta-analize nosioca E2-alela u odnosu na osobe koje ne nose taj alel. Grubo simetričan prikaz (engl. *roughly symmetrical*) sugerira da nema publikacijske pristranosti (engl. *bias*), niti ikakve druge pristranosti koja bi se mogla pojaviti u malim studijama. Rezultati Beggova i Eggerova testa također nisu ukazali na pristranost.

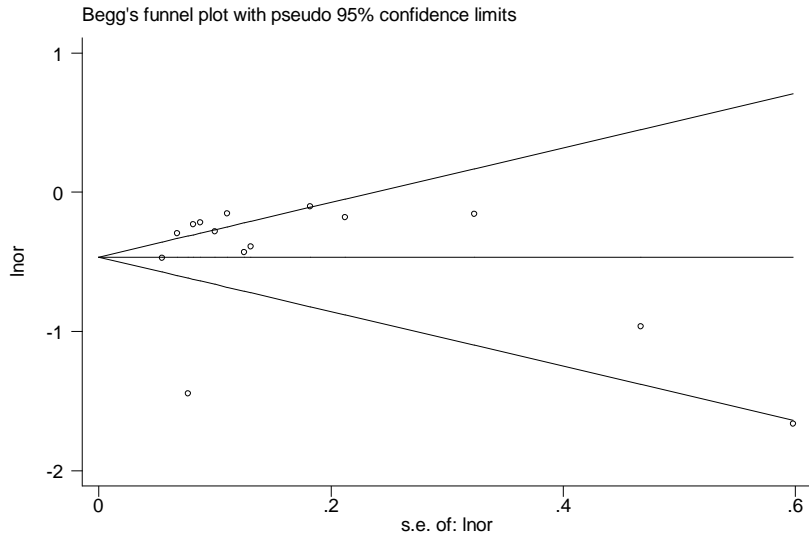


Slika 4.09. Grafički prikaz rezultata analize utjecaja studija uključenih u meta-analizu *APOE* E2 alela s prikazom procjena šansi (*OR*) dobivenih nakon isključivanja svaki puta druge populacije iz analize.



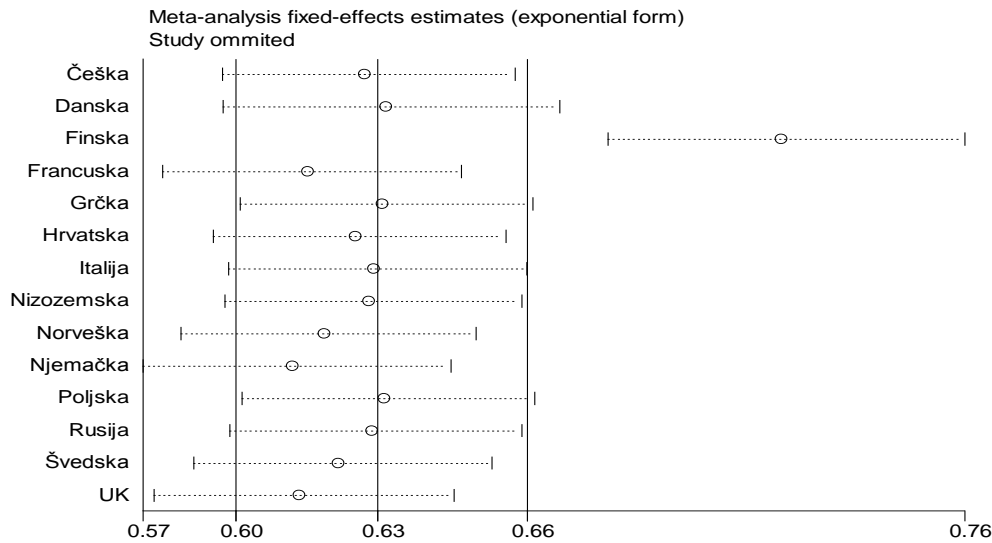
Heterogeneity chi-squared = 207,56 (d.f.=13)  
 Test of OR=1, p=0,000

Slika 4.10. Grafički trakasti prikaz rezultata meta-analize distribucije *APOE* E4 alela u dvije dobne kohorte iz četrnaest europskih zemalja na logaritamskoj skali. Podaci za svaku državu uključuju učestalosti E4 alela u općoj populaciji i populaciji osoba starih 80 i više godina, omjer šansi (*OR*) za svaku populaciju zasebno i zajednički *OR*, raspon 95%-tnog intervala pouzdanosti (*CI*), kao i doprinos svake subpopulacije ukupnom *OR*-u. Ukupan *OR*, s obzirom na visok stupanj heterogenosti ( $I^2 < 94\%$ ) prema DerSimonian-Lairdu je 0,65 (95% CI 0,51-0,82,  $p < 0,0001$ ). Paralelne linije na trakastom prikazu predstavljaju 95%-tni interval pouzdanosti za svaku studiju pojedinačno, dok veličina kvadrata odgovara “težini” studije u meta-analizi. Ravna okomita linija prikazuje *OR* kada iznosi 1, a isprekidana okomita linija odgovara ukupnom *OR*-u uzorka.



Begg's test  $p=0,171$   
 Egger's test  $p=0,806$

Slika 4.11. Ljevkašti grafički prikaz rezultata meta-analize nosioca E4-alela u odnosu na osobe koje ne nose taj alel. Grubo simetričan prikaz (engl. *roughly symmetrical*) sugerira da nema publikacijske pristranosti (engl. *bias*), niti ikakve druge pristranosti koja bi se mogla pojaviti u malim studijama. Rezultati Beggova i Eggerova testa također nisu ukazali na pristranost.



Slika 4.12. Grafički prikaz rezultata analize utjecaja studija uključenih u meta-analizu APOE E4 alela s prikazom procjena šansi (OR) dobivenih nakon isključivanja svaki puta druge populacije iz analize.

Tablica 4.31. Usporedba učestalosti VNTR polimorfizma *eNOS* gena u općoj i starijoj (80-101 god) populaciji Hrvatske. Podaci o učestalosti alela VNTR polimorfizma u općoj populaciji Hrvatske preuzeti su iz doktorske disertacije Ivanke Mikulić (Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2011).

Ukupno		Genotipovi			Učestalost alela		
		44	45	55	4	5	
Hrvatska – opća populacija (n=51)	N	4	15	32	23	79	102
	%	7,8	29,5	62,7	22,5	77,5	100
Hrvatska – 80+ populacija (n=320)	N	20	91	209	131	509	602
	%	6,3	28,4	65,3	20,5	79,5	100
		$\chi^2=0,232$ , d.f.=2			$\chi^2=0,231$ , d.f.=1		
		p=0,891			p=0,631		



## 5. RASPRAVA

Unatoč razlikama u očekivanom trajanju života stanovnika razvijenih i nerazvijenih zemalja svijeta, prosječno trajanje života čovjeka se produljuje. Smatra se da je ono prvenstveno rezultat poboljšanih higijensko-sanitarnih uvjeta odnosno smanjenja smrtnosti novorođenčadi i djece, ali i kvalitetnije prehrane, obrazovanja te primjene znanstveno-tehnoloških otkrića u medicini (Finch, 2007). Brojne studije dugovječnosti pokušavaju odrediti okolišne i genetske čimbenike koji doprinose dostizanju izuzetno duboke starosti u nekih pojedinaca. Kako su neke studije pokazale da varijacije određenih gena povećavaju rizik obolijevanja od kroničnih nezaraznih bolesti koje nose znatan dio dobno-vezanog mortaliteta te ako dugovječnost shvatimo kao izbjegavanje smrtnog ishoda, tako istraživanja mogu biti usmjerena ka istraživanju utjecaja upravo onih gena uključenih u patogenezu različitih kroničnih bolesti koje se tipično javljaju u starijoj životnoj dobi (Drenos i Kirkwood, 2010).

Naime, najčešće kronične bolesti današnjice mogu se smatrati dijelom procesa starenja jer u njihovoj patofiziologiji dominiraju generalizirani degenerativni procesi te osjetljivost ili otpornost na njihov nastanak ima snažan utjecaj na duljinu života. Među najvažnije od njih ubrajamo kardiovaskularne bolesti, bolesti koštano-mišićnog sustava, neurodegenerativne bolesti te karcinome. Kardiovaskularne su bolesti složene, višesustavne bolesti, koje dugi niz godina mogu biti asimptomatske, a nastaju kao posljedica međudjelovanja čimbenika okoliša i različitih genetskih čimbenika. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, upravo su kardiovaskularne bolesti (KVB) vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, a samim time i predmet brojnih epidemioloških i populacijsko-genetičkih istraživanja. Iako je proveden velik broj istraživanja s ciljem otkrivanja gena koji doprinose nastanku KVB, još nije u potpunosti jasno koji sve geni i u kojoj mjeri utječu na razvoj ovih kompleksnih bolesti.

U ovoj disertaciji testirana je uloga polimorfizama gena *APOE*, *ACE*, *eNOS* i *MTHFR* u dugovječnosti. Kako je uloga ovih gena u nastanku KVB potvrđena u brojnim studijama, iz toga je proizašlo mnoštvo podataka o učestalostima alela u različitim populacijama i dobnim skupinama te smo proveli meta-analize razlika između opće populacije i dugoživućih osoba. Nadalje, s obzirom da je u pozadini kompleksnih bolesti interakcija genetskih čimbenika i čimbenika okoliša, pokušali smo procijeniti utjecaj ispitivanih negenetičkih čimbenika na dugovječnost. Već je nekoliko studija ukazalo na mogućnost da neki negenetički čimbenici,

koji u mlađoj ili srednjoj dobi povećavaju rizik pojave KVB, u dubokoj starosti zapravo predstavljaju prednost te se koriste kao prediktori dugovječnosti (Sabayan i sur., 2012; Engelaer i sur., 2012).

### **5.1. Ciljna skupina ovog istraživanja - osobe duboke starosti**

Starenje je proces tjelesnih, mentalnih i psihičkih promjena koje se odvijaju kroz čitav životni vijek, no najviše dolaze do izražaja u kasnijem životnom periodu (Kresnik Bergant, 2000). Starije osobe do dobi od 80 godina uglavnom su relativno samostalne, no osobe duboke starosti (85+ god.) obično više nisu u mogućnosti samostalno zadovoljiti vlastite potrebe te trebaju pomoć (Zeng i sur., 2001). S obzirom da mlađi članovi obitelji često imaju vlastite poslovne i obiteljske obaveze, a i potrebe starijih osoba nerijetko prelaze vještine i mogućnosti članova obitelji, barem dio brige o starijim članovima zajednice preuzimaju različite društvene institucije (Kregar, 1994).

Smještaj u domovima za starije i nemoćne određen je smještajnim kapacitetima, koji u Republici Hrvatskoj nisu dostatni: u domovima za starije i nemoćne osobe živi oko 2% osoba starijih od 65 godina, što je upola manje od europskog prosjeka. Prema podacima Centra za gerontologiju Zavoda za javno zdravstvo Grada Zagreba, od ukupno 114 domova za starije i nemoćne u Hrvatskoj, 31 dom s 4583 korisnika se nalazi u Zagrebu (Tomek-Roksandić 2009). Kako je cilj ovog istraživanja bio utvrditi međudjelovanje genetskih i negenetskih čimbenika na dugovječnost, a muškarci u Hrvatskoj u prosjeku žive 72,3 godine, dok žene u prosjeku žive 79,2 godine, upravo je skupina osoba duboke dobi (85 i više godina), bez značajnih kognitivnih oštećenja i relativno očuvane funkcionalne sposobnosti odabrana za predmet istraživanja. Ne postoji podatak o točnom broju osoba starih 85 i više godina u domskoj populaciji Grada Zagreba te ne možemo točno odrediti koliki smo postotak populacije duboke starosti obuhvatili ovim istraživanjem, no prema aproksimativnom izračunu dobnog omjera ukupnog staračkog stanovništva Grada Zagreba (65+ godina) i osoba duboke starosti, očekivali bismo da je u domovima za starije i nemoćne smješteno 307 osoba starih 85 i više godina. Nadalje, 16 je nešto mlađih osoba, dobi 80 do 85 godina, također izrazilo želju za sudjelovanjem te su i oni uključeni u studiju. Kako naš ukupan uzorak sadrži 325 ispitanika, smatramo da smo našim istraživanjem obuhvatili gotovo čitavu populaciju osoba 85+ god. koja je u vrijeme terenskog istraživanja (2007.-2009.) obitavala u domovima čiji je osnivač Grad Zagreb.

## 5.2. Osobe duboke dobi prema spolu i starosti

Ženske osobe čine gotovo  $\frac{3}{4}$  našeg uzorka, što je u skladu s podacima Popisa stanovništva Republike Hrvatske za tu dobnu skupinu (Popis stanovništva, 2001). Veći broj žena nego muškaraca u poznoj dobi nije nalaz samo naše studije. Žene u gotovo svim populacijama svijeta imaju manju stopu smrtnosti i u prosjeku žive dulje nego muškarci. Tako, na primjer, rezultati američkog National Center for Health Statistics (NCHS) pokazuju da su u 2005. godini muškarci u odnosu na žene imali višu stopu smrtnosti u 12 od 15 najčešćih uzroka smrti. Dobno usklađen odnos stope smrtnosti muškaraca naspram žena iznosio je 1,4x, ako se stopa smrtnosti promatrala za sve uzroke smrti ukupno, a odvojeno prema uzročnicima smrti kretao se u rasponu od 0,7x za Alzheimerovu bolest, do 2,1x za kroničnu bolest jetre i cirozu, dok je od vanjskih uzročnika više muškaraca nego žena stradavalo nesretnim slučajevima (2,2x) te u ubojstvima (3,8x) i samoubojstvima (4,1x). Unatoč tome što muškarci umiru od bolesti srca 1,4x češće nego žene, kako je ovaj uzrok smrtnosti odgovoran za preko  $\frac{1}{4}$  svih smrti, smatra se da i najviše doprinosi spolnim razlikama u smrtnosti (Kung i sur., 2008).

Razlike između spolova u stopi smrtnosti najčešće se objašnjavaju s pozicije dviju perspektiva: jedna naglašava ulogu okolišnih (bihevioralnih) čimbenika, a druga ulogu bioloških čimbenika (Rogers i sur., 2010). Smatra se da različite socijalne uloge u obitelji i društvu, različit pristup zdravstveno-odgovornom ponašanju i socio-ekonomski čimbenici barem djelomično utječu na razliku u stopi smrtnosti muškaraca i žena, jednako kao i biološki (genetski, hormonalni) čimbenici. Iako su još uvijek muškarci ti koji su češće zaposleni i više zarađuju nego žene, spolne razlike u socio-ekonomskom standardu se sve više gube (Schnittker, 2007). 1980. godine prosječna je plaća žene iznosila 64% plaće muškarca u SAD-u, a 2006. je porasla na 80% plaće muškarca (U.S. Department of Labor, 2008).

Kada se govori o biološkim, odnosno, genetskim čimbenicima koji su različiti među spolovima, može se početi od hormona. Testosteron se počinje lučiti već u embrionalnoj fazi razvoja gdje sudjeluje u formiranju testisa i penisa. Razina testosterona povećava se u pubertetu, najviša je između 18. i 35. godine života, a nakon 40. godine počinje opadati stopom od 0,8% godišnje (Feldman i sur., 2002). Opadanje razine testosterona završava stanjem hipogonadizma, koje je značajno češće utvrđeno kod muškaraca starih 60 i više godina u odnosu na mlađe dobne skupine (Harman i sur., 2001). Rezultati epidemioloških

studija sugeriraju da niža ukupna koncentracija testosterona kod muškaraca povećava vjerojatnost pojave osteoporoze, Alzheimerove bolesti, dijabetesa, hipertenzije, ishemijske bolesti srca i brojnih drugih bolesti od kojih mnoge mogu dovesti do smrti (Stanworth i Jones, 2008). Osim toga, predloženo je da povišena razina testosterona u adolescenciji i ranoj mladosti muškarce čini sklonijima riskantnijem i agresivnijem ponašanju, poput vožnje autom pri velikim brzinama ili u pijanom stanju, koje nerijetko završe tragično: u životnoj dobi od 15. do 29. godine, na jednu ženu poginulu u prometnoj nesreći poginu 4 muškarca (The Social Issues Research Centre, 2004). Dakle, snižena razina testosterona čini muškarce podložnijima razvoju bolesti, a povišena potiče riskantno ponašanje – oboje čini da muškarci, u prosjeku, umiru ranije nego žene.

Protektivni učinak estrogena doveden je u vezu sa smanjenom incidencijom koronarne bolesti srca (engl. *coronary heart disease*, CHD) kod žena u predmenopauzi u odnosu na muškarce iste dobi, no u postmenopauzi se ta razlika među spolovima gubi (Saltiki i Alevizaki, 2007; Moreau, 2011). Ova bolest se kod žena u prosjeku javlja 7-10 godina kasnije nego kod muškaraca, no češće ima fatalan ishod (Mass i Appelman, 2010; Go i sur., 2013). Kod muškaraca u dobi od 45 godina 6x je veća vjerojatnost smrti kao posljedice koronarne bolesti srca u odnosu na žene iste dobi (Ho i sur., 2005), no nakon 65. godine života CHD postaje glavni uzročnik smrti kod žena (Go i sur., 2013).

U Women Ischemia Syndrome Evaluation studiji kod mladih žena koje pate od deficijencije estrogena utvrđen je 7x veći rizik pojave CHD-a u odnosu na njihove vršnjakinje koje imaju prosječne vrijednosti estrogena (Bailey Merz i sur., 2003). Deficijencija estrogena utječe na promjene endotela krvnih žila i razvoj ateroskleroze (Holm, 2001). Rezultati Women's Health Initiative studije potvrdili su protektivni učinak estrogena na kardiovaskularno zdravlje žena (i ukupnu smrtnost od koronarne bolesti srca), no samo kod onih koje su počele terapiju estrogenom unutar 10 godina od menopauze (Rossouw i sur., 2007).

### 5.3. Negenetički čimbenici rizika za KVB u uzorku osoba dobi 80 i više godina

Testiranjem srednjih vrijednosti kvantitativnih varijabli u ukupnom uzorku prema spolu, uočili smo statistički značajne razlike u različitim biometrijskim pokazateljima značajnima za zdravlje: kod muškaraca su zabilježene veće vrijednosti antropometrijskih varijabli, a kod žena povišeni lipidi u krvi. Očekivano, s obzirom na spolni dimorfizam, i u starosti su muškarci viši, teži, imaju veće srednje vrijednosti visine potkoljenice i širine lakta te veći opseg struka i omjer struk/bokovi nego žene. Pa ipak, unatoč većoj srednjoj vrijednosti opsega struka kod muškaraca, opseg struka kod žena češće prelazi granicu određenu kao rizičnu za razvoj KVB, a žene su češće i pretile ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), s povišenim vrijednostima sume kožnih nabora. Statistički značajne spolne razlike u učestalosti morfoloških čimbenika rizika za KVB postoje unutar cjelokupnog analiziranog uzorka i/ili samo kod osoba mlađih od 90 godina.

Kako je opadanje visine tijela starenjem već odavno uočeno u brojnim populacijama diljem svijeta (Rossman, 1977), ta pojava nas ni kod muškaraca ni kod žena nije iznenadila. U starijoj je dobi također zabilježeno mijenjanje težine i sastava tijela (Villareal i sur., 2005) te pretpostavljamo da bi trendovi utvrđeni u našoj populaciji mogli biti rezultat tih promjena. U općoj populaciji Hrvatske (18-64 god.) opseg struka veći od EU standarda ( $\geq 80$  cm za žene i  $\geq 94$  cm za muškarce) ima 56,0% muškaraca i 63,8% žena (Ivičević Uhernik i Musić Milanović, 2009), a u našoj populaciji osoba 80+ god., 70,5% muškaraca i 84,5% žena. Baumgartner i suradnici (1995) su, proučavajući sastav tijela osoba dobi 60 do 95 godina, utvrdili da nakon 80. godine života opada količina i postotak masti u tijelu žena, no ne i muškaraca, što je u skladu s našim nalazima. Kod naših smo ispitanika starijih od 90 godina primijetili smanjivanje opsega struka u odnosu na one dobi 80-89 god. što je posebno zanimljivo s obzirom da se smatra da kod starijih osoba dolazi do gubitka mišićne mase abdomena i preraspodjele tjelesne masti, odnosno, porasta njene količine unutar abdomena i povećanja opsega struka (Noppa i sur., 1980). No, treba uzeti u obzir da su kod starijih osoba česti poremećaji poput zatajenja srca, bubrega ili pluća, koji dovode do zadržavanja vode u šakama, rukama, trbušnoj šupljini i sl., stoga morfološke varijable koje opisuju voluminoznost i masno tkivo treba tumačiti s oprezom, a ne odmah "nekritički" prihvatiti kao zbiljski pokazatelj pretilosti u ovoj populaciji (Valli i sur., 2004; Villareal i sur., 2005; Thaler i sur., 2010). Samo bi rezultati longitudinalne studije mogli pomoći razlučiti radi li se uistinu o

smanjenju masnog tkiva kod osoba duboke starosti ili o selektivnom mortalitetu pretilih osoba.

Što se biokemijskih pokazatelja zdravstvenog statusa tiče, kod žena smo utvrdili značajno više srednje vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida, iako uz istovremeno povišen zdravstveno protektivan HDL kolesterol. Izmjereni ukupni i LDL kolesterol i trigliceridi kod žena također češće prelaze granice rizika za KVB odnosno sugeriraju poremećaj lipidnog statusa, dok muškarci češće imaju hiperglikemiju. Rezultati NHANES studije provedene 1999.-2002. godine na uzorku oba spola dobi 20-70 godina, pokazali su da srednja vrijednost koncentracije ukupnog kolesterola i LDL kolesterola kod muškaraca postupno raste do 60. godine života nakon čega počinje opadati, dok srednja vrijednost triglicerida opada već nakon 50. godine. Kod žena je zabilježen trend porasta svih vrijednosti do 70. godine života nakon čega je uočen plato. Nadalje, muškarci stari 70 i više godina imaju značajno niže srednje vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida u odnosu na žene iste dobne skupine (Carroll i sur., 2005). S obzirom da NHANES studija nije obuhvatila osobe starije od 74 godina, naši rezultati se ne mogu direktno usporediti, no i kod nas žene imaju signifikantno više srednje vrijednosti lipida nego muškarci. Također, uz iznimku koncentracije triglicerida kod žena koja signifikantno opada s dobi, lipoproteini osoba oba spola nakon 80. godine života održavaju plato. Veća prevalencija hiperglikemije kod muškaraca u našem uzorku gubi se nakon 90. godine života, nakon koje je povišena razina glukoze u krvi određena u gotovo polovici osoba oba spola.

Iako je poznato da krvni tlak osim po dobi varira i ovisno o spolu te da je prosječni krvni tlak muškaraca viši nego kod žena (August i Oparil, 1999), u populaciji osoba dobi 80 i više godina nismo pronašli spolne razlike u srednjoj vrijednosti krvnih tlakova kao ni u prevalenciji hipertenzije (65,4%) ili kardiovaskularnih bolesti, koje se u uzorku javljaju s učestalošću od 45,8%. Unatoč relativno visokoj prevalenciji hipertenzivnih osoba, znatno višoj nego li u općoj populaciji Hrvatske (18-64 god.) u kojoj je prevalencija HT kod muškaraca 40,7%, a kod žena 33,1% (Ivičević Uhernik i Musić Milanović, 2009), ukoliko naš uzorak podijelimo na hipertenzivne i nehipertenzivne osobe, osim u srednjim vrijednostima sistoličkog i dijastoličkog tlaka i tlaka pulsa, statistički značajne razlike postoje samo u srednjim vrijednostima varijable omjer struka i bokova. Veći omjer struka i bokova imaju nehipertenzivni muškarci u odnosu na hipertenzivne te, unutar ukupnog uzorka, sve nehipertenzivne osobe u odnosu na hipertenzivne. Iako se u općoj populaciji i populaciji

"mlađih" starijih osoba (60-80 god.) i dalje preporuča snižavanje povišenog krvnog tlaka jer dokazano snižava ukupnu stopu smrtnosti i stopu pobola i smrtnosti od KVB (Musini i sur., 2009), zanimljivo je istaknuti nalaze nekih studija dugovječnosti koji su pokazali da hipertenzija kod osoba starijih od 80 godina ne predstavlja problem, već prednost. Naime, u nekim je studijama povišeni krvni tlak u osoba dobi 85 i više godina indikator dobrog tjelesnog i kognitivnog zdravlja i, praktički, prediktor dugovječnosti (Matilla i sur., 1988; Euser i sur., 2009; Sabayan i sur., 2012), iako su rezultati istraživanja provedenog u populaciji Japana pokazali drugačije (Turin i sur., 2012). Hipertenzija kod osoba duboke dobi ne utječe na povećanu smrtnost (Van Bommel i sur., 2006), nego je smrtnost veća kod hipotenzivnih u odnosu na hipertenzivne osobe (Engelaer i sur., 2012). S druge strane, u nedavnoj studiji utvrđeno je da tlak pulsa u osoba starih 70-90 godina opada s dobi te je ovaj pad povezan s većom dugovječnošću (Stessman i sur., 2013). U našem uzorku povišeni tlak pulsa (>40mm Hg) češće nalazimo kod žena nego li kod muškaraca.

Kod naših ispitanika, uz tlak pulsa, i gotovo svi testirani biometrijski i biokemijski parametri značajno češće prelaze granice definirane kao rizične za razvoj KVB kod žena, iz čega bi bilo logično zaključiti da je kod žena, u odnosu na muškarce, veći i rizik razvoja KVB. Međutim, nismo pronašli statistički značajne razlike u prevalenciji KVB među spolovima. Nadalje, analize sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka ne pokazuju dobni trend ni kod muškaraca ni kod žena, a ni rezultati višestruke regresije ne upućuju na povezanost klasičnih KVB čimbenika rizika sa sistoličkim krvnim tlakom u ovoj dobnoj skupini, dok u manjoj mjeri pokazuju povezanost s dijastoličkim tlakom. Iz svega ovoga proizlazi pitanje o ulozi negenetičkih čimbenika rizika u razvoju KVB u osoba duboke starosti. Naime, provedene analize ukazuju na vrlo ograničen učinak klasičnih čimbenika rizika na zdravlje osoba duboke starosti. On je više indirektno vidljiv u smislu mogućeg selektivnog mortaliteta pretilih osoba i osoba s povišenom razinom glukoze u krvi, jer ih ima manje u 90+ dobnoj skupini.

U ovom radu također smo željeli ispitati ulogu kandidatskih gena za KVB u osoba duboke dobi: je li povezanost rizičnih varijanti gena s KVB fenotipovima, koja je višekratno potvrđena u općoj populaciji, prisutna i u ovoj dobnoj skupini? Ili je možda ona već u mlađoj dobi dovela do pobola i selektivnog mortaliteta te promijenila učestalosti alela u skupini osoba duboke starosti?

#### 5.4. I/D polimorfizam gena za angiotenzin-pretvarajući enzim (ACE)

Povezanost insercijsko/delecijskog (I/D) polimorfizma na intronu 16 gena za angiotenzin-pretvarajući enzim s patološkim stanjima otkrivena je još 1992. godine: DD genotip se pokazao rizičnim u patogenezi ateroskleroze i tromboze (Cambien i sur., 1992, 1994). Kako je sustav renin-angiotenzin-aldosteron jedan od najvažnijih regulatora kardiovaskularne homeostaze i krvnoga tlaka, a Ace ključni enzim u pretvorbi angiotenzina I u angiotenzin II, smatra se da do hipertenzije dolazi zbog utjecaja varijacija u ACE genu na razinu enzima u krvotoku: osobe s II genotipom imaju nisku razinu Ace enzima, heterozigoti ID imaju srednju razinu enzima, a najviša razina Ace enzima izmjerena je kod osoba s DD genotipom (Rigat i sur., 1990). U ovoj studiji, unatoč visokom postotku hipertenzivnih osoba, nije detektirana samostalna povezanost ni ACE DD genotipa niti D alela s povišenim sistoličkim ili dijastoličkim krvnim tlakom, tlakom pulsa, niti s hipertenzijom. Provedena logistička regresija je pokazala da niti jedan genotip ACE gena nije uključen u najbolji model za predikciju hipertenzije, no, iznenađujuće, model koji sadržava kombinaciju ACE DD genotipa, MTHFR TT genotipa i eNOS 55 VNTR polimorfizam, pokazao se kao zaštitni za razvoj kardiovaskularnih bolesti (model koji uz navedenu kombinaciju genotipova sadrži samo spol objašnjava 3,9% varijance). Osim toga, kombinacija koja sadrži genotipove ACE DD i MTHFR CC je pokazala manju šansu doživljenja dugovječnosti definirane kao dob  $\geq 90$  godina, u modelu koji objašnjava 3,6% varijance ovog fenotipa. Ovu neobičnu interakciju provjerili smo testiranjem učestalosti D alela između opće populacije i populacije osoba dobi 80 i više godina: veća učestalost D alela i DD genotipa pronađena je u osoba duboke starosti Hrvatske, što je potvrđeno meta-analizom deset autohtonih europskih populacija.

Prvo istraživanje distribucije ACE I/D genotipova kod stogodišnjaka i opće populacije pokazalo je neočekivano visoku učestalost DD genotipa kod stogodišnjih Francuza u odnosu na kontrolnu skupinu: 40,0% naprema 26,0%,  $p < 0,01$  (Schachter i sur., 1994). Slično istraživanje provedeno je 2000. godine na uzorku ispitanika gotovo dvostruko većem od prvog, no nisu pronađene statistički značajne razlike: učestalost DD genotipa u populaciji stogodišnjaka iznosila je 35,0% naprema 30,5% u općoj populaciji,  $p = 0,22$  (Blanche i sur., 2001). Nakon Francuske, slijedile su još Rotterdamska studija (Arias-Vasquez i sur., 2005) te studija provedena u Italiji (Nacmias i sur., 2007), no nijedna nije pronašla povezanost ACE I/D polimorfizma s dugovječnošću. Međutim, pronađeno je da se u populaciji Nijemaca starih više od 80 godina D alel javlja s većom učestalošću nego kod mladih osoba (Luft, 1999),



jednako kao i kod Rusa, stanovnika Moskve dobi 80+ godina (Miloserdova i sur., 2002). Osim generacijskih razlika u učestalosti alela i genotipova, Panza je uočio da se učestalosti D i I alela mijenjaju prema geografskoj širini: od sjevera prema jugu Europe, bilježi se trend smanjenja učestalosti I alela i povećanja učestalosti D alela, kako kod stogodišnjaka, tako i kod mladih osoba (Panza i sur., 2003).

Schahterova skupina je prva predložila da D alel, uz rizik pojave KVB koji nosi sa sobom, s druge strane možda pruža dugotrajni zaštitni učinak: takav bi učinak mogao pružiti ranu selektivnu prednost i/ili kasniji obrat negativnog utjecaja na preživljenje. Predložili su i moguću povezanost zaštitnog učinka DD genotipa i drugih bioloških funkcija *ACE* gena osim u RAS i kinin-kallikrein sustavu, a to su neuroendokrine i imunomodulatorske funkcije koje su ovisne o razini Ace enzima u krvi i mogle bi doprinijeti ukupnom preživljenju i dugovječnosti (Ehlers i Riordan, 1989; McGeer i Singh, 1992; Costerousee i sur., 1993). Dakako, povezanost DD genotipa s dugovječnošću može također biti rezultat neravnoteže vezanosti gena (LD) s nekim susjednim genom koji još nije identificiran. Primjerice, zanimljivo je napomenuti da se gen za ljudski hormon rasta također nalazi na 17q23 kromosomu, pokazuje jaku povezanost s *ACE* genom, i čini se da ima važnu ulogu u starenju (McGeer i Singh, 1992; Cristan i Carr, 2000; Huang i sur., 2007). I alel *ACE* gena u modelu logističke regresije pokazao se prediktivnim za pretilost u kombinaciji s *eNOS* 44 i 55 polimorfizmima, u modelu koji objašnjava čak 8,3% varijance. Potvrdu povezanosti *ACE* gena i pretilosti nismo pronašli u drugim studijama. Međutim, sve je više dokaza da *ACE* gen ima puno kompleksnije djelovanje koje premašuje njegovu ulogu u RAS sustavu i čiji učinak prepoznajemo u snažnom odmaku od Hardy-Weinbergovih proporcija u uzorku osoba duboke starosti.

## 5.5. Polimorfizam gena za apolipoprotein E (*APOE*)

Poznavanje lipidnog profila pomaže liječniku da pravovremeno preventivno djeluje te smanji vjerojatnost da osoba razvije neku od kardiovaskularnih bolesti, zbog čega je vrlo važno prepoznati čimbenike koji utječu na koncentraciju lipida u krvi. Istraživanja povezanosti ApoE proteina i *APOE* polimorfizma s hiperlipoproteinemijom, aterosklerozom i koronarnom bolesti srca traju već preko 25 godina: E4 alel se pokazao rizičnim za aterosklerozu, dok je E2 alel prepoznat kao protektivan (Kolovou i Anagnostopoulou, 2007). Iako je *APOE* polimorfizam najčešće bio testiran u klasičnim *case-control* studijama (zdrave vs. bolesne osobe), 1988. je provedeno istraživanje i u 80+ populaciji Kanađana oba spola, s pretpostavkom da će učestalost E4 alela biti manja kod starijih osoba nego u općoj populaciji, što se i potvrdilo (Davignon i sur., 1988). Nekako istovremeno su brojni znanstvenici pokušavali locirati uzročnike ranojavljajuće (do 65. godine života) i kasnojavljajuće Alzheimerove bolesti (AD): uzročnici ranojavljajuće AD locirani su na kromosomima 21 i 14 (St.George-Hyslop i sur., 1987; Schellenberg i sur., 1992), a uzročnik obiteljske AD je lociran na kromosomu 19 (Pericak-Vance i sur., 1991). Konačnu potvrdu dao je 1993. godine Saunders, koji je utvrdio da je alel E4 *APOE* gena, koji se nalazi na kromosomu 19, povezan s kasnojavljajućom obiteljskom te sporadičnom Alzheimerovom bolešću (Saunders i sur., 1993). Unatoč povezanosti *APOE* E4 alela s povišenom razinom kolesterola te češćom pojavom KVB, najsnažnija povezanost postoji upravo s dobnovezanim kognitivnim propadanjem (Alzheimerovom bolešću) te se i danas *APOE* polimorfizmi najčešće istražuju u tom kontekstu (Geßner i sur., 1997; Deary i sur., 2004; Bathum i sur., 2006). Osobe koje su E4/E4 homozigoti, u odnosu na E3/E3 homozigote, imaju 15x veću vjerojatnost pojave AD ukoliko su europskog porijekla, a 8x veću vjerojatnost ukoliko su afričkog porijekla (Murabito i sur., 2012).

Još je 1994. godine kod kognitivno zdravih 100 i više godišnjaka s područja čitave Francuske (Schachter i sur., 1994) i 90+ godišnjaka iz grada Oulu iz Finske (Kervinen i sur., 1994), utvrđena statistički značajno veća učestalost E2 alela, a značajno manja učestalost E4 alela u odnosu na odgovarajuću opću populaciju. Povezanost ovog polimorfizma s dugovječnošću nije potvrđena u studijama kandidatskih gena u populaciji Italije (Bader i sur., 1998) i Švedske (Skoog i sur., 1998), ali jest u brojnim drugim populacijama (Gerdes i sur., 2000; Frisoni i sur., 2001; Blanche i sur., 2001; Maruszak i sur., 2012). Uloga *APOE* gena u dugovječnosti dodatno je potvrđena u cjelogenomskim asocijacijskim studijama (GWAS)

(Deelen i sur., 2011; Nebel i sur., 2011; Sebastiani i sur., 2012). Danas je općeprihvaćeno da *APOE* gen utječe na trajanje života odnosno dugovječnost u ljudi putem ubrzanog razvoja ateroskleroze i drugih dobno-vezanih bolesti (Murabito i sur., 2012; Ganna i sur., 2013).

Unatoč tome što usporedba opće populacije i osoba dobi 80 i više godina u Hrvatskoj nije pokazala statistički značajnu razliku, meta-analiza 14 europskih populacija pokazala je signifikantnu razliku u učestalosti i E2 alela i E4 alela između ovih dobnih skupina. Kod starijih osoba se E2 alel *APOE* gena javlja češće nego u općoj populaciji, za razliku od E4 alela koji je češći u općoj populaciji u odnosu na 80+ osobe. Kada smo naš uzorak podijelili na mlađe i starije od 95 godina, pronašli smo signifikantno veću učestalost E4 alela u skupini osoba dobi 80-94 godine nego u osoba 95+. Zanimljivo je istaknuti i da su u našem uzorku nađene 2 osobe sa E4/E4 genotipom, čiji rezultat Mini-mental testa nije ukazao na kognitivni otklon u odnosu na ostale ispitanike (prosjeak uzorka iznosi  $23,5 \pm 3,6$  boda): MMS prvog ispitanika je iznosio 23,5 boda, a drugog 22,5 boda. Utoliko je neočekivaniji nalaz logističke regresije koju smo proveli, a koja je izdvojila upravo genotip E2E3 *APOE* gena, u kombinaciji s CT genotipom *MTHFR* gena, kao rizičan za pojavu hipertenzije, u modelu koji objašnjava 4,5% varijance, a uz navedene genotipove sadrži samo spol.

### **5.6. VNTR polimorfizam gena za endotelnu sintazu dušičnog oksida (*eNOS*)**

Endotelni NOS (*eNOS*) jedna je od tri izoforme enzima sintaze dušičnog oksida (NOS), koji je vrlo bitan u održavanju proizvodnje dušičnog oksida (NO), odnosno, posredno u regulaciji kardiovaskularne homeostaze. Smanjena proizvodnja ili aktivnost NO-a direktno utječe na poremećaj rada srca (Thomas i sur., 2013). Do sada je pronađena nekolicina polimorfizama *eNOS* gena od kojih tri pokazuju povezanost s patofiziologijom bolesti. Jedan od tih polimorfizama je VNTR polimorfizam u intronu 4 gena, za kojeg je utvrđena povezanost sa promijenjenom razinom NO-a u krvnoj plazmi i varijacije u koncentraciji nitrita i nitrata (Tsukada i sur., 1998; Wang i sur., 1997). Nadalje, pronađena je povezanost *eNOS* VNTR polimorfizma s koronarnom aterosklerozom i vaskularnim komplikacijama u dijabetičkih bolesnika u raznim populacijama svijeta (Wang i Wang, 2000; Casas i sur., 2006; Zhang i sur., 2006; Kim i sur., 2007; Ahluwalia i sur., 2008).

Prema našim saznanjima, učestalost VNTR polimorfizma u *eNOS* genu određena je samo u jednoj europskoj populaciji staroj 80 i više godina: Alvarez i suradnici su istražujući gensku podlogu kasnojavljujuće AD odredili učestalost ovog polimorfizma u općoj populaciji

Španjolske (<65 god.) te populaciji zdravih osoba duboke dobi (>85 god.), no nisu našli razlike u učestalosti ni genotipova niti alela (Alvarez i sur., 1999). Usporedba opće populacije Hrvatske i osoba dobi 80 i više godina također nije pokazala statistički značajnu razliku između ovih dviju dobnih skupina, a s obzirom na samo jednu, prethodno navedenu europsku studiju, meta-analiza nije mogla biti provedena. Ipak, rezultati logističke regresije pokazali su da kombinacija *eNOS* 55 polimorfizma te *ACE* DD i *MTHFR* TT genotipova smanjuje šansu pojave KVB (model objašnjava 3,9% varijance), kao i da genotipovi 44 i 55 *eNOS* gena u kombinaciji s I alelom *ACE* gena povećavaju šansu razvoja pretilosti (model objašnjava 8,3% varijance).

### **5.7. Polimorfizam gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (C667T)**

5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza, enzim je s ključnom ulogom u metabolizmu folata: katalizira redukciju 5,10-metilentetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat, prevladavajući oblik folata u cirkulaciji, koji služi kao donor ugljika za remetilaciju homocisteina u metionin. Povišena razina homocisteina pokazala se prediktornom za kardiovaskularne bolesti – infarkt miokarda, inzult, aterosklerozu. Adekvatna razina folata može smanjiti razinu homocisteina i smanjiti učestalost KVB (Frosst i sur., 1995). Supstitucija 677. nukleotida *MTHFR* gena iz C u T dovodi do promjene aminokiseline alanina u valin u proteinu; pokazalo se da je TT genotip povezan sa smanjenom aktivnošću enzima, njegovom termolabilnošću i povišenom razinom homocisteina.

Jedna od prvih studija povezanosti ovog polimorfizma s dugovječnošću provedena je u Švedskoj, no nisu nađene razlike u učestalosti alela ili genotipova koje bi se mogle pripisati zaštitnom ili štetnom djelovanju istraživanih alela (Brattstrom i sur., 1998b). Povišena koncentracija homocisteina pokazala se također dobrim prediktorom kognitivnog propadanja (Tucker i sur., 2005; Ravaglia i sur., 2005; Mooijaart i sur., 2005) te je stoga istraživana uloga *MTHFR* C667T polimorfizma kod starijih osoba u svrhu procjene kognitivnog propadanja i posredno, dugovječnosti. Lise Bathum nije utvrdila povezanost kod 90 i više godišnjih ispitanika, sudionika Danish 1905 Cohort studije (Bathum i sur., 2007), no u populaciji Italije se pokazalo da veća učestalost T alela povećava vjerojatnost javljanja kasnog oblika Alzheimerove bolesti (engl. *late-onset AD*, Coppede i sur., 2012). Studije slične ovoj, u kojima je testirana uloga polimorfizama kandidatskih gena koji povećavaju kardiovaskularni rizik, pokazale su da između opće populacije i populacije stogodišnjaka u Danskoj nema

razlika u učestalosti alela i genotipova C667T polimorfizma (Bladbjerg i sur., 1999), kao ni između opće i stogodišnje populacije Francuske (Faure-Delanef i sur., 1997).

U ovoj disertaciji nisu pronađene statistički značajne razlike u učestalosti *MTHFR* genotipova i alela između opće i staračke populacije Hrvatske, iako je učestalost T alela kod osoba starijih od 80 godina ipak bila nešto viša; 35,5% naprema 31,4% kod mladih. Rezultati meta-analize, unatoč omjeru šansi  $OR > 1$ , također nisu pokazali signifikante razlike među generacijama ( $p = 0,277$ ). Genotipovi *MTHFR* gena u modelima logističke regresije pokazali su uključenost u tri od četiri istraživana fenotipa. Genotip CC *MTHFR* gena u kombinaciji s genotipom DD *ACE* gena smanjuje šansu doživljenja dobi 90 i više godina, a genotip TT u kombinaciji s genotipovima DD *ACE* gena i 55 *eNOS* gena smanjuje šansu pojave kardiovaskularne bolesti (model objašnjava 3,9% varijance). Šansu razvoja hipertenzije povećava kombinacija CT genotipa *MTHFR* gena i E2E3 genotipa *APOE* gena (objašnjava 4,5% varijance). Kao što vidimo, sva tri primjera predstavljaju neočekivan rezultat jer TT genotip *MTHFR* gena niti u jednom primjeru nije prepoznat kao onaj koji predstavlja zdravstveni rizik. Stoga očekujemo da će, kao i u slučaju *ACE* I/D polimorfizma, buduće studije pružiti dokaze o pleiotropnom djelovanju *MTHFR* gena.

### **5.8. Interakcija istraživanih genetičkih i negenetičkih čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti u populaciji osoba dobi 80 i više godina**

Rezultati ispitivanja pojedinačne povezanosti izučavanih polimorfizama s kardiovaskularnim čimbenicima rizika pokazali su pozitivnu povezanost *ACE*, *APOE* i *eNOS* polimorfizama s pokazateljima pretilosti, negativnu povezanost E4 polimorfizma *APOE* gena s dugovječnošću i pozitivnu povezanost E2 polimorfizma istog gena s lipidima u krvi. Kod nositelja I alela *ACE* gena češće je utvrđen opseg struka veći od vrijednosti definiranih kao rizične za pojavu KVB prema EU standardima, a osobe s genotipom 44 *eNOS* gena značajno češće imaju sumu kožnih nabora iznad 66. percentila (u odnosu na osobe koje nemaju taj genotip). Svi nositelji E4 alela *APOE* gena imaju omjer struk/bokovi iznad granice rizika i svi su mlađi od 95 godina, a nositelji E2 alela češće imaju vrijednosti LDL kolesterola ispod granice rizika za KVB u odnosu na osobe koje nemaju E2 alel. Također, niti jedna osoba s E2 alelom *APOE* gena nema dijastolički krvni tlak iznad 90 mm Hg.

S ciljem kvantificiranja povezanosti izučavanih polimorfizama kandidatskih gena za KVB s ostalim kardiovaskularnim čimbenicima rizika u populaciji osoba 80+ god., proveli

smo logističku regresiju koja pokazuje kolika je šansa razvoja (pojave) ispitivanog fenotipa ukoliko osoba nosi određenu kombinaciju alela ili genotipova. Od četiri testirane varijable, najveći postotak objašnjenja varijance je dobiven u modelu koji sadrži kombinaciju *ACE* DD i *MTHFR* CC genotipova i smanjuju šansu doživljenja dobi od 90 godina (27,5% varijance), te u modelu koji povećava šansu pojave prekomjerne potkožne masti (pretilost prema sumi kožnih nabora) u osoba koje nose I alel *ACE* gena i genotipove 44 i 55 *eNOS* gena (21,7% varijance). U modelu koji objašnjava najveću varijancu za doživljenjem dugovječnosti, manju šansu doživljenja kasne dobi imaju osobe s DD\_CC kombinacijom genotipova, žene i pretile osobe ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), dok vjerojatnost doživljenja dugovječnosti povećavaju viša koncentracija željeza i povišena glukoza u krvi ( $>6,4 \text{ mmol/L}$ ). Ženski spol (OR=3,150), povišeni trigliceridi u krvi (OR=1,452) te već navedeni IID\_4455 genotip (OR=1,963) povećavaju omjer šansi da osoba bude pretila, dok dob iznad 90 godina smanjuje šansu.

Unatoč tome što svi ispitivani polimorfizmi u općoj populaciji pokazuju vezu s hipertenzijom i ostalim fenotipovima kardiovaskularnih bolesti, najbolji model prediktorskih varijabli u logističkoj regresiji za hipertenziju sadrži genotipove samo dva ispitivana gena i objašnjava svega 7,4% varijance, a model za kardiovaskularne bolesti objašnjava 12,1% varijance pomoću genotipova tri gena. Kombinacija genotipa CT *MTHFR* gena i genotipa E2E3 *APOE* gena čak 5,829 x povećava šansu razvoja hipertenzije i jedina je statistički značajna u najboljem prediktivnom modelu za HT. U modelu koji najbolje objašnjava kardiovaskularne bolesti, kombinacija *ACE* DD genotipa, *MTHFR* TT genotipa i *eNOS* 55 genotipa smanjuje šansu razvoja KVB, dok veći BMI povećava omjer šansi za razvoj KVB.

## 5.9. REZIME

Konačni cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti povezanost dugovječnosti u ljudi s klasičnim negenetičkim čimbenicima rizika i četiri kandidatska gena za KVB, kako bismo identificirali negenetičke i genetičke čimbenike uključene u ovaj fenotip. S obzirom na snažnu hipotezu koja se razvila iz činjenice da su KVB glavni uzročnik smrtnosti, a odabrani *ACE*, *APOE*, *eNOS* i *MTHFR* geni i negenetički čimbenici nedvojbeno uključeni u patogenezu bolesti, intuitivno smo očekivali povezanost navedenih čimbenika rizika s dugovječnosti.

Iznenadujuće, i u suprotnosti s podacima iz literature o rezultatima studija općih populacija, kod osoba dobi 80 i više godina nismo pronašli povezanost klasičnih čimbenika rizika za KVB s KVB fenotipovima. Nadalje, nijedan istraživani polimorfni gen u ovoj 80+ populaciji nije pojedinačno bio signifikantno povezan s hipertenzijom i/ili KVB fenotipovima, što je opet u suprotnosti s nalazima u općoj populaciji. Povezanost ispitivanih gena s dugovječnošću otkrili smo u više europskih populacija za alele dvaju gena: D alel *ACE* gena i E2 alel *APOE* gena. Dobiveni rezultat kako nositelji E2 alela imaju veću šansu za postizanje dugovječnosti, u odnosu na osobe koje nemaju taj alel, bio je očekivan s obzirom da je isto dobiveno u brojnim studijama kandidatskih gena i GWAS studijama, no sada smo meta-analizom dokazali statistički značajnu povezanost E2 alela s dugovječnošću u europskim populacijama. Uz taj nalaz, originalan doprinos ovog istraživanja je i dokazano pozitivan utjecaj D alela *ACE* gena na dugovječnost, također potvrđen u velikom broju europskih populacija (Zajc Petranović i sur., 2012).

Iako se oba gena, čiju smo ulogu potvrdili u dugovječnosti naše populacije, primarno vežu uz nastanak KVB, njihovo djelovanje je očigledno pleiotropno. Tako, npr., produkt *ACE* gena, Ace protein, osim u vazokonstrukciji, sudjeluje i u upalnim procesima, oksidativnom stresu, staničnom rastu i diferencijaciji, a može i interferirati s otpuštanjem acetilkolina u neuronima i utjecati na kognitivne funkcije (Bartus i sur., 1982). ApoE enzim sudjeluje u regulaciji lipida u krvi i povezan je s nastankom ateroskleroze i demencije, a nedavno je u više studija objavljeno kako mlađe osobe koje nose "štetan" E4 alel imaju veći IQ od osoba koje ne nose taj alel te je predložena ideja antagonističke pleiotropije (Tuminello i Duke Han, 2011; Jochemsen i sur., 2012).

Dugovječnost je kompleksno svojstvo na koje utječe mnoštvo čimbenika. Opsežne studije koje se provode sa ciljem otkrivanja bioloških puteva, gena i genskih varijanti koje

utječu na razlike među pojedincima u prvom redu ciljaju ka dobivanju novih spoznaja o tome kako neizbježan proces starenja učiniti što bezbolnijim. Odnosno, usmjerene su ka boljoj prevenciji, dijagnostici i liječenju dobnno vezanih bolesti kako bi se poboljšala kvaliteta života u starosti. U ovoj je disertaciji istraživana uloga samo četiri polimorfizma, no svejedno naši rezultati doprinose sveukupnosti spoznaja o utjecaju *ACE*, *APOE*, *eNOS* i *MTHFR* gena i negenetičkih biometrijskih čimbenika na zdravlje u starosti i na samu dugovječnost.



## 6. ZAKLJUČCI

Provedene analize povezanosti polimorfizama četiriju kandidatskih gena za kardiovaskularne bolesti s negenetičkim čimbenicima rizika u osoba starih 80 i više godina upućuju na sljedeće zaključke:

- 1) Gotovo  $\frac{3}{4}$  uzorka od 325 osoba starih 80 i više godina ( $88,28 \pm 3,49$ ) sačinjavaju žene, što adekvatno reprezentira odnos spolova u toj dobnoj skupini. Učestalost čimbenika rizika za KVB u uzorku je sljedeća: hipertenzije 65,4%, pretilosti 28,3%, opsega struka većeg od EU standarda 81,0%, omjera stuka i bokova  $\geq 0,80$  91,6%, tlaka pulsa  $>40$  mm Hg 85,8%, povišene razine glukoze 42,2%, ukupnog kolesterola 65,5%, LDL kolesterola 61,7% i triglicerida 38,8% te snižene razine HDL kolesterola 25,2%. Ustanovljene su značajne spolne razlike u prisutnosti KVB rizika: kod žena je zabilježena veća učestalost većine testiranih čimbenika koji prelaze vrijednosti određene kao kritične za razvoj KVB; od antropometrijskih pokazatelja žene češće imaju  $BMI \geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, opseg struka veći od EU standarda, sumu kožnih nabora iznad 66. percentila, tlak pulsa  $>40$  mm Hg, a od lipidnih pokazatelja povišenu koncentraciju ukupnog i LDL kolesterola te triglicerida. Muškarci pak češće imaju povišenu koncentraciju glukoze u krvi.
- 2) Kada je skupina osoba dobi 80 i više godina podijeljena na mlađu ( $<90$  god) i stariju ( $\geq 90$  god) podskupinu, žene dviju dobnih skupina razlikovale su se u svim izmjerenim antropometrijskim osobinama, pri čemu su žene starije dobne skupine imale konzistentno niže srednje vrijednosti. Muškarci su se razlikovali samo u visini tijela i visini potkoljenice, a obje varijable su bile veće kod mlađih muškaraca. Mlađi muškarci imali su i više vrijednosti indeksa ateroskleroze, a mlađe žene veću koncentraciju triglicerida u odnosu na stariju podskupinu.
- 3) Razdioba genotipova *ACE* I/D i *eNOS* VNTR polimorfizma u ovom uzorku nije u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom, dok je razdioba genotipova *MTHFR* C667T i *APOE* epsilon polimorfizma u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. Ustanovljene su sljedeće učestalosti alela: 61,0% D i 39,0% I alela (*ACE*), 64,5% C i 35,5% T alela (*MTHFR*), 20,5% alela 4 i 79,5% alela 5 (*eNOS*) te 7,2% alela E2, 85,4% alela E3 i 7,4% alela E4 (*APOE*).
- 4) Mješovite kvantitativno-kvalitativne analize koje su u setu nezavisnih varijabli sadržavale i negenetičke i kombinacije genetičkih čimbenika rizika za KVB,

provedene pomoću logističke regresije, su pomogle u identifikaciji modela koji objašnjavaju čak 27,5% varijance za dob  $\geq 90$  god. i 21,7% varijance pretilosti. Najbolji logistički modeli za hipertenziju i razvijene kardiovaskularne bolesti objašnjavali su samo 7,4%, odnosno, 12,1% varijance.

- 5) Identificirane su kombinacije genotipova koje povećavaju šansu razvoja hipertenzije (*MTHFR* CT u kombinaciji s genotipom *APOE* E2E3) i pretilosti (I alel *ACE* gena u kombinaciji s genotipovima *eNOS* 44 i 55). Također su identificirani genotipovi koji smanjuju šansu doživljenja dugovječnosti odnosno dobi  $\geq 90$  god. (*ACE* DD u kombinaciji s *MTHFR* CC) i genotipovi koji smanjuju šansu razvoja kardiovaskularnih bolesti (*ACE* DD u kombinaciji *MTHFR* TT i *eNOS* 55 genotipom).
- 6) Meta-analiza I/D polimorfizma *ACE* gena dokazala je signifikantno veću učestalost D alela u populaciji osoba dobi 80 i više godina u odnosu na opću populaciju u uzorku od deset europskih populacija, što je potvrda nalaza ustanovljenog u populaciji Hrvatske.
- 7) Meta-analiza epsilon polimorfizma *APOE* gena potvrdila je signifikantno veću učestalost E2 alela u osoba dobi 80 i više godina u odnosu na opću populaciju u uzorku od četrnaest europskih populacija te signifikantno manju učestalost E4 alela na istom uzorku, što je potvrda nalaza i prethodnih drugih studija. U Hrvatskoj je također ustanovljen navedeni odnos između E2 i E4 alela, ali on nije bio statistički signifikantan.
- 8) Usporedbom devet europskih populacija, za istraživani C/T polimorfizam *MTHFR* gena nije detektirana statistički značajna razlika učestalosti alela u osoba dobi 80 i više godina u odnosu na opću populaciju. Za VNTR polimorfizam *eNOS* gena meta-analiza nije mogla biti napravljena zbog nedostatnog broja publikacija koje bi odgovarale traženim kriterijima.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Agarwal DP (2001) Genetic predisposition to cardiovascular diseases. *Int J Hum Genet* 1: 233–241.
2. Ageing Report 2009: economic and budgetary projections for the EU-27 Member States (2008-2060). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2009. DOI 10.2765/80301
3. Agerholm-Larsen B, Tybjaerg-Hansen A, Frikke-Schmidt R, Grønholdt ML, Jensen G, Nordestgaard BG (1997) ACE gene polymorphism as a risk factor for ischemic cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 127: 346–355.
4. Ahluwalia TS, Ahuja M, Rai TS, Kohli HS, Sud K, Bhansali A, Khullar M (2008) Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes and diabetic nephropathy among Asian Indians. *Mol Cell Biochem* 314(1-2): 9-17.
5. Al-Omer DK (2010) The impact of antihypertensive medication class on pulse pressure. *Thi-Qar Medical Journal* 4(1): 18-25.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells. *Molecular Biology of the Cell* (textbook) (5<sup>th</sup> ed.) Garland Science, p. 1115.
7. Alexander P (1967) The role of DNA lesions in processes leading to aging in mice. *Symp Soc Exp Biol* 21: 29-50.
8. Alexeyev MF (2009) Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? Review. *The FEBS Journal* 276(20): 5768-5787.
9. Alía P, Mañá J, Capdevila O, Alvarez A, Navarro MA (2005) Association between ACE gene I/D polymorphism and clinical presentation and prognosis of sarcoidosis. *Scand J Clin Lab Invest* 65(8): 691—698.
10. Alvarez R, Alvarez V, Lahoz CH, Martínez C, Peña J, Sánchez JM, Guisasola LM, Salas-Puig J, Morís G, Vidal JA, Ribacoba R, Menes BB, Uría D, Coto E (1999) Angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase DNA polymorphisms and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 733–736.

11. Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423(6936): 181-185.
12. Anson RM, Guo Z, de Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram DK, Lane MA, Mattson MP (2003) Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6216–6220.
13. Arbustini E, Grasso M, Fasani R, Klersy C, Diegoli M, Porcu E, Banchieri N, Fortina P, Danesino C, Specchia G (1995) Angiotensin converting enzyme gene deletion allele is independently and strongly associated with coronary atherosclerosis and myocardial infarction. *Brit Heart J* 74: 584–591.
14. Arias-Vasquez A, Sayed-Tabatabaei FA, Schut AF, Hofman A, Bertolli-Avella AM, Vergeer JM, Aulchenko YS, Witteman JC, van Duijn CM (2005) Angiotensin converting enzyme gene, smoking and mortality in a population-based study. *Eur J Clin Invest* 35: 444–449.
15. Arking R (2006) *The biology of aging; observations and principles*. 3<sup>rd</sup> Ed. New York, Oxford University Press.
16. Armani C, Landini L, Leone A (2010) Interactive Effect of Cigarette Smoking and Gene Variants for Predisposing to Cardiovascular Disease. *Curr Pharm Des* 16(23): 2531-2538.
17. Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, Herrington DM, Hong Y, Jaquish C, McDermott DA, O'Donnell CJ (2007) Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 115(22): 2878-2901.
18. Assmann G, Schmitz G, Menzel H-J, Schulte H (1984) Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia. *Clin Chem* 30(5): 641-643.
19. August P, Oparil S (1999) Hypertension in women. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1862-1866.

20. Babić Božović I, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Mahulja-Stamenković V, Prpić I, Brajenović-Milić B (2011) MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 53(4): 546-550.
21. Bader G, Zuliani G, Kostner GM, Fellin R (1998) Apolipoprotein E polymorphism is not associated with longevity or disability in a sample of Italian octo- and nonagenarians. *Gerontology* 44: 293–299.
22. Baehner RL, Murrmann SK, Davis J, Johnston RB Jr (1975) The role of superoxide anion and hydrogen peroxide in phagocytosis-associated oxidative metabolic reactions. *J Clin Invest* 56(3): 571-576.
23. Baggio G, Franceschi C, Mari D, Herskind AM (1997) Biology and genetics of human longevity. World Congress of Gerontology, Adelaide, Australia.
24. Bai JL, Zheng MH, Xia X, Ter-Minassian M, Chen YP, Chen F (2009) MTHFR C677T polymorphism contributes to prostate cancer risk among Caucasians: a meta-analysis of 3511 cases and 2762 controls. *Eur J Cancer* 45(8): 1443-1449.
25. Bairey Merz CN, Johnson BD, Sharaf BL, Bittner V, Berga SL, Braunstein GD, Hodgson TK, Matthews KA, Pepine CJ, Reis SE, Reichek N, Rogers WJ, Pohost GM, Kelsey SF, Sopko G; WISE Study Group (2003) Hypoestrogenemia of hypothalamic origin and coronary artery disease in premenopausal women: a report from the NHLBI-sponsored WISE study. *J Am Coll Cardiol* 41(3): 413–419.
26. Barbalić M, Peričić M, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N (2004) ACE Alu insertion polymorphism in Croatia and its isolates. *Coll Antropol* 28: 603–610.
27. Bartke A, Brown-Borg H (2004) Life extension in the dwarf mouse. *Curr Top Dev Biol* 63: 189 –225.
28. Bartolucci AA (2009) Opis i tumačenje metodoloških i statističkih tehnika u meta-analizama. *Biochem Med* 19(2): 127-136.
29. Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lipka AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-414.
30. Bathum L, Christiansen L, Jeune B, Vaupel J, McGue M, Christensen K (2006) Apolipoprotein E genotypes: relationship to cognitive functioning, cognitive decline, and survival in nonagenarians. *J Am Geriatr Soc* 54(4): 654-658.

31. Bathum L, von Bornemann Hjelmberg J, Christiansen L, McGue M, Jeune B, Christensen K (2007) Methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T and methionine synthase 2756A>G mutations: no impact on survival, cognitive functioning, or cognitive decline in nonagenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62(2): 196-201.
32. Baumgartner RN, Stauber PM, McHugh D, Koehler KM, Garry PJ (1995) Cross-sectional age differences in body composition in persons 60+ years of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50(6): M307-316.
33. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337–342.
34. Beckstead WA, Ebbert MT, Rowe MJ, McClellan DA (2009) Evolutionary pressure on mitochondrial cytochrome b is consistent with a role of Cytb17T affecting longevity during caloric restriction. *PLoS One* 4: 5836.
35. Begg CB, Mazumdar M (1994) Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics* 50: 1088–1101.
36. Bellizzi D, Dato S, Cavalcante P, Covello G, Di Cianni F, Passarino G, Rose G, De Benedictis G (2007) Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: SIRT3 and PSMD13. *Genomics* 89: 143-150.
37. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G (2010) Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med* 2: 247–257
38. Bennett EA, Keller H, Mills RE, Schmidt S, Moran JV, Weichenrieder O, Devine SE (2008) Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Res* 18(12): 1875-1883.
39. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290(5497): 1771-1775.
40. Best BP (2009) Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. *Rejuv Res* 12(3): 199–208.

41. Bethke L, Webb E, Murray A, Schoemaker M, Feychting M, Lönn S, Ahlbom A, Malmer B, Henriksson R, Auvinen A, Kiuru A, Salminen T, Johansen C, Christensen HC, Muir K, McKinney P, Hepworth S, Dimitropoulou P, Lophatananon A, Swerdlow A, Houlston R (2008) Functional polymorphisms in folate metabolism genes influence the risk of meningioma and glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17(5): 1195-1202.
42. Bickeböller H, Campion D, Brice A, Amouyel P, Hannequin D, Didierjean O, Penet C, Martin C, Pérez-Tur J, Michon A, Dubois B, Ledoze F, Thomas-Anterion C, Pasquier F, Puel M, Demonet JF, Moreaud O, Babron MC, Meulien D, Guez D, Chartier-Harlin MC, Frebourg T, Agid Y, Martinez M, Clerget-Darpoux F (1997) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: genotype-specific risks by age and sex. *Am J Hum Genet* 60(2): 439-446.
43. Bishop NA, Guarente L (2007) Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet* 8: 835–844.
44. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007) Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 297(8): 842–857.
45. Black HR, Wong ND, Gardin MJ (1999) Preventive Cardiology, Cardiovascular risk factors (Chapter 3). The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
46. Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* 120(1): 33-53.
47. Bladbjerg EM, Andersen-Ranberg K, de Maat MP, Kristensen SR, Jeune B, Gram J, Jespersen J (1999) Longevity is independent of common variations in genes associated with cardiovascular risk. *J Thromb Haemost* 82: 1100–1105.
48. Blanche H, Cabanne L, Sahbatou M, Thomas G (2001) A study of French centenarians: are ACE and APOE associated with longevity? *Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Serie III*, 324: 129–135.
49. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299(5606): 572-574.
50. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349 –352.

51. Bohr VA, Sander M, Kraemer KH (2005) Rare diseases provide rare insights into DNA repair pathways, TFIIH, aging and cancer center. *DNA Repair* 4(2): 293-302.
52. Borinskaya SA, Kal'ina NR, Sanina ED, Kozhekbaeva ZhM, Gupalo EYu, Garmash IV, Ogurtsov PP, Parshukova ON, Bojko SG, Veselovsky EM, Vershubskaya GG, Kozlov AI, Rogaev EI, Yankovsky NK (2007) Polymorphism of the Apolipoprotein E Gene (APOE) in the Populations of Russia and Neighboring Countries. *Genetika* 43(10): 1434-1440. Russian.
53. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L (1998a) Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98: 2520–2526.
54. Brattström L, Zhang Y, Hurtig M, Refsum H, Ostensson S, Fransson L, Jonés K, Landgren F, Brudin L, Ueland PM (1998b) A common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and longevity. *Atherosclerosis* 141(2): 315-319.
55. Brown KS, Kluijtmans LA, Young IS, Murray L, McMaster D, Woodside JV, Yarnell JW, Boreham CA, McNulty H, Strain JJ, McPartlin J, Scott JM, Mitchell LE, Whitehead AS (2004) The 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism interacts with smoking to increase homocysteine. *Atherosclerosis* 174(2): 315-322.
56. Buer MC (1926) *Health, Wealth and Population in the Early Days of the Industrial Revolution*. London: George Routledge & Sons. p. 30.
57. Buettner D (2008) *The Blue Zones: Lessons for Living Longer From the People Who've Lived the Longest*. National Geographic Society, Washington DC, USA.
58. Burl VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D (1995) Prevalence of hypertension in the US adult population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1991. *Hypertension* 25: 305–313.
59. Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvári M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A, Kaerberlein M, Soti C, Partridge L, Gems D (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C.elegans* and *Drosophila*. *Nature* 477(7365): 482-485.



60. Busjahn A, Knoblauch J, Knoblauch M, Bohlender J, Menz M, Faulhaber HD, Becker A, Schuster H, Luft FC (1997) Angiotensin converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms, plasma levels, cardiac dimensions. A twin study. *Hypertension* 29: 165–170.
61. Caballero B (2007) The Global Epidemic of Obesity: An Overview. *Epidemiol Rev* 29(1): 1-5.
62. Caloric Restriction Society International, <http://www.crsociety.org/>
63. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F (1992) Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641–644.
64. Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF, Evans A, Arveiler D, Cambou JP, Luc G (1994) Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 90: 669–676.
65. Cambien F, Tiret L (2007) Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome. *Circulation* 116(15): 1714-1724.
66. Campisi J (2011) Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev* 21(1): 107-112.
67. Cao K, Blair CD, Faddah DA, Kieckhafer JE, Olive M, Erdos MR, Nabel EG, Collins FS (2011) Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest* 121: 2833–2844.
68. Capurso C, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso SA, Semeraro C, Capurso A, Panza F (2004) Interleukin 6-174 G/C promoter gene polymorphism in centenarians: no evidence of association with human longevity or interaction with apolipoprotein E alleles. *Exp Gerontol* 39(7): 1109-1114.
69. Carrieri G, Bonafè M, De Luca M, Rose G, Varcasia O, Bruni A, Maletta R, Nacmias B, Sorbi S, Corsonello F, Feraco E, Andreev KF, Yashin AI, Franceschi C, De Benedictis G (2001) Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet* 108(3): 194-198.

70. Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, Cleeman JI, Gordon DJ, Wolz M, Grundy SM, Johnson CL (2005) Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA* 294(14): 1773-1781.
71. Casas JP, Cooper J, Miller GJ, Hingorani AD, Humphries SE (2006) Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies. *Ann Hum Genet* 70(Pt 2): 145-169.
72. Castro E, Ogburn CE, Hunt KE, Tilvis R, Louhija J, Penttinen R, Erkkola R, Panduro A, Riestra R, Piussan C, Deeb SS, Wang L, Edland SD, Martin GM, Oshima J (1999) Polymorphisms at the Werner locus: I. Newly identified polymorphisms, ethnic variability of 1367Cys/Arg, and its stability in a population of Finnish centenarians. *Am J Med Genet* 82(5): 399-403.
73. Cattin L, Fiscaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, Da Col PG, Casagrande S, Pincetri E, Bovenzi M, Baralle F (1997) Polymorphism of the Apolipoprotein E Gene and Early Carotid Atherosclerosis Defined by Ultrasonography in Asymptomatic Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(1): 91-94.
74. Catto AJ, McCormack LJ, Mansfield MW, Carter AM, Bamford JM, Robinson P, Grant PJ (2000) Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular disease. *Acta Neurol Scand* 101(6): 399-404.
75. Chan GK, Duque G (2002) Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology* 48(2): 62-71.
76. Chano T, Okabe H, Hulette CM (2007) RB1CC1 insufficiency causes neuronal atrophy through mTOR signaling alteration and involved in the pathology of Alzheimer's diseases. *Brain Res* 1168: 97-105.
77. Chapman T, Partridge L (1996) Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263: 755-759.
78. Chatterjee S, Lardinois O, Bhattacharjee S, Tucker J, Corbett J, Deterding L, Ehrenschaft M, Bonini MG, Mason RP (2011) Oxidative stress induces protein and DNA radical formation in follicular dendritic cells of the germinal center and modulates its cell death patterns in late sepsis. *Free Radic Biol Med* 50(8): 988-999.

79. Chen B, Wagner A (2012) Hsp90 is important for fecundity, longevity, and buffering of cryptic deleterious variation in wild fly populations. *BMC Evol Biol* 12: 25.
80. Chen Z, Boreham J (2002) Smoking and cardiovascular disease. Review. *Semin Vasc Med* 2(3): 243-252.
81. Cho CG, Kim HJ, Chung SW, Jung KJ, Shim KH, Yu BP, Yodoi J, Chung HY (2003) Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp Gerontol* 38(5): 539-548.
82. Christensen K, Johnson TE, Vaupel JW (2006) The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights. *Nat Rev Genet* 7(6): 436-448.
83. Chumlea WC, Roche AF, Steinbaugh ML (1985) Estimating stature from knee height for persons 60 to 90 years of age. *J Am Geriatr Soc* 33(2): 116-120.
84. Chung W-H, Dao R-L, Chen L-K, Hung S-I (2010) The role of genetic variants in human longevity. *Ageing Res Rev* 9 (Suppl 1): S67-78.
85. Cigliero SS, Fabiani C, Boccatto CM, Moratti M, Procopio M, Fattorini P (2011) C667T mutation in MTHFR: population data in Friuli-Venezia Giulia (North-East Italy). *FSI: Genetics Supplement Series* 3: e295-e296.
86. Clancy D, Birdsall J (2012) Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing. *Ageing Res Rev*, epub. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.011>.
87. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L (2001) Extension of lifespan by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science* 292: 104–106.
88. Colman RJ, Anderson RM (2011) Nonhuman primate calorie restriction. *Antioxid Redox Sign* 14(2): 229–239.
89. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201–204.
90. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5: 99 –118.
91. Coppedè F, Tannorella P, Pezzini I, Migheli F, Ricci G, Lenco EC, Piaceri I, Polini A, Nacmias B, Monzani F, Sorbi S, Siciliano G, Migliore L (2012) Folate, homocysteine,

vitamin B12, and polymorphisms of genes participating in one-carbon metabolism in late-onset Alzheimer's disease patients and healthy controls. *Antioxid redox signal* 17(2): 195-204..

92. Corbo RM, Scacchi R, Cresta M (2004) Differential reproductive efficiency associated with common apolipoprotein E alleles in postreproductive-aged subjects. *Fertil Steril* 81(1): 104-107.
93. Corbo RM, Ulizzi L, Piombo L, Scacchi R (2008) Study on a possible effect of four longevity candidate genes (ACE, PON1, PPAR-c, and APOE) on human fertility. *Biogerontology* 9: 317–323.
94. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F (1993) Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 290: 33–40.
95. Couderc R, Mahieux F, Bailleul S, Fenelon G, Mary R, Fermanian J (1993) Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease. A case-control study. *Stroke* 24(5): 661-664.
96. Crean C, Geacintov NE, Shafirovich V (2008) Intrastrand G-U cross-links generated by the oxidation of guanine in 5'-d(GCU) and 5'-r(GCU). *Free Radic Biol Med* 45(8): 1125-1134.
97. Crisan D, Carr J (2000) Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn* 2: 105–115.
98. Critchley JA, Capewell S (2003) Mortality risk reduction associated with smoking cessation in patients with coronary heart disease: a systematic review. *JAMA* 290: 86-97.
99. Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, Ffrench M, Terman A (2005) Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. Review. *Autophagy* 1(3): 131-140.
100. Currey DR (1965) An ancient bristlecone pine stand in eastern Nevada. *Ecology* 46: 564-566.
101. Čustović F, Goldner V, Čikeš I i sur (1995) *Klinička kardiologija*. Zagreb: Medicinska naklada.

102. Dankova Z, Sivakova D, Luptakova L, Blazicek P (2009) Association of ACE (I/D) polymorphism with metabolic syndrome and hypertension in two ethnic groups in Slovakia. *Anthropol Anz* 67(3): 305-316.
103. Davignon J, Gregg RE, Sing CF (1988) Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8(1): 1-21.
104. Dawkins R (1976) *The Selfish Gene*. Oxford University Press, University of Oxford, Velika Britanija.
105. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Cats VM, Orth-Gomer K, Perk J, Pyorala K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 10(Suppl. 1): S1–S78.
106. Dean C, Robertson Z, Reid V, Wang Q, Hailey H, Moore S, Rasalam AD, Turnpenny P, Lloyd D, Shaw D, Little J (2008) A high frequency of the MTHFR 677C>T polymorphism in Scottish women with epilepsy: possible role in pathogenesis. *Seizure* 17: 269–275.
107. Deary IJ, Whiteman MC, Pattie A, Starr JM, Hayward C, Wright AF, Visscher PM, Tynan MC, Whalley LJ (2004) Apolipoprotein e gene variability and cognitive functions at age 79: a follow-up of the Scottish mental survey of 1932. *Psychol Aging* 19(2): 367-371.
108. Deelen J, Beekman M, Uh HW, Helmer Q, Kuningas M, Christiansen L, Kremer D, et al (2011) Genome-wide association study identifies a single major locus contributing to survival into old age; the APOE locus revisited. *Aging Cell* 10(4): 686–698.
109. Der Simonian R, Laird N (1986) Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 7: 177-188.
110. Dessapt AL, Gourdy P (2012) Menopause and cardiovascular risk. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 41(7 Suppl): F19-9. Article in French.

111. Di Pasquale P, Cannizzaro S, Paterna S (2004) Does angiotensin-converting enzyme gene polymorphism affect blood pressure? Findings after 6 years of follow-up in healthy subjects. *Eur J Heart Fail* 6: 11–16.
112. Dizdaroglu M, Jaruga P (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 46(4): 382-419.
113. Dolgikh MM, Voevoda MI, Malyutina SK (2001) Age change of ACE gene genotypes and alleles frequencies in urban population of West Siberia. First Workshop on Information Technologies Application to Problems of Biodiversity and Dynamics of Ecosystems in North Eurasia (WITA-2001), Book of abstracts.
114. Dolgikh MM, Voevoda MI, Yudin NS, Kulikov IV, Khasnulin VI, Baum VA, Ustinov SN, Malyutina SK, Konchuk C, Kobzev VF, Romashchenko AG, Nikitin YuP (2001) Polymorphism Of Some Genes Associated With Common Diseases In Novosibirsk Long-Livers. First Workshop on Information Technologies Application to Problems of Biodiversity and Dynamics of Ecosystems in North Eurasia (WITA-2001), Book of abstracts.
115. Dong LM, Wilson C, Wardell MR, Simmons T, Mahley RW, Weisgraber KH, Agard DA (1994) Human Apolipoprotein-E - Role of Arginine-61 in Mediating the Lipoprotein Preferences of the E3-Isoform and E4-Isoform. *J Biol Chem* 269: 22358–22365.
116. Douglas PM, Dillin A (2010) Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol* 190: 719 –729.
117. Drenos F, Kirkwood TBL (2010) Selection on alleles affecting human longevity and late-life disease: the example of apolipoprotein E. *PLoS One* 5(4): e10022. doi: 10.1371/journal.pone.0010022.
118. Dulin E, Guisasola MC (2012) Homocysteine, C677T MTHFR polymorphism and vascular risk in a Spanish population sample. *Eur J Intern Med* 23(1): e32-e33.
119. Dutta A, Henley W, Lang I, Llewellyn D, Guralnik J, Wallace RB, Melzer D (2011) Predictors of extraordinary survival in the Iowa established populations for epidemiologic study of the elderly: cohort follow-up to “extinction”. *J Am Geriatr Soc* 59(6): 963–971.
120. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005) The metabolic syndrome. *Lancet* 365: 1415-1428.

121. Egger M, Davey G, Schneider M, Minder C (1997) Bias in meta-analysis detected by a simple graphical test. *BMJ* 315: 629-634.
122. Eggertsen G, Tegelmann R, Ericsson S, Angelin B, Berglund L (1993) Apolipoprotein E polymorphism in a healthy Swedish population: variation of allele frequency with age and relation to serum lipid concentrations. *Clin Chem* 39(10): 2125-2129.
123. Ehlers MRW, Riordan JF (1989) Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 28: 5311–5313.
124. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkilä, Utermann G (1986) Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J Lipid Res* 27: 227-235.
125. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret GB, Munroe PB, Rice KM, Bochud M, et al (2011) Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature* 478(7367): 103-109.
126. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Review. Toxicol Pathol* 35(4): 495-516.
127. Engelaer FM, van Bodegom D, Westendorp RG (2012) Hypotension is more risky than hypertension in very old people. *BMJ* 344: e721. doi: 10.1136/bmj.e721.
128. Engels WR, Johnson-Schlitz D, Flores C, White L, Preston CR (2007) A Third Link Connecting Aging with Double Strand Break Repair. *Cell Cycle* 6:131-135.
129. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, Wüst S, Wadhwa PD (2011) Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(33): E513-518. doi: 10.1073/pnas.1107759108.
130. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423: 293–298.

131. Euser SM, van Bommel T, Schram MT, Gussekloo J, Hofman A, Westendorp RG, Breteler MM (2009) The effect of age on the association between blood pressure and cognitive function later in life. *J Am Geriatr Soc* 57(7): 1232-1237.
132. Everitt AV, Rattan SIS, le Couteur DG, de Cabo R (ur.) (2010) *Calorie restriction, aging and longevity*. Springer, New York.
133. Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, Mahjoub T, Kacem M, Almawi WY (2008) Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and 786T>C gene variants with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 22(5): 331–338.
134. Falchi A, Giovannoni L, Piras IS, Calo CM, Moral P, Vona G, Varesi L (2005) Prevalence of genetic risk factors for coronary artery disease in Corsica island (France). *Exp Mol Pathol* 79(3): 210-213.
135. Faure-Delanef L, Quéré I, Chassé JF, Guerassimenko O, Lesaulnier M, Bellet H, Zittoun J, Kamoun P, Cohen D (1997) Methylentetrahydrofolate reductase thermolabile variant and human longevity. *Am J Hum Genet* 60(4): 999-1001.
136. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB (2002) Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab* 87(2): 589-598.
137. Festa A, Williams K, D'Agostino R, Jr, Wagenknecht LE, Haffner SM (2006) The Natural Course of  $\beta$ -Cell Function in Nondiabetic and Diabetic Individuals: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 55: 1114–1120.
138. Finch CE (2007) *The Biology of Human Longevity*. Academic Press, Burlington, MA, USA.
139. Finch CE, Kirkwood TB. *Chance, development, and aging*. New York: Oxford University Press; 2000.
140. Finette BA, Sullivan LM, O'Neill JP, Nicklas JA, Vacek PM, Albertini RJ (1994) Determination of hprt mutant frequencies in T-lymphocytes from a healthy pediatric population: statistical comparison between newborn, children and adult mutant frequencies, cloning efficiency and age. *Mutat Res* 308(2): 223-231.
141. Flachsbar F, Caliebe A, Kleindorp R, Blanché H, von Eller-Eberstein H, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A (2009) Association of FOXO3A variation with human



- longevity confirmed in German centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(8): 2700-2705.
142. Fleiss JL, Gross AJ (1991) Meta-analysis in epidemiology, with special reference to studies of the association between exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer: a critique. *J Clin Epidemiol* 44(2): 127-139.
143. Fogel RW, Costa DL (1997) A theory of technophysio evolution, with some implications for forecasting population, health care costs, and pension costs. *Demography* 34(1): 49–66.
144. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12(3): 189–198.
145. Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy lifespan— from yeast to humans. *Science* 328: 321–326.
146. Franceschi C, Valensin S, BonaFe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De BG (2000) The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 35 (6-7): 879-896.
147. Friedman DB, Johnson TE (1988) A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118: 75–86.
148. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Thudium D, Moes Grønholdt M-L, Tybjærg-Hansen A (2000) APOE genotype predicts AD and other dementia but not ischemic cardiovascular disease. *Neurology* 56: 194–200.
149. Frisoni GB, Louhija J, Geroldi C, Trabucchi M (2001) Longevity and the epsilon2 allele of apolipoprotein E: the Finnish Centenarians Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: M75–M78.
150. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuve LP, Rozen R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. (Letter). *Nat Genet* 10: 111-113.
151. Fuentes RM, Perola M, Nissinen A, Tuomilehto J (2002) ACE gene and physical activity, blood pressure and hypertension: a population study in Finland. *J Appl Physiol* 92: 2508–2512.

152. Furchogott RF (1990) Studies on endothelium-dependent vasodilatation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* 139: 257–270.
153. Galinsky D, Tysoe C, Brayne CE, Easton DF, Huppert FA, Dening TR, Paykel ES, Rubinsztein DC (1997) Analysis of the apo E/apo C-I, angiotensin converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase genes as candidates affecting human longevity. *Atherosclerosis* 129: 177–183.
154. Galvan-Portillo MV, Oñate-Ocaña LF, Pérez-Pérez GI, Chen J, Herrera-Goepfert R, Chihu-Amparan L, Flores-Luna L, Mohar-Betancourt A, López-Carrillo L (2010) Dietary folate and vitamin B12 intake before diagnosis decreases gastric cancer mortality risk among susceptible MTHFR 677TT carriers. *Nutrition* 26(2): 201–208.
155. Ganna A, Rivadeneira F, Hofman A, Uitterlinden AG, Magnusson PK, Pedersen NL, Ingelsson E, Tiemeier H (2013) Genetic determinants of mortality. Can findings from genome-wide association studies explain variation in human mortality? *Hum Genet* DOI 10.1007/s00439-013-1267-6 [Epub ahead of print].
156. Gard PR (2010) Implications of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in health and disease: a snapshot review. *Int J Mol Epidemiol Genet* 1(2): 145-157.
157. Garrib A, Zhou W, Sherwood R, Peters T (1998) Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism in patients with sarcoidosis. *Biochem Soc Trans* 26: 137.
158. Geisel J, Hübner U, Bodis M, Schorr H, Knapp JP, Obeid R, Herrmann W (2003) The role of genetic factors in the development of hyperhomocysteinemia. *Clin Chem Lab Med* 41(11): 1427-1434.
159. GenAge Database, <http://genomics.senescence.info/genes/longevity.html>
160. George JC, Bockstoce JR (2008) Two historical weapon fragments as an aid to estimating the longevity and movements of bowhead whales. *Polar Biology* 31: 751-754.
161. Gerdes LU, Jeune B, Ranberg KA, Nybo H, Vaupel JW (2000) Estimation of apolipoprotein E genotype-specific relative mortality risks from the distribution of genotypes in centenarians and middle-aged men: apolipoprotein E gene is a "frailty gene", not a "longevity gene". *Genet Epidemiol* 19(3): 202-210.

162. Geßner R, Reischies FM, Kage A, Geiselman B, Borchelt M, Steinhagen-Thiessen E, Köttgen E (1997) In an epidemiological sample the apolipoprotein E4 allele is associated to dementia and loss of memory function only in the very old. *Neurosci Lett* 222(1): 29-32.
163. Gibbons GH, Liew CC, Goodarzi MO, Rotter JI, Hsueh WA, Siragy HM, Pratt R, Dzau VJ (2004) Genetic markers: progress and potential for cardiovascular disease. Review. *Circulation* 109(25 Suppl 1): IV47-58.
164. Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, Faccini G, Pignatti PF, Mazzucco A, Corrocher R (1998) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood* 91(11): 4158-4163.
165. Glass GV (1976) Primary, secondary, and meta-analysis of research. *Educational Researcher* 5 (10): 3–8.
166. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2013) Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 127(1):e6-e245.
167. Goldstein DB, Weale ME (2001) Population genomics: linkage disequilibrium holds the key. *Curr Biol* 11(14): R576-579.
168. Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43(2): 405-413.
169. Grounds MD (2002) Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology* 3(1-2): 19-24.
170. Gruber J, Schaffer S, Halliwell B (2008) The mitochondrial free radical theory of ageing--where do we stand? *Front Biosci* 13: 6554-6579.

171. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Sowers JR (1999) Diabetes and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 100: 1134-1146.
172. Guarente L (2011) Franklin H. Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. *N Engl J Med* 364(23): 2235-2244.
173. Guarente LP, Partridge L, Wallace DC (ur) (2008) *Molecular Biology of Aging*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
174. Gudmundsson H, Gudbjartsson DF, Frigge M, Gulcher JR, Stefansson K (2000) Inheritance of human longevity in Iceland. *Eur J Hum Genet* 8: 743–749.
175. Guigoz Y, Vellas B, Garry PJ (1996) Assessing the nutritional status of the elderly: The Mini Nutritional Assessment as part of the geriatric evaluation. Review. *Nutr Rev* 54(1 Pt 2): S59-65.
176. Guigoz Y, Vellas BJ (1997) Malnutrition in the elderly: the Mini Nutritional Assessment (MNA). Review. *Ther Umsch.* 54(6): 345-350. German.
177. Guo Z, Fratiglioni L, Viitanen M, Lannfelt L, Basun H, Fastbom J, Winblad B (2001) Apolipoprotein E genotypes and the incidence of Alzheimer's disease among persons aged 75 years and older: variation by use of antihypertensive medication? *Am J Epidemiol* 153(3): 225-231.
178. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, et al (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306(5940): 234-238.
179. Gussekloo J, Heijmans BT, Slagboom PE, Lagaay AM, Knook DL, Westendorp RG (1999) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of cognitive impairment in those over 85. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67(4): 535-538.
180. Hadjadj S, Tarnow L, Forsblom C, Kazeem G, Marre M, Groop PH, Parving HH, Cambien F, Tregouet DA, Gut IG, Théva A, Gauguier D, Farrall M, Cox R, Matsuda F, Lathrop M, Hager-Vionnet N; EURAGEDIC Study Group (2007) Association between Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphisms and

Diabetic Nephropathy: Case-Control, Haplotype, and Family-Based Study in Three European Populations. *J Am Soc Nephrol* 18: 1284-1291.

181. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE (2000) APO E gene and gene environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics* 4: 101–108.
182. Hajjar I, Kotchen TA (2003) Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA* 290(2): 199-206.
183. Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10469-10474.
184. HapMap projekt, <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>
185. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3): 298-300.
186. Harman D (1991) The aging process: major risk factor for disease and death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12): 5360-5363.
187. Harman D (2009) Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology* 10(6): 773-781.
188. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR, Baltimore Longitudinal Study of Aging (2001) Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *Baltimore Longitudinal Study of Aging. J Clin Endocrinol Metab* 86(2): 724–731.
189. Harmon DL, McMaster D, Shields DC, Whitehead AS, Rea IM (1997) MTHFR thermolabile genotype frequencies and longevity in Northern Ireland. *Atherosclerosis* 131(1): 137-138.
190. Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST (1998) Genetic traces of ancient demography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1961-1967.
191. Harris H (1980) *The Principles of Human Biochemical Genetics*. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 329-379.
192. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller

- RA (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460 (AOP): 392–395.
193. Hasty P (2010) Research highlight. Rapamycin: The Cure for all that Ails. *J Moll Cell Biol* 2: 17-19.
194. Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. Review. *Genes Dev* 18(16): 1926-1945.
195. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
196. Heijmans BT, Gussekloo J, Kluit C, Droog S, Lagaay AM, Knook DL, Westendorp RG, Slagboom EP (1999) Mortality risk in men is associated with a common mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene (MTHFR). *Eur J Hum Genet* 7(2): 197-204.
197. Heijmans BT, Slagboom PE, Gussekloo J, Droog S, Lagaay AM, Kluit C, Knook DL, Westendorp RG (2002) Association of APOE epsilon2/epsilon3/epsilon4 and promoter gene variants with dementia but not cardiovascular mortality in old age. *Am J Med Genet* 107(3): 201-208.
198. Hekimi S, Lapointe J (2010) When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67: 1- 8.
199. Hernández Ortega E, Medina Fernández-Aceituno A, Rodríguez-Esparragón FJ, Hernández Perera O, Melián Nuez F, Delgado Espinosa A, Fúza Pérez D, Anabitarte Prieto A, Rodríguez Pérez JC (2002) The involvement of the renin-angiotension system gene polymorphisms in coronary heart disease. *Revista Española de Cardiología* 55(2): 92–99.
200. Herrmann W, Quast S, Ullrich M, Schultze H, Bodis M, Geisel J (1999) Hyperhomocysteinemia in high-aged subjects: relation of B-vitamins, folic acid, renal function and the methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Atherosclerosis* 144(1): 91-101.
201. Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel JW (1996) The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet* 97(3): 319-323.

202. Hestad K, Kveberg B, Engedal K (2005) Low blood pressure is a better predictor of cognitive deficits than the apolipoprotein e4 allele in the oldest old. *Acta Neurol Scand* 111(5): 323-328.
203. Heydari AR, Wu B, Takahashi R, Strong R, Richardson A (1993) Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription *Mol Cell Biol* 13(5): 2909-2918.
204. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG (2003) Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327: 557–560.
205. Higgins JPT, Thompson SG (2002) Quantifying heterogeneity in meta-analysis. *Stat Med* 21: 1539-1558.
206. Hippe M, Vestbo J, Bjerg AM, Borch-Johnsen K, Appleyard M, Hein HO, Andersen PK, Jensen G, Sørensen TI (1997) Cardiovascular risk factor profile in subjects with familial predisposition to myocardial infarction in Denmark. *J Epidemiol Community Health* 51(3): 266-271.
207. Hirsh HR (1978) The waste-product theory of aging: waste dilution by cell division. *Mech Ageing Dev* 8(1): 51-62.
208. Hjelmborg JV, Iachine I, Skytthe A, Vaupel JW, McGue M (2006) Genetic influence on human lifespan and longevity. *Hum Genet* 119: 312-321.
209. Ho JE, Paultre F, Mosca L (2005) The gender gap in coronary heart disease mortality: is there a difference between blacks and whites? *J Womens Health (Larchmt)* 14(2): 117-127.
210. Holm P (2001) Effect of estrogen on development of atherosclerosis: a review of experimental animal studies. *Dan Med Bull* 48: 146–160.
211. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421(6919): 182-187.
212. Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2004) Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2003. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 39.
213. Huang S, Chen XH, Payne JR, Pennell DJ, Gohlke P, Smith MJ, Day IN, Montgomery HE, Gaunt TR (2007) Haplotype of growth hormone and angiotensin I-

converting enzyme genes, serum angiotensin I-converting enzyme and ventricular growth: pathway inference in pharmacogenetics. *Pharmacogenet Genomics* 17(4): 291–294.

214. Hubacek JA, Peasey A, Pikhart H, Stavek P, Kubinova R, Marmot M, Bobak M (2010) APOE polymorphism and its effect on plasma C-reactive protein levels in a large general population sample. *Hum Immunol* 71(3): 304-308.
215. Husemoen LL, Thomsen TF, Fenger M, Jørgensen HL, Jørgensen T (2003) Contribution of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant to total plasma homocysteine levels in healthy men and women. *Inter99* (2). *Genet Epidemiol* 24(4): 322-330.
216. Huxley R, Lewington S, Clarke R (2002) Cholesterol, coronary heart disease and stroke: a review of published evidence from observational studies and randomized controlled trials. Review. *Semin Vasc Med* 2(3): 315-323.
217. Hyde Z, Flicker L, McCaul KA, Almeida OP, Hankey GJ, Chubb SAP, Yeap BB (2012) Associations between Testosterone Levels and Incident Prostate, Lung, and Colorectal Cancer. A Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21(8): 1319-1329.
218. Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403: 795–800.
219. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM (1987) Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(19): 6919-6923.
220. Islam MS, Lehtimäki T, Juonala M, Kähönen M, Hutri-Kähönen N, Kainulainen K, Miettinen H, Taittonen L, Kontula K, Viikari JS, Raitakari OT (2006) Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensinogen (AGT) genes and their associations with blood pressure and carotid artery intima media thickness among healthy Finnish young adults — the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Atherosclerosis* 188: 316–322.



221. Ivičević Uhernik A, Musić Milanović S (2009) Anthropometric Indices of obesity and hypertension in different age and gender groups of Croatian population. *Coll Antropol* 33(Suppl. 1): 75–80.
222. Jackson A, Brown K, Langdown J, Luddington R, Baglin T (2000) Effect of the angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism on the risk of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 111: 562-564.
223. Jacobsen T (1939) *The Sumerian King List*. The University of Chicago, Chicago, IL, pp. 69–77.
224. James RW, Boemi M, Giansanti R, Fumelli P, Pometta D (1993) Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 13(10): 1456-1459.
225. Jang YC, Remmen HV (2009) The mitochondrial theory of aging: Insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp Gerontol* 44(4): 256-260.
226. Jennings BA, Willis GA, Skinner J, Relton CL (2010) Genetic selection? A study of individual variation in the enzymes of folate metabolism. *BMC Med Genet* 11: 18.
227. Jessen F, Wiese B, Cvetanovska G, Fuchs A, Kaduszkiewicz H, Kölsch H, Luck T, Mösch E, Pentzek M, Riedel-Heller SG, Werle J, Weyerer S, Zimmermann T, Maier W, Bickel H (2007) Patterns of subjective memory impairment in the elderly: association with memory performance. *Psychol Med* 37(12): 1753-1762.
228. Jeune B, Vaupel JW (1999) Species of evidence of exceptional longevity. U: Jeune B, Vaupel JW (ur): *Validation of exceptional longevity*. Odense Monographs on Population Aging 6. Odense University Press, Odense, Denmark, 11-22.
229. Jia K, Chen D, Riddle DL (2004) The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131(16): 3897–3906.
230. Jochemsen HM, Muller M, van der Graaf Y, Geerlings MI (2012) APOE ε4 differentially influences change in memory performance depending on age. The SMART-MR study. *Neurobiol Aging* 33(4): 832.e15-e22. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.016.

231. Kaeberlein M, Kennedy BK (2011) Hot topics in aging research: protein translation and TOR signaling. *Aging Cell* 10(2):185-190.
232. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13: 2570–2580.
233. Kaletsky R, Murphy CT (2010) The role of insulin/IGF-like signaling in *C.elegans* longevity and aging. *Dis Model Mech* 3(7-8): 415-419.
234. Kannel WB (1995) Clinical misconceptions dispelled by epidemiological research. Review. *Circulation* 92(11): 3350-3360.
235. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J3rd (1961) Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease—Six-Year Follow-up Experience The Framingham Study. *Ann Intern Med* 55(1): 33-50.
236. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S (2004) Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Curr Biol* 14(10): 885–890.
237. Kaplan HS, Hooper PL, Gurven M (2009) The evolutionary and ecological roots of human social organization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1533): 3289-3299.
238. Kaplan KM (1988) *Clinical hypertension*. Baltimore, USA; Williams & Wilkins.
239. Myocardial Infarction Genetics Consortium, Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, Anand S, Engert JC, Samani NJ, Schunkert H, et al (2009) Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* 41(3): 334-341.
240. Keavney BD, Dudley CR, Stratton IM, Holman RR, Matthews DR, Ratcliffe PJ, Turner RC (1995) UK prospective diabetes study (UKPDS) 14: association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction in NIDDM. *Diabetologia* 38(8): 948–952.
241. Kehoe PG, Russ C, McIlory S, Williams H, Holmans P, Holmes C, Liolitsa D, Vahidassr D, Powell J, McGleenon B, Liddell M, Plomin R, Dynan K, Williams N,

- Neal J, Cairns NJ, Wilcock G, Passmore P, Lovestone S, Williams J, Owen MJ (1999) Variation in DCP1, encoding ACE, is associated with susceptibility to Alzheimer disease. *Nat Genet* 21: 71-72.
242. Kennedy BK, Austriaco NR, Zhang JS, Guarente L (1995) Mutation in the silencing gene Sir4 can delay aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 80: 485–496.
243. Kennedy BK, Gotta M, Sinclair DA, Mills K, McNabb DS, Murthy M, Pak SM, Laroche T, Gasser SM, Guarente L (1997) Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S.cerevisiae*. *Cell* 89: 381–391.
244. Kenyon C (2011) The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1561): 9–16.
245. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461–464.
246. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245(4922): 1073-1080.
247. Kersnik Bergant M (2000) Što znači starenje. *Vzajemnost*: 20-21.
248. Kervinen K, Savolainen MJ, Salokannel J, Hynninen A, Heikkinen J, Ehnholm C, Koistinen MJ, Kesaniemi YA (1994) Apolipoprotein E and B polymorphisms-longevity factors assessed in nonagenarians. *Atherosclerosis* 105: 89–95.
249. Kessler C, Spitzer C, Stauske D, Mende S, Stadlmüller J, Walther R, Rettig R (1997) The Apolipoprotein E and  $\beta$ -Fibrinogen G/A-455 Gene Polymorphisms Are Associated With Ischemic Stroke Involving Large-Vessel Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2880-2884.
250. Khot UN, Khot MB, Bajzer CZ, Sapp SK, Ohman M, Brener SJ (2003) Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* 290: 898-904.
251. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Sampas N, Graves T, Hansen N et al (2008) Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature* 453 (7191): 56-64.
252. Kim IJ, Bae J, Lim SW, Cha DH, Cho HJ, Kim S, Yang DH, Hwang SG, Oh S, Kim NK (2007) Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms

- (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 119: 579–585.
253. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942–946.
254. Kimura M, Hjelmborg JV, Gardner JP, Bathum L, Brimacombe M, Lu X, Christiansen L, Vaupel JW, Aviv A, Christensen K (2008) Telomere length and mortality: a study of leukocytes in elderly Danish twins. *Am J Epidemiol* 167(7): 799–806.
255. Kirkwood TB (2011) Systems biology of ageing and longevity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1561): 64-70.
256. Kirkwood TBL (1977) Evolution of ageing. *Nature* 270(5635): 301-304.
257. Kirkwood TBL, Holliday R (1986) Ageing as a consequence of natural selection. In: Bittles AH, Collins KJ (ur). *The Biology of Human Aging*. Cambridge University Press: 1-16.
258. Kitazoe Y, Kishino H, Hasegawa M, Matsui A, Lane N, Tanaka M (2011) Stability of mitochondrial membrane proteins in terrestrial vertebrates predicts aerobic capacity and longevity. *Genome Biol Evol* 3: 1233-1244.
259. Klass MR (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev* 6: 413–429.
260. Klass MR (1983) A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech Ageing Dev* 22: 279 –286.
261. Klebanov S, Diais S, Stavinoha WB, Suh Y, Nelson JF (1995) Hyperadrenocorticism, attenuated inflammation, and the life-prolonging action of food restriction in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50(2): B78-82.
262. Klotz L, Farkas M, Bain N, Keskitalo S, Semmler A, Ineichen B, Jelcic J, Klockgether T, Kösch H, Weller M, Linnebank M (2010) The variant methylenetetrahydrofolate reductase c.1298A>C (p.E429A) is associated with multiple sclerosis in a German case-control study. *Neurosci Lett* 468(3): 183-185.

263. Koch MC, Stegmann K, Ziegler A, Schröter B, Ermert A (1998) Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population. *Eur J Pediatr* 157(6): 487-492.
264. Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Review. Toxicol Pathol* 30(6): 620-650.
265. Kölling K, Ndrepepa G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 93(10): 1201-1206.
266. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK (2007) Apolipoprotein E polymorphism, age and coronary heart disease. *Ageing Res Rev* 6: 94-108.
267. Korovaitseva GI, Shcherbatykh TV, Selezneva NV, Gavrilova SI, Golimbet VE, Voskresenskaia NI, Rogaev EI (2001) Genetic association between the Apolipoprotein E (APOE) gene and different forms of Alzheimer`s disease. *Genetika* 37(4): 529-535. Russian.
268. Kregar J (1994) Promjene u strukturi obiteljskih zajednica. *Rev Soc Polit* 1: 211-224.
269. Kristensen B, Malm J, Nilsson TK, Hultdin J, Carlberg B, Dahlén G, Olsson T (1999) Hyperhomocysteinemia and hypofibrinolysis in young adults with ischemic stroke. *Stroke* 30(5): 974-980.
270. Kudlow BA, Kennedy BK, Monnat RJ Jr (2007) Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. *Review. Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 394-404.
271. Kumar T, Liestøl K, Maehlen J, Hiorth A, Jettestuen E, Lind H, Brorson SH (2002) Allele frequencies of apolipoprotein E gene polymorphisms in the protein coding region and promoter region (-491A/T) in a healthy Norwegian population. *Hum Biol* 74(1): 137-142.
272. Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL (2008) Deaths: Final Data for 2005. *National Vital Statistics Reports* 56(10): 1-124.

273. Kurniawan C, Westendorp RG, de Craen AJ, Gussekloo J, de Laat J, van Exel E (2012) Gene dose of apolipoprotein E and age-related hearing loss. *Neurobiol Aging* 33(9): 2230.e7-2230.e12.
274. Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, Evans A, Ferrario M, Tuomilehto J, for the WHO MONICA Project (2000) Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 355: 675-687.
275. Lakatta EG (2000) Cardiovascular aging in health. *Clin Geriatr Med* 16 (3): 419-444.
276. Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265(5181): 2037-2048.
277. LaRosa JC, Hunninghake D, Bush D, Criqui MH, Getz GS, Gotto AM, Grundy SM, Rakita L, Robertson RM, Weisfeldt ML (1990) The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation* 81: 1721-1733.
278. Le Bourg E (2010) Predicting whether dietary restriction would increase longevity in species not tested so far. *Ageing Res Rev* 9: 289–297.
279. Lee MH, Lu K, Patel SB (2001) Genetic basis of sitosterolemia. *Curr Opin Lipidol* 12(2): 141-149.
280. Lee RY, Hench J, Ruvkun G (2001) Regulation of *C.elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Curr Biol* 11: 1950–1957.
281. Lehrman MA, Schneider WJ, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW (1985) Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science* 227: 140–146.
282. Li X, Alafuzoff I, Soininen H, Winblad B, Pei JJ (2005) Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain. *FEBS Journal* 272(16): 4211–4220.

283. Li X, Kazgan N (2011) Mammalian Sirtuins and Energy Metabolism. *Int J Biol Sci* 7(5): 575–587.
284. Liao CY, Rikke BA, Johnson TE, Diaz V, Nelson JF (2010) Genetic variation in the murine lifespan response to dietary restriction: from life extension to life shortening. *Aging Cell* 9: 92–95.
285. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C (1997) *daf-16*: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278: 1319–1322.
286. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289(5487): 2126-2128.
287. Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418(6895): 344-348.
288. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. Review. *Nature* 362(6422): 709-715.
289. Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ (1991) In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 256(1): 45-48.
290. Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B (2012) Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab* 16(1): 18-31.
291. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367(9524): 1747–1757.
292. Lovričević I, Franjić BD, Tomičić M, Vrkić N, De Syo D, Hudorović N, Sonicki Z, Lončar R (2004) 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C>T genetic polymorphism in 228 Croatian volunteers. *Coll Antropol* 28(2): 647-654.
293. Luft FC (1999) Bad genes, good people, association, linkage, longevity and the prevention of cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(7): 576-579.
294. Luo ZW, Wu CI (2001) Modeling linkage disequilibrium between a polymorphic marker locus and a locus affecting dichotomous disease traits in natural populations. *Genetics* 158: 1785-1800.

295. Luoto R, Sharrett AR, Schreiner P, Sorlie PD, Arnett D, Ephross S (2000) Blood pressure and menopause transition: the Atherosclerosis Risk in Communities Study (1987–1995). *J Hypertens* 18: 27–33.
296. Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407(6801): 233-241.
297. Ljungquist B, Berg S, Lanke J, McClearn GE, Pedersen NL (1998) The effect of genetic factors for longevity: a comparison of identical and fraternal twins in the Swedish Twin Registry. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53(6): M441-M446.
298. Maas AHEM, Appelman YEA (2010) Gender differences in coronary heart disease. *Neth Heart J* 18(12): 598-603.
299. MacLeod MJ, De Lange RP, Breen G, Meiklejohn D, Lemmon H, Clair DS (2001) Lack of association between apolipoprotein E genotype and ischaemic stroke in a Scottish population. *Eur J Clin Invest* 31(7): 570-573.
300. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang YD (2009) Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res* 50: S183–S188.
301. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE i sur. (2007) 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 28 (12): 1462-1536.
302. Mantel N, Haenszel W (1959) Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22: 719-748.
303. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G (2000) C-reactive protein in offspring is associated with the occurrence of myocardial infarction in first-degree relatives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1): 198-203.
304. Markus HS, Ali N, Swaminathan R, Sankaralingam A, Molloy J, Powell J (1997) A common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 28(9): 1739-1743.
305. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Halimi S, Muller A, Sackmann H, Bauduceau B, Bled F,



- Passa P, Alhenc-Gelas F (1997) Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest* 99(7): 1585-1595.
306. Maruszak A, Pepłońska B, Safranow K, Chodakowska-Żebrowska M, Barcikowska M, Zekanowski C (2012) TOMM40 rs10524523 polymorphism's role in late-onset Alzheimer's disease and in longevity. *J Alzheimers Dis* 28(2): 309-322.
307. Masoro EJ (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 126: 913-922.
308. Masoro EJ (2007) The role of hormesis in life extension by dietary restriction. *Review. Interdiscipl Top Gerontol* 35: 1-17.
309. Masoro EJ (2009) Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1790(10): 1040-1048.
310. Matilla V, Joukamaa M, Salokanga RK (1988) Mental health in the population approaching retirement age in relation to physical health, functional ability and creativity. Findings of the TURVA project. *Acta Psychiatr Scand* 77(1): 42-51.
311. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489(7415): 318-321.
312. Mattison JA, Roth GS, Lane MA, Ingram DK (2007) Dietary restriction in aging nonhuman primates. *Interdiscip Top Gerontol* 35: 137-158.
313. Mattson MP, Chan SL, Duan W (2002) Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev* 82(3): 637-672.
314. Mattson MP, Duan W, Guo Z (2003) Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *J Neurochem* 84: 417-431.
315. Maxwell MM, Zaldivar-Jolissaint JF, Mai A, Outeiro TF, Kazanstevev AG (2012) Meeting Report. Highlights of the Keystone Symposium: sirtuins in metabolism, aging and disease. *EMBO Mol Med* 4: 557-560.
316. Mayer B, Erdmann J, Schunkert H (2007) Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 96: 1-7.

317. Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares AR, Jiménez AJ, Gaitán MJ, Rodríguez A, Ruiz M, Reyes-Engel A (2008) Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. *BMC Med Genet* 9: 104.
318. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size. *J Nutrit* 10: 63–79.
319. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA (1989) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* 5: 155–171.
320. McCully KS (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56: 111–128.
321. McDonald RB, Ramsey JJ (2010) Honoring Clive McCay and 75 years of calorie restriction research. *J Nutrit* 140(7): 1205-1210.
322. McEvoy BP, Powell JE, Goddard ME, Visscher PM (2011) Human population dispersal "Out of Africa" estimated from linkage disequilibrium and allele frequencies of SNPs. *Genome Res* 21(6): 821-829.
323. McGeer EG, Singh EA (1992) Angiotensin-converting enzyme in cortical tissue in Alzheimer's and some other neurological diseases. *Dementia* 3: 299–303.
324. Medawar PB (1952) *An unsolved problem of biology*. HK Lewis, London.
325. Medvedev Z (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65: 375–398.
326. Mehrab-Mohseni M, Tabatabaei-Malazy O, Hasani-Ranjbar S, Amiri P, Kouroshnia A, Bazzaz JT, Farahani-Shrhabi M, Larijani B, Amoli MM (2011) Endothelial nitric oxide synthase VNTR (intron 4 a/b) polymorphism association with type 2 diabetes and its chronic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 91(3): 348-352.
327. Metuzalem <http://www.rmtr.org/oldlist.htm>
328. Mikulić I (2011) Dušikov (II) oksid i polimorfizam gena endotelne sintaze dušikovog oksida u bolesnika s kroničnim bolestima bubrega. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
329. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M (2005) Methionine deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters

glucose, T4, IGF1, and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4: 119–125.

330. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, Fernandez E, Flurkey K, Javors MA, Nelson JF, Orihuela CJ, Pletcher S, Sharp ZD, Sinclair D, Starnes JW, Wilkinson JE, Nadon NL, Strong R (2011) Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Med Sci* 66: 191–201.
331. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
332. Miloserdova OV, Slominsky PA, Limborska SA (2002) Age-Dependent Variation of the Allele and Genotype Frequencies in Insertion–Deletion Polymorphism for the Angiotensin-Converting Enzyme Gene. *Genetika* 38(1): 87–89.
333. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15: 575–591.
334. Mockett RJ, Cockrell JC, Puri S, Nguyen M, Nisa M (2012) Long-lived genotypes for studies of life extension in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 133(5): 359-367.
335. Mondry A, Loh M, Pengbo L, Zhu AL, Nagel M (2005) Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrology* 6: 1-11.
336. Mooijaart SP, Gussekloo J, Frölich M, Jolles J, Stott DJ, Westendorp RG, de Craen AJ (2005) Homocysteine, vitamin B-12, and folic acid and the risk of cognitive decline in old age: the Leiden 85-Plus study. *Am J Clin Nutr* 82: 866–871.
337. Moreau KL (2011) The modulatory influence of estrogen on vascular endothelial function in women: Is it all about timing? *Menopausal Medicine* 19(1): S8-S11.
338. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1996) A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382: 536–539.
339. Motti C, Gnasso A, Bernardini S, Massoud R, Pastore A, Rampa P, Federici G, Cortese C (1998) Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.

- Correlation with homocysteine and other risk factors for vascular disease. *Atherosclerosis* 139(2): 377-383.
340. Murabito JM, Yuan R, Lunetta KL (2012) The Search for Longevity and Healthy Aging Genes: Insights From Epidemiological Studies and Samples of Long-Lived Individuals. *J Gerontol A Biol Med Sci* 67(5): 470-479.
341. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277–283.
342. Musini VM, Tejani AM, Bassett K, Wright JM (2009) Pharmacotherapy for hypertension in the elderly (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD000028. doi: 10.1002/14651858.CD000028.pub2.
343. Mustapić M, Popovic Hadzija M, Pavlovic M, Pavkovic P, Presecki P, Mrazovac D, Mimica N, Korolija M, Pivac N, Muck-Seler D (2012) Alzheimer's disease and type 2 diabetes: the association study of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha and apolipoprotein E genes. *Metab Brain Dis* 27(4): 507-512.
344. Myllykangas L, Polvikoski T, Sulkava R, Verkkoniemi A, Tienari P, Niinistö L, Kontula K, Hardy J, Haltia M, Pérez-Tur J (2000) Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease: a genetic association study in a population aged 85 or over. *Neurosci Lett* 292: 195-198.
345. Nabel EG (2003) Cardiovascular disease. *N Engl J Med* 349(1): 60-72.
346. Nachman MW (2002) Variation in recombination rate across the genome: evidence and implications. *Curr Opin Genet Dev* 12(6): 657-663.
347. Nacmias B, Bagnoli S, Tedde A, Cellini E, Bessi V, Guarnieri B, Ortensi L, Piacentini S, Bracco L, Sorbi S (2007) Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism in sporadic and familial Alzheimer's disease and longevity. *Arch Gerontol Geriatr* 45(2): 201-206.
348. Naiman S, Kanfi Y, Cohen HV (2012) Sirtuins are regulators of mammalian aging. *Aging* 4(8): 521-522.
349. Napolioni V, Gianni P, Carpi FM, Predazzi IM, Lucarini N (2011) APOE haplotypes are associated with human longevity in a Central Italy population: evidence for epistasis with HP 1/2 polymorphism. *Clin Chim Acta* 412(19-20): 1821-1824.

350. Naughten ER, Yap S, Mayne PD (1998) Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. *Eur J Pediatr* 157 (Suppl 2): S84-87.
351. Nawaz SK, Hasnain S (2008) Pleiotropic effects of ACE polymorphism. *Biochemia Med* 19(1): 36–49.
352. Nazarov IB, Woods DR, Montgomery HE, Shneider OV, Kazakov VI, Tomilin NV, Rogozkin VA (2001) The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. *Eur J Hum Genet* 9: 797-801.
353. Neaton JD, Wentworth DN (1992) Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med* 152: 56-64.
354. Nebel A, Kleindorp R, Caliebe A, Nothnagel M, Blanché H, Junge O, Wittig M, Ellinghaus D, Flachsbart F, Wichmann HE, Meitinger T, Nikolaus S, Franke A, Krawczak M, Lathrop M, Schreiber S (2011) A genome-wide association study confirms APOE as the major gene influencing survival in long-lived individuals. *Mech Ageing Dev* 132(6–7): 324–330.
355. Nelson JF, Liao CY, Rikke BA, Johnson TE, Gelfond JAL, Diaz V (2011) Fat maintenance is a predictor of the murine lifespan response to dietary restriction. *Aging Cell* 10: 629–639.
356. Nešić D, Mazić S, Dragović G, Popović, Trbojević J, Stanojević D, Suzić S, Stojimirović B (2005) Starenje, bolesti i evoluciona biologija. *Gerontologija* 33(1): 20-27.
357. Newman AB, Walter S, Lunetta KL, Garcia ME, Slagboom PE, Christensen K, Arnold AM, Aspelund T, Aulchenko YS, Benjamin EJ, Christiansen L, D'Agostino RB Sr, Fitzpatrick AL, Franceschini N, Glazer NL, Gudnason V, Hofman A, Kaplan R, Karasik D, Kelly-Hayes M, Kiel DP, Launer LJ, Marcianti KD, Massaro JM, Miljkovic I, Nalls MA, Hernandez D, Psaty BM, Rivadeneira F, Rotter J, Seshadri S, Smith AV, Taylor KD, Tiemeier H, Uh HW, Uitterlinden AG, Vaupel JW, Walston J, Westendorp RG, Harris TB, Lumley T, van Duijn CM, Murabito JM (2010) A meta-analysis of four genome-wide association studies of survival to age 90 years or older: the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65(5): 478-487.

358. Nohl H, Hegner D (1978) Do Mitochondria Produce Oxygen Radicals in vivo? Eur J Biochem 82(2): 563-567.
359. Noppa H, Andersson M, Bengtsson C, Bruce A, Isaksson B (1980) Longitudinal studies of anthropometric data and body composition. The population study of women in Göteborg, Sweden. Am J Clin Nutr 33(1): 155-162.
360. Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, Blackburn EH, Mitchell BD, Shuldiner AR, Hsueh WC (2007) Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. Proc Natl Acad Sci U S A 104(29): 12135-12139.
361. O'Donnell CJ, Nabel EG (2011) Genomics of cardiovascular disease. N Engl J Med 365: 2098–2109.
362. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulinlike metabolic and longevity signals in *C.elegans*. Nature 389: 994–999.
363. Okamoto H, Accili D (2003) In vivo mutagenesis of the insulin receptor. J Biol Chem 278(31): 28359-28362.
364. Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J Theor Biol 41(1): 181–190.
365. Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA (2003) Pathogenesis of hypertension. Review. Ann Intern Med 139(9): 761-776.
366. Osborne TB, Mendel CB, Ferry ER (1917) The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life in rats. Science 45: 294–295.
367. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. J Biol Chem 285: 8340–8351.
368. Page GP, Amos CI (1999) Comparison of linkage-disequilibrium methods for localization of genes influencing quantitative traits in humans. Am J Hum Genet 64(4): 1194-1205.
369. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Rodriguez L, Miranda-Fillooy JA, Fernandez-Gutierrez B, Llorca J, Martin J,

- Gonzalez-Gay MA (2010) A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12(2): R71.
370. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP (2001) Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 154(3): 681-689.
371. Panza F, Solfrizzi V, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso C, Kehoe PG, Capurso A (2003) Angiotensin I converting enzyme (ACE) gene polymorphism in centenarians: Different allele frequencies between the North and South of Europe. *Exp Gerontol* 38: 1015–1020.
372. Paolisso G, Tagliamonte MR, De Lucia D, Palmieri F, Manzella D, Rinaldi C, Bossone A, Colaizzo D, Margaglione M, Varricchio M (2001) ACE Gene Polymorphism and Insulin Action in Older Subjects and Healthy Centenarians. *J Am Geriatr Soc* 49: 610-614.
373. Paterna S, Di Pasquale P, D'Angelo A, Seidita G, Tuttolomondo A, Cardinale A, Maniscalchi T, Follone G, Giubilato A, Tarantello M, Licata G (2000) Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism determines an increase in frequency of migraine attacks in patients suffering from migraine without aura. *Eur Neurol* 43(3): 133-136.
374. Patsch W, Gotto AM Jr (1996) Apolipoproteins: pathophysiology and clinical implications. *Methods Enzymol* 263: 3-32.
375. Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran QT, Ikeno Y, Richardson A (2009) Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim Biophys Acta* 1790: 1005–1014.
376. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, Earl NL, Heyman A, Clark CM, Roses AD (1991) Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48(6): 1034–1050.
377. Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, Joyce E, Brewster S, Kunkel L, Puca A (2002) Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 8442-8447.
378. Petiti DB (1994) *Meta-analysis Decision Analysis and Cost-Effectiveness Analysis*. Oxford University Press, New York.

379. Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, Giossi A, Monastero R, Dalla Volta G, Archetti S, Zavarise P, Camarda C, Gasparotti R, Magoni M, Camarda R, Padovani A (2007) Migraine mediates the influence of C677T MTHFR genotypes on ischemic stroke risk with a stroke-subtype effect. *Stroke* 38(12): 3145-3151.
380. Popis stanovništva 2001 (zadnji put pristupljeno 04.10.2012.) [http://www.dzs.hr/Hrv/censuses/Census2001/Popis/H01\\_01\\_01/H01\\_01\\_01.html](http://www.dzs.hr/Hrv/censuses/Census2001/Popis/H01_01_01/H01_01_01.html)
381. Population Reference Bureau 2012 <http://www.prb.org/Publications/Datasheets/2012/world-population-data-sheet.aspx>
382. Powers RW 3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S (2006) Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev* 20(2): 174-184.
383. Prüfer K, Munch K, Hellmann I, Akagi K, Miller JR, Walenz B, Koren S, Sutton G, Kodira C, Winer R, Knight JR, Mullikin JC, Meader SJ, Ponting CP, Lunter G, Higashino S, Hobolth A, Dutheil J, Karakoç E, Alkan C, Sajjadian S, Catacchio CR, Ventura M, Marques-Bonet T, Eichler EE, André C, Atencia R, Mugisha L, Junhold J, Patterson N, Siebauer M, Good JM, Fischer A, Ptak SE, Lachmann M, Symer DE, Mailund T, Schierup MH, Andrés AM, Kelso J, Pääbo S (2012) The bonobo genome compared with the chimpanzee and human genomes. *Nature* 486(7404): 527-531.
384. Przedborski S, Schon EA (2011) Mitochondria: the next (neurode) generation. *Neuron* 70: 1033–1053.
385. Puca AA, Carrizzo A, Ferrario A, Villa F, Vecchione C (2012) Endothelial nitric oxide synthase, vascular integrity and human exceptional longevity. *Immun Ageing* 9(1): 26.
386. Rall SC, Jr., Weisgraber KH, Mahley RW (1982) Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 257: 4171–4178.
387. Rastas S, Mattila K, Verkkoniemi A, Niinistö L, Juva K, Sulkava R, Lämsimies E (2004) Association of apolipoprotein E genotypes, blood pressure, blood lipids and ECG abnormalities in a general population aged 85+. *BMC Geriatrics* 4: 1.
388. Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N, Porcellini E, Licastro F (2005) Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 82: 636–643.



389. Rea IM, McDowell I, McMaster D, Smye M, Stout R, Evans A (2001) Apolipoprotein E alleles in nonagenarian subjects in the Belfast Elderly Longitudinal Free-living Ageing Study (BELFAST). *Mech AgeingDev* 122: 1367–1372.
390. Rea IM, McMaster D, Woodside JV, Young IS, Archbold GP, Linton T, Lennox S, McNulty H, Harmon DL, Whitehead AS (2000) Community-living nonagenarians in northern Ireland have lower plasma homocysteine but similar methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile genotype prevalence compared to 70-89-year-old subjects. *Atherosclerosis* 149(1): 207-214.
391. Reaven GM (1988) Banting Lecture. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1596-1607.
392. Reckelhoff JF (2001) Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 37: 1199–1208.
393. Reinhardt D, Sigusch HH, Vogt SF, Farker K, Müller S, Hoffmann A (1998) Absence of association between a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of coronary artery disease. *Eur J Clin Invest* 28(1): 20-23.
394. Richard F, Fromentin-David I, Ricolfi F, Ducimetière P, Di Menza C, Amouyel P, Helbecque N (2001) The angiotensin I converting enzyme gene as a susceptibility factor for dementia. *Neurology* 56: 1593–1595.
395. Riera-Fortuny C, Real JT, Chaves FJ, Morales-Suárez-Varela M, Martínez-Triguero ML, Morillas-Ariño C, Hernández-Mijares A (2005) The relation between obesity, abdominal fat deposit and the angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism and its association with coronary heart disease. *Int J Obes Relat Metab Disord* 29: 78–84.
396. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343–1346.
397. Ristow M, Schmeisser S (2011) Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51: 327–336.
398. Rizza RA, Mandarino LJ, Gerich JE (1982) Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose

utilisation due to a postreceptor defect of insulin action. *J Clin Endocrinol Metab* 54: 131-138.

399. Rochon J, Bales CW, Ravussin E, Redman LM, Holloszy JO, Racette SB, Roberts SB, Das SK, Romashkan S, Galan KM, Hadley EC, Kraus WE, CALERIE Study Group (2011) Design and conduct of the CALERIE study: comprehensive assessment of the long-term effects of reducing intake of energy. *J Gerontol A: Biol Sci Med Sci* 66A(1): 97–108.
400. Rogers RG, Everett BG, Saint Onge JM, Krueger PM (2010) Social, behavioral, and biological factors, and sex differences in mortality. *Demography* 47(3): 555-578.
401. Rogina B (2009) The effect of sex peptide and calorie intake on fecundity in female *Drosophila melanogaster*. *Scientific World Journal* 9: 1178-1189.
402. Rogina B, Helfand S (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15998–16003.
403. Rontu R, Ojala P, Hervonen A, Goebeler S, Karhunen PJ, Nikkilä M, Kunnas T, Jylhä M, Eklund C, Hurme M, Lehtimäki T (2006) Apolipoprotein E genotype is related to plasma levels of C-reactive protein and lipids and to longevity in nonagenarians. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64: 265–270.
404. Rorabaugh WJ, Critchlow DT, Baker PC (2004) *America's Promise: A Concise History of the United States*. Lanham, Maryland: Rowman & Littlefield.
405. Rose G, Dato S, Altomare K, Bellizzi D, Garasto S, Greco V, Passarino G, Feraco E, Mari V, Barbi C, BonaFe M, Franceschi C, Tan Q, Boiko S, Yashin AI, De Benedictis G (2003) Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol* 38: 1065-1070.
406. Rose MR, Burke MK, Shahrestani P, Mueller LD (2008) Evolution of ageing since Darwin. *J Genet* 87: 363–371.
407. Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschräger M (2008) The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutat Res* 659(3): 284–292.
408. Rossman I (1977) Anatomic and body composition changes with aging. U: Finch CE, Hayflick L (ur.) *Handbook of the biology of aging*. New York, Van Nostrand Reinhold.

409. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML (2007) Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 297(13): 1465–1477.
410. Roth GS (1995) Changes in tissue responsiveness to hormones and neurotransmitters during aging. *Exp Gerontol* 30(3-4): 361-368.
411. Rothenbacher D, Fischer HG, Hoffmeister A, Hoffmann MM, Marz W, Bode G, Rosenthal J, Koenig W, Brenner H (2002) Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase genotype: association with risk of coronary heart disease and relation to inflammatory, hemostatic, and lipid parameters. *Atherosclerosis* 162(1): 193–200.
412. Ruidavets JB, Ducimetière P, Arveiler D, Amouyel P, Bingham A, Wagner A, Cottel D, Perret B, Ferrieres J (2002) Types of alcoholic beverages and blood lipids in a French population. *J Epidemiol Community Health* 56: 24–28.
413. Sabayan B, Oleksik AM, Maier AB, van Buchem MA, Poortvliet RK, de Ruijter W, Gussekloo J, de Craen AJ, Westendorp RG (2012) High blood pressure and resilience to physical and cognitive decline in the oldest old: the Leiden 85-plus Study. *J Am Geriatr Soc* 60(11): 2014-2019.
414. Saltiki K, Alevizaki M (2007) Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors. Review. *Hormones* 6(1): 9-24.
415. Samani NJ, O'Toole L, Martin D, Rai H, Fletcher S, Lodwick D, Thompson JR, Morice AH, Channer K, Woods KL (1996) Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme gene and risk of and prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 28: 338-344.
416. Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton ML, Sletvold O, Saltvedt I, White LR, Lydersen S, Aasly JO (2008) APOE epsilon 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway. *BMC Neurology* 16; 8:9.
417. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ,

- Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses AD (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43(8): 1467–1472.
418. Scacchi R, De Bernardini L, Mantuano E, Donini LM, Vilardo T, Corbo RM (1995) Apolipoprotein E (APOE) allele frequencies in late-onset sporadic Alzheimer's disease (AD), mixed dementia and vascular dementia: lack of association of epsilon 4 allele with AD in Italian octogenarian patients. *Neurosci Lett* 201: 231–234.
419. Schachter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D (1994) Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet* 6: 29–32.
420. Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30(11): 1191–1212.
421. Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Martin GM (1992) Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258(5082): 668–671.
422. Schiepers OJ, van Boxtel MP, Harris SE, Gow AJ, Pattie A, Brett CE, de Groot RH, Jolles J, Starr JM, Deary IJ (2011) MTHFR polymorphisms and cognitive ageing in the ninth decade: the Lothian Birth Cohort 1921. *Genes Brain Behav.* DOI: 10.1111/j.1601-183X.2011.00675.x. [Epub ahead of print]
423. Schnittker J (2007) Working More and Feeling Better: Women's Health, Employment, and Family Life, 1974–2004. *Am Sociol Rev* 72: 221–238.
424. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6(4): 280-293.
425. Schunkert H, Hense H-W, Holmer S-R, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GA (1994) Association between a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *New Engl J Med* 330: 1634–1638.

426. Schunkert H, König IR, Kathiresan S, et al. (2011) Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43: 333-338.
427. Sebastiani P, Solovieff N, Dewan AT, Walsh KM, Puca A, Hartley SW, Melista E, Andersen S, Dworkis DA, Wilk JB, Myers RH, Steinberg MH, Montano M, Baldwin CT, Hoh J, Perls TT (2012) Genetic signatures of exceptional longevity in humans. *PLoS One* 7(1): e29848.
428. Seripa D, Forno GD, Matera MG, Gravina C, Margaglione M, Palermo MT, Wekstein DR, Antuono P, Davis DG, Daniele A, Masullo C, Bizzarro A, Gennarelli M, Fazio VM (2003) Methylenetetrahydrofolate reductase and angiotensin converting enzyme gene polymorphisms in two genetically and diagnostically distinct cohort of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 24(7): 933-939.
429. Sertić J, Juričić L, Ljubić H, Božina T, Lovrić J, Markeljević J, Jelaković B, Merkler M, Reiner Ž (2009) Variants of ESR1, APOE, LPL and IL-6 loci in young healthy subjects: association with lipid status and obesity. *BMC Research Notes* 2: 203.
430. Shah RS, Cole JW (2010) Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. Review. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 8(7): 917-932.
431. Shanley DP, Danielle AW, Manley NR, Palmer DB (2009) An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol* 30(7): 374–381.
432. Sharma P (1998) Meta-analysis of the ACE gene in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64: 227–230.
433. Shay JW, Woodring WE (2008) Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. In: Guarente LP, Partridge L, Wallace DC (ur). *Molecular Biology of Aging*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 575-597.
434. Sherman HC, Campbell HL (1928) The influence of food upon longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14: 852–855.
435. Sherman HC, Campbell HL (1935) Rate of growth and length of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 21: 235–239.

436. Sivakova D, Lajdova A, Basistova Z, Cvicelova Z, Blazicek P (2009) ACE insertion/deletion polymorphism and its relationships to the components of metabolic syndrome in elderly Slovaks. *Anthropol Anz* 67(1): 1-11.
437. Sklavounou E, Economou-Petersen E, Karadima G, Panas M, Avramopoulos D, Varsou A, Vassilopoulos D, Petersen MB (1997) Apolipoprotein E polymorphism in the Greek population. *Clin Genet* 52(4): 216-218.
438. Skoog I, Hesse C, Aevansson O, Landahl S, Wahlström J, Fredman P, Blennow K (1998) A population study of apoE genotype at the age of 85: relation to dementia, cerebrovascular disease, and mortality. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64(1): 37-43.
439. Skytthe A, Pedersen NL, Kaprio J, Stazi MA, Hjelmberg JVB (2003) Longevity studies in GenomEUtwin. *Twin Research* 6: 448-454.
440. Slagboom PE, Beekman M, Passtoors WM, Deelen J, Vaarhorst AA, Boer JM, van den Akker EB, van HD, de Craen AJ, Maier AB, Rozing M, Mooijaart SP, Heijmans BT, and Westendorp RG (2011) Genomics of human longevity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366 (1561): 35-42.
441. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI (1994) Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 55(5): 876-882.
442. Snejdrlava M, Kalvach Z, Topinkova E, Vrablik M, Prochazkova R, Kvasilova M, Lanska V, Zlatohlavek L, Prusikova M, Ceska R (2011) APOE polymorphism as a potential determinant of functional fitness in the elderly regardless of nutritional status. *Neuro Endocrinol Lett* 32(Suppl 2): 51-54.
443. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ (1989) Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2): 587-591.
444. St George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, i sur. (1987) The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235(4791): 885-890.

445. Stakias N, Liakos P, Tsiapali E, Goutou M, Koukoulis GN (2006) Lower prevalence of epsilon 4 allele of apolipoprotein E gene in healthy, longer-lived individuals of Hellenic origin. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61(12): 1228-1231.
446. Stanfel MN, Shamieh LS, Kaeberlein M, Kennedy BK (2009) The TOR pathway comes of age. *Biochim Biophys Acta* 1790(10): 1067-1074.
447. Stanworth RD, Jones TH (2008) Testosterone for the aging male; current evidence and recommended practice. *Clin Interv Aging* 3: 25–44.
448. Stegmayr B, Asplund K, Kuulasmaa K, Rajakangas AM, Thorvaldsen P, Tuomilehto J for the WHO MONICA Project (1997) Stroke incidence and mortality correlated to stroke risk factors in the WHO MONICA Project. *Stroke* 28: 1367–1374.
449. Stessman J, Jacobs JM, Stessman-Lande I, Gilon D, Leibowitz D (2013) Aging, resting pulse rate, and longevity. *J Am Geriatr Soc* 61(1): 40-45.
450. Stocker R, Keaney JF Jr (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. Review. *Physiol Rev* 84(4): 1381-1478.
451. Strachan T, Read A (2011) *Human Molecular Genetics*, 4<sup>th</sup> Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. Chapter 9 – Organization of the human genome.
452. Strandhagen E, Zetterberg H, Aires N, Palmér M, Rymo L, Blennow K, Thelle DS (2004) The apolipoprotein E polymorphism and the cholesterol-raising effect of coffee. *Lipids Health Dis* 3: 26.
453. Strandhagen E, Zetterberg H, Aires N, Palmér M, Rymo L, Blennow K, Landaas S, Thelle DS (2004) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is a major determinant of coffee-induced increase of plasma homocysteine: a randomized placebo controlled study. *Int J Mol Med* 13(6): 811-815.
454. Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N, Cohen P (2008) Functionally significant insulin-like growth factor 1 receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3438–3442.
455. Sullivan JM, Fowlkes LP (1996) The clinical aspects of estrogens and the cardiovascular system. *Obstet Gynecol* 87(Suppl 2): 36-43.

456. Swim HE (1959) Microbiological aspects of tissue culture. *Annu Rev Microbiol* 13: 141-176.
457. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends lifespan and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107–110.
458. Taylor BJ, Johnson BD (2010) The pulmonary circulation and exercise responses in the elderly. *Semin Respir Crit Care Med* 31(5): 528-538.
459. Terry DF, Pencina MJ, Vasan RS, Murabito JM, Wolf PA, Hayes MK, Levy D, D'Agostino RB, Benjamin EJ (2005) Cardiovascular risk factors predictive for survival and morbidity-free survival in the oldest-old Framingham Heart Study participants. *J Am Geriatr Soc* 53(11): 1944–1950.
460. Terwilliger JD, Weiss KM (1998) Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? Review. *Curr Opin Biotechnol* 9(6): 578-594.
461. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM et al (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466: 707-713.
462. Thaler HW, Wirnsberger G, Pienaar S, Roller RE (2010) Bilateral leg edema in the elderly. *Eur Geriatr Med* 1(6): 353-357.
463. The Social Issues Research Center (2004) Sex differences in driving and insurance risk. Social Issues Research Center, Oxford, UK: 1-24.
464. Thøgersen AM (2005) Risk markers for a first myocardial infarction. Doktorska disertacija. Department of Public Health and Clinical Medicine, Umeå University, Umeå, Švedska.
465. Thomson J, Forfar JO (1950) Progeria (Hutchinson - Gilford syndrome): Report of a Case and Review of the Literature. *Arch Dis Child* 25: 224-234.
466. Thomas BN, Thakur TJ, Yi L, Guindo A, Diallo DA, Ott J (2013) Extensive Ethnogenomic Diversity of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Polymorphisms. *Gene Regul Syst Biol* 7: 1-10.
467. Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410: 227–230.



468. Tombaugh TN, McIntyre NJ (1992) The mini-mental state examination: a comprehensive review. *Review. J Am Geriatr Soc* 40(9): 922-935.
469. Tomek-Roksandić S (2009) Antropometrijske osobine stogodišnjaka. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
470. Torday JS, Rehan VK (2012) *Evolutionary biology: Cell-Cell Communication, and Complex Disease*. 1<sup>st</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
471. Tosetto A, Missiaglia E, Frezzato M, Rodeghiero F (1997) The VITA project: C677T mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and risk of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 97(4): 804-806.
472. Trepanowski JF, Canale RE, Marshall KE, Kabir MM, Bloomer RJ (2011) Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings. *Nutr J* 10: 107.
473. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J (1998) Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 190–193.
474. Tu JV, Nardi L, Fang J, Liu J, Khalid L, Jahansen H, Canadian Cardiovascular Outcomes Research Team (2009) National trends in rates of death and hospital admissions related to acute myocardial infarction, heart failure and stroke, 1994–2004. *CMAJ* 180(13): E118-125.
475. Tucker KL, Qiao N, Scott T, Rosenberg I, Spiro A III (2005) High homocysteine and low B vitamins predict cognitive decline in aging men: the Veterans Affairs Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 82: 627–635.
476. Tuminello ER, Duke Han S (2011) The Apolipoprotein E Antagonistic Pleiotropy Hypothesis: Review and Recommendations. *Int J Alzheimers Dis*, article ID 726197: 1-12. DOI: 10.4061/2011/726197.
477. Turin TC, Murakami Y, Miura K, Rumana N, Kita Y, Hayakawa T, Okamura T, Okayama A, Ueshima H; NIPPON DATA80/90 Research Group (2012) Hypertension and life expectancy among Japanese: NIPPON DATA80. *Hypertens Research* 35(9): 954-958.

478. Tyroler HA (1987) Review of lipid-lowering clinical trials in relation to observational epidemiologic studies. Review. *Circulation* 76(3): 515-522.
479. Tysoe C, Galinsky D, Robinson D, Brayne CE, Easton DF, Huppert FA, Denning T, Paykel ES, Rubinsztein DC (1997) Analysis of alpha-1 antichymotrypsin, presenilin-1, angiotensin-converting enzyme, and methylenetetrahydrofolate reductase loci as candidates for dementia. *Am J Med Genet* 74(2): 207-212.
480. U.S. Department of Labor. 2008. Women in the Labor Force: A Databook. Report 1011. Dostupno online na <http://www.bls.gov/cps/wlf-databook-2008.pdf>.
481. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Review. *Mol Cell Biochem* 266(1-2): 37-56.
482. Valli G, Fedeli A, Antonucci R, Paoletti P, Palange P (2004) Water and sodium imbalance in COPD patients. Review. *Monaldi Arch Chest Dis* 61(2): 112-116.
483. Van Bommel T, Gussekloo J, Westendorp RG, Blauw GJ (2006) In a population-based prospective study, no association between high blood pressure and mortality after age 85 years. *J Hypertens* 24: 287-292.
484. van der Sande MA, Walraven GE, Milligan PJ, Banya WA, Ceesay SM, Nyan OA, McAdam KP (2001) Family history: an opportunity for early interventions and improved control of hypertension, obesity and diabetes. *Bull World Health Organ* 79(4): 321-328.
485. van Duijn CM, de Knijff P, Wehnert A, De Voecht J, Bronzova JB, Havekes LM, Hofman A, Van Broeckhoven C (1995) The apolipoprotein E epsilon 2 allele is associated with an increased risk of early-onset Alzheimer's disease and a reduced survival. *Ann Neurol* 37(5): 605-610.
486. van Winkel R, Rutten BP, Peerbooms O, Peuskens J, van Os J, De Hert M (2010) MTHFR and risk of metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 121(1-3): 193-198.
487. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C (2007) Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 128: 83-91.

488. Vellas B, Guigoz Y, Garry PJ, Nourhashemi F, Bennahum D, Lauque S, Albaredo JL (1999) The Mini Nutritional Assessment (MNA) and its use in grading the nutritional state of elderly patients. Review. *Nutrition (Burbank, LA)* 15(2):116-122.
489. Verhoef P, Kok FJ, Kluijtmans LA, Blom HJ, Refsum H, Ueland PM, Kruyssen DA (1997) The 677C>T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 132(1): 105-113.
490. Villar J, Flores C, Pérez-Méndez L, Maca-Meyer N, Espinosa E, Blanco J, Sangüesa R, Muriel A, Tejera P, Muros M, Slutsky AS; GRECIA group; GEN-SEP group (2008) Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with susceptibility and outcome in sepsis and acute respiratory distress syndrome. *J Intensive Care Med* 34: 488-495.
491. Villareal DT, Apovian CM, Kushner RF, Klein S, American Society for Nutrition; NAASO, The Obesity Society (2005) Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, The Obesity Society. Review. *Am J Clin Nutr* 82(5): 923-934.
492. Visscher PM, Tynan M, Whiteman MC, Pattie A, White I, Hayward C, Wright AF, Starr JM, Whalley LJ, Deary IJ (2003) Lack of association between polymorphisms in angiotensin-converting-enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase genes and normal cognitive ageing in humans. *Neurosci Lett* 347(3): 175-178.
493. Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, Guarente L (2005) A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C.elegans* life span. *Dev Cell* 9: 605–615.
494. Wajchenberg BL (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* 21: 697–738.
495. Walford RL (1964) The immunologic theory of aging. *Gerontologist* 4(4): 195-197.
496. Walter S, Atzmon G, Demerath EW, Garcia ME, Kaplan RC, Kumari M, Lunetta KL, Milaneschi Y, Tanaka T, Tranah GJ, Völker U, Yu L, Arnold A, Benjamin EJ, Biffar R, Buchman AS, Boerwinkle E, Couper D, De Jager PL, Evans DA, Harris TB, Hoffmann W, Hofman A, Karasik D, Kiel DP, Kocher T, Kuningas

- M, Launer LJ, Lohman KK, Lutsey PL, Mackenbach J, Marcianti K, Psaty BM, Reiman EM, Rotter JJ, Seshadri S, Shardell MD, Smith AV, van Duijn C i sur. (2011) A genome-wide association study of aging. *Neurobiol Aging* 32(11): 2109.e15-28.
497. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J (1997) Genetic contribution of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 3147–3153
498. Wang XL, Wang J (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 70: 241–251.
499. Watkins H, Farrall M (2006) Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet* 7(3): 163-173.
500. Weatherby SJ, Mann CL, Davies MB, Carthy D, Fryer AA, Boggild MD, Young C, Strange RC, Ollier W, Hawkins CP (2000) Polymorphisms of apolipoprotein E; outcome and susceptibility in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 6(1): 32-36.
501. Weiner JS, Lourie JA (1981) Practical human biology (Inter-national biological programme handbook No. 9). Academic Press, London.
502. Weismann A (1889) Essays upon heredity and kindred biological problems. Oxford: Clarendon Press.
503. Weissman L, Jo DG, Sørensen MM, de Souza-Pinto NC, Markesbery WR, Mattson MP, Bohr VA (2007) Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Nucleic Acids Res* 35(16): 5545-5555.
504. Westlye ET, Lundervold A, Rootwelt H, Lundervold AJ, Westlye LT (2011) Increased hippocampal default mode synchronization during rest in middle-aged and elderly APOE ε4 carriers: relationships with memory performance. *J Neurosci* 31(21): 7775-7783.
505. White PC, Mune T, Agarwal AK (1997) 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev* 18(1): 135-156.
506. WHO - Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.

507. WHO – Life expectancy: life expectancy by country. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.710> (pristupljeno 11.02.2012.)
508. WHO - Preventing and Managing the Global Epidemic of Obesity. Report of the World Health Organization Consultation of Obesity. Geneva, World Health Organization, 1997.
509. Willcox BJ, He Q, Chen R, Yano K, Masaki KH, Grove JS, Donlon TA, Willcox DC, Curb JD (2006) Midlife risk factors and healthy survival in men. *JAMA* 296: 2343–2350.
510. Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 11(4): 398–411.
511. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB (1998) Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 97: 1837-1847.
512. Wong JM, Collins K (2003) Telomere maintenance and disease. Review. *Lancet* 362(9388): 983-988.
513. World Health Federation (pristupljeno 27.01.2013.) <http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/>
514. Wüllner U, Kölsch H, Linnebank M (2005) Methylenetetrahydrofolate reductase in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 58(6): 972-973.
515. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signalling in growth and metabolism. *Cell* 124(3): 471-484.
516. Yates LB, Djousse L, Kurth T, Buring JE, Gaziano JM (2008) Exceptional longevity in men: modifiable factors associated with survival and function to age 90 years. *Arch Intern Med* 168(3): 284–290.
517. Young JH, Chang YPC, Kim JDO, Chretien JP, Klag MJ, Levine MA, Ruff CB, Wang N-Y, Chakravarti A (2005) Differential susceptibility to hypertension is due to selection during the out-of-Africa expansion. *PLoS Genet* 1(6): e82.
518. Yu YH, Ginsberg HN (2005) Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res* 96: 1042–1052.
519. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, on behalf of the INTERHEART Study Investigators (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with

myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364: 937-952.

520. Zajc Petranović M, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Tomas Ž, Krajačić P, Miličić J, Barbalić M, Tomek-Roksandić S (2012) Angiotensin-converting enzyme deletion allele is beneficial for the longevity of Europeans. *AGE* 34(3): 583-595.
521. Zamarovsky V (1985) Junaci antičkih mitova - Leksikon grčke i rimske mitologije. Školska knjiga, Zagreb, str. 149.
522. Zeng Y, Vaupel JW, Xiao Z, Zhang C, Liu Y (2001) The healthy longevity survey and the active life expectancy of the oldest old in China. *Population: An English Selection* 13(1): 95–116.
523. Zerba KE, Ferrell RE (1996) Genotype-environment interaction: apolipoprotein E (apoE) gene effects and age as an index of time and spatial context in the human. *Genetics* 143: 463-478.
524. Zhang C, Lopez-Ridaura R, Hunter DJ, Rifai N, Hu FB (2006) Common variants of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary heart disease among U.S. diabetic men. *Diabetes* 55: 2140–2147.
525. Zhang Z, Xu G, Liu D, Fan X, Zhu W, Liu X (2012) Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism contributes to ischemic stroke risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. *PLoS One* 7(10): e46495.
526. Zuliani G, Cherubini A, Volpato S, Palmieri E, Mecocci P, De Rango P, Cao P, Costantini F, Mezzetti A, Mascoli F, Senin U, Fellin R (2002) Genetic factors associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57(9): M611-615.
527. Žuntar I, Antoljak N, Vrkić N, Topić E, Kujundzić N, Demarin V, Vuković V (2006) Association of methylenetetrahydrofolate (MTHFR) and apolipoprotein E (apo E) genotypes with homocysteine, vitamin and lipid levels in carotid stenosis. *Coll Antropol* 30(4): 871-878.
528. Žuntar I, Topić E, Vukosavić D, Vuković V, Demarin V, Begonja A, Antoljak N, Šimundić AM (2003) Croatian population data for the C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase: frequencies in healthy and atherosclerotic study groups. *Clin Chim Acta* 335(1-2): 95-100.

Matea Zajc Petranović rođena je 1979. u Zagrebu. Diplomirala je molekularnu biologiju na Prirodoslovno matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2005. godine s temom diplomskog rada *Citogenetička stabilnost trajnih transgenih kultura bobna, Vicia faba L.*, a 2006. godine na istom je fakultetu upisala doktorski studij biologije, modul Molekularna i stanična biologija. Od 2006. godine zaposlena je kao znanstvena novakinja na Institutu za antropologiju u Zagrebu gdje sudjeluje u radu nekoliko domaćih i međunarodnih projekata. Znanstveno se usavršavala na brojnim specijalističkim tečajevima i radionicama u zemlji i inozemstvu. Sudjeluje u izvođenju nastave na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu kolegija "Auksologija čovjeka", "Uvod u populacijsku genetiku", "Interakcija čovjek – okoliš" te "Čovjek i biotop", dok na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sudjeluje u izvođenju kolegija "Metode istraživanja u molekularnoj biologiji". Sudjelovala je na 14 međunarodnih znanstvenih skupova s više od 20 izlaganja, a do sada je objavila 8 znanstvenih radova u međunarodnim znanstvenim časopisima, kao i dva poglavlja u knjizi. Dobitnica je stipendije Sveučilišta u Zagrebu najboljim redovitim studentima 2001. godine te znanstvenih stipendija društava European Anthropological Association, European Society for Human Genetics te CBM Summer School Fellowship. Članica je Hrvatskog antropološkog društva, Hrvatskog društva za humanu genetiku, European Society of Human Genetics te European Anthropological Association.

## POPIS PUBLIKACIJA

Poglavlja u knjizi (2)

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima (5)

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u CC časopisima (1)

Znanstveni radovi u drugim časopisima (2)

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu (8)

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima (4)

Sažeci u zbornicima skupova (9)

Neobjavljena sudjelovanja na skupovima (2)

- Smolej Narančić N, Tomek-Roksandić S, Miličić J, Škarić-Jurić T, Zajc Petranović M, Tomas Ž (2012) Antropometrija u procjeni stanja uhranjenosti starijih osoba. U: Tomek-Roksandić S, Šostar Z, Fortuna V (ur.) Četiri stupnja gerijatrijske zdravstvene njege sa sestrinskom dokumentacijom i postupnikom opće/obiteljske medicine u domu za starije osobe, 2. Dopunjeno izdanje. Zagreb: Referentni centar Ministarstva zdravlja RH za zaštitu zdravlja starijih osoba, pp 299-311. (poglavlje u knjizi)

- Smolej Narančić N, Tomek-Roksandić S, Miličić J, Škarić-Jurić T, Zajc Petranović M, Tomas Ž: Antropometrija u procjeni stanja uhranjenosti starijih osoba. U: Četiri stupnja gerijatrijske zdravstvene njege sa sestrinskom dokumentacijom i postupnikom opće/obiteljske medicine u domu za starije osobe. Tomek-Roksandić S, Šostar Z, Fortuna V (ur.). Centar za gerontologiju Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb, 2011., str 290-302. (poglavlje u knjizi)

- Temaj G, Zajc Petranović M, Škarić-Jurić T, Behluli I, Smolej Narančić N, Xharra S, Sopi R, Miličić J (2012) A detection of microevolutionary changes by the analysis of qualitative dermatoglyphic traits: an example of Albanians from Kosovo. *Anthropol Anz* 69(4): 461-72.

- Veček N, Veček A, Zajc Petranović M, Tomas Ž, Arch-Veček B, Škarić-Jurić T, Miličić J (2012) Secular trend of menarche in Zagreb (Croatia) adolescents. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 160, 1: 51-4.

- Škarić-Jurić T, Martinović Klarić I, Smolej Narančić N, Drmić S, Peričić Salihović M, Barać Lauc L, Miličić J, Barabalić M, Zajc M, Jančićević B (2007) Trapped between tradition and transition - Anthropological and epidemiological cross-sectional study of bayash Roma in Croatia. *Croat Med J* 48, 5: 708-19.

- Škarić-Jurić T, Zajc M, Smolej Narančić N, Barabalić M, Peričić M, Barać Lauc L (2006) Calcaneous ultrasonographic assessment of bone mineral density in the Roma minority population of Croatia – Preliminary report. *Coll Antropol* 30, 4: 761-5.

- Zajc M, Smolej Narančić N, Škarić-Jurić T, Miličić J, Barabalić M, Martinović Klarić I, Jančićević B (2006) Body mass index and nutritional status of the Bayash Roma from Eastern Croatia. *Coll Antropol* 30, 4: 783-7.

- Zeljko HM, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Barešić A, Tomas Ž, Zajc Petranović M, Peričić Salihović M, Jančićević B (2012) Age trends in prevalence of cardiovascular risk factors in Roma minority population of Croatia. *Econ Hum Biol* DOI 10.1016/j.ehb.2012.02.007 (epub ahead of print).



- Veček A, Tomas Ž, Zajc Petranović M, Veček N, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Arch-Veček B, Miličić J (2012) Secular trend in height mirrors socio-economic changes: a study of adolescent population from Zagreb, Croatia. *The Anthropologist* 14(4): 353-8.
- Zajc Petranović M, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Tomas Ž, Krajačić P, Miličić J, Barbalić M, Tomek-Roksandić S (2012) Angiotensin-converting enzyme deletion allele is beneficial for the longevity of Europeans. *AGE* (Dordrecht, Netherlands) 34(3): 583-95. DOI 10.1007/s11357-011-9270-0.
- Tomas Ž, Zajc Petranović M, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N: Association analysis of the leptin receptor gene haplotypes with cardiovascular risk phenotypes. *Abstracts of the European Human Genetics Conference 2012*, u: *Eur J Hum Genet* 20, 2. Nature Publishing Group, 2012; 214-214.
- Tomas Ž, Zajc Petranović M, Krajačić P, Škarić-Jurić T, Miličić J, Tomek-Roksandić S, Smolej Narančić N: MTHFR C667T polymorphism, folate level and hypertension in Croatian elderlies. *Abstracts of the European Human Genetics Conference 2011*, u: *Eur J Hum Genet* 19, 2. Nature Publishing Group, 2011; 341-341.
- Krajačić P, Tomas Ž, Zajc Petranović M, Škarić-Jurić T, Bišof V, Miličić J, Tomek-Roksandić S, Smolej Narančić N: Genotype and haplotype analysis of TP53 and health related traits in Croatian senescent population. *Abstracts of the European Human Genetics Conference 2011*, u: *Eur J Hum Genet* 19, 2. Nature Publishing Group, 2011; 341-341.
- Zajc Petranović M, Tomas Ž, Krajačić P, Miličić J, Škarić-Jurić T, Tomek-Roksandić S, Smolej Narančić N: ACE I/D polymorphism and human longevity - Croatian senescence study. // *European Journal of Human Genetics* (Vol. 18, Suppl. 1) / Nature Publishing Group, 2010; 252-252.
- Tomas Ž, Krajačić P, Zajc Petranović M, Škarić-Jurić T, Bišof V, Miličić J, Tomek-Roksandić S, Smolej Narančić N: The P53 gene polymorphisms and life and family history of cancer in Croatian elderly population. // *European Journal of Human Genetics* (Vol. 18, Suppl. 1) / Nature Publishing Group, 2010; 262-262.
- Zeljko HM, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Peričić Salihović M, Martinović Klarić I, Miličić J, Barbalić M, Zajc Petranović M, Barać Lauc L, Janičijević B: Prevalence of the classical cardiovascular risk factors in Roma minority population of Croatia // *Atherosclerosis, Volumen 11, Supplement 2* / EAS (ur.). Hamburg: Elsevier, 2010. 48-48
- Tomas Ž, Smolej Narančić N, Barbalić M, Zajc M, Škarić-Jurić T, Rudan P, Rudan I, Campbell H, Wright AF.: Leptin and Leptin Receptor Gene Variation and Human Obesity // *European Journal of Human Genetics* (Vol. 17, Suppl. 2) / Gert-Jan B van Ommen (ur.). Basingstoke, UK: Nature Publishing Group, 2009; 225-225.
- Tomas Ž, Smolej Narančić N, Barbalić M, Zajc M, Škarić-Jurić T, Rudan P, Campbell H, Wright Alan F: Association analysis of G-2548A and A19G polymorphisms in the human leptin gene with obesity // *Abstracts of the European Human Genetics Conference 2008* ; u: *European Journal of Human Genetics. Supplement 16 (2008) (S)*. Nature Publishing Group, 2008; 381-381.
- Barbalić M, Zajc M, Škarić-Jurić T, Miličić J, Smolej Narančić N: Analiza vezanosti gena za hipertenziju u izoliranoj populaciji otoka Visa // *Sažeci Četvrtog hrvatskog kongresa iz humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem* ; u: *Paediatrica Croatica. Supplement 51 (2007) (S)* / Barišić, Ingeborg (ur.). Zagreb : Klinika za dječje bolesti, 2007.; 146-147.

- Martinović Klarić I, Peričić Salihović M, Barać Lauc L, Pokupčić K, Cukrov S, Smolej-Narančić N, Škarić-Jurić T, Barbalić M, Zajc M, Jančićjević B: Antropološka istraživanja Roma u Hrvatskoj - očinsko genetičko nasljeđe Bajaša // *Paediatrica Croatica* / Barišić, Ingeborg (ur.). Zagreb: Klinika za dječje bolesti Zagreb, 2007; 151-151.
- Tomas Ž, Zajc M, Barbalić M, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N: Povezanost polimorfizma G-2548A gena za leptin s koncentracijom leptina u serumu i pretiulošću // *Paediatrica Croatica* / Barišić, Ingeborg (ur.). Zagreb: Klinika za dječje bolesti Zagreb, 2007; 149-149.
- Zeljko H, Škarić-Jurić T, Martinović Klarić I, Barbalić M, Smolej Narančić N, Jančićjević B, Barać Lauc L, Peričić Salihović M, Zajc M, Miličić J: ACE I/D polimorfizam i njegova povezanost s hipertenzijom u Roma Bajaša u Hrvatskoj // *Paediatrica Croatica* / Barišić, Ingeborg (ur.). Zagreb: Klinika za dječje bolesti Zagreb, 2007; 150-150.
- Zajc Petranović M, Tomas Ž, Veček A, Smolej Narančić N, Škarić-Jurić T, Miličić J: The influence of socio-economic status on menarche and body measures in urban girls from Croatia // *18<sup>th</sup> Congress of the European Anthropological Association – Human Evolution and Dispersals (Abstracts)* / Gulec E (ur.). Ankara, 2012; 17-17.
- Tomas Ž, Zajc Petranović M, Veček A, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Miličić J: Secondary education, out-of-school activities and obesity: a study of adolescent population from Zagreb, Croatia // *18<sup>th</sup> Congress of the European Anthropological Association – Human Evolution and Dispersals (Abstracts)* / Gulec E (ur.). Ankara 2012; 95-95.
- Zajc Petranović M, Tomas Ž, Krajačić P, Škarić-Jurić T, Miličić J, Tomek-Roksandić S, Smolej Narančić N: eNOS VNTR polymorphism and hypertension in oldest-olds (85+ years) // *Croatian Genetic Society 3rd congress of Croatian geneticists with international participation: Book of abstracts* / Franekić J, Garaj-Vrhovac V(ur.). Zagreb: Croatian Genetic Society 2012; 118-118.
- Tomas Ž, Zajc Petranović M, Škarić-Jurić T, Rudan I, Rudan P, Smolej Narančić N: The evidence of proinflammatory and prothrombotic role of leptin receptor gene // *The seventh ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine – Final program and abstracts* / Schanfield M, Primorac D; Vuk-Pavlović S (ur.). Zagreb: ISABS - International Society for Applied Biological Sciences 2011; 299-299.
- Tomek-Roksandić S, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Tomas Ž, Krajačić P, Zajc Petranović M, Miličić J: Ultrasonographic Assessment of Bone Mineral Density in Elderly Population of Croatia // *The 1st International Congress on Controversies in Longevity, Health and Aging (CoLONGY): Program and Abstracts*. Barcelona 2010; 25-25.
- Tomek-Roksandić S, Smolej Narančić N, Škarić-Jurić T, Miličić J, Tomas Ž, Zajc Petranović M, Krajačić P: Increased Body Mass Index and Muscle Mass are Related to Functional Ability in Very Old Age // *The 1st International Congress on Controversies in Longevity, Health and Aging (CoLONGY): Program and Abstracts*. Barcelona 2010; 25-25.
- Barešić A, Tomas Ž, Zajc M, Škarić-Jurić T, Martinović Klarić I, Smolej Narančić N, Peričić Salihović M, Miličić J, Barać Lauc L, Jančićjević B: Socio-economic Status and Reproductive profile of Bayash Roma Living in Two Regions of Croatia // *16th Congress of the European Anthropological Association* / Boldsen J, Petersen HC (ur.). Odense: University of Southern Denmark, 2008; 171-172.

- Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N, Barbalić M, Zajc M, Peričić M, Barać-Lauc L: Bone mineral density and the prevalence of osteoporosis in the Bayash – Roma minority population from Eastern Croatia // *Congress book, 15<sup>th</sup> Congress of the European Anthropological Association - Man and Environment: Trends and Challenges in Anthropology* / Budimpešta, Mađarska 2006.
- Smolej Narančić N, Škarić-Jurić T, Barbalić M, Zajc M, Martinović Klarić I, Janićijević B: Nutritional status of the Bayash – Roma minority population from Eastern Croatia // *Congress book, 15<sup>th</sup> Congress of the European Anthropological Association - Man and Environment: Trends and Challenges in Anthropology* / Budimpešta, Mađarska 2006.
- Škarić-Jurić T, Zeljko HM, Smolej Narančić N, Zajc Petranović M, Tomas Ž, Barešić A, Miličić J, Peričić Salihović M, Janićijević B: Comparison of anthropometric indicators of obesity in rural and urban Croatian Roma: a pilot study (pozvano predavanje). 5. Slovenski kongres preventivne medicine, Portorož, Slovenija, 2012.
- Miličić J, Veček A, Zajc Petranović M, Tomas Ž, Veček N, Škarić-Jurić T, Smolej Narančić N: Secular trend in adolescents` height and weight from Zagreb, Croatia, in the last twenty years (pozvano predavanje). 5. Slovenski kongres preventivne medicine, Portorož, Slovenija, 2012.