

# Raspodjela genotipova moždanoga neurotrofnoga čimbenika (BDNF Val66Met) i razina N-glikana u plazmi kao pokazatelji prekomjerne tjelesne mase u djece

---

**Turčić, Marijana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:813413>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

Marijana Turčić

Raspodjela genotipova moždanoga neurotrofnoga  
čimbenika (*BDNF* Val66Met) i razina *N*-glikana u  
plazmi kao pokazatelji prekomjerne tjelesne mase  
u djece

DISERTACIJA



**ZAGREB, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

Marijana Turčić

Raspodjela genotipova moždanoga neurotrofnoga  
čimbenika (*BDNF* Val66Met) i razina *N*-glikana u  
plazmi kao pokazatelji prekomjerne tjelesne mase  
u djece

DISERTACIJA



**ZAGREB, 2015.**

Disertacija je izrađena na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju, Zavoda za molekularnu medicinu, te u ambulantomata školske medicine Zavoda za javno zdravstvo Zagrebačke županije

Voditelji rada: prof.dr.sc. Fran Borovečki  
prof.dr.sc. Nela Pivac, znanstvena savjetnica

*„Čo staviš va glavu, nijedon ti ne more zet“  
(bodulska beseda moga dede)*

*Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinjeli izradi ove disertacije, a posebice iskreno hvala:*

*Mentorima, prof.dr.sc. Franu Borovečkom i prof.dr.sc. Neli Pivac za stručno vođenje, podršku i samu ideju disertacije, uz posebnu zahvalu prof.dr.sc. Neli Pivac na maksimalnom angažmanu u svakom pogledu.*

*Dr.sc. Matei Nikolac Perković za pomoć u statističkoj i tehničkoj obradi disertacije.*

*Mileni Popović, mag.med.biochem., i svim djelatnicama medicinsko-biokemijskog laboratorija Popović, na njihovoj susretljivosti i pomoći.*

*Mojim roditeljima, Ivanu i Zlati Turčić, koji su mi svojom bezuvjetnom ljubavi, bezrezervnom podrškom i samoodricanjem omogućili da slijedim svoje snove.*

*Mojoj djeci, mojim malim anđelima Florijanu, Lukreciji i Elizabeti, koji su smisao mojeg života.*

*Samu disertaciju i sve što ona predstavlja posvećujem **prof.dr.sc. Boži Krušlinu** bez koga ova disertacija nikada ne bi bila ni ostvarena.*

*Još kao studenticu treće godine medicine uveo me u svijet znanosti, nesebično i bezuvjetno mi prenio osnove struke i znanstvenog promišljanja. Njegova stručna podrška, strpljivost, razumijevanje i ohrabrenje u ovih 16 godina nikada nisu izostali, vjerovao je u mene kada ni sama nisam, a bio je uz mene i u mojim najtežim životnim trenucima.*

*Hvala Vam, profesore!*

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Pretilost .....	1
1.1.1. Procjena uhranjenosti .....	2
1.1.2. Etiologija prekomjerne tjelesne mase.....	6
1.2. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF) .....	9
1.2.1. Centralno djelovanje BDNF-a .....	13
1.2.2. Periferno djelovanje BDNF-a .....	19
1.2.3. BDNF i regulacija apetita .....	19
1.2.4. BDNF i tjelesna masa .....	20
1.2.5. Gen <i>BDNF</i> .....	21
1.2.6. Utjecaj različitih čimbenika na BDNF .....	22
1.3. <i>N</i> -glikani .....	25
1.3.1. <i>N</i> -glikani i tjelesna masa .....	31
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>35</b>
<b>3. CILJEVI RADA.....</b>	<b>36</b>
<b>4. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI .....</b>	<b>37</b>
4.1. Ispitanici .....	37
4.2. Postupak istraživanja .....	38
4.2.1. Uzimanje krvi .....	38
4.2.2. Postupak izdvajanja plazme .....	38
4.2.3. Izolacija DNA metodom isoljavanja .....	39
4.2.4. Određivanje <i>BDNF</i> genotipa .....	40
4.2.5. Otpuštanje <i>N</i> - glikana .....	41
4.2.6. Denaturacija i oslobađanje <i>N</i> -glikana .....	43
4.2.7. Obilježavanje <i>N</i> -glikana .....	44
4.2.8. Određivanje <i>N</i> -glikanskih struktura .....	45

4.3. Statistička obrada podataka .....	45
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>47</b>
5.1. Demografski podaci .....	47
5.2. Polimorfizam gena <i>BDNF</i> .....	51
5.2.1. Polimorfizam gena <i>BDNF</i> s obzirom na nacionalne referentne vrijednosti ITM centila .....	51
5.2.2. Polimorfizam gena <i>BDNF</i> i indeks tjelesne mase (ITM) .....	54
5.3. Razina <i>N</i> -glikana u plazmi kao pokazatelj prekomjerne tjelesne mase u djece .....	55
5.3.1. Profil <i>N</i> -glikana u plazmi razdvojenih na 16 sijaliziranih kromatografskih vršaka (GP serija) metodom HILIC .....	55
5.3.2. Profil <i>N</i> -glikana u plazmi razdvojenih na 13 desijaliziranih kromatografskih vršaka (DG serija) metodom HILIC .....	62
5.3.3. Profil <i>N</i> -glikana u plazmi koji dijele slične strukturne karakteristike ..	68
5.3.4. Profil <i>N</i> -glikana u plazmi razdvojenih prema broju sijalinskih kiselina metodom WAX-HPLC .....	74
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>79</b>
6.1. Prekomjerna tjelesna masa u djece .....	79
6.2. Povezanost <i>BDNF</i> polimorfizma Val66Met i prekomjerne tjelesne mase .....	80
6.3. <i>N</i> -glikani i ITM .....	89
6.4. Ograničenja studije .....	95
<b>7. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>96</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>97</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>98</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>99</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>129</b>

## **Popis oznaka i kratica**

A adenin

ADA adenzin deaminaza, engl. adenosine deaminase

ADHD poremećaj pažnje s hiperaktivnošću, engl. attention deficit hyperactivity disorder

ADRB2  $\beta$ 2-adrenergički receptor 2, engl. adrenergic  $\beta$ 2-receptor

ADRBK2  $\beta$ 2-adrenergička receptor kinaza 2, engl. adrenergic  $\beta$ 2-receptor kinase 2

AFP alfa-fetoprotein

AGP alfa-1 glikoprotein, engl. alpha-1 acid glycoprotein

AMPA amino-3-(3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-il)-propanska kiselina, engl. amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

AN anoreksija nervoza

ANOVA jednosmjerna analiza varijance, engl. analysis of variance

ARC arkuatni nukleus, engl. arcuate nucleus

B3GAT1 beta-1,3-glukuroniltransferaza 1, engl. beta-1,3-glucuronyltransferase 1

BA biantenarni

BADS disijalizirani biantenarni

BAMS monosijalizirani biantenarni

BDNF moždani neurotrofni čimbenik, engl. brain derived neurotrophic factor

BN bulimija nervoza

CA125 karcinomski antigen 125, engl. cancer antigen 125

CA15-3 karcinomski antigen 15-3, engl. cancer antigen 15-3

CA19-9 karcinomski antigen 19-9, engl. cancer antigen 19-9

CDC centar za prevenciju i kontrolu bolesti, engl. Centers for Disease Control and Prevention

CDG kongenitalni poremećaji u glikozilaciji, engl. congenital disorders of glycosylation

CEA karcinoembrijski antigen, engl. carcinoembryonic antigen

CRH kortikotropin-oslobađajući hormon, engl. corticotropin-releasing hormone

DMN dorzomedijalni nukleus, engl. dorsomedial nucleus

DNA deoksiribonukleinska kiselina

DVC dorzalni vagalni kompleks, engl. dorsal vagal complex

FGF faktor rasta fibroblasta, engl. fibroblast growth factor

FOXC2 račvasti obiteljski transkripcijski faktor C2, engl. forkhead box protein C2

FTO gen nezasićenosti, engl. fat mass and obesity associated

FUC fukozilirani, engl. fucosylated

FUT fukoziltransferaza, engl. fucosyltransferase

G gvanin

GABA gama-aminomaslačna kiselina, engl. gamma-aminobutyric acid

GLS glikosfingolipid

GNPDA2 glukozamin-6-fosfat deaminaza tipa 2, engl. glucosamine-6-phosphate deaminase 2

GWAS cjelogenomska studija povezanosti, engl. genome wide association study

HCC hepatocelularni karcinom, engl. hepatocellular carcinoma

HDL lipoprotein visoke gustoće, engl. high-density lipoprotein

HNF 1a jetreni nuklearni čimbenik 1 homeobox A, engl. hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A

HPLC visokotlačna tekućinska kromatografija, engl. high performance liquid chromatography

IDF međunarodna federacija za dijabetes, engl. International Diabetes Federation

IgG imunoglobulin G

IOTF međunarodna skupina za pretilost, engl. International Obesity Taskforce

ITM indeks tjelesne mase ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )

JAK Janus kinaza, engl. Janus kinase

KCTD15 domena 15 tetramerizacije  $\text{K}^+$  kanala, engl. potassium channel tetramerisation domain containing 15

LDLR receptor za lipoprotein male gustoće, engl. low-density lipoprotein receptor

LH lateralni hipotalamus, engl. lateral hypothalamus

LPA lizofosfatična kiselina, engl. lysophosphatidic acid

LTD dugotrajna depresija, engl. long-term depression

MALDI-TOF tandemna spektrometrija masa, engl. matrix-assisted laser deionisation-time of flight

MAPK mitogenom aktivirana protein kinaza, engl. mitogen-activated protein kinase  
MC4R melanokortin-4 receptor, engl. melanocortin-4 receptor  
Met metionin  
MGAT1 manozil (alfa-1,3-)-glikoprotein beta-1, engl. mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1  
MGAT5 alfa-1,6-manozilglikoprotein 6-beta-N-acetilglukozaminiltransferaza A, engl. alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A  
MTCH2 homolog mitohondrijskog nositelja 2, engl. mitochondrial carrier 2  
MUC1 mucin 1  
NA2 asijalo-galaktozilirani biantenarni, engl. asialo-galactosylated biantennary N-glycan  
NASH ne-alkoholni steatohepatitis, engl. non-alcoholic steatohepatitis  
NEGR1 regulator rasta neurona, engl. neuronal growth regulator 1  
NGA2F asijalo-agalakto-biantenarni N-glikan, engl. asialo-agalacto-biantennary fucosylated N-glycan  
NPY neuropeptid Y  
NPY/AgRP neuropeptid y i aguti povezan peptid engl. neuropeptide Y/agouti-related peptide  
NT neurotrofin  
PCR lančana reakcija polimeraze, engl. polymerase chain reaction  
POMC proopiomelanokortin, engl. proopiomelanokortin  
PVN paraventrikularni nukleus, engl. paraventricular nucleus  
RAI-1 retinoičnom kiselinom inducirani 1 protein, engl. retinoic acid-induced 1  
RTM relativna tjelesna masa  
SD standardna devijacija  
SEC16B SEC16 homolog B, engl. SEC16 homologue B  
SF-1 steroidogeni faktor 1  
SH2B1 SH2B adaptirajući protein 1, engl. SH2B adaptor protein 1  
SLC9A9 član 9 obitelji slobodnih nosača, engl. solute carrier family 9 member 9  
SNP polimorfizam jednog nukleotida, engl. single nucleotide polymorphism  
ST3GAL5 beta-galaktozid alfa-2,3-sijaliltransferaza 5, engl.  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase 6  
ST6GAL1 beta-galaktozamid alfa-2,6-sijaliltransferaza 1, engl.  $\beta$ -galactosamide  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1  
TA tetraantenarni  
TM tjelesna masa u kilogramima (kg)  
TMEM18 transmembranski protein 18, engl. transmembrane protein 18  
TNF čimbenik nekroze tumora, engl. tumor necrosis factor  
TRH tireotropni hormon, engl. thyrotropin-releasing hormone  
TRIA triantenarni  
TrkB tirozin-kinazni receptor, engl. tyrosine kinase receptor  
TV tjelesna visina u metrima (m)  
UCN urokortin, engl. urocortin  
UCP protein razdvajanja, engl. uncoupling protein  
Val valin  
VMN ventromedijalni nukleus, engl. ventromedial nucleus  
VTA ventralno tegmentalno područje, engl. ventral tegmental area  
WAGR Wilms tumor bubrega, aniridija irisa, genitourinarne anomalije i retardacija eng. Wilms tumour, aniridia, urinary anomalies, mental retardation  
WHO svjetska zdravstvena organizacija, engl. World Health Organisation



# 1. UVOD

## 1.1. Prekomjerna tjelesna masa

Prekomjerna tjelesna masa postaje jedan od glavnih zdravstvenih problema današnjice, a time predstavlja i jedan od najvećih javnozdravstvenih izazova. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije iz 2008. godine (WHO, engl. World Health Organisation), na svijetu danas živi milijardu i 500 milijuna odraslih osoba starijih od 20 godina koje su preuhranjene, s time da je više od 200 milijuna muškaraca, te oko 300 milijuna žena pretilo. Tijekom posljednja dva desetljeća učestalost pretilosti se utrostručila u razvijenim zemljama, a čak 10% djece ima prekomjernu tjelesnu masu (1). U prilog tome govore i podaci pregledne studije iz 2010. godine koja je uključila 144 zemlje, u kojoj se navodi da je, prema WHO kriterijima za procjenu uhranjenosti, 43 milijuna djece u dobi do 5 godina preuhranjeno, kao i da godišnje od posljedica prekomjerne tjelesne mase umire oko 2,5 milijuna ljudi (2). Nastavi li se ovakav trend epidemije prekomjerne tjelesne mase, prema predviđanju WHO do 2025. godine u svijetu će biti čak 70 milijuna preuhranjene i pretile djece (3).

Povećanje učestalosti pretilosti u sve ranijoj životnoj dobi, zbog svojih posrednih i neposrednih posljedica na zdravlje, predstavlja veliki problem ne samo u razvijenim zemljama nego i u zemljama u razvoju. Naime, uz debljinu se vežu brojni zdravstveni rizici, kao što su arterijska hipertenzija, dislipidemija, kronična upala, hiperinzulinizam, endotelna disfunkcija i veća sklonost zgrušavanju krvi (4), šećerna bolest i njenzina otežana regulacija, i veća učestalost komplikacija (5,6). Osim navedenog, u dječjoj i mladenačkoj dobi uz debljinu se razvijaju i poremećaji socijalnog i emocionalnog funkcioniranja, posebice u djevojaka (7). O ozbiljnosti ovog problema govori i podatak da su ekstremno pretila djeca i adolescenti, po narušenosti kvalitete života vezane uz zdravlje, usporedivi s vršnjacima oboljelima od raka (8). Za procjenu uhranjenosti djece kao antropometrijski standard upotrebljava se indeks tjelesne mase (ITM), a isti predstavlja omjer tjelesne mase u kilogramima i tjelesne visine u metrima ( $ITM = TM(kg)/TV(m)^2$ ). Istraživanja pokazuju kako djevojčice s višim indeksom tjelesne mase (ITM), u dobi 2-8 godina starosti imaju za 0,7 godina, a dječaci za 0,6 godina raniji početak puberteta. Svako povećanje ITM-a za jednu jedinicu smanjuje u stadiju adolescencije visinu za 0,51 cm u djevojčica, a za 0,88 cm u dječaka (9). Tome u prilog govore i rezultati nedavnog američkog longitudinalnog istraživanja na 2808 djece i adolescenata hispanskog podrijetla (10) u kojem se, služeći se kriterijima Američkog državnog centra za prevenciju i kontrolu

bolesti (CDC, engl. Centers for Disease Control and Prevention) iz 2000. godine za procjenu tjelesne uhranjenosti, navodi kako su preuhranjene i pretile osobe u svom prepubertetskom razdoblju bile višeg rasta od prosjeka, no u pubertetu su imale manji zamah rasta. Također, meta-analiza svih studija provedenih u razdoblju 1970.-1992. godine, iako su antropometrijska mjerenja varirala između studija, potvrdila je da trećina pretile predškolske i polovica pretile školske djece ostaju pretila i u odrasloj dobi (11,12), te imaju veći rizik za pojavu poremećaja prehrane (13-17), osobito bulimije (18), samo-nametnute restriktivne dijetе s posljedičnim razvojem anoreksije (19) ili paradoksalno prekomjernog dobivanja na tjelesnoj masi (20) od normalno uhranjene djece. Spomenuti poremećaji u općoj populaciji prisutni su u 30-45% slučajeva, od čega na pedijatrijsku populaciju zdrave djece otpada 25-35%, odnosno 33-80% kod djece s poteškoćama u razvoju (21,22).

U Republici Hrvatskoj se bilježi značajan porast učestalosti prekomjerne tjelesne mase i pretilosti posljednjih godina i u odraslih i u djece. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo prevalencija djece s povećanom tjelesnom masom u dobnoj skupini 7-14 godina porasla je s 10,6% u razdoblju od 1997-2000. godine na 11,9% u razdoblju od 2000-2005.godine. U istom razdoblju učestalost pretilosti porasla je sa 3,5% na 6,9% (23). Međutim, u kasnije praćenom razdoblju, rezultati istraživanja provedenog u Hrvatskoj 2006-2008. godine na reprezentativnom uzorku od 11683 školske djece u dobi od 6,5 do 18,5 godina, pokazali su da je, prema kriterijima Međunarodne skupine za pretilost (IOTF, engl. International Obesity Taskforce), 18,2% dječaka i 15,2% djevojčica imalo prekomjernu tjelesnu masu, a pretilih je bilo 7,9% dječaka i 5,5% djevojčica. Uspoređujući rezultate istraživanja kohorte učenika prvih razreda osnovne škole u Hrvatskoj 2003-2004. godine i 2006-2008. godine, učestalost dječaka s prekomjernom tjelesnom masom porasla je s 13,8% na 14,9%, dok je učestalost djevojčica s prekomjernom tjelesnom masom porasla s 12,6% na 17,6%. Preuhranjenih je u prvom razdoblju bilo 8,3% dječaka i 6,9% djevojčica, a u drugom razdoblju 9,6% dječaka i 8,6% djevojčica (24).

Ministarstvo zdravlja i socijalne skrbi je 2010. godine je prepoznalo javnozdravstveni problem pretilosti, podržalo „Globalnu strategiju o prehrani, tjelesnoj aktivnosti i zdravlju“ objavljenu od strane WHO-a, i donijelo vlastiti „Akcijski plan za prevenciju i smanjenje prekomjerne tjelesne mase“.

### **1.1.1. Procjena uhranjenosti**

Pretilost, odnosno debljina, prema Hrvatskom nacionalnom konsenzusu o dijagnostici i liječenju debljine, donesenom na Drugom hrvatskom kongresu o debljini 2006. godine, kronična je bolest

proizašla iz neravnoteže kalorijskog unosa i potrošnje energije, a karakterizirana je metaboličkim i endokrinološkim poremećajima. U većini zemalja za procjenu uhranjenosti upotrebljavaju se sljedeći pokazatelji:

- relativna tjelesna masa / stvarna tjelesna masa u odnosu na standardnu x 100
- tjelesna masa za dob u centilima, za dob i spol
- tjelesna masa za visinu u centilima, za dob i spol
- indeks tjelesne mase u centilima, za dob i spol
- opseg struka
- opseg nadlaktice, debljina kožnih nabora

Relativna tjelesna masa (RTM) prikazuje u postocima stvarnu tjelesnu masu u odnosu na standardnu za određenu dob i spol (stvarna tjelesna masa u kilogramima/standardna tjelesna masa x 100). Prema RTM neishranjena su djeca s vrijednostima RTM-a ispod 90%, a pretila su djeca s RTM većom od 120% (25).

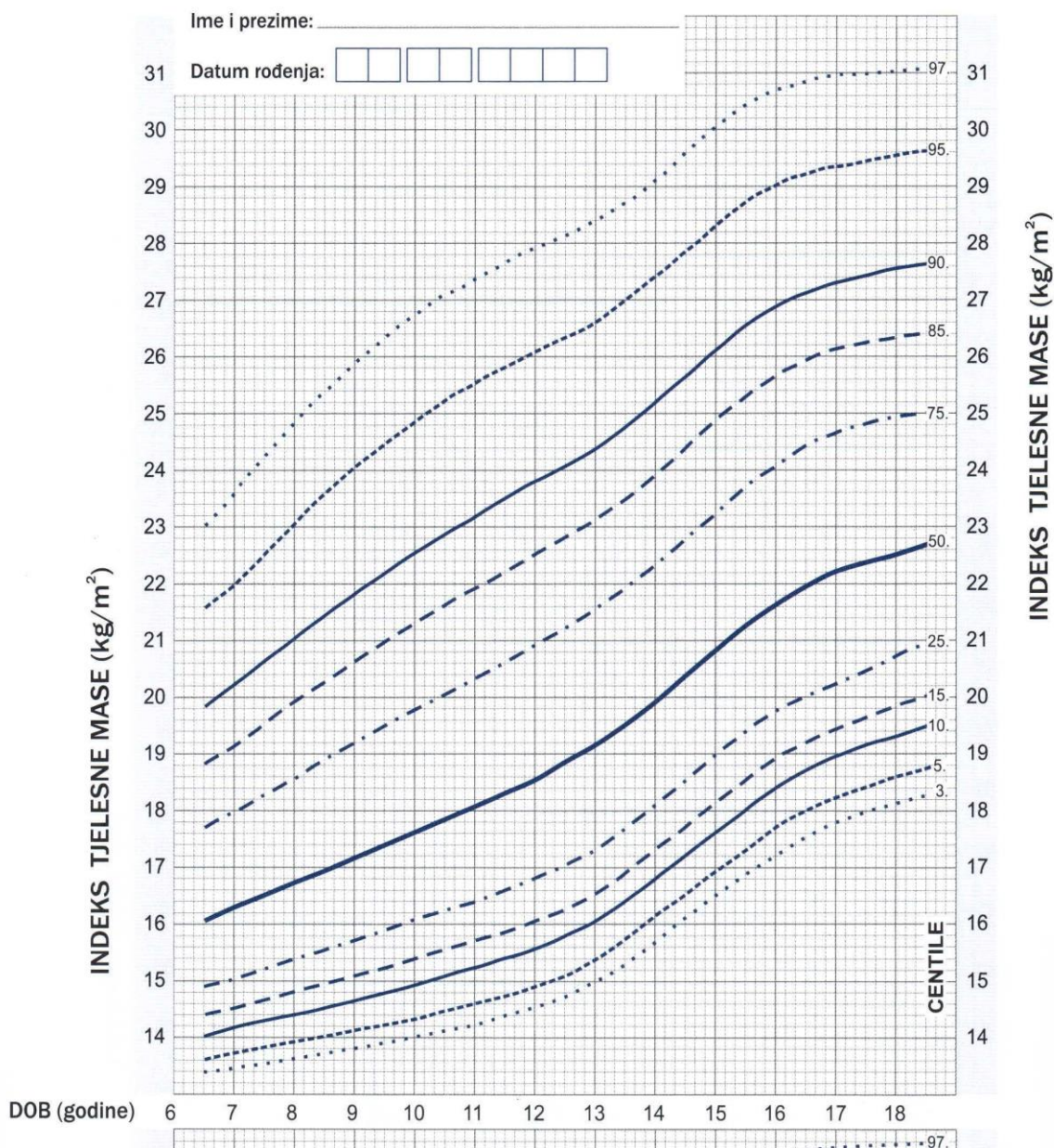
Tjelesna masa za dob pokazuje masu u odnosu na dob što se prikazuje grafički pomoću tzv. centilnih krivulja za djevojčice, odnosno dječake. S obzirom da je to dobar pokazatelj trenutnog stanja uhranjenosti, njena primjena je više usmjerena praćenju porasta tjelesne mase u dojenačkoj dobi, a manje za procjenu stanja uhranjenosti djece i adolescenata. Tjelesna masa za visinu prikazuje odnos mase i visine također centilnim krivuljama za svaki spol, ali ne uzimajući u obzir dob. Stoga je njezina primjena većinom usmjerena na utvrđivanje neishranjenosti ili pretilosti dojenčadi i mlađe djece (26).

Indeks tjelesne mase upotrebljava se kao indirektni pokazatelj udjela masti u ukupnoj tjelesnoj masi, a izračunava se kao omjer mase tijela u kilogramima s kvadratom tjelesne visine u metrima ( $ITM = TM(kg)/TV(m)^2$ ). Prema ITM-u pojedinci mogu biti pothranjeni, normalno uhranjeni, preuhranjeni ili pretili. Granice između podskupina su točno određene samo za odraslu populaciju. Normalno uhranjene odrasle osobe imaju ITM od 18,5-24,99 kg/m<sup>2</sup>. Odrasle osobe sa ITM-om ispod 18,49 kg/m<sup>2</sup> su pothranjene, s ITM-om od 25-29,99 kg/m<sup>2</sup> su preuhranjene, a osobe s ITM-om jednakim ili većim od 30 kg/m<sup>2</sup> su pretile (27,28). Ovaj način mjerenja prihvaćen je i od WHO, stoga ITM danas predstavlja standardizirani objektivni način procjene stanja uhranjenosti za međunarodne usporedbe nutritivnog statusa (29-31). Međutim, kako su u djece te granice promjenljive ovisno o dobi i spolu djeteta, utvrđivanje stanja uhranjenosti vrši se pomoću tzv. centilnih krivulja, s time da postoji nekoliko različitih antropometrijskih standarda za dijagnozu pretilosti, što dodatno otežava

usporedbe međunarodih istraživanja. Tako se, prema smjernicama WHO, kao dijagnostički kriterij pretilosti uzima z-vrijednost ITM-a za visinu gdje +1 standardna devijacija (SD) z-vrijednosti predstavlja rizik za prehranjenost, +2SD označava prekomjernu tjelesnu masu, a +3SD označava pretilost (32). Također se spominju i granične vrijednosti 85. i 97. centile ITM-a za dob i spol. Međutim, u američkim istraživanjima većinom se primjenjuju kriteriji CDC-a koji djecu s ITM-om od 85. do 95. centile definiraju kao prehranjene, a djecu s ITM-om  $\geq 95.$  centila kao pretile (33-37) (Slika 1, Slika 2), dok europske studije češće primjenjuju dijagnostičke kriterije IOTF gdje se pretilost definira sukladno vrijednostima ITM-a ovisno o dobi i spolu (34). Tako su djeca s vrijednostima ITM-a od 25 do 29,99 kg/m<sup>2</sup> prekomjerne tjelesne mase, pretila su djeca s ITM-om  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>, a sva djeca s vrijednostima ITM-a  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> spadaju u ukupno pretile (engl. total overweight).

U djece se ITM, zajedno s tjelesnom visinom i masom, koristi kao pokazatelj tjelesnog rasta kojeg kontroliraju nasljedni i okolišni čimbenici (38,39). Studije napravljene na blizancima i posvojenoj djeci utvrdile su kako je utjecaj okolišnih čimbenika na tjelesnu masu i ITM najsnažniji po rođenju te se smanjuje s porastom dobi (40,41). S druge strane, smatra se da je nasljeđe odgovorno za čak 65% varijacija u vrijednosti ITM-a te da se njegov utjecaj pojačava do kasne adolescencije (42,43). Stoga je upravo taj parametar, uz raspodjelu masnog tkiva, najbolji za procjenu jačine nasljedne komponente u razvoju pretilosti (44).

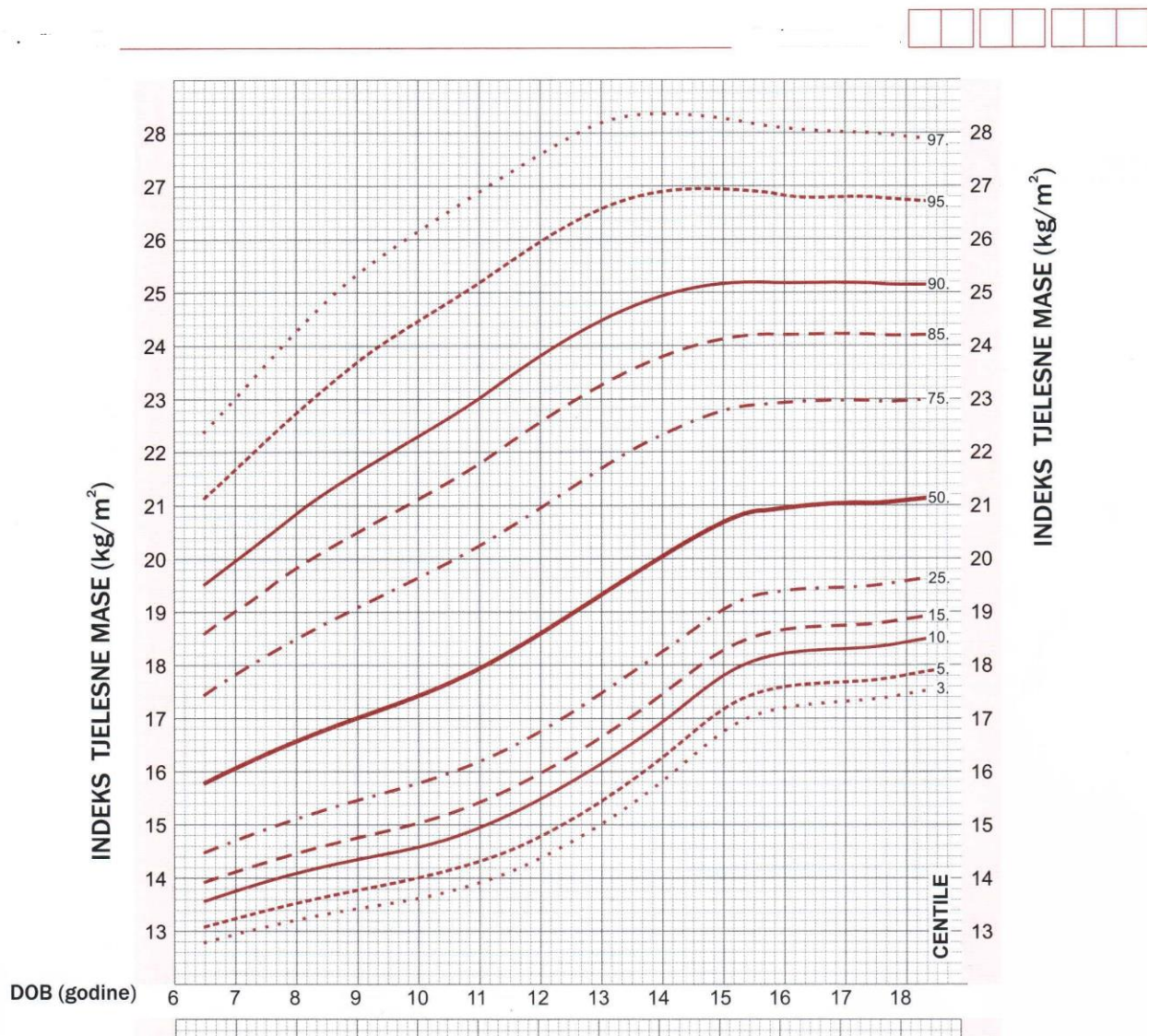
## HRVATSKE REFERENTNE VRIJEDNOSTI INDEKSA TJELESNE MASE (kg/m<sup>2</sup>) DJEČAKA U DOBI OD 6,5 DO 18,5 GODINA



**Slika 1. Centilne krivulje za dječake od 6,5 do 18,5 godina**

Modificirano prema Jureša V i sur. Hrvatske referentne vrijednosti antropometrijskih mjera školske djece i mladih. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb: Škola narodnog zdravlja Andrija Štampar, 2011.

## HRVATSKE REFERENTNE VRIJEDNOSTI INDEKSA TJELESNE MASE ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) DJEVOJČICA U DOBI OD 6,5 DO 18,5 GODINA



**Slika 2. Centilne krivulje za djevojčice od 6,5 do 18,5 godina**

Modificirano prema Jureša V. i sur. Hrvatske referentne vrijednosti antropometrijskih mjera školske djece i mladih. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb: Škola narodnog zdravlja Andrija Štampar; 2011.

### 1.1.2. Etiologija prekomjerne tjelesne mase

Na ITM u djece utječu nasljedni i okolišni čimbenici (38,39). Neki od okolišnih čimbenika koji se povezuju s ITM-om su perinatalni i postnatalni nutritivni status majke i djeteta, usvajanje

prehrambenih navika, bavljenje sportom, te sjedilački ili aktivni način života mladih generacija (45). Individualne varijacije u bazalnom metabolizmu tijekom mirovanja, probavljanju i termičkom odgovoru na hranu, te potrošnji energije pri fizičkoj aktivnosti, razlog su pojedinačnoj otpornosti ili sklonosti za razvoj pretilosti, a rezultat su polimorfizma gena odgovornih za energetske ravnoteže (28). Studije napravljene na blizancima i posvojenoj djeci utvrdile su kako je utjecaj okolišnih čimbenika na tjelesnu masu i ITM najsnažniji po rođenju te se smanjuje s porastom dobi odnosno u odrasloj dobi (40,41).

S druge strane, smatra se kako su upravo genetički čimbenici, čiji je utjecaj najjači nakon rođenja i do kasne adolescencije (42,43), u 55-85% slučajeva odgovorni za pojavu prekomjerne tjelesne mase i pretilosti (46-50). Pokazano je da postoji oko 250 s pretilošću povezanih gena (51). Među genima vezanim za pojavu prekomjerne tjelesne mase, opisano je čak 11 genetičkih varijanti različitih gena čiji rizični genotipovi doprinose višim vrijednostima ITM-a u dječjoj, adolescentnoj i odrasloj dobi (52). To su rizični genotipovi različitih gena: gena za moždani neurotrofni čimbenik (*BDNF*, engl. brain-derived neurotrophic factor), gena domene 15 tetramerizacije K<sup>+</sup> kanala (*KCTD15*, engl. potassium channel tetramerisation domain containing 15), gena transmembranskog proteina 18 (*TMEM18*, engl. transmembrane protein 18), gena nezasićenosti (*FTO*, engl. fat mass and obesity associated), gena za glukozamin-6-fosfat deaminazu 2 (*GNPDA2*, engl. glucosamine-6-phosphate deaminase 2), gena za SH2B adaptirajući protein 1 (*SH2B1*, engl. SH2B adaptor protein 1), gena za homolog mitohondrijskog nositelja 2 (*MTCH2*, engl. mitochondrial carrier homologue 2), gena za melanokortin 4 receptor (*MC4R*, engl. melanocortin 4 receptor), gena za SEC16 homolog B (*SEC16B*, engl. SEC16 homologue B) i gena regulatora rasta neurona 1 (*NEGR1*, engl. neuronal growth regulator 1), koji su povezani s većim porastom tjelesne mase do jedanaeste godine starosti (52). Ti su rizični genotipovi također povezani s većim rastom u visinu do dobi od 7 godina starosti (52). Primjerice, zamjena jedne baze (SNP, engl. single nucleotide polymorphism) unutar *FTO* gena, i to A varijanta polimorfizma koji se naziva rs9939609, povezana je s porastom ITM-a. *FTO* gen je prvi u kojeg je utvrđena povezanost s pretilošću (53), i njegove varijante utječu na unos energije te povećavaju ITM za 0,33 kg/m<sup>2</sup>, dok genetičke varijante *TMEM18* gena, čiji produkt ima značajnu ulogu u migraciji matičnih neuralnih stanica, dovodi do porasta ITM-a za 0,26 kg/m<sup>2</sup> (54-56). Nedavna cjelogenomska studija povezanosti (GWAS, engl. genome-wide association study) povezuje nekoliko rizičnih alela gena *TMEM18*, *GNPDA2*, *SH2B1* i *NEGR1* s pretilošću u djece i odraslih osoba, a budući da je ekspresija tih gena visoka u hipotalamusu, ti nalazi potvrđuju važnu ulogu središnjeg živčanog sustava u nastanku pretilosti, porasta tjelesne mase i povećanog ITM-a (54). Također, zabilježeno je više od 150 genetičkih varijacija gena za *MC4R* koje se povezuju s hiperfagijom, povećanim ITM

vrijednostima i hiperinzulinemijom (57). I rizični genotipovi drugih gena, npr. gena račvastog obiteljskog transkripcijskog faktora C2 (*FOXC2*, engl. forkhead box protein C2) povezani su s promjenama plazmatskih razina glukoze i triglicerida, a utječu i na kontrolu tjelesne mase (58), dok se varijacije u razini potrošnje energije bazalnog metabolizma povezuju s mutacijama gena proteina razdvajanja (*UCP*, engl. uncoupling protein) (28,59).

Promjene u procesu mobilizacije lipida i lipolize unutar adipocita zabilježene su u pretilih osoba. Tako supresija gena za receptor lipoproteina male gustoće (*LDLR*, engl. low-density lipoprotein receptor) u masnom tkivu omentuma, s posljedičnom smanjenom ekspresijom *LDLR*-a, posreduje razvoju pretilosti povezane s dislipidemijom, odnosno povećanim cirkulirajućim vrijednostima lipoproteina male gustoće (60,61). Aktivacija  $\beta$ 2-adrenergičkih receptora (*ADRB2*, engl. adrenergic  $\beta$ 2-receptor) pokreće snažnu lipolizu, no u masnom tkivu pretilih osoba zabilježena je pojačana transkripcija kinaze  $\beta$ -adrenergičkog receptora 2 (*ADRBK2*, engl. adrenergic  $\beta$ 2-receptor kinase) uključene u desenzibilizaciju  $\beta$ -adrenergičkih receptora, koja, uz smanjenu ekspresiju  $\beta$ 2-adrenergičkog receptora pronađenu u pretilih osoba, potiče daljnji razvoj pretilosti inhibirajući lipolizu (61). Na oštećenu lipolitičku aktivnost u pretilih upućuje i smanjena koncentracija cirkulirajuće adenozin deaminaze (*ADA*, engl. adenosine deaminase), bitne za poticanje lipolize koja to čini otklanjanjem inhibitornog djelovanja adenzina (62), te pojačana ekspresija receptora Y1 i Y5 za neuropeptid Y1 (*NPY1*) i Y5 (*NPY5*), neurotransmitera snažnog antilipolitičkog djelovanja (63).

Nadalje, pretilost je karakterizirana leptinskom rezistencijom. Leptin se oslobađa iz adipoznog tkiva. S obzirom da je aktivacija Janus kinaza (*JAK*, engl. Janus kinase) bitna u signalnom putu leptina, upravo se smanjena ekspresija *JAK2* smatra indikatorom leptinske rezistencije na periferiji (61,64). Smanjena ekspresija gena iz obitelji faktora rasta fibroblasta (*FGF*, engl. fibroblast growth factor), uključenih u adipogenezu, uz pojačanu stimulaciju gena iz obitelji mitogenom aktiviranih protein kinaza (*MAPK*, engl. mitogen-activated protein kinase) koji inhibiraju proliferaciju i diferencijaciju adipocita, govori u prilog određenom prirodnom mehanizmu obrane protiv pretilosti (65-67).

Primjer interakcije genetičkih i okolišnih čimbenika vidljiv je u pojavi pretilosti i dijabetesa tipa 2. Sklonost za njihov razvoj povezuje se s varijacijama u genima, kao i u ekspresiji gena *FOXC2*, *MC4R*, *UCP*, adiponektina i *FTO* (58,68,69). No, u pojavnosti spomenutog fenotipa važan utjecaj ima nutritivno stanje majke tijekom trudnoće, te prehrana pojedinca u fetalnom razdoblju i u ranom djetinjstvu, što je bitno za pravilan razvoj hipotalamusa kao regulacijskog centra za energetske ravnoteže (70). Naime, niska porođajna masa i hipotalamička disfunkcija povezuju se s visokom



prevalencijom metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2 i razvojem pretilosti u kasnijem životu (71,72). Osim navedenog, ne treba zanemariti niti prenatalne čimbenike, malu porođajnu masu, te utjecaj prehrane i rasta u djetinjstvu, koji mogu biti odgovorni za predispoziciju prema porastu tjelesne mase i razvoju pretilosti u odrasloj dobi (72).

Nesumnjivo je da okolišni i genetički čimbenici međusobno utječu na pojavu prekomjerne tjelesne mase i pretilosti. Naime, regulacija apetita rezultat je kompleksnih psiholoških mehanizama koji uključuju interakciju mnoštva različitih molekula čije promjene također mogu dovesti do poremećaja prehrane (73-75). U hipotalamusu postoje brojne jezgre koje su uključene u nastanak pretilosti i kontrolu unosa hrane, koje oslobađaju različite molekule i peptide koji utječu na apetit, hranjenje i metabolizam energije. To su prvenstveno proopiomelanokortin (POMC, engl. proopiomelanocortin), alfa-melanocit-stimulirajući hormon (alfa-MSH) i kortikotropin-oslobađajući hormon (CRH, engl. corticotropin releasing hormone). Među tim molekulama važno mjesto zauzima i BDNF (73).

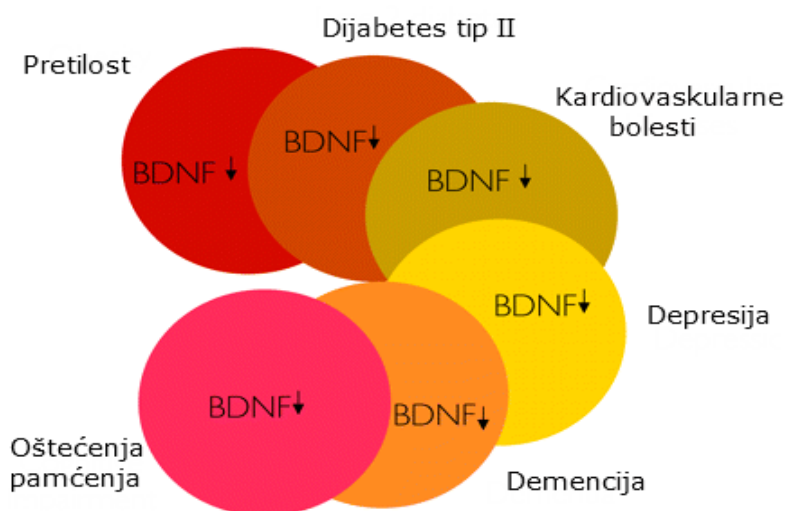
Budući da povećana tjelesna masa ovisi o dobi, te da velik dio pretile predškolska i školske djece ostaju pretila i u odrasloj dobi (12), u ovom smo istraživanju pratili ITM i prekomjernu tjelesnu masu u djece dobi od 6-7 godina. Iako su različiti genetički čimbenici povezani s prekomjernom tjelesnom masom, u ovom smo istraživanju posebnu pažnju usmjerili na protein BDNF, jer je taj protein jedan od ključnih proteina u regulaciji energije, unosa hrane i kontrole tjelesne mase (73).

## **1.2. Moždani neurotrofni čimbenik (BDNF)**

BDNF je neurotrofin iz obitelji čimbenika rasta koji, zajedno s drugim neurotrofinima (NT 3, NT 4/5 i NT 6), ima važnu ulogu u proliferaciji, diferencijaciji, plastičnosti i preživljavanju neurona središnjeg živčanog sustava (76,77).

Sinteza BDNF-a odvija se u nekoliko područja hipotalamusa, uključujući paraventricularnu (PVN, engl. paraventricular nucleus), ventromedijalnu (VMN, engl. ventromedial nucleus) i dorzomedijalnu jezgru (DMN, engl. dorsomedial nucleus) te lateralno hipotalamičko područje (78,79). Također je široko rasprostranjen u hipokampusu, amigdalama, određenim područjima talamusa, uključujući ventralno tegmentalno područje (VTA, engl. ventral tegmental area), ali i u dorzalnom vagalnom kompleksu (DVC, engl. dorsal vagal complex) (80). BDNF je povezan s nekoliko aktivnih molekula u regulaciji energetskeg metabolizma u hipotalamusu. U hipotalamusu leptin aktivira receptore anoreksigenog pro-hormona proopiomelanokortina i to u dvije jezgre, arkuatnoj i ventromedijalnoj. Neuron koji

sadrže proopiomelanokortin se projeciraju u paraventricularnoj i ventromedijalnoj jezgri hipotalamusa. Iz molekule proopiomelanokortina se oslobađaju razni aktivni peptidi i hormoni a među njima i alfa-melanocit-stimulirajući hormon (alfa-MSH), koji se veže na melanokortinski receptor MC4R. Genetičke varijante gena za MC4R su povezane s ITM-om (57). Aktivacija tog receptora u ventromedijalnoj jezgri kontrolira ekspresiju BDNF-a. Leptin i alfa-MSH potiču ekspresiju BDNF-a u ventromedijalnoj jezgri. Nakon toga BDNF utječe na energetski metabolizam na način da se veže za svoj receptor tropomiozin-receptor kinazu B (TrkB) u ventromedijalnoj i paraventricularnoj jezgri. U paraventricularnoj jezgri, BDNF posreduje kod pojačane ekscitabilnosti neurona na način da smanjuje utjecaj glavnog inhibicijskog neurotransmitora, gama-aminomaslačne kiseline (GABA-e, engl. gamma-aminobutyric acid) koja to čini vezanjem za svoje GABA-A receptore, koji inhibiraju živčani prijenos u središnjem živčanom sustavu. Neuronu iz paraventricularne jezgre oslobađaju CRH, koji se otpušta u odgovoru organizma na stres i to je prvi korak u aktivaciji osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Ta os je glavna struktura koje posreduje u odgovorima na stresne podražaje. Utvrđeno je da CRH, kao i BDNF, smanjuje apetit. Pokazano je da su učinci BDNF-a oslabljeni kada se na CRH receptore vežu njihovi antagonisti. Prema tome, čini se da BDNF ostvaruje svoje učinke i putem aktivacije CRH receptora tipa 2. BDNF se eksprimira također i u dorzalnom vagalnom kompleksu gdje regulira energetski metabolizam preko MC4R, dok je u ventralnom tegmentalnom području umiješan u hedonističke aspekte hranjenja (73).



**Slika 3. Oboljenja povezana sa smanjenom koncentracijom BDNF-a**

Modificirano prema: Pedersen BK i sur. Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Exp Physiol.* 2009;94:1153-1160.

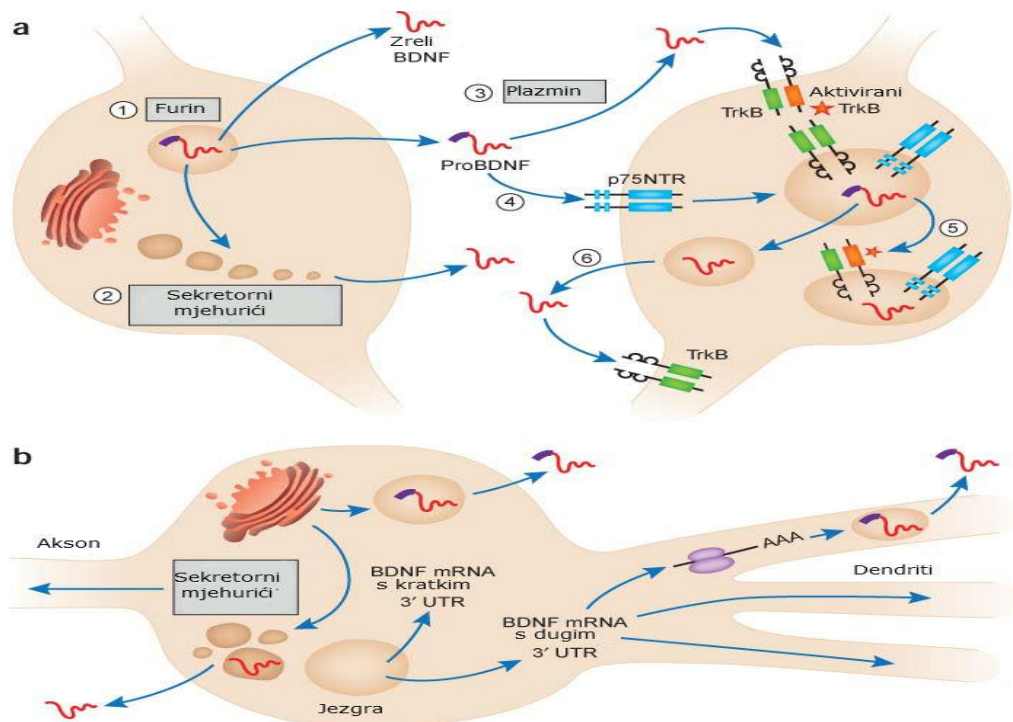
BDNF utječe na neurotransmisiju posredovanu različitim neurotransmitorima kao što su kolinergički, dopaminergički, serotonergički i GABA-ergički neurotransmitterski sustavi, te tako djeluje na brojne

moždane funkcije. Taj protein ima važnu ulogu u regulaciji procesa pamćenja, učenja, raspoloženja i ponašanja, u nadzoru odgovora na stres, ali i procesa koji reguliraju unos hrane i energetske ravnotežu (73-75,81). U skladu s njegovim učincima i njegovom rasprostranjenosti, promjene koncentracije BDNF-a u mozgu, prvenstveno snižena koncentracija BDNF-a, je povezana i s razvojem brojnih neuropsihijatrijskih poremećaja kao što su shizofrenija, depresija, bipolarni afektivni poremećaj, posttraumatski stresni poremećaj, poremećaji hranjenja, te s neurodegenerativnim bolestima, kao što su Alzheimerova, Huntingtonova i Parkinsonova bolest, kognitivnim poremećajima, pojavom psihotičnih simptoma u raznim neuropsihijatrijskim bolestima, ali i endokrinološkim i kardiovaskularnim bolestima i pretilosti (81-86), shematski prikazano u Slici 3.

Ljudski gen *BDNF* smješten je na kromosomu 11p13, sastoji se od 11 egzona i 9 funkcionalnih promotora specifičnih za određenu moždanu regiju i tkivo (87). Ovisno o vrsti promotora pronađeno je mnoštvo različitih transkripta koji kodiraju za zreli protein BDNF, no njihova transkripcija regulirana je neuronskom aktivnošću, odnosno brojnim fiziološkim i patološkim stanjima koji posredno mijenjaju aktivnost neurona (88-90). Još uvijek nije potpuno poznata regulacijska uloga različitih BDNF transkripata. Aktivacijom  $Ca^{+}$  kanala putem svojih receptora na površini neurona glutamat potiče transkripciju gena *BDNF*, dok GABA suprimira ekspresiju gena *BDNF* u mozgu (90,91).

Sama sinteza proteina BDNF polazi iz pro-izoforme, pro-BDNF-a, koji u zreli oblik BDNF-a prelazi bilo ekstracelularno cijepanjem od strane plazmina ili metaloproteinaza, bilo unutar Golgijevog tijela furinom ili prokonvertazama (70,73,92). Kao takav BDNF se u vezikulama transportira do plazmatske membrane gdje se nakon fuzije s njom otpušta u ekstracelularni prostor (92) (Slika 4).

Molekula BDNF-a posjeduje visok afinitet za TrkB (93), receptor prisutan u presinaptičkim i postsinaptičkim dijelovima neurona, putem kojeg BDNF ostvaruje svoju neuroprotektivnu i neurorazvojnu funkciju (94).



**Slika 4. Transkripcija i otpuštanje BDNF oblika unutar neurona**

(a) Mehanizmi nastanka zrelog BDNF-a iz njegove pro-BDNF forme; intracelularno cijepanjem putem furina unutar endoplazmatskog retikuluma (1) ili unutar sekretornih mjehurića od strane prokonvertaza (2), a ekstracelularno posredstvom plazmina (3). Ekstracelularni pro-BDNF može se vezati za receptor p75NTR i pomoću endocitoze te cijepanja unutar endosoma preći u zreli BDNF koji se unutar endosoma veže za receptor TrkB (5) ili se oslobađa nazad u ekstracelularni prostor (6).

(b) Mjesto translacije BDNF-a unutar neurona možda utječe na oblik otpuštenog BDNF-a; BDNF mRNA s kratkim 3' UTR krajevima nakuplja se unutar tijela neurona gdje se pro-BDNF cijepa u svoj zreli oblik unutar Golgijevog tjelešca, dok se BDNF mRNA s duljim 3'UTR krajevima transportira u dendrite kojima nedostaje Golgijev aparat zbog čega se ovdje dominantno otpušta pro-BDNF.

Modificirano prema: Barker PA. Whither proBDNF? *Nature Neurosci.* 2009;12:105-106.

Vežući se za TrkB receptore na obje strane sinapse (95), BDNF dovodi do presinaptičkog oslobađanja ekscitacijskih neurotransmitera (96), ekspresije postsinaptičkih receptora za (R,S)-2-amino-3-(3-hidroksi-5-metilizoksazol-4-il)-propansku kiselinu (AMPA, engl. amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) (97,98), te ima važnu ulogu u održavanju dendritičkih izdanka (99-101).

U animalnim modelima je pokazano da BDNF ima zaštitnu ulogu kod oksidativnog stresa jer sprječava nakupljanje peroksida i povećava razinu antioksidativnih enzima u neuronima hipokampusa (102). Time sprječava gubitak stanične funkcije, apoptozu ili nekrozu stanica uzrokovanih stresom (103,104). Primjerice, stres uzrokovan akutnom imobilizacijom uzrokuje brz porast BDNF-a u hipotalamusu (105,106), što je popraćeno smanjenom tjelesne mase i povećanjem lokomotorne aktivnosti, kao i aktiviranjem osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (105). Znakovito je da lokalna primjena BDNF-a u leđnu moždinu štakora rezultira smanjenjem lipidne peroksidacije 48 sati

nakon aplikacije BDNF-a te se povezuje sa smanjenom količinom aktiviranih mikroglialnih stanica, što vjerojatno pridonosi smanjenju oksidativnog stresa (107). Povećana koncentracija proteina BDNF u hipokampusu je pronađena u odraslih štakora, koji su bili izvrgnuti neonatalnom stresu i to odvajanjem mladunaca štakora iz njihovih kaveza i od majki na 180 min dnevno (108). Pretpostavlja se dolazi do kompenzatorne reakcije na separaciju za vrijeme neonatalnog perioda koja održava neurogenezu u odraslih štakora (108).

Oksidativni stres je prisutan i rano u patogenezi Alzheimerove bolesti (109,110). No, nadoknada vitamina E, poznatog antioksidansa, sprječava razvoj oksidativnog stresa, ublažava navedeno smanjenje razine BDNF-a, upućujući da se razina BDNF-a mijenja u odgovoru na oksidativni stres (111). U regijama mozga gdje je prisutan gubitak neurona, kao što je slučaj u Huntingtonovoj i Alzheimerovoj bolesti (82,112), prisutne su niske koncentracije BDNF-a, što pridonosi degeneraciji neurona povezanoj s tim bolestima (112). Međutim, uloga BDNF-a nije uvijek zaštitna, s obzirom da se pro-BDNF može vezati i za p75<sup>NTR</sup> receptore (iako smanjenim afinitetom), čijom aktivacijom može pridonjeti apoptozi neurona (113,114). Dakle, iz pro-BDNF-a može nastati zreli BDNF koji djeluje putem vezanja za TrkB receptore i ima zaštitni učinak na neurone, no pro-BDNF oblik ima i svoj potpuno suprotan, neovisni biološki učinak jer kad se veže za p75<sup>NTR</sup> neurotrofinski receptor, član superporodice čimbenika nekroze tumora (TNF, engl. tumor necrosis factor), dovodi do apoptoze neurona te do dugotrajne depresije (LTD, engl. long-term depression) (70).

### **1.2.1. Centralno djelovanje BDNF-a**

Iako široko rasprostranjen u moždanom tkivu, smatra se kako je primarno mjesto sinteze i djelovanja BDNF-a ventromedijalna jezgra hipotalamusa (70), gdje su pronađene visoke koncentracije BDNF-a i veći broj TrkB receptora (115). Neuroni iz ventromedijalne jezgre projiciraju se u mnoga područja povezana s ponašanjem pri hranjenju, uključujući amigdalnu (116,117), arkuatnu regiju (118), lateralni hipotalamus (LH, engl. lateral hypothalamus) (119), paraventrikularnu (120), dorzomedijalnu (121,122) jezgru, kao i područja koja nadziru različite aspekte ponašanja nagrađivanja hranjenjem, uključujući ventralno tegmentalno područje (73,123) i jezgre solitarnog trakta (116). Ventromedijalna jezgra prima informacije iz arkuatne regije (124,125), lateralnog hipotalamusa (117,126) i amigdale (127,128), te je također uključena u kontrolu autonomnih odgovora koji stvaranjem osjećaja sitosti pridonose prevenciji pretilosti (123,129).

Animalni modelu pokazuju da su lezije tog područja povezane s pojavom hiperfagije u eksperimentalnih životinja (130). Primjer za to su životinjski modeli heterozigotni za steroidogeni faktor-1 (SF-1, engl. steroidogenic factor-1), koji se, osim što sudjeluje u sintezi BDNF-a, ispoljava paralelno s njime, te ima važnu ulogu u kasnijem razvoju ventromedijalne jezgre (131,132). Posljedična smanjena razina SF-1 povezana je sa smanjenom razinom BDNF-a, što rezultira povećanjem tjelesne mase, hiperfagijom i nižim dnevnim bazalnim metabolizmom u tih životinja (133).

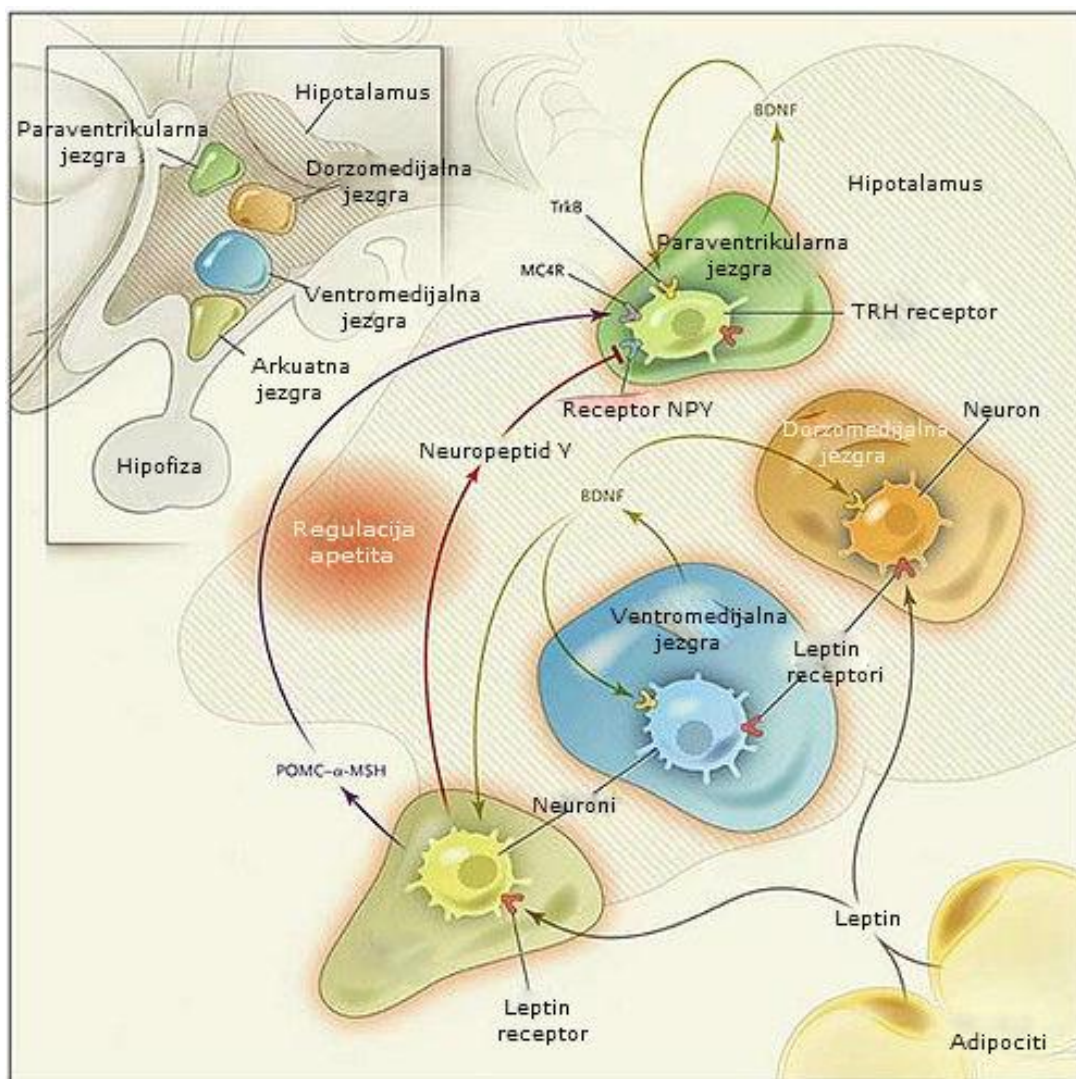
Količina otpuštenog zrelog oblika proteina BDNF iz neuronskih stanica ovisi o plazmatskim razinama glukoze, masnih kiselina, bjelančevina, inzulina i leptina. Sukladno tome, BDNF heterozigotni miševi pokazuju abnormalnost serotoninskih (5-HT) neurona frontalnog korteksa, hipotalamusa i hipokampusu, što, smanjujući razinu BDNF-a, dovodi do serotoninske disfunkcije i posljedično poremećene regulacije osjećaja sitosti s razvojem hiperfagije i pretilosti u miševa (115,134,135). Ove životinje, koje su genetičkom manipulacijom stvorene kao BDNF heterozigoti, također razvijaju otpornost na leptin, te imaju izrazito visoku koncentraciju inzulina u plazmi (136). Ti rezultati potvrđuju pretpostavku o silaznoj regulacijskoj ulozi BDNF-a na unos hrane putem leptin-proopiomelanokortinskog signalnog puta (137). Naprotiv, povećana ekspresija gena *BDNF* u hipotalamusu kod animalnih modela povezana je s povećanom proizvodnjom toplinske energije, ubrzanom respiracijom i povećanim bazalnim metabolizmom, što dovodi i do povećane ekspresije TrkB receptora, receptora za inulin, povećanih koncentracija CRH, kao i tireotropin-oslobađajućeg hormona (TRH, engl. thyrotropin releasing hormon) (138,139). Posljedično se povećava sekrecija hormona adiponektina u masnom tkivu (139), a to sve dovodi do povećane oksidacije masnih kiselina, poboljšanog metabolizma glukoze i gubitka tjelesne mase (140).

Sama ekspresija BDNF-a u ventromedijalnoj jezgri, osim stanjem uhranjenosti, kontrolirana je i putem MC4R. Naime, životinje kojima nedostaje taj receptor ili su heterozigoti za MC4R postaju pretile (141), dok infuzija MC4R agonista smanjuje unos hrane i tjelesnu masu u štakora tretiranih prehranom s visokim postotkom masti (142). Aktivacija MC4R dovodi do akutnog povećanja koncentracije BDNF-a u hipotalamusu, što, osim utjecaja na apetit i tjelesnu temperaturu u životinja (143), izaziva povećanu fizičku aktivnost i ubranu respiraciju, i na taj način doprinosi povećanju termogeneze i stimulira metabolizam masnoća (73,123). Time se ujedno objašnjava i povećani gubitak masnog tkiva nakon primjene BDNF-a (73,123). S druge strane, intracerebroventrikularna aplikacija BDNF-a u hipotalamus životinja povećava ekspresiju MC4R (139), upućujući na to kako je

ekspresija BDNF-a u ventromedijalnoj jezgri kontrolirana MC4R signalizacijom te da MC4R putem BDNF-a regulira energetske ravnoteže (70).

Uzlazno od MC4R, leptin, adipokin koji se stvara i otpušta iz masnog tkiva, signalizacijom putem svojih leptinskih LepRb receptora u središnjem živčanom sustavu inhibira unos hrane i povećava potrošnju energije, te na taj način sprječava pojavu pretilosti (144). Također, u određenim područjima mozga štakora leptin povećava koncentraciju BDNF-a, uključujući dorzalni vagalni kompleks (80) i ventromedijalnu i dorzomedijalnu jezgru (139, 144), što rezultira smanjenim unosom hrane (73,80,144-146). Navedeni učinci BDNF-a u animalnim modelima mogu se objasniti time da leptin povećava ekspresiju BDNF-a putem melanokortinskih puteva ili putem leptinskih receptora te na taj način regulira uzimanje hrane i ravnotežu energije (144). Pretili fenotip mogao bi biti uzrokovan nedostatkom funkcionalnih leptinskih receptora ili pak nemogućnošću leptina da u hipotalamusu poveća ekspresiju BDNF-a (144). U skladu s time su i rezultati (147) napravljene na animalnim modelima u kojih, zbog nedostatka leptina ili njegovih nefunkcionalnih receptora, dolazi do razvoja pretilosti i hiperfagije, dok intracerebroventrikularna ili periferna infuzija leptina izaziva povećanu ekspresiju BDNF-a u ventromedijalnoj jezgri, te smanjeni apetit i gubitak tjelesne mase (148,149).

Međutim, BDNF također i smanjuje proizvodnju leptina u adipocitima djelujući putem  $\beta$ -adrenergičkih receptora i osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda u životinja (138). U eksperimentalnih životinja je pokazano da snižena razina leptina zajedno s hipoglikemijom i hipoinzulinemijom uzrokovanom gladovanjem u NPY/AgRP (engl. neuropeptide Y/agouti-related peptide) neuronima arkuatnog nukleusa (ARC) potiče ekspresiju neuropeptida Y, jednog od najpotentnijih kontraregulatornih neuropeptida koji putem svojih receptora u ventromedijalnoj jezgri potiskuje anoreksigeni učinak smanjujući ekspresiju BDNF-a (150,151) (Slika 5). Navedene suprotne učinke BDNF-a i neuropeptida Y potvrđuju studije na štakorima gdje primjena BDNF-a, djelovanjem preko TrkB receptora, inhibira pojačani apetit i porast tjelesne mase induciran djelovanjem neuropeptida Y (145), dok primjena neuropeptida Y smanjuje hipotalamičku produkciju BDNF-a (152).



**Slika 5. Hipotalamička regulacija apetita putem BDNF-a.**

Modificirano prema: Froguel P i sur. The Power of the Extreme in Elucidating Obesity. N Engl J Med. 2008; 359:891-893.

Visoke koncentracije BDNF-a, kao i njegovih TrkB receptora, nalaze se i u paraventrikularnoj jezgri hipotalamusa, gdje BDNF u interakciji s neuropeptidom Y također regulira unos hrane i potrošnju energije (153). Rezultati istraživanja na animalnim modelima upućuju da je paraventrikularna jezgra uključena i u odgovor na stres, uslijed čega dolazi do povećane ekspresije BDNF-a (105), koji tada putem TrkB receptora smanjuje ekspresiju inhibicijskih GABA receptora na sinapsama te time pojačava aktivaciju neurona paraventrikularne jezgre (73,154,155). Djelovanja BDNF-a u ovoj regiji hipotalamusa pokazana su brojnim istraživanjima na animalnim modelima. Primjerice, injekcije BDNF-a u paraventrikularnu jezgru štakora dovode do povećanja potrošnje energije, uglavnom na račun povećanog bazalnog metabolizma i termogeneze (153), a u arkuatnoj jezgri smanjuju ekspresiju neuropeptida Y (153). Također dolazi do normalizacije hiperglikemije, hiperlipidemije,



hiperinzulinemije i hiperleptinemije izazvanih prehranom s visokim postotkom masti, i ti rezultati upućuju kako BDNF u paraventricularnoj jezgri smanjuje učinke metaboličkog sindroma i pridruženu otpornost na inzulin i leptin (156). Kronična primjena BDNF-a u paraventricularnu jezgru smanjuje pretilost induciranu prehranom s visokim postotkom masnoća, a životinje s većom količinom masnih naslaga osjetljivije su na učinak primijenjenog BDNF-a (156). Kontinuirana infuzija BDNF-a u paraventricularnu jezgru hipotalamusa u eksperimentalnih životinja povećava razinu CRH i neuropeptida urokortina (UCN, engl. urocortin), koji smanjuju apetit te povećavaju potrošnju energije, povećavajući lokomotornu aktivnost i tjelesnu temperaturu. To u konačnici izaziva lipolizu, anoreksiju i gubitak tjelesne mase u raznih eksperimentalnih životinja (105,157-160). BDNF, povećavajući razinu CRH u hipotalamusu te modificira aktivnost osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, i taj je proces povezan s aktivacijom  $\beta$ -adrenergičkih receptora (138). Svi ti nalazi upućuju da BDNF djeluje na navedene metaboličke promjene i putem simpatičkog živčanog sustava (138).

Paraventricularna jezgra je regija u kojoj se sintetizira i oslobađa TRH, hormon koji ima bitnu ulogu u kontroli energetske ravnoteže (161). Naime, TRH utječe u adenohipofizi na tireotropin stimulirajući hormon koji potiče oslobađanje tireotropnih hormona štitne žlijezde (trijodtironina ili T3 i tiroksina ili T4). Trijodtironin djeluje suprotno od BDNF-a jer aktivacijom neurona u ventromedijalnoj jezgri smanjuje ekspresiju receptora za leptin, proopiomelanokortin, TRH, i AgRP (162,163), te na taj način stimulira unos hrane neovisno o potrošnji energije (164).

Iako je dobro poznata važnost hipotalamičkih regija u regulaciji apetita i unosa hrane, značajne uloge imaju dorzalni vagalni kompleks i područja autonomne integracije kontrole unosa hrane moždanog debla (80) uključene u prikupljanje signala sitosti proizašlih iz perifernih masnih naslaga (74). U ovom području BDNF također djeluje kao anorektički čimbenik, a ta je njegova uloga potvrđena i lokalnom intraparenhimalnom infuzijom BDNF-a u životinja (80). Isti učinak izazvalo je i periferno ubrizgavanje leptina i holecistokinina, koje povećava razinu BDNF-a u dorzalnom vagalnom kompleksu 48 sati nakon gladovanja (80). Pri tome se količina BDNF-a u dorzalnom vagalnom kompleksu smanjuje, a nakon hranjenja se, sukladno navedenom, ponovo povećava. Međutim, 14-dnevna infuzija smanjuje spomenuti anorektički učinak BDNF-a, upućujući na određeni oblik supstitucije ili desenzitizacije na primjenu BDNF-a (73,123).

Iako je hipokampalno područje mozga prvenstveno odgovorno za procese učenja i pamćenja, novija istraživanja upućuju kako hipokampus također sudjeluje u regulaciji energetske ravnoteže. U pretilih

ljudi je funkcionalna magnetska rezonancija (fMRI) identificirala hipokampus i prefrontalni korteks kao mjesta najveće aktivacije (166).

Pokusi na animalnim modelima su potvrdili tu ulogu hipokampusa. Naime, štakori s kompletnom lezijom hipokampusa (165) pokazala je povećan unos hrane, povećanje apetita i tjelesne mase te povećanu metaboličku aktivnost kod takvih životinja. U skladu s time, prehrana s visokim postotkom masti i/ili s visokim postotkom šećera u životinjskih modela uzrokuje disfunkciju hipokampalnih neurona, što smanjuje koncentraciju BDNF-a u toj regiji i rezultira poremećenim ponašanjem hranjenja u vidu prejedanja. Time se dodatno smanjuje koncentracija BDNF-a u hipokampusu, koja rezultira inhibicijom pamćenja, pa se proces nastavlja u krug (167). Još je nekoliko studija utvrdilo povezanost između prehrane s povećanim udjelom masti i oštećenja kognitivnih sposobnosti (168-171). Tg2576 miševi, inače naširoko korišteni kao modeli za Alzheimerovu bolest, zbog ranog razvijanja amiloidnih plakova i posljedičnog kognitivnog deficita, razvijaju pretilost i inzulinsku otpornost kao posljedicu hiperfagije hrane s povećanim udjelom masnoća (172,173). Upravo to abnormalno ponašanje pri hranjenju povezuje se s povećanim formiranjem amiloidnih plakova, smanjenom koncentracijom BDNF-a u hipotalamusu te s kognitivnim oštećenjem kao rezultatom apoptoze neurona hipotalamusa (174).

Vrsta hrane također utječe na koncentraciju BDNF-a u hipokampusu. Naime i vrsta šećera u hrani je važna, jer prehrana s visokim postotkom masti u kombinaciji sa saharozom nema utjecaja na hipokampalnu koncentraciju BDNF-a, dok kombinacija prehrane s visokim postotkom masti i dekstroze dovodi do smanjenih vrijednosti BDNF-a u hipokampusu u štakora (175). Unatoč spomenutoj razlici u koncentraciji BDNF-a u te dvije skupine štakora, prirast tjelesne mase bio je podjednak, što upućuje kako razlika u koncentraciji BDNF-a u hipokampusu nije izravno povezana s tjelesnom masom (175). Koja je točna uloga BDNF-a u hipokampusu u energetske metabolizmu još uvijek nejasna, moguće je da BDNF ima ulogu u pamćenju vrste hrane koju životinja preferira, te na taj način utječe na motivaciju za hranjenjem (176).

Osim u hipokampusu, vrsta prehrane također utječe i na koncentraciju BDNF-a u ventralnom tegmentalnom području, te se smatra kako je unutar mezolimbickog dopaminskog sustava BDNF uključen u regulaciju hranjenja kao hedonističke nagrade (177). Naime, miševi s lokalno specifičnom deplecijom BDNF-a u ventralnom tegmentalnom području, kojima je na izbor ponuđena standardna hrana i hrana s visokim udjelom masnoća, razvijaju hiperfagiju, jer se isključivo hrane hranom s

visokim udjelom masnoća (177). Vjerojatno je da BDNF u ventralnom tegmentalnom području djeluje na hedonističke procese, do kojih dovodi konzumacija ukusne hrane s visokim udjelom masnoća (70).

### **1.2.2. Periferno djelovanje BDNF-a**

Uz centralna djelovanja BDNF-a i njegovu zastupljenost u moždanom tkivu, BDNF se nalazi i u bronhalnom epitelu, glatkom mišićju dišnih puteva, tkivu jajnika, kao i u tkivima važnim za regulaciju energetske ravnoteže, smeđem masnom tkivu, jetri i skeletnim mišićima (178,179). Kako se smatra da zreli BDNF ne prelazi intaktnu krvno-moždanu barijeru (180), nego se to može omogućiti samo preko određenih nosača (181), studije koje izvještavaju o fiziološkim učincima potkožne injekcije BDNF-a upućuju na pretpostavku o njegovim perifernim djelovanjima (178,182). Tako u glodavaca s dijabetesom potkožno primijenjen BDNF obnavlja koncentraciju inzulina u  $\beta$  stanicama gušterače, iako iste ne posjeduju TrkB receptore. Također, dovodeći do pojačane fosforilacije acetil-koenzim A karboksilaze  $\beta$  i oksidacije masnih kiselina, povećava se osjetljivost na inzulin, poboljšava iskorištavanje glukoze u mišićnom i smeđem masnom tkivu, čime dolazi do normalizacije razine šećera u krvi (183-185). Svi ti učinci dovode do smanjenja masnih naslaga i težine jetre te posljedično do gubitka tjelesne mase u životinja (186). Međutim, navedene promjene nisu zabilježene u životinja s normoglikemijom (186). Ipak, spomenuti periferni učinak BDNF-a svakako treba uzeti u obzir kao doprinos ukupnoj regulaciji energetske ravnoteže.

### **1.2.3. BDNF i regulacija apetita**

Osim svoje rasprostranjenosti u regijama mozga odgovornim za energetske ravnotežu, u reguliranju energetske ravnoteže BDNF djeluje u interakciji s nekoliko drugih neuropeptida uključujući melanokortin (73,137,187), leptin (73,145,146,188-190), CRH (73, 139,191,192), kao i TRH (162,193). Na eksperimentalnim životinjama napravljena su istraživanja BDNF-a i praćena je njegova uloga u regulaciji unosa hrane. Tako je pronađeno (194) kako kronična intracerebroventrikularna infuzija BDNF-a u štakora dovodi do smanjenog dobitka na tjelesnoj masi. Također, genetički modificirani miševi, BDNF<sup>+/-</sup> heterozigoti, s posljedično 50% sniženom razinom hipotalamičke ekspresije gena BDNF, razvijaju pojačanu agresivnost, te kroničnu hiperfagiju praćenu značajnim dobitkom na tjelesnoj masi već u ranoj odrasloj dobi (134,195). Infuzija BDNF-a u BDNF heterozigotnih miševa povećane tjelesne mase s razvijenom hipertrofijom masnog tkiva i razvijenim prehrambenim

poremećajima dovela je do kratkotrajnog poboljšanja u vidu regulacije apetita i posljedičnog smanjenja pretilosti (136).

U ljudi takav primjer BDNF haploinsuficijencije postoji u pojedinaca s WAGR sindromom (Wilms tumor, aniridija, anomalije genitourinarnog trakta, intelektualne poteškoće), rijetkim poremećajem karakteriziranim heterozigotnom delecijom barem dvaju gena smještenih u neposrednoj blizini gena *BDNF* u 11p13 regiji, a ponekad i uz postojanje heterozigotne delecije gena *BDNF*. Studija provedena na 33 ispitanika s WAGR sindromom (196), i to prema CDC kriterijima iz 2000. godine za procjenu uhranjenosti, pokazala je kako su svi BDNF heterozigotni ispitanici bili pretili već do navršениh 10 godina starosti, što je u velikoj većini slučajeva bio rezultat hiperfagije (196). Sličan nalaz je primijećen u nekoliko izoliranih slučajeva koji opisuju hiperfagiju s pretiulošću visokog stupnja u djeteta s mutacijom TrkB receptora (197), te u dvoje djece s *BDNF* haploinsuficijencijom, koja je nastala kao rezultat kromosomskog poremećaja (198,199).

Nedavno istraživanje (200), provedenog u miševa i ljudi, dovodi u uzročno-posljedičnu vezu haploinsuficijenciju *RAI1* (engl. retinoic acid-induced 1) gena s gubitkom osjećaja sitosti i posljedičnom hiperfagijom. Kao posljedica navedene *RAI1* haploinsuficijencije dolazi do promjena u silaznim signalnim putevima, među kojima se nalazi i BDNF, a to se povezuje s pojavom Smith-Magenis sindroma, razvojnog poremećaja karakteriziranog visokom incidencijom dječje pretilosti (201).

#### **1.2.4. BDNF i tjelesna masa**

Dosadašnja istraživanja navode kako u hranidbenim postupcima i regulaciji tjelesne mase, uz okolišne, kulturološke i socioekonomske faktore, genetička komponenta ima značajnu ulogu (202,203). Smatra se kako genetičke promjene *BDNF*-a, kao jednog od gena koji putem centralnih mehanizama smanjuje apetit i tjelesnu masu, pridonose podložnosti za razvoj poremećaja u prehrani koji se pokazuju u povećanoj tjelesnoj masi, povećanim ITM-om, te razvojem pretilosti prilikom ekcesivnog unosa hrane, ili razvojem anoreksije (AN) ili bulimije (BN), kao rezultatom smanjenog unosa hrane (18,204).

Sudjelovanje BDNF-a u energetskej ravnoteži u ljudi teško je proučavati jer su studije većinom ograničene na korelaciju između serumske/plazmatske razine BDNF-a i ITM-a. Unatoč dokazima o povezanosti serumskih razina BDNF-a i ITM-a, njihov odnos još uvijek je nejasan s obzirom na

oprečne rezultate dosadašnjih istraživanja. Naime, iako neke studije govore o negativnoj korelaciji serumskih i/ili plazmatskih vrijednosti BDNF-a i pretilosti ili količine masnog tkiva (199,205-208), niže serumske razine BDNF-a pronađene su i u djevojaka oboljelih od anoreksije ili bulimije (204,209-211), kao i u oboljelih od šećerne bolesti tipa 2 neovisno o stanju uhranjenosti (205,212). Razlog tim oprečnim rezultatima vjerojatno je u dodatnim čimbenicima koji također utječu na serumsku koncentraciju BDNF-a, kao što su primjerice dob, spol, životno okruženje, te loše životne navike kao što su ovisnost o alkoholu i nikotinu (213). S obzirom na istraživanja u kojima se navodi kako serumska razina BDNF-a odražava količinu BDNF-a pohranjenog u trombocitima, a ispuštenog tijekom procesa zgrušavanja (214,215), moguće je da se i bolesti hematopoetskog sustava mogu utjecati na razinu serumskog BDNF-a. Plazmatski BDNF vjerojatno ima mnogo izvora, kao što su stanice imunološkog sustava i endotelne stanice (216-219). Njegove više vrijednosti zabilježene su u pretilih žena, s time da mu razina znatno opada nakon operacije ugradnje želučane prenosnice (220). Međutim, postoji i studija (221) koja navodi negativnu povezanost plazmatskih vrijednosti BDNF-a i ITM-a, dok druga studija (215) nije utvrdila korelaciju između BDNF-a u plazmi i ITM-a u ispitanika s poremećajima prehrane. Postoje i rezultati (205) koji su pokazali pad razine BDNF-a u plazmi pojedinaca oboljelih od dijabetesa tip 2 neovisno o pretilosti, a također je utvrđeno kako se moždana koncentracija BDNF-a reflektira u cirkulaciji. Naime, plazmatske razine BDNF-a su obrnuto proporcionalne postprandijalnoj razini glukoze u plazmi, te se pri povišenim vrijednostima glukoze u krvi blokira otpuštanje BDNF-a iz mozga (205).

### **1.2.5. Gen *BDNF***

Ljudski gen *BDNF* sadrži ukupno 11 egzona koji rezultiraju s 34 moguća mRNA transkripata (222), a svaki od njih je organo-specifičan jer se različito ispoljava u različitim dijelovima mozga i perifernim tkivima (223). Okolišni čimbenici, kao što je stres, mogu promijeniti ekspresiju mRNA transkripata i rezultirati izmijenjenim omjerom između pro-BDNF-a i ukupnog BDNF-a (224), međutim točna uloga svakog od tih pojedinih transkripata još uvijek je nepoznata. Različite genetičke varijante svojim djelovanjem na biosintezu i/ili post-translacijsku obradu pro-BDNF-a mijenjaju aktivnost ili raspoloživost zrelog BDNF-a (92). Do sada, od 24 poznatih SNP-ova gena *BDNF*, tri SNP-a pokazala su se funkcijski i klinički relevantnim (70,225). Najčešće istraživani polimorfizam je Val66Met, kojeg karakterizira supstitucija aminokiseline valin (Val) metioninom (Met). Taj polimorfizam (rs6265 ili Val66Met ili G196A) se u svjetskoj populaciji javlja u heterozigotnom obliku s prevalencijom 20-30%, dok je prevalencija homozigotnog Met/Met oblika u korejskoj populaciji 24%, a u hrvatskoj populaciji 4% (226). Iako taj polimorfizam ne utječe na funkciju zrelog proteina BDNF, on utječe na razinu

raspoloživog zrelog BDNF-a i to na način da se Met oblik povezuje sa značajno smanjenom raspoloživošću proteina BDNF (227,228). Kao posljedica smanjene raspoloživosti zrelog BDNF-a dolazi do oštećenja i atrofije hipotalamičkih i hipokampalnih neurona, a to rezultira sa smanjenom aktivnošću tih neurona, što dodatno smanjuje koncentraciju BDNF-a u tim regijama mozga (123). Sukladno tome, u literaturi se spominju brojni podaci o povezanosti *BDNF* Val66Met polimorfizma s neuropsihijatrijskim poremećajima uzrokovanim patološkim promjenama u hipotalamusu i hipokampusu, kao što su primjerice Alzheimerova i Parkinsonova bolest, shizofrenija, moždani udar, poremećaji ponašanja, depresija, bipolarni kao i opsesivno-kompulzivni poremećaji, alkoholizam, zlouporaba sredstava ovisnosti, promjena osobnosti povezana s anksioznošću i posttraumatski stresni poremećaj (83,229-236), kao i poremećaji učenja i pamćenja (226,227). Osim toga, postoje podaci koji upućuju na povezanost BDNF Met alela i posljedično smanjene količine raspoloživog BDNF-a s poremećajima prehrane (83,237), posebice anoreksijom restriktivnog tipa i s niskim ITM-om (190,238). No, zabilježena je i povezanost *BDNF* Met alela s prekomjernom tjelesnom masom kao i s kompulzivnim prejedanjem u djevojaka (239,240). Naime, nositeljice Met alela oboljele od bulimije ili poremećaja kompulzivnog prejedanja razvijaju teži oblik poremećaja karakteriziran učestalijim i količinski obilnijim epizodama prejedanja, a također su sklonije većem riziku pojavnosti poremećaja kompulzivnog prejedanja, ovisno o drastičnosti restrikcije unosa hrane.

Do sličnih rezultata dovela su i istraživanja na animalnim modelima u kojih redukcija unosa hrane, koja izaziva sniženje razine BDNF-a, potencira hiperfagiju i pretilost (137), a isti rezultat dobiven je i u miševa s izbačenim genom *BDNF* (*BDNF* knockout miševi) ili u miševa s jednim funkcionalnim alelom *BDNF*-a (136,141,241).

Neke studije u ljudi nisu utvrdile povezanost *BDNF* Val66Met polimorfizma s poremećajima prehrane (198,242). Međutim, meta-analiza koja je uključivala 39 studija (78) i koja je usporedile ispitanike s poremećaje hranjenja s kontrolnim zdravim ispitanicima je pokazala da je *BDNF* Val66Met polimorfizam povezan s 33% povećanim rizikom za razvoj poremećaja hranjenja, što je potvrđeno i u kasnijim istraživanjima (240).

#### **1.2.6. Utjecaj različitih čimbenika na BDNF**

Dosadašnji oprečni rezultati istraživanja upućuju na mogućnost postojanja niza čimbenika koji mogu utjecati na ekspresiju gena *BDNF* i koncentraciju BDNF-a, kao što su dob, spol, mutacija *TrkB* receptora ili neke druge komponente duž njegovog silaznog signalnog puta djelovanja, pridružene

neuropsihijatrijske bolesti i ostala oboljenja, kulturološki i socioekonomski čimbenici. Radi toga je važno istraživati povezanost *BDNF* Val66Met s određenim fenotipom na usko definiranoj skupini ispitanika (243). Pokazano je da postoje etničke razlike u distribuciji genotipova *BDNF* Val66Met, budući da je genotip Val/Met najučestaliji kod azijske populacije (45,9%), dok genotip Val/Val dominira kod bijele rase (64,2%) (226). Također, etničke kao i međupopulacijske razlike u *BDNF* Val66Met povezane su s različitim ITM-om, prehrambenim i sportskim navikama, pretilošću, pušenjem te različitim osobinama ličnosti (226,244). Postoje oprečni podatci u literaturi o povezanosti *BDNF* Val66Met i ITM-e, pa je tako na zdravoj djeci bijele populacije genotip Met/Met povezan s povećanim ITM-om (243), dok je kod zdravih pripadnika bijele rase genotip Met/Met povezan s nižim ITM-om (245).

Poznato je da je hipokampus osjetljiv na starenje, te da s porastom dobi, uz smanjenje volumena, dolazi i do morfoloških promjena koje rezultiraju različitom količinom BDNF-a i TrkB receptora u mozgu ovisno o dobi (246). Tako je u ljudi zabilježena niska koncentracija BDNF mRNA u moždanom tkivu tijekom djetinjstva, najviše koncentracije su zabilježene u ranoj odrasloj dobi, nakon čega opadaju do određene konstantne koncentracije tijekom odrasle dobi (247).

Ti rezultati dobiveni u ljudi su u skladu s istraživanjima na animalnim modelima u kojih zreli oblik BDNF-a u hipotalamusu postiže najvišu koncentraciju oko tjedan dana nakon rođenja, ostaje povišen tijekom prvog mjeseca života, a potom s dobi opada do određene konstantne koncentracije (246,248). Kod štakora je pokazano da količina TrkB receptora počinje opadati u mladih štakora starih 2 mjeseca, a ekstremno smanjenje javlja se u starijih štakora u dobi od 22 mjeseca starosti (248).

Spomenuti podatak o promjenama razine BDNF-a ovisno o dobi može upućivati na mogućnost da različiti genetički, a i okolišni čimbenici mogu izazvati različite posljedice i psihofizičke promjene ovisno o vremenskom razdoblju njihova djelovanja na ljudski organizam (246,247). U skladu s time su i studije koje pokazuju da Met alel može imati i protektivnu ulogu, ovisno o stupnju psihofizičkog razvoja, tj. ovisno o dobi, u trenutku izloženosti različitim negativnim okolišnim čimbenicima, kao što su stres izazvan odvojenošću od majke, ili kod napuštene djece i to ovisno o dobi kada su udomljena (83,227,246,247,249). Naime, s obzirom da Met alel, kao i izloženost stresnim situacijama, dodatno smanjuje ionako nižu hipokampalnu ekspresiju gena *BDNF* u ranoj životnoj dobi, istodobno pojačavajući vulnerabilnost na stres, njegova prisutnost povezuje se sa smanjenim volumenom hipokampalne regije (252), te se smatra rizičnim čimbenikom za pojavu funkcionalnog oštećenja mozga, ali i za razvoj psihijatrijskih poremećaja uzrokovanih stresom, a povezanih sa spomenutim

smanjenim volumenom hipokampalne regije (depresija, shizofrenija, anksioznost, posttraumatski stresni poremećaj) (234,235,247,250,251). Naprotiv, u adolescenciji, razdoblju s najvišom razinom ekspresije BDNF-a (246, 83), Met alel, upravo zbog posljedične smanjene ekspresije gena *BDNF*, djeluje protektivno na razvoj psihijatrijskih poremećaja izazvanih stresnim događajima (bipolarni poremećaji, zlouporaba sredstava ovisnosti) koji su ujedno povezani s pojačanom ekspresijom gena *BDNF* u području amigdala (povećani volumen) (83,229,232,247,253). Promjene u povezanosti gena i ITM-a s dobi pokazane su i u istraživanju Elks-a i sur. (52) gdje je utvrđen bifazični uzorak povezanosti ITM-a i gena vezanih uz pretilost u Britanskoj populaciji. Navedena povezanost se povećava tijekom djetinjstva i adolescencije, postiže maksimum u 20-im godinama, a potom se smanjuje tijekom daljnjeg života.

Utjecaj okolišnih čimbenika i dobi na ekspresiju gena *BDNF* potkrepljuju i studije na miševima smještenim u pozitivnom odnosno obogaćenom okruženju (veliki otvoreni prostor, igračke i kotači za trčanje), u kojih je zabilježena povećana ekspresija gena *BDNF*, bolja sposobnost učenja i pamćenja, kao i povećana neurogeneza, u odnosu na životinje iste starosti smještene unutar standardnog okruženja (138,255). Utjecaj fizičke aktivnosti na razinu BDNF-a također je različit ovisno o dobi. Naime, za razliku od mladunaca, starije životinje pokazuju veći relativni porast zrelog BDNF-a unatoč manjoj fizičkoj aktivnosti (256).

I u ljudi je potvrđena (257) protektivna uloga fizičke aktivnosti za razvoj depresije u adolescentnih djevojaka koje su bile nositeljice Met alela. Stoga je očita mogućnost da se pozitivnim okolišnim čimbenicima poništi utjecaj dobi na pad koncentracije BDNF-a, ali i da se utječe na genetički predisponirane psihofizičke poremećaje intervencijama usmjerenim na promjenu ponašanja i okolišnih čimbenika u određenoj životnoj dobi (138,247,257).

Uz polimorfizam, na ekspresiju gena *BDNF*-a također utječu i epigenetske modifikacije koje rezultiraju promjenom transkripcije gena uzrokovane vanjskim utjecajima, naročito u ranoj životnoj dobi, a koje dovode do trajnih promjena koje se reflektiraju na čitav psihofizički razvoj pojedinca (258,259). Istraživanja na štakorima pokazuju da su perinatalno i rano postnatalno razdoblje najosjetljivije za razvoj spomenutih modifikacija, što dovodi do promjena u funkciji odraslog mozga i do promjena u ponašanju (260-262).

Postoje brojni primjeri na animalnim modelima o utjecaju stresa, kao i pothranjenosti majke u perinatalnom razdoblju, na izmjenjenu ekspresiju gena *BDNF*, što rezultira promjenama u moždanom



sazrijevanju i u funkcijama koje su posredovane BDNF-om u kasnijoj dobi(260,262). Sve te promjene dovode do razvoja ponašanja sličnog anksioznom, koje se povezuje s hiperfagijom (260,262). S druge strane, izloženost stresu (nepovoljno okruženje ili odvajanje mladunaca od majke) u ranom postnatalnom razdoblju smanjuje ekspresiju BDNF-a u moždanom tkivu hipermetilacijom bitne regulatorne regije na genu (263-268), dok pozitivni okolišni čimbenici acetilacijom histona na genu *BDNF* dovode do njegove pojačane ekspresije, što se povezuje s povećanom neurogenezom, većom sposobnosti učenja i pamćenja, boljim socijalnim kontaktima u odrasloj dobi i mršavijim fenotipom (138,255,269,270).

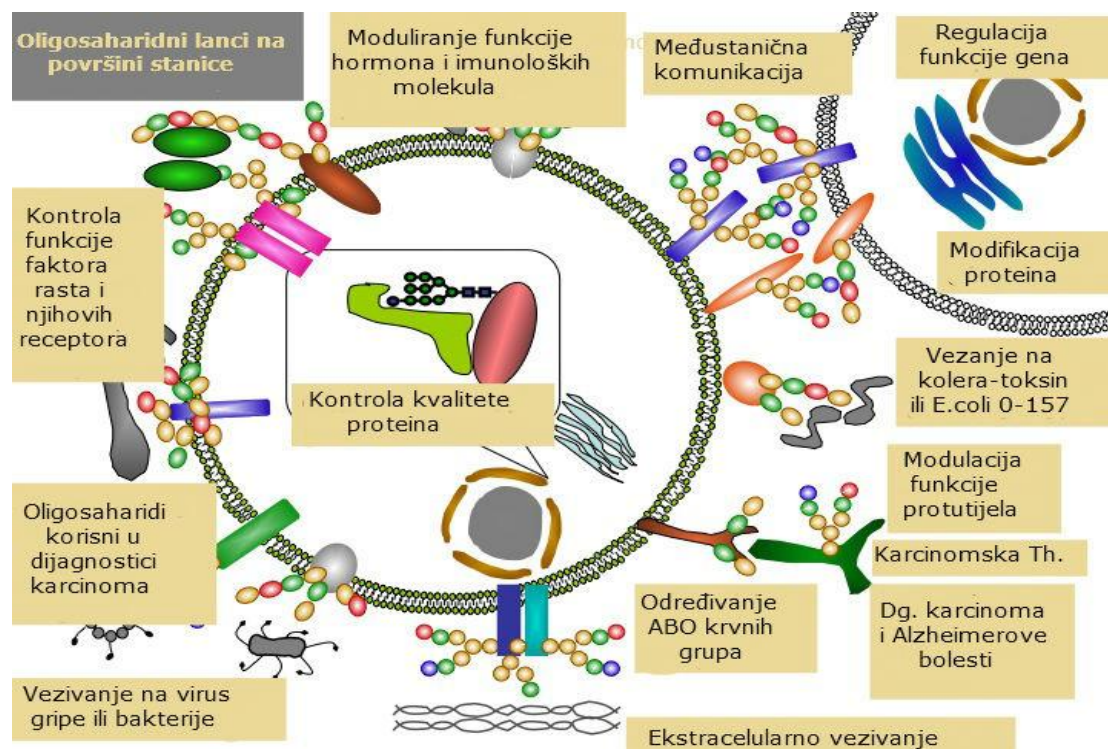
Potvrdu navedenim istraživanjima nalazimo i u ljudi na primjeru izraženijeg razvoja pretilosti kroz generacije (271,272), koja je također rezultat hipermetilacije gena *BDNF* i posljedično njegove potisnute transkripcije (258).

### **1.3. N-glikani**

Većinski dio humanog serumskog proteoma je glikoziliran, točnije više od 70% ljudskih proteina, što znači da glikozilacija obuhvaća brojne hormone, enzime, citokine, receptore, protutijela te razne strukturne proteine (273-275). Glikani, odnosno oligosaharidni lanci kovalentno vezani na polipeptide i lipide na površini stanica sudjeluju u raznim interakcijama između stanica i njihovog izvanstaničnog okoliša, kao i u raznolikim biološkim funkcijama, kao što su međustanična komunikacija, signalizacija, smatanje proteina ili njihov stabilitet, stanično prepoznavanje te regulacija ekspresije gena (276-279). Funkcije glikana su shematski prikazane u Slici 6. Glikozilacijom, odnosno visokospecifičnom, složenom i strogo reguliranom ko-translacijskom i post-translacijskom modifikacijom proteina, formiraju se vrlo heterogene i strukturno kompleksne forme (280-284), sastavljene od ograničenog broja monosaharida povezanih *N*-glikozidnom i/ili *O*-glikozidnom vezom (285). Razlike u fenotipu određenih glikana rezultat su interakcije genetičkih i okolišnih utjecaja, međutim, unatoč izrazitoj varijabilnosti, individualni sastav glikoma plazme vrlo je postojan (286). Međutim, raspon utjecaja nasljeđa na razine glikana u plazmi proteže se od beznačajnog ili vrlo malog pa do više od 50% za neke glikanske oblike (287).

*N*-glikani zauzimaju oko 30% raspoloživih sekvenci ljudskog proteoma (288), imaju glikansku jezgru od pet monosaharida, dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze, te uvijek započinju *N*-acetilglukozaminom vezanim s asparaginom. Njihova biosinteza odvija se unutar stanice, točnije u

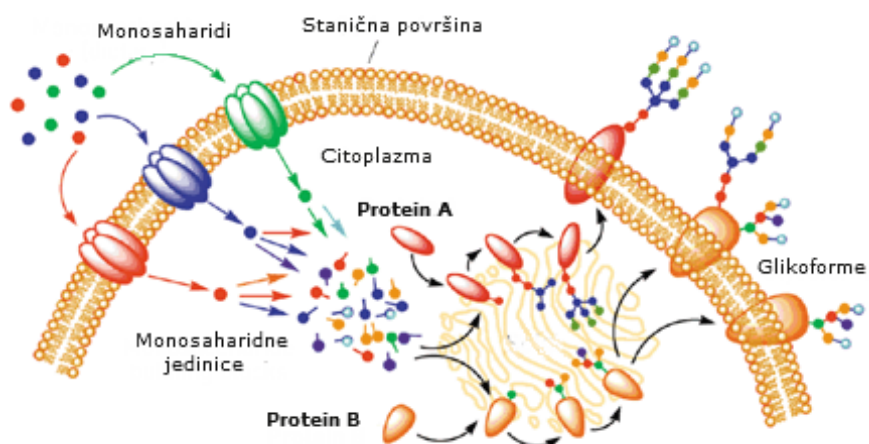
endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom tjelešću, uz djelovanje brojnih glikozidaza i glikoziltransferaza.



**Slika 6. Raznolikost funkcija glikana**

Modificirano prema: Yamaguchi Y. Functions of Glycans. ASI pamphlet, June 2008.

Gotovi oblici, koji su protein- i stanično-specifični, potom se transportiraju do plazmatske membrane (Slika 7), no ipak ih se dio, porijeklom pretežno iz B-limfocita ili jetrenih stanica, otpušta u ekstracelularni prostor te ih se može detektirati u tjelesnim tekućinama kao što su plazma, serum, suze, slina, urin ili cerebrospinalna tekućina (285), gdje su i najdostupnije za analizu (289-291).



**Slika 7. Biosinteza glikoproteina rezultira raznolikošću glikoformi**

Modificirano prema: Borman SC, Washington E. Any new proteomics techniques out there? Sci Technol. 2001; 26: 31-33

Ovisno o grananju, *N*-glikani mogu se podijeliti u tri grupe, čineći pri tome oligomanozne, kompleksne ili hibridne tipove glikana. Oligomanozni tipovi imaju dvije do šest dodatnih manosa, dok kompleksni tipovi sadrže dvije ili više grana s barem jednim *N*-acetilglukozaminom i galaktozom te često s jednom sijalinskom kiselinom na svakoj grani. Hibridni je tip glikana mješavina između prva dva tipa – sadrži jednu granu kompleksne strukture te jednu ili više oligomanoznih grana (285,286).

Strukturno, ovisno o broju vezanih grana razlikuju se biantenarni (dvije grane), triantenarni (tri grane) ili tetraantenarni (četiri grane) oblik *N*-glikana, dok prema stupnju sijalizacije i galaktozilacije glikani se dijele u a-, di-, tri- i tetra-sijalizirane, odnosno a-, di-, tri- i tetra-galaktozilirane forme. Njihova razgranatost, varijacije u redosljedu i spajanju monosaharida, post-glikozilacijska modifikacija te mogućnost formiranja raznih izomera i oblika grananja, omogućuje im nebrojeno puta veću raznolikost u odnosu na aminokiseline i nukleotide, a time i ogroman bioinformativni potencijal kodiranja, zbog čega se smatra da su *N*-glikani obećavajući izvor brojnih novih biomarkera različitih poremećaja i bolesti (275,292). Naime, suprotno od strogo reguliranog genetičkog i aminokiselinskog kodiranja, „glikokod“ se zbog svoje fleksibilnosti prilagodbe različitim konformacijama dovodi u vezu s brojnim patološkim stanjima koja dovode do reprogramiranja kompleksnih kontrolnih mehanizama. Smatra se da dinamične promjene u strukturi glikana, uzrokovane raznim intracelularnim i ekstracelularnim poticajima, reflektiraju originalno porijeklo molekule te upućuju na fiziološko i biokemijsko stanje organizma u trenutku njenog otpuštanja (275,293,294). Osim navedenog, promjene glikozilacije povezuju se i s raznovrsnim patološkim procesima i neuropsihijatrijskim bolestima (295-299).

Promjene *N*-glikozilacije najčešće su posljedica poremećene biosinteze *N*-glikana u hepatocitima (300), a kako su gotovo svi glikoproteini u plazmi porijeklom iz hepatocita, koji imaju funkciju „filtera“ u organizmu, vjeruje se da su bilo kakvi okolišni uvjeti koji utječu na glikozilaciju upravo vidljivi na glikoproteinima plazme. Sukladno tome, utvrđene su promjene *N*-glikozilacije proteina seruma u raznim bolestima jetre i u zlorabi alkohola (300-303). Radi toga je predloženo da se *N*-glikani mogu koristiti kao biomarkeri za razlikovanje između nealkoholnog steatohepatitisa (NASH, engl. non-alcoholic steatohepatitis) i steatoze jetre (300) ili između ciroze jetre i kronične bolesti jetre (301). Naime, u nealkoholnom steatohepatitisu je utvrđena značajno smanjena galaktozilacija imunoglobulina G (IgG, engl. immunoglobulin G) u odnosu na steatozu jetre (300) temeljem čega su Chen i sur. (304) osmislili i dijagnostički "GlycoNashTest", test temeljen na koncentracijama i

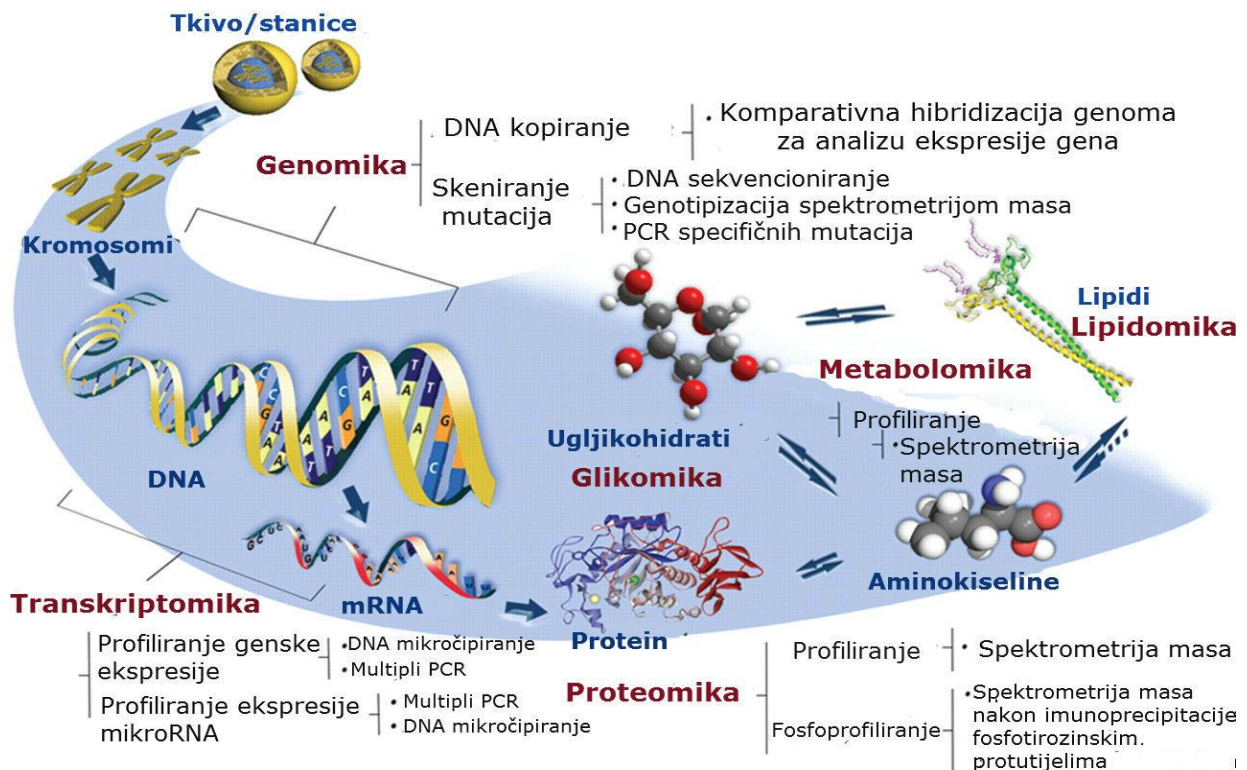
logaritamskim omjerima dvije vrste *N*-glikana, asijalo-agalakto-biantenarnog (NGA2F, engl. asialo-agalacto-biantennary fucosylated) i asijalo-galaktoziliranog biantenarnog (NA2, engl. asialo-galactosylated biantennary), s 89,5% osjetljivošću i 71,4% specifičnošću u diferencijalnoj dijagnostici tih dvaju jetrenih oštećenja.

Promjene razgranatosti *N*-glikana, sijalizacije, fukozilacije kao i galaktozilacije zabilježene su i u brojnim metaboličkim i upalnim poremećajima te malignim bolestima (283,294,305-317). Tako su u reumatskom artritisu zabilježene značajne varijacije u manozilaciji, galaktozilaciji i glukozilaciji kiselog alfa-1 glikoproteina (AGP, engl. alpha-1 acid glycoprotein) i haptoglobina (295), dok se pušenje, koje stvara upalnu reakciju organizma, povezuje s porastom grananja *N*-glikana u vidu povećanih razina tetraantenarnih (TA) i tetragalaktoziliranih te smanjenih biantenarnih plazmatskih *N*-glikanskih struktura (318). Smanjena razgranatost *N*-glikana zabilježena u djece s poremećajem pažnje i hiperaktivnošću (ADHD, engl. attention deficit hyperactivity disorder), dovodi do promjena u međustaničnoj signalizaciji, i smatra se jednim od predisponirajućih čimbenika za razvoj ADHD-a (296,319).

Fukozilirani biantenarni glikani s dvije terminalne galaktoze specifični su za adenokarcinom jednjaka, dok su u hepatocelularnom karcinomu (HCC, engl. hepatocellular carcinoma) zabilježene snižene, a u karcinomu dojke povišene vrijednosti hibridnih glikana (320). Neki glikani, odnosno glikoproteini, već su u upotrebi kao biomarkeri tumorskih stanica (karcinomski antigen 125 (CA125), karcinomski antigen 19-9 (CA19-9), karcinoembrionski antigen (CEA), karcinomski antigen 15-3 (CA15-3), mucin 1 (MUC1)) (321), s time da pojačana sijalizacija, fukozilacija i razgranatost određenih *N*-glikana korelira sa stupnjem maligniteta kao i stadijem karcinoma (320,322-326). Analiza svih glikana u serumu pokazala je veću osjetljivost i specifičnost u ranom otkrivanju hepatocelularnog karcinoma u pacijenata s cirozom u odnosu na analizu određenih razgranatih fukoziliranih glikoformi proteina ili u odnosu na analizu koncentracije alfa-fetoproteina (AFP, engl. alpha-fetoprotein) (327). Osim toga kombiniranom analizom svih serumskih glikana s koncentracijom alfa-feto proteina, hepatocelularni karcinom se od ciroze može razlikovati s 90%-tnom specifičnošću i 95%-tnom osjetljivošću (328).

S obzirom da je upravo zbog iznimne strukturne raznolikosti i posljedično komplicirane analize, do nedavno glikozilacija bila zapostavljena u odnosu na sve druge analize, te da je detaljna analiza strukture i kvantifikacije glikana tek od nedavno omogućena zahvaljujući dostupnosti novih tehnologija, kao što su kapilarna elektroforeza, matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom-vrijeme poleta (MALDI-TOF, engl. matrix-assisted laser deionisation-time of flight)

masena spektrometrija, te izrazito djelotvorna visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC, engl. high performance liquid chromatography), pravi se potencijal glikana kao biomarkera tek treba detaljno ispitati (Slika 8).



**Slika 8. Brojnost znanstvenih pravaca i tehnologija u istraživanju ljudskog genoma**  
 Modificirano prema Wu RQ i sur. Novel molecular events in oral carcinogenesis via integrative approaches. J Dent Res. 2011;90:561-572.

Upravo zahvaljujući spomenutom tehnološkom napretku omogućen je detaljniji uvid u genetičku regulaciju glikozilacije. Utvrđeno je kako 5-10% genoma kodira enzime uključene u sintezu glikana, a 1-2% odnosi se na gene povezane s proizvodnjom glikoziltransferaza, enzima koji sudjeluju u procesu glikozilacije što glikozilaciju proteina svrstava u najkompleksniji oblik biosinteze (298,329,330). Neki od poznatih gena uključenih u proces *N*-glikozilacije su gen za beta-1,3-glukuroniltransferazu 1 (*B3GAT1*, engl. beta-1,3-glucuronyltransferase 1), člana 9 obitelji slobodnih nosača (SLC9A9, engl. solute carrier family 9 member 9), alfa-1,6-manozilglikoprotein 6-beta-N-acetilglukozaminiltransferazu A (*MGAT5*, engl. alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A), beta-galaktozamid alfa-2,6-sijaliltransferazu 1 (*ST6GAL1*, engl.  $\beta$ -galactosamide  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase 1), fukoziltransferazu 8 (*FUT8*, engl. fucosyltransferase 8), FUT3/FUT6, FUC7, jetreni nuklearni čimbenik 1 homeobox A (*HNF1a*, engl. hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A) i gen za enzim beta-galaktozid alfa-2,3-sijaliltransferazu 5 (*ST3GAL5*, engl.  $\beta$ -

galactoside  $\alpha$ -2,3-sialyltransferase 6) (331-333). Mutacije unutar pojedinih gena uključenih u proces glikozilacije pridonose genetičkoj varijabilnosti glikana (334), a povezuju se i s brojnim bolestima. Smatra se da u karcinomu prostate povećana ekspresija gena *MGAT5* te povećana ekspresija *FUC8* u hepatocelularnom karcinomu doprinosi malignitetu i invazivnosti zloćudnih stanica kao i otpornosti na kemoterapiju (335,336). Smanjena ekspresija *FUT7*, zbog posljedične smanjene fukozilacije glikosfingolipida (GLS), uzrokuje defekt sinteze sialil Lewis X antigena (sLe<sup>x</sup>) prisutnog na selektinima i proteinima akutne faze, što rezultira deficijencijom leukocitne adhezije tipa 2, jednim od oblika imunodeficijencije (337). Sindrom Rolandove epilepsije, sljepoće i zastoja u rastu, kao i mioklonus-distonija sindrom vežu se uz mutaciju gena *ST3GAL5* koji kodira za ključni enzim u sintezi glikosfingolipida (333,338,339). Polimorfizam gena *SLC9A9* povezuje se s ADHD-om (340), dok se jačina simptoma u progresivnoj multiploj sklerozi povezuje s polimorfizmom gena *MGAT5* (341). Nadalje, kronična zloraba alkohola uzrokuje smanjenu ekspresiju gena *ST6GAL1* te dovodi do smanjene sializacije apolipoproteina što, zbog defektnog transporta lipoproteina, rezultira alkoholnom steatozom jetre (302,303,332,342). Mutacije unutar gena za jetreni nuklearni faktor 1 $\alpha$  uzrokuju varijacije u plazmatskim razinama  $\gamma$ -glutamil transferaze, C-reaktivnog proteina i LDL-a te se povezuju s kardiovaskularnim bolestima, karcinomom gušterače i dijabetesom tipa 2 (343-348).

Nedavna cjelogenomska studija povezanosti na fenotipovima povezanim s pretilošću identificirala je gen *MGAT1*, koji kodira za jednu od ključnih glikoziltransferaza odgovornih za grananje glikana, kao glavni gen povezan s tjelesnom masom (349). Međutim, valja naglasiti da kombinacija nekoliko SNP-ova kod istog pojedinca može uzrokovati neki od oblika kongenitalnih poremećaja glikozilacije (CDG, engl., congenital disorders of glycosylation), kompleksnih rijetkih oboljenja karakteriziranih neurološkim, gastroenterološkim i imunološkim simptomima, s visokom stopom mortaliteta (350-352), čije je nasljeđivanje autosomno recesivno, a smrtnost iznosi čak 20% u prvih 5 godina života. Do sada je identificirano 32 kongenitalna poremećaja glikozilacije od čega je tipizirano samo 19 od više od 60 gena odgovornih za specifični poremećaj *N*-glikozilacije (353,354).

Kako je starenje genetički predodređen fiziološki proces koji proizlazi iz stalne interakcije između genoma i okoliša (355), logično je za očekivati da će se glikozilacija plazmatskih proteina u ljudi promijeniti tijekom života te da će te promjene obuhvatiti mnoge glikanske strukture (272). To je potvrđeno brojnim studijama (356-361). Također je utvrđeno kako su navedene promjene u razinama glikanskih obilježja, usporedo sa starenjem, ovisne i o spolu te su izraženije u žena (353), što se pripisuje promjenama u hormonskom statusu. To je već dokazano u trudnoći, u osoba na hormonskoj terapiji i u žena u menopauzi (318,362-364).

Većina dobivenih saznanja rezultat su istraživanja na odraslim osobama, dok gotovo da i ne postoje studije na *N*-glikanima u dječjoj dobi. Istraživanje Pučić i sur. (299) jedno je od rijetkih koje uključuje dječju populaciju te donosi nekoliko bitnih saznanja. Naime, tek s pojavom puberteta uočena je razlika u razini agalaktoziliranih plazmatskih glikana u djevojčica i dječaka, a kod glikozilacije IgG-a spolne razlike su otkrivene još prije puberteta u vidu viših razina fukoziliranih i sijaliziranih formi u djevojčica. Također, utvrđeno je da se mnoge značajke glikana mijenjaju s djetetovim rastom i razvojem, uključujući smanjenje granjanja glikana, galaktozilacije (trigalaktozilirani i tetragalaktozilirani glikani) i sijalizacije (trisijalizirani i tetrasijalizirani glikani) s porastom dobi. Najviši koeficijent korelacije utvrđen je za tetrasijalizirane glikane i dob, koji pokazuju značajan pad u djece s porastom dobi, a popraćen je porastom disijaliziranih biantenarnih glikana. Razina fukoziliranih i agalaktoziliranih glikana plazme značajno se smanjuje, dok se razina digalaktoziliranih glikana povećava sa starenjem. Usporedbom plazmatskih i IgG glikanskih promjena tijekom odrastanja u djece s onima u odraslih osoba, uočeno je kako karakteristike gotovo svih glikana pokazuju trend ili stopu promjene u odrasloj dobi. Na primjeru agalaktoziliranih glikana, koji su najčešće istraživani (356,358,365,366), dokazano je kako se razina agalaktoziliranih glikana zapravo smanjuje s dobi kod djece te da je njihova minimalna razina postignuta u ranoj zrelosti. Također, i za mnoge druge značajke glikana uočeno je da se sastav plazmatskih glikana u djetinjstvu značajno razlikuje od sastava glikana plazme u odrasloj dobi, čak štoviše, mijenja se značajno tijekom djetetova rasta. To saznanje je vrlo važno, osobito radi činjenice da su promjene u glikanskim strukturama često proučavane kao dijagnostički biomarkeri, a vjerojatno upravo promjena glikozilacije još u dječjoj dobi predisponira za razvoj brojnih s pretilošću povezanih metaboličkih poremećaja, te raznih oboljenja u odrasloj dobi.

### **1.3.1. *N*-glikani i tjelesna masa**

Dosadašnja saznanja kako promjene u plazmatskoj razini *N*-glikana utječu na signalne puteve leptina i na o inzulinu ovisne PI-3K signalne puteve (367,368), u skladu su s izvješćima o utjecaju tjelesne mase na *N*-glikozilaciju. Ta istraživanja pokazuju da *N*-glikozilacija korelira s određenim genetičkim varijacijama onih gena koji su povezani s glikozilacijom (286,318,369-374). Nedavna GWAS studija na fenotipovima povezanim s pretilošću identificirala je gen manozil (alfa-1,3-)-glikoprotein beta-1 (*MGAT1*, engl. mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1), koji kodira za jednu od ključnih glikoziltransferaza odgovornih za grananje glikana, kao glavni gen povezan s tjelesnom masom (349).

U studiji provedenoj na pojedincima hrvatskog podrijetla utvrđena je pozitivna korelacija između parametara procjene tjelesne masti i plazmatske razine negalaktoziliranih i disijaliziranih biantenarnih *N*-glikana, a istovremeno su zabilježene i snižene vrijednosti monogalaktoziliranih te povećana razina trigalaktoziliranih glikanskih struktura (318). Prekomjerna količina masnih naslaga u organizmu, kao i slobodnih masnih kiselina, uzrokuje inzulinsku rezistenciju te posljedičnu hiperinzulinemiju, i dovodi do dislipidemije u vidu povećanih razina triglicerida te smanjenih vrijednosti HDL-kolesterola (HDL, lipoprotein visoke gustoće, engl. high density lipoprotein) (375). Iako je poznato kako je za urednu funkciju svih lipoproteina odgovornih za transport kolesterola ključna upravo pravilna *N*-glikozilacija (376-379), studije o strukturi tih *N*-glikana su oskudne. Uočene su statistički značajne korelacije između grananja, sijalizacije, fukozilacije glikana i razine ukupnog kolesterola u krvi, kao i njegovih frakcija. Naime, tetragalaktosijalizirane strukture *N*-glikana pozitivno koreliraju sa svim frakcijama kolesterola, osim triglicerida, kod kojih postoji obrnuta korelacija (318,380). Navedeni nalazi su u skladu s nedavnom kompleksnom analizom provedenom na tri europske populacije koja je utvrdila jaku povezanost visoko razgranatih glikana i različitih vrsta nezasićenih lipida (381).

Smatra se da pretilost pogoršava metabolizam lipida u osoba s genetičkom predispozicijom za razvoj dislipidemije, a istodobna prisutnost ta dva poremećaja povezuje se s razvojem hipertenzije, dijabetesa tipa 2, sklonosti ubrzanom zgrušavanju krvi, kao i s proupalnim stanjima, zajedničkog naziva metabolički sindrom (382). Prije dobi od 10 godina metabolički sindrom se ne može dijagnosticirati, no u pretiloj djece potrebno je provesti daljnja mjerenja ako postoji pozitivna obiteljska anamneza metaboličkog sindroma, dijabetesa tip 2, kardiovaskularnih oboljenja, dislipidemije, hipertenzije i/ili pretilosti. Prema međunarodnoj federaciji za dijabetes (IDF, engl. International Diabetes Federation) kriteriji metaboličkog sindroma za djecu starosti  $10 \leq 16$  godina (383) su prikazani u Tablici 1.

Prvi pokušaj da se istraži profil *N*-glikana i njihova povezanost s metaboličkim sindromom napravljen je u studiji koja je uključila ispitanike kineskog i hrvatskog podrijetla (357), gdje je uz već poznate čimbenike rizika (dob, ITM, krvni tlak i vrijednosti glukoze natašte), identificirano nekoliko grupa *N*-glikana, odnosno njihovih razina u plazmi (G3, biantenarni (BA), triantenarni (TRIA), sržni fukozilirani (FUC), monosijalizirani, disijalizirani i trisijalizirani glikani), i predloženo je da se ti glikani koriste kao dodatni pokazatelji rizika za razvoj metaboličkog sindroma jer pokazuju promjene metabolizma.



Dobna skupina (god.)	Pretilost (OS)*	Trigliceridi	HDL-c	Krvni tlak	Glukoza (mmol/L) ili T2DM
6 – <10	≥90 %	Metabolički sindrom ne može biti dijagnosticiran, no treba provesti daljnja mjerenja ako postoji obiteljska anamneza za metabolički sindrom, T2DM, dislipidemiju, kardiovaskularnu bolest, hipertenziju i/ili pretilost			
10 – <16 metabolički sindrom	≥90 % ili smjernice za odrasle ako je vrijednost niža	≥1,7 mmol/L	<1,03 mmol/L	Sistolički ≥130 mmHg dijastolički ≥85 mmHg	≥5,6 mmol/L (ako ≥5,6 mmol/L ili prisutan T2DM, preporuča se OGTT)
16+ metabolički sindrom	Koristiti postojeće IDF kriterije za odrasle, tj.: Središnja pretilost (definirana kao opseg struka ≥94 cm za europske muškarce i ≥80 cm za europske žene te vrijednosti specifične za ostale etničke skupine*) plus bilo koji od sljedeća četiri čimbenika: Povišeni trigliceridi: ≥1,7 mmol/L, Smanjen HDL-c: <1,03 mmol/L kod muškaraca i <1,29 mmol/L u žena ili postoji specifično liječenje za ove lipidne abnormalnosti, Povećan krvni tlak: sistolički ≥130 ili dijastolički ≥85 mmHg ili postoji liječenje prethodno dijagnosticirane hipertenzije, Konzracija glukoze u plazmi natašte od 5,6 mmol/L ili prethodno dijagnosticiran tip 2 dijabetes				

**Tablica 1. IDF definicija metaboličkog sindroma u djece i adolescenata**

Pretilost se povezuje s povećanjem trisijaliziranih i tetrasijaliziranih struktura, ali i sa smanjenom fukozilacijom i galaktozilacijom (297,357), pa je tako u studiji na velikom broju ispitanika bijele rase, od kojih su dvije skupine hrvatske otočke populacije, a treća populacija je škotskog podrijetla, zabilježena korelacija između razine galaktozilacije IgG-a i ITM-a (297). Naime, smanjena razina galaktozilacije IgG-a može se povezati s višim ITM-om, dok se povećana razina galaktozilacije povezuje sa smanjenim vrijednostima ITM-a. Također, spomenuta smanjena razina galaktozilacije kod osoba s povećanim ITM-om mogla bi biti povezana s upalnim procesima koji često prate pojavu pretilosti (297).

S obzirom na ključnu ulogu IgG-a u upalnom procesu, pretpostavlja se da nepotpuna galaktozilacija uzrokuje neprimjeren proupalni odgovor koji rezultira kroničnom upalom (384,385), procesom karakterističnim za brojna oboljenja poput reumatskog artritisa, kardiovaskularnih i

neuropsihijatrijskih bolesti, multiple skleroze i pretilosti (286,297,305,386). Navedene, znatno više, cirkulirajuće razine upalnih markera u pretilih osoba sudjeluju i u razvoju ateroskleroze kao sustavnog upalnog stanja (387,388), te pogoduju stvaranju inzulinske rezistencije, dislipidemije i razvoju drugih metaboličkih poremećaja povezanih s prekomjernom tjelesnom masom (389,390), a sva su ta stanja povezana s promjenama glikozilacije.

Masno tkivo, osim što je jedan od izvora spomenutih brojnih upalnih markera (389), također otpušta i brojne endokrine peptide (adiponektin, leptin, angiotenzinogen) koji imaju značajnu ulogu u razvoju komplikacija povezanih s pretilošću (hipertenzija, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, karcinom). Autotaksin, odnosno lipofosfolipaza D, uključen je u sintezu lizofosfatične kiseline (LPA) i također potječe iz adipocita, te ima važnu ulogu u hipertrofiji i regrutaciji novih masnih stanica (adipogenezi), ali i u razvoju dijabetesa uzrokovanom pretilošću (391,392). Ekspresija autotaksina povećana je u masnom tkivu genetički pretilih miševa s dijabetesom, kao i u pretilih osoba s inzulinskom rezistencijom (393,394). Svojim djelovanjem putem sinteze lizofosfatične kiseline, autotaksin aktivira proliferaciju i diferencijaciju preadipocita u adipocite (hiperplazija), ali i dovodi do prekomjernog nakupljanja triglicerida u postojećim adipocitima (hipertrofija), čime doprinosi povećanom stvaranju masnog tkiva i razvoju pretilosti (394-396). Gubitak *N*-terminalnog signalnog peptida pod utjecajem inhibitora globomicina, kao i inhibicija *N*-glikozilacije aminokiselina N53 i N410 autotaksina, inhibira njegovu sekreciju kao i aktivnost lizofosfolipaze D u animalnim modelima, zbog čega je vjerojatno da *N*-glikozilacija ima ključnu ulogu u parakrinoj regulaciji adipogeneze i dijabetesa uzrokovanog pretilošću (392,397).

## 2. HIPOTEZA

1. Veći udio AA (Met/Met) i AG (Met/Val) genotipa, te veći broj (A) Met nosioca (kombinacija AA (Met/Met) i AG (Met/Val) genotipova) i veća učestalost A (Met) alela prisutni su u djece s prekomjernom tjelesnom masom (preuhranjena i pretila djeca) u odnosu na normalno uhranjenu djecu.
2. Povećan indeks tjelesne mase pozitivno je povezan s određenim *N*-glikanima (negalaktoziliranim i disijaliniziranim biantenarnim glikanima).

### 3. CILJEVI RADA

1. Istražiti povezanost između prekomjerne tjelesne mase ili pretilosti i polimorfizma gena *BDNF* (BDNF Val66Met), tj. utvrditi postoji li razlika u distribuciji genotipova, alela i Met nosioca između normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom (preuhranjene i pretile djece).
2. Istražiti mijenja li se koncentracija *N*-glikana u normalno uhranjene djece u odnosu na djecu s prekomjernom tjelesnom masom (preuhranjenu i pretilu djecu).

## 4. ISPITANICI, METODE I MATERIJALI

### 4.1. Ispitanici

U ovo istraživanje bilo je uključeno je 97 djece u dobi od 6-7 godina koja su prolazila prvi pregled prilikom upisa u školu. Antropometrijska mjerenja i uzimanje uzoraka krvi napravljeni su prilikom sistematskog pregleda za upis u prvi razred osnovne škole provedenog u ambulantomama školske medicine, Ispostava Vrbovec i Sveti Ivan Zelina, Zavoda za javno zdravstvo Zagrebačke županije. Od 380 djece koja su na tom području u školskoj godini 2012/2013 bili školski obveznici, zbog odbijanja sudjelovanja u istraživanju prikupljeno je 97 uzoraka krvi, a zbog oštećenja dijela uzoraka krvi tijekom transporta, studijska skupina obuhvatila je ukupno 93 djece (49 dječaka i 44 djevojčice). Antropološka mjerenja visine i tjelesne mase provedena su standardiziranim postupcima sukladno preporukama WHO, a služeći se antropometrom za mjerenje visine (visina je izmjerena do najbližih 0,5 cm) te medicinskom decimalnom vagom s kliznim utegom (tjelesna masa je izmjerena s digitalnom skalom do najbližih 0,1 kg). Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao omjer mase u kilogramima i visine u metrima kvadratnim i ta su mjerenja izvršena u ambulantomama školske medicine, ispostave Vrbovec i Sveti Ivan Zelina, Zagrebačka županija. Ispitanicima su uzimani uzorci krvi (4 mL) u epruvete s podtlakom (Vacoutainer sistem) s 1 mL ACD (acid-citrat dekstroza) antikoagulansa. Uzorci su istog dana dostavljeni u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, kako bi se odmah po dolasku obradili.

Svi su ispitanici podijeljeni prema vrijednostima centila na djecu uredne uhranjenosti i djecu s prekomjernom tjelesnom masom (preuhranjenu i pretilu djecu) i to prema nacionalnim referentnim vrijednostima centilnih krivulja ITM-a za djevojčice i dječake u dobi od 6,5 do 18,5 godina (35). Među ispitanicima nije bilo niti jedno dijete ispod 5. centile. Međutim, lomne vrijednosti su kod svih ispitanika napravljene sukladno CDC kriterijima za procjenu uhranjenosti (33-37), te su svi ispitanici podijeljeni na normalno uhranjenu djecu (<85 centila), preuhranjenu djecu (≥85-95 centila) i pretilu djecu (≥95 centila).

Čitavo istraživanje je provedeno sukladno Helsinškoj deklaraciji, uz odobrenja Etičkih povjerenstava Zavoda za javno zdravstvo Zagrebačke županije i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te uz usmeni pristanak djece, a pismeni pristanak njihovih roditelja.

Kriteriji za uključivanje u istraživanje:

- usmeni pristanak sudionika te potpisan pristanak roditelja za sudjelovanje u istraživanju, nakon razgovora i objašnjenja svrhe i ciljeva istraživanja

Kriteriji za isključivanje iz istraživanja:

- odustajanje,
- neurološke i psihičke smetnje,
- prethodno medikamentozno liječenje

## **4.2. Postupak istraživanja**

### **4.2.1. Uzimanje krvi**

Dobrovoljnim ispitanicima postupkom venepunkcije uzeto je po 4 mL venske krvi u epruvete s podtlakom (Vacoutainer sistem) s 1 mL ACD antikoagulansa. Sadržaj epruvete potom se odmah dobro promiješao laganim pokretima ruke minimalno 10 puta. Prikupljeni uzorci su istoga dana u prijenosnom hladnjaku transportirani u Laboratorij za molekularnu neuropsihijatriju, Zavod za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu gdje je nastavljena daljnja obrada uzoraka: izdvojena je plazma, izolirana DNA i određeni su *BDNF* Val66Met genotipovi i aleli.

### **4.2.2. Postupak izdvajanja plazme**

Dostavljeni uzorci krvi (4mL venske krvi + 1 mL ACD-a) dobro su promiješani na rotacijskoj mješalici u trajanju od 10 minuta na približno 35-40 okretaja u minuti. Tijekom tog vremena ohlađena je centrifuga na 4°C. Potom je serijom centrifugiranja u ohlađenoj centrifugi iz pune krvi prvo izdvojena plazma (3 min na 1100 x g), a zatim iz plazme trombociti (15 min na 5087 x g) kao bi se dobila plazma siromašna trombocitima. Trombociti se izdvajaju iz plazme kako ne bi oslobađali BDNF. Plazma siromašna trombocitima, trombociti i preostali dio krvi s leukocitima za izolaciju DNA pohranjeni su na -20°C.

### 4.2.3. Izolacija DNA metodom izoliranja

#### Reagensi i otopine

- RLCB (red cell lysis buffer) - pufer za lizu eritrocita (10mM Tris (Sigma Aldrich, SAD), 5mM MgCl<sub>2</sub> (Kemika, Hrvatska), 10mM NaCl (Kemika, Hrvatska), pH 7,6)
- SE pufer - (75mM NaCl, 25mM EDTA (Sigma Aldrich, SAD), pH 8)
- 5M NaCl- natrij klorid (Sigma Aldrich, SAD)
- 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) - natrij dodecil sulfat (Sigma Aldrich, SAD)
- proteinaza K, 20mg/ml (TaKaRa, SAD)
- izopropranolol (Kemika, Hrvatska)
- etanol 96%, 70% (Kemika, Hrvatska)
- 1xTE (Tris-EDTA) pufer - 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,6 (Sigma Aldrich, SAD)

#### Tehnička oprema i pribor

- plastične tubice (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga Thermo Scientific™ Sorvall™ Legend™ (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- vorteks mješalica (Heidolph, Njemačka)
- termomikser (Eppendorf, Njemačka)
- magnetska mješalica (Heidolph, Njemačka)
- hladnjak, 4°C
- zamrzivač, -20 °C

#### Postupak

Plastične epruvete izvađene su iz zamrzivača i uzorci su odležani. Epruvete su potom stavljene na rotacijsku mješalicu gdje su se uzorci miješali 20 minuta. Nakon miješanja, u tubice od 1,5 mL odvojeno je 300 µL uzorka, dodano 900 µL RCLB pufera za lizu eritrocita i tubice su dobro izmiješane na vorteks mješalici oko 20 sekundi. Tubice su tada stavljene na led 10 minuta, a potom su 2 minute centrifugirane na 13 400 x g čime se dobio supernatant koji sadrži lizirane eritrocite i talog s leukocitima. Uz pomoć pipete odstranjen je i odbačen supernatant, a talog leukocita je sačuvan i pročišćen u tri navrata dodavanjem 900 µL RCLB pufera i centrifugiranjem po 2 min na 13 400 x g, dok talog nije postao bijelkaste boje. Nakon zadnjeg ispiranja na talog je dodano 300 µL SE pufera. Sve je zajedno dobro izmiješano. Zatim je dodano 30 µL 10% SDS-a i 1,5 µL proteinaze K. Zatvorene

tubice su lagano okretane par puta u smjeru gore-dolje te su inkubirane u termobloku na 56°C kroz 2 sata uz lagano miješanje, prilikom čega je došlo do lize leukocita. Nakon inkubacije, vađenja tubica iz termobloka i njihovog hlađenja na sobnu temperaturu, u svaku je tubicu dodano 1/3 volumena 5M natrijevog klorida (NaCl), te su potom tubice izmiješane na vorteks miješalici i centrifugirane 5 minuta na 12 000 x g. Tada je supernatant, u kojem ostaje DNA, prebačen pipetom u novi set označenih tubica. Na taj je supernatant dodano 2 volumena (otprilike 800 µL) hladnog izopropanola. Nove tubice su potom zatvorene i nekoliko puta okrenute u smjeru gore-dolje prilikom čega je došlo do renaturacije DNA koja je postala vidljiva u obliku bijelkaste niti koja se nakon dvominutnog centrifugiranja na 12 000 x g istaložila. Supernatant je ponovno odliven i odbačen, tubice s talogom su ostavljene da se posuše na papiru, te je na talog dodano 400 µL 75 %-tnog etanola. Ponovno je uslijedilo centrifugiranje od 2 minute na 12 000 x g. Dobiveni supernatant je odliven, tubice su lagano ocijeđene na papiru s ciljem da se ukloni što više etanola, a potom su otvorene stavljene u digestor ili termoblok na 37°C 15-30 minuta kako bi etanol ishlapio i talog se osušio. Nakon sušenja na talog je dodano 100 µL TE pufera (pH 8), te je ostavljen oko sat vremena na 37°C uz laganu trešnju (300 rpm) da se DNA otopi. Nakon tog postupka otopljena DNA pohranjena je na 4°C.

#### 4.2.4. Određivanje *BDNF* genotipa

Pod određivanjem genotipa *BDNF*-a podrazumijeva se određivanje prisutnosti adenin (A) ili gvanin (G) alela na položaju 196 gena *BDNF*, a substitucija G/A rezultira zamjenom aminokiseline valin (Val) aminokiselinom metionin (Met). Pomoću uređaja ABI Prism7300 Real time PCR System apparatus, a prema protokolu proizvođača Applied Biosystems (SAD), omogućena je analiza SNP-a provođenjem lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. polymerase chain reaction) u stvarnom vremenu (real time PCR) kojom se omogućuje umnažanje željenih sljedova DNA. Početnicama se smatraju jednolančani sljedovi DNA komplementarni sljedovima DNA između kojih se nalazi sekvenca koju želimo umnožiti, a dugački su 20 do 30 nukleotida. Za svaki slijed koji sadrži jednu promijenjenu bazu specifično se veže jedna MGB (engl. minor groove binder) sonda koja je sastavni dio TaqMan<sup>®</sup> mješavine početnica i proba (TaqMan<sup>®</sup> Pre-designed SNP Genotyping Assay). U slučaju polimorfizma Val66Met gena *BDNF*, to su sonda koje sadrže na određenoj poziciji A ili G bazu. Sonda specifična za alel A na 5'-kraju ima vezanu VIC fluorescentnu boju, a sonda specifična za alel B ima na 5'-kraju FAM vezanu fluorescentnu boju. Na 3'-kraju obje sonde imaju vezani utišavač fluorescencije (NFQ, engl. nonfluorescent quencher). Kada je proba vezana za komplementarni slijed na lancu DNA (isti ujedno služi i kao kalup u PCR-u), utišavač fluorescencije i boja se nalaze na takvoj udaljenosti koja



omogućuje utišavaču da spriječi fluorescenciju boje. Kako se početnice počinju produljivati pod djelovanjem termostabilne polimeraze sadržane u TaqMan® matičnoj mješavini za genotipizaciju (TaqMan® Genotyping Master Mix), polimeraza će pocijepati vezane sonde pa boja više neće biti pod utjecajem utišavača te će početi fluorescirati, a isto će se zabilježiti uređajem kao signal. Što se segmenti DNA uz pomoć PCR metode više umnažaju, nastaje sve veća količina DNA, a istovremeno i fluorescencija boja postaje sve jača. Jačina i vrsta dobivenog signala omogućuje određivanje genotipa. Naime, fluorescencija VIC boje upućuje na homozigotni AA ili Met/Met genotip, fluorescencija FAM boje na homozigotni GG ili Val/Val genotip, a fluorescencija obje boje upućuje na heterozigotnost, odnosno prisutnost oba alela, tj. na heterozigotni GA ili Val/Met genotip.

Real time PCR je reakcija od nekoliko koraka koji se uzastopno ponavljaju više puta. Prvi korak je početna denaturacija zagrijavanjem reakcijske smjese na 95 °C kroz 10 minuta. Nakon ovog početnog koraka slijede denaturacija na 92 °C (15 s) te vezivanje i produljivanje početnica na 60 °C (60 s) pomoću termostabilne DNA polimeraze, što je omogućeno korištenjem dNTP-ova koji se nalaze u reakcijskoj smjesi. Navedeni koraci se ponavljaju uzastopno kroz 45 ciklusa.

**Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za genotipizaciju PCR metodom u stvarnom vremenu.**

Sastojak reakcijske smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen po reakciji/ $\mu\text{L}^1$
TaqMan® matična mješavina za genotipizaciju	2 x	1 x	12,5
TaqMan® mješavina početnica i sonde	40 x	1 x	0,625
Genomska DNA razrijeđena u deH <sub>2</sub> O	oko 1,8 ng/ $\mu\text{L}$	oko 0,8 ng/ $\mu\text{L}^2$	11,25

<sup>1</sup> Volumen se prilagođava razmjerno ukupnom volumenu reakcijske smjese

<sup>2</sup> 1-20 ng genomske DNA po reakcijskoj smjesi

Ukupni volumen korištene reakcijske smjese za genotipizaciju bio je 25  $\mu\text{L}$ , a točan sastav reakcijske smjese prikazan je u Tablici 2.

#### 4.2.5. Otpuštanje N-glikana

##### Reagensi i otopine

- etanol 96% (Kemika, Hrvatska)
- aceton (Kemika, Hrvatska)

- 12% SDS (sodium dodecyl sulfate) poliakrilamidni gel - 50,2mL destilirane vode, 1,5mL 10% SDS, 37,5mL 1.5M Tris-HCl, pH 8,8, 60mL akrilamid/bisakrilamid (30%T, 2.67% $C_{bis}$ ) (Sigma Aldrich, SAD), 750 $\mu$ L 10% amonijev persulfat (Sigma Aldrich, SAD), 75 $\mu$ L TEMED (Sigma Aldrich, SAD)
- n-butamol (Kemika, Hrvatska)
- pufer za ekvibraciju - 6M urea, 2% SDS, 99.5% glicerol, bromfenol modriilo s 1% DDT (ditiotreitol), 50mM Tris, pH8,8) (Sigma Aldrich, SAD)
- jodacetamid -2,5% (Sigma Aldrich, SAD)
- destilirana voda
- pufer za denaturaciju -10% SDS, 0.5M Tris/HCl, pH=6.6
- 2AB (2-aminobenzamid) mješavina - 66 mg natrij-cijanoborhidrid, 55 mg antranilamid, 770  $\mu$ L DMSO(dimetil-sulfoksid) i 330  $\mu$ L glacijalna octena kiselina
- NaAc pufer- natrij acetatni pufer, 500mM (Sigma Aldrich, SAD)
- 50mM mravlja kiselina - pH 4,4 (Kemika, Hrvatska)
- acetonitril (Kemika, Hrvatska)
- 0,1 M octena kiselina - pH 7,0 (Kemika, Hrvatska)
- DTT (ditiotreitol) (Sigma Aldrich, SAD)
- 20 mM natrij hidrogenkarbonat (Kemika, Hrvatska)

### **Tehnička oprema i pribor**

- AcroPrep™ 96 pločice za sakupljanje uzoraka (Pall Corporation, SAD)
- AcroPrep™ 96 filter pločice (Pall Corporation, SAD)
- centrifuga 5804 R (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- termomikser Eppendorf (Njemačka)
- "Protean II XL" sustav za vertikalnu elektroforezu (Bio Rad, SAD)
- tresilica
- kromatografski papir- 3 mm (Whatman, SAD)
- Agilent Technologies 1200 Series HPLC system (Agilent Technologies, SAD)
- "TSKgel Amide 80" kolone (Tosoh Bioscience, Njemačka)
- " Prozyme GlycosStep C" kolone (ProZyme, SAD)
- hladnjak, -4 °C
- zamrzivač, -20

## **Postupak**

Određivanje *N*-glikana napravljeno je u tvrtki Genos.d.o.o. Plastične epruvete se izvade iz zamrzivača, izvana se očiste 96% etanolom i pričekaju se da se uzorci odlede. U bazenčice AcroPrep™ 96 pločica za precipitaciju se, nakon prethodnog miješanja uzoraka, odvoji 5 µL uzorka i pomiješa s 20 µL acetona te se ostavi preko noći na -20 °C kako bi se proteini istaložili. Uzorci se tada centrifugiraju na 13 200 x g kroz 10 minuta na 4 °C, uklanja se aceton, a talog se ostavlja sušiti 30 minuta. Tako pripremljeni uzorci razdvajaju se na poliakrilamidnom gelu za elektroforezu koji sadrži natrijev dodecilsulfat (SDS-PAGE, engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) i to u 2 dimenzije. Pritom se proteini razdvajaju prema veličini i izoelektričnoj točki. U tu svrhu priprema se 12%-tni SDS gel (50,2 ml destilirane vode, 1,5 ml 10% SDS, 37,5 ml 1.5M Tris-HCl, pH 8,8, 60 ml akrilamid/bisakrilamida (30%T, 2.67% $C_{bis}$ ), 75 µl TEMED i 750 µl 10% amonijeva persulfata) koji se izljeva u prethodno posložena stakala te se sve prekriva *n*-butanolom radi sprječavanja površinske oksidacije. Nakon polimerizacije gela s površine se uklanja *n*-butanol višekratnim ispiranjem destiliranom vodom. Između posloženih stakala do ruba gela umeću se IPG trakice prethodno ekvilibrirane u puferu za ekvibraciju (6 M urea, 2% SDS, 99.5% glicerol, bromfenol modriilo s 1% DDT, 50 mM Tris, pH 8,8) na 15 minuta, a potom još toliko vremena u istom puferu s time da on umjesto DTT-a 2,5% jodoacetamida. Pritom se treba paziti da se ne stvore mjehurići zraka između trakica i gela što se može riješiti laganim pritiskom. Staklene ploče s gelovima potom se umeću u "Protean II XL" sustav za vertikalnu elektroforezu (Bio Rad, SAD).

### **4.2.6. Denaturacija i oslobađanje *N*-glikana**

Za obilježavanje *N*-glikana upotrebljene su AcroPrep™ 96 filter pločice i pločice za sakupljanje uzoraka. Prvo se provodi potpuna denaturacija prethodno izdvojenih glikoproteina tako da se u svaki bazenčić pločice izdvoji 5 µL uzorka, 2 µL pufera za denaturaciju (10% SDS, 0.5 M Tris/HCl, pH=6.6), 1 µL 0,5 M DTT-a i 2 µL destilirane vode te se inkubira na 65 °C kroz 15 minuta. Potom se dodaje 1 µL 100 mM jodoacetamida koji služi kao stabilizator reducirane veze vezanjem acetamidne grupe na svaku sulfhidrilnu grupu, lagano se protrese te se inkubira u mraku na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta. Tako denaturirane glikoproteine uklapa se u SDS poliakrilamidni gel na filtracijskoj pločici kako bi se uklonili svi agensi, a istovremeno se smanjuje mogućnost renaturacije i gubitka glikoproteina. Da bi se polimerizirali, gelovi su ostavljeni na sobnoj temperaturi kroz 15 minuta te su potom prebačeni pipetom u filter pločice. Slijedi ispiranje gelova u tri navrata naizmjeničnim

hidratiziranjem 1 ml 20 mM otopine natrij hidrogenkarbonata i dehidriranjem s 1 mL acetonitrila te se stavljaju na tresilicu kroz 10 minuta. Na kraju postupka vakuum filtracijom se uklanja acetonitril.

Filter pločice stavljaju se na pločice za sakupljanje uzoraka, a potom se na svaki gel na pločici dodaje 25  $\mu\text{L}$  0.05 U/mL otopine peptid-*N*-glikozidaze F (PNGaseF, engl. Peptide-*N*-glycosidase F). Uzorke se ostavlja 5 minuta da dobro upiju otopinu nakon čega se postupak još jednom ponavlja. Zatim se dodaje 50  $\mu\text{L}$  20 mM otopine natrijevog hidrogenkarbonata, pločicu se prekriva prijanjajućim filmom i tako inkubira preko noći na 37 °C. Glikani se drugog jutra ispiru s gelova na isti način kao i kod denaturacije s time da se sada filtrat sakuplja u pločice. Svakom gelu pipetom se u dva navrata naizmjenice dodaje 200  $\mu\text{L}$  destilirane vode te acetonitrila. Potom se sadržaj filter pločice prazni vakuumom, a glikani otopljeni u vodi ostaju u pločicama za sakupljanje uzorka koje se sada preko noći ostavljaju sušiti u vakuum centrifugi. U gelove je naizmjenično dodano dva puta po 200  $\mu\text{L}$  destilirane vode i acetonitrila. Ponovno je ispiranje završeno acetonitrirom, a svi su filtrati uhvaćeni u pločice za sakupljanje uzoraka, koje su zatim stavljene u vakuumsku centrifugu i ostavljene preko noći da se osuše.

#### **4.2.7. Obilježavanje *N*-glikana**

Za obilježavanje *N*-glikana upotrijebljena je 2-aminobenzamid mješavina (2AB) (66 mg natrijevog cijanoborhidrida, 55 mg antranilamida, 770  $\mu\text{L}$  DMSO-a i 330  $\mu\text{L}$  glacijalne octene kiseline), a za učinkovitije obilježavanje *N*-glikana koristi se 1%-tna mravlja kiselina na način da se na suhe uzorke dodaje 20  $\mu\text{L}$  1%-tne mravlje kiseline i potom se inkubira na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Na svaki potpuno osušeni uzorak pipetom se dodaje 5  $\mu\text{L}$  2AB-a, stavlja ih se na tresilicu kroz 5 minuta, a zatim se 30 minuta inkubiraju na 65 °C. Nakon toga su ponovo miješani 5 minuta na tresilici kako bi se uzorak i sredstvo za označavanje dobro izmiješali. Na kraju su stavljani još 90 minuta na inkubaciju na 65 °C. Višak 2AB-a uklanja se 3-milimetarskim kromatografskim papirom (Whatman, SAD) koji je prethodno ispran u vodi, osušen na 65 °C, presavijen dva puta te izrezan na komadiće od 1  $\text{cm}^2$ . U svaki bazenčić nove filter pločice (prethodno isprana s po 200  $\mu\text{L}$  acetonitrila i vode te osušena pomoću vakuum pumpe) stavljen je kromatografski papir na kojeg se potom prenosi čitav uzorak. Uzorak se ostavlja sušiti kroz 15 minuta nakon čega se u svaki bazenčić stavlja 1,6 mL acetonitrila pa se pločica kroz 15 minuta stavlja na tresilicu, a potom se acetonitril uklanja vakuumom. Nakon što se opisani postupak ponovi još 4 puta, filter pločica se stavlja na čistu pločicu za sakupljanje uzoraka, dodaje se 500  $\mu\text{L}$  destilirane vode te se ponovno stavlja na tresilicu kroz idućih 15 minuta. Po uklanjanju vakuumom, glikani i voda su uhvaćeni u čistu pločicu. Ovaj postupak se ponovi još 2 puta

nakon čega se pločice s uzorcima na iduća dva dana stavljaju u vakuum centrifugu. Tako osušeni glikani ponovo se otapaju u poznatoj količini vode.

#### **4.2.8. Određivanje *N*-glikanskih struktura**

Otpušteni glikani analiziraju se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koja se zasniva na hidrofilnim interakcijama (HILIC) na kolonama veličine 250 x 4.6 mm s unutrašnjim promjerom čestica od 5 $\mu$ m ("TSKgel Amide 80", Tosoh Bioscience, Njemačka) na 30 °C u 50 mM mravlje kiseline (pH 4,4) te otopine amonijaka i acetonitrila. Svaka kromatografija traje 60 minuta uz fluorescentni detektor s ekscitacijskom valnom duljinom od 330 nm i emisijskom od 420 nm. Sustav se kalibrira pomoću vanjskog standarda hidroliziranih i 2AB obilježenih oligomera glukoze čija su retencijska vremena pretvorena u glukozne jedinice (GU, engl. glucose units). Glikani se dodatno razdvajaju prema broju sijalinskih kiselina pomoću "Prozyme GlycoSep C" kolone, 75mm x 7.5mm (ProZyme, SAD) na 30 °C s 20 % acetonitriлом u destiliranoj vodi i 0.1 M octenom kiselinom (pH 7,0) s otopinom amonijaka u 20 % acetonitriлу. Na kraju se radi određivanja strukture *N*-glikana provodi usporedba s referentnim vrijednostima iz baze podataka 'Glyco – Base' (<http://glycobase.nibr.ie>).

#### **4.3. Statistička obrada podataka**

Učestalost genotipova (Val/Val, Val/Met i Met/Met) i alela (Val, Met) obzirom na polimorfizam gena *BDNF* (*BDNF* Val66Met ili rs 6265) u ispitivanim uzorcima uspoređena je pomoću  $\chi^2$ -testa koji je također korišten kako bi se provjerilo da li postoji odstupanje distribucije genotipova od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Dodatni izračun vrijednosti standardiziranih reziduala „R“ korišten je kako bi se utvrdilo koji od genotipova polimorfizma Val66Met gena za *BDNF* doprinosi statistički značajnoj razlici dobivenoj  $\chi^2$ -testom između istraživanih skupina djece.

Rezultati vezani za demografske podatke prikazani su kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD) nakon što je provjereno odstupanje od normalne distribucije podataka Kolmogorov-Smirnovim testom. Za statističku obradu normalno distribuiranih podataka korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), nakon koje su pojedine skupine evaluirane pomoću metode multiple komparacije s Tukeyovim testom. Studentov t-test je korišten samo kad su se uspoređivale dvije skupine normalno distribuiranih podataka.

Za usporedbu ITM-a između nosioca Val/Val, Val/Met i Met/Met genotipa polimorfizma Val66Met gena *BDNF* korištena je Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova radi odstupanja podataka od normalne distribucije. Mann-Whitneyev test rangova je korišten kada su uspoređene dvije skupine podataka koje su odstupale od normalne distribucije.

Kod određivanja vrijednosti *N*-glikana, normalna distribucija svih glikanskih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom da je utvrđeno odstupanje od normalne distribucije većine varijabli i s obzirom na mali broj ispitanika u skupini preuhranjene i pretile djece ( $N < 20$ ), za analizu povezanosti ITM-a i glikanskih varijabli su korišteni neparametrijski testovi (Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova nakon koje je usporedba između dvije skupine podataka učinjena pomoću Mann-Whitneyevog U-testa). Ti su rezultati, koji su odstupali od normalne distribucije podataka, prikazani kao medijani i vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila).

Odstupanja su smatrana statistički značajnima ako je  $p$  bio manji od 0,05. Za statističku obradu podataka korišten je računalni program SigmaStat 3.5 (Jandell Scientific Corp., USA).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Demografski podaci

U našem istraživanju sudjelovalo je 93 djece (49 dječaka i 44 djevojčice) koja su prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila (35) i CDC kriterijima lomnih vrijednosti podijeljena u tri skupine: normalno uhranjena djeca (<85 centila), preuhranjena (≥85 - 95 centile) i pretila djeca (≥95 centila).

Od 93 djece uključenih u istraživanje njih 78,5% djece imalo normalnu tjelesnu masu, 10,75% djece bilo je preuhranjeno, a 10,75% djece bilo je pretilo. Među ispitanicima nije bilo neuhranjene djece.

Kako bi se provjerilo postoje li razlike po spolu, usporedbom podataka pomoću t-testa ustanovljeno je da ne postoji značajna razlika u dobi ( $p=0,849$ ), ITM-u ( $p=0,399$ ), visini ( $p=0,082$ ) i tjelesnoj masi ( $p=0,242$ ) između dječaka i djevojčica (Tablica 3).

**Tablica 3: Demografski podaci muških i ženskih ispitanika.** Svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

	Muška djeca (N=49)	Ženska djeca (N=44)	t-test df=91	
			t	P
Dob (godine)	6,1 ± 0,3	6,1 ± 0,3	-0,191	0,849
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	17,3 ± 3,3	16,7 ± 3,5	0,848	0,399
Visina (m)	122,0 ± 5,5	119,9 ± 6,2	1,758	0,082
Masa (kg)	26,0 ± 6,3	24,4 ± 7,2	1,177	0,242

Ta je statistička obrada podataka pokazala da nema značajne razlike između dječaka i djevojčica u vrijednostima za dob, ITM-e, visinu i tjelesnu masu. Temeljem toga nalaza u daljnjoj obradi podataka, vezanih za raspodjelu genotipova gena *BDNF* s obzirom na polimorfizam Val66Met i podataka vezanih za vrijednosti *N*-glikana u plazmi, skupine djece podijeljene prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila promatrane su bez dodatne podjele po spolu.

Demografski podaci ispitanika podijeljenih prema skupinama s obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila prikazani su u Tablici 4. Statističkom obradom podataka (ANOVA nakon koje slijedi Tukeyov test) pokazano je, prema očekivanju, da pretila i preuhranjena djeca imaju značajno veći ITM, visinu i masu ( $p < 0,001$ ) u odnosu na normalno uhranjenu djecu. Između ispitivanih skupina nije bilo značajne razlike u dobi ispitanika (Tablica 4).

**Tablica 4. Demografski podaci ispitanika podijeljenih prema skupinama s obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila.** Svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. N predstavlja broj ispitanika po skupini.

	Skupine djece prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila				ANOVA	
	Normalno uhranjena djeca (N=73)	Preuhranjena djeca (N=10)	Pretila djeca (N=10)	df=2, 90		
				F	P	
Dob (godine)	6,1 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 0,0	0,287	0,752	
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	15,6 $\pm$ 1,5	20,5 $\pm$ 1,0*	24,4 $\pm$ 3,1',**	143,023	<0,001	
Visina (m)	119,7 $\pm$ 5,5	124,4 $\pm$ 3,9***	127,2 $\pm$ 5,3*	11,057	<0,001	
Masa (kg)	22,4 $\pm$ 3,1	31,8 $\pm$ 2,9*	39,6 $\pm$ 6,5',**	120,997	<0,001	

\*  $p < 0,001$  u odnosu na normalno uhranjenu djecu; \*\*  $p < 0,001$  u odnosu na djecu s prekomjernom tjelesnom masom; \*\*\*  $p = 0,027$  u odnosu na normalno uhranjenu djecu (Tukeyev test).

Iako se svi djevojčice i dječani nisu razlikovali u vrijednostima ITM-a, visine i tjelesne mase, kako bi dodatno provjerili postoje li spolno ovisne razlike, demografske podatke vezane za dob, ITM-e, visinu i tjelesnu masu, ali podijeljene prema skupinama s obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila, skupine su prikazane posebno u muških i ženskih ispitanika u Tablici 5.

U istraživanje je bilo uključeno 73,5% dječaka koji su imali normalnu tjelesnu masu, 16,3% preuhranjnih dječaka i 10,2% pretilih dječaka, te 84,1% djevojčica sa normalnom tjelesnom masom, 4,5% preuhranjnih djevojčica i 11,4% pretilih djevojčica.

U Tablici 5 je pokazano da nije bilo značajne razlike u dobi unutar skupina djevojčica ili dječaka. Jednosmjerna ANOVA i Tukeyev test višestruke usporedbe su pokazali da pretili i preuhranjeni dječaci, te pretile i preuhranjene djevojčice, imaju značajno veći ITM i tjelesnu masu ( $p < 0,001$ ) u odnosu na odgovarajuće normalno uhranjene dječake i djevojčice. Visina se značajno ( $p < 0,001$ ) razlikovala unutar skupina djevojčica ali ne i unutar skupina dječaka podijeljenih u pretile,



prehranjene i normalno uhranjene. Naime, pretile djevojčine su bile značajno više nego normalno uhranjene djevojčice (Tablica 5).

Usporedba između muških i ženskih ispitanika je pokazala da se dob djevojčica i dječaka ne razlikuje značajno između skupina podijeljenih obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila (Tablica 5).

**Tablica 5: Demografski podaci muških i ženskih ispitanika podijeljenih prema skupinama s obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila.** Svi rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Skupine djece prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila						
	Muška djeca			Ženska djeca		
	Normalno uhranjena (N=36)	Preuhranjena (N=8)	Pretila (N=5)	Normalno uhranjena (N=37)	Preuhranjena (N=2)	Pretila (N=5)
Dob (godine)	6,1 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,0	6,1 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0
	F=0,198; df=2,46; p=0,821			F=0,167; df=2,41; p=0,847		
	F=0,153; df=5, 87; p=0,979 (za sve ispitanike)					
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	15,6 $\pm$ 1,5	20,4 $\pm$ 1,1*	24,5 $\pm$ 1,8***	15,5 $\pm$ 1,5	21,0 $\pm$ 0,2*	24,3 $\pm$ 4,2*
	F=96,477; df=2,46; p<0,001			F=50,851; df=2,41; p<0,001		
	F=49,210; df=5, 87; p<0,001 (za sve ispitanike)					
Visina (m)	121,0 $\pm$ 5,4	124,4 $\pm$ 4,4	125,5 $\pm$ 6,4	118,4 $\pm$ 5,4	124,5 $\pm$ 0,7	129,0 $\pm$ 3,8*
	F=2,493; df=2,46; p=0,094			F=10,038; df=2,41; p<0,001		
	F=5,648; df=5, 87; p<0,001 (za sve ispitanike)					
Masa (kg)	23,0 $\pm$ 3,4	31,6 $\pm$ 3,2*	38,6 $\pm$ 4,7*; <sup>†</sup>	21,7 $\pm$ 2,7	32,5 $\pm$ 0,0*	40,6 $\pm$ 8,4*; <sup>**</sup>
	F=56,051; df=2,46; p<0,001			F=63,791; df=2,41; p<0,001		
	F=55,656; df=5, 87; p<0,001 (za sve ispitanike)					

\* p<0,001 u odnosu na normalno uhranjenu djecu; \*\* p=0,030 u odnosu na djecu s prekomjernom tjelesnom masom; \*\*\* p<0,001 u odnosu na djecu s prekomjernom tjelesnom masom; <sup>†</sup> p=0,003 u odnosu na djecu s prekomjernom tjelesnom masom.

Vrijednosti ITM-e značajno ( $p < 0,001$ ) su se razlikovale između djevojčica i dječaka podijeljenih obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila, jer su pretili i preuhranjeni dječaci i pretile i preuhranjene djevojčice imale značajno značajno ( $p < 0,001$ ) veće vrijednosti ITM-a nego normalno uhranjeni dječaci i normalno uhranjene djevojčice. Također, pretili dječaci i pretile djevojčice imali su značajno značajno ( $p < 0,001$ ) veće vrijednosti ITM-a nego preuhranjeni dječaci i prehranjene djevojčice (Tablica 5).

Visina je bila značajno ( $p < 0,001$ ) različita između djevojčica i dječaka podijeljenih obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila, jer su pretile djevojčice bile značajno ( $p < 0,001$ ) više nego normalno uhranjene djevojčice (Tablica 5).

Tjelesna masa se značajno ( $p < 0,001$ ) razlikovale između djevojčica i dječaka podijeljenih obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila, jer su pretile i preuhranjene djevojčice bile značajno ( $p < 0,001$ ) teže nego normalno uhranjene djevojčice, a preuhranjene djevojčice su bile značajno teže ( $p < 0,001$ ) nego normalno uhranjene djevojčice. Kod skupina dječaka pronađeno je da su pretili dječaci bili značajno ( $p = 0,012$ ) teži nego normalno uhranjeni dječaci (Tablica 5).

Međutim, istražujući moguće razlike izazvane spolom ispitanika, utvrđeno je da nije bilo značajnih ( $p > 0,05$ , Tukeyev test multiple komparacije) razlika povezanih sa spolom između skupina djevojčica i dječaka podijeljenih obzirom na nacionalne referentne vrijednosti centila u dobi, te u vrijednostima ITM-a, visini i tjelesnoj masi (Tablica 5).

Ta je analiza potvrdila da ne postoje značajne razlike između dječaka i djevojčica u vrijednostima za dob, ITM-e, visinu i tjelesnu masu, te su skupine djece podijeljene prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila u daljnjim obradama podataka promatrane bez dodatne podjele po spolu.

## 5.2. Polimorfizam gena *BDNF*

### 5.2.1. Polimorfizam gena *BDNF* s obzirom na nacionalne referentne vrijednosti ITM centila

Nakon genotipizacije uzoraka pomoću metode PCR u stvarnom vremenu, opažene frekvencije genotipova Val/Val, Val/Met i Met/Met ispitivanog polimorfizma Val66Met gena *BDNF* nisu odstupale od Hardy-Weinbergove ravnoteže ( $\chi^2=0,014$ ;  $df=1$ ;  $p=0,907$ ). Odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže nije zabilježeno niti nakon što su djeca podijeljena u tri skupine prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila na normalno uhranjenu djecu, preuhranjena djecu i pretilu djecu (Tablica 6). Također nije bilo odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže ( $\chi^2=1,250$ ;  $df=1$ ;  $p=0,263$ ) kada su zajedno kombinirane skupine djece s prekomjernom tjelesnom masom (preuhranjena i pretila djeca).

**Tablica 6. Hardy-Weinbergova ravnoteža polimorfizma u genu *BDNF***

Skupine djece prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila	Pearsonov $\chi^2$ test (Hardy-Weinbergova ravnoteža)
Normalno uhranjena djeca (N=73)	$\chi^2=0,057$ ; $df=1$ ; $p=0,812$
Preuhranjena djeca (N=10)	$\chi^2=1,715$ ; $df=1$ ; $p=0,190$
Pretila djeca (N=10)	$\chi^2=0,098$ ; $df=1$ ; $p=0,754$

Usporedbom distribucije genotipova Val/Val, Val/Met i Met/Met ( $\chi^2=0,403$ ;  $df=2$ ;  $p=0,818$ ), alela Val i Met ( $\chi^2=0,244$ ;  $df=1$ ;  $p=0,621$ ) i nosioca Met prema Val/Val homozigotima ( $\chi^2=0,160$ ;  $df=1$ ;  $p=0,689$ ) ispitivanog polimorfizma u genu *BDNF* između dječaka i djevojčica uočeno je da nema značajne razlike u učestalosti njihovog pojavljivanja. Ti su podaci uputili da ne postoji značajna razlika u frekvenciji pojavljivanja Val/Val, Val/Met i Met/Met genotipova koja je izazvana spolom.

Budući da nije bilo značajnih razlika ovisnih o spolu djece, razlike u distribuciji genotipova Val/Val, Val/Met i Met/Met i alela Val i Met i za ispitivani polimorfizam u genu *BDNF* i učestalost njihovog pojavljivanja u skupinama djece koja više nisu bila podijeljena po spolu, nego samo prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila, su pokazane i izračunate u Tablici 7. Rezultati su pokazali da nema značajne ( $p>0,05$ ) razlike u distribuciji genotipova Val/Val, Val/Met i Met/Met između ispitivanih skupina. Budući da je pronađeno samo 3 nosioca homozigotnog Met/Met

genotipa u skupini normalno uhranjene djece (4,1%), postoji samo trend prema značajnim razlikama ( $p=0,057$ ), no taj je izračun radi premalog broja podataka u jednoj skupini upitan.

Rezultati su pokazali značajnu razliku u distribuciji alela, jer je distribucija alela Val i Met bila je značajno ( $p=0,017$ ) različita između ispitivanih skupina (Tablica 7).

Upravo radi malog broja nosioca homozigotnog Met/Met genotipa u istraživanoj studiji, nosioci homozigotnog Met/Met genotipa i heterozigotnog Met/Val genotipa kombinirani u jednu zajedničku skupinu nosioca Met alela. Kod skupina podijeljenih na nosioce Met alela i Val/Val homozigote (Tablica 7), utvrđena je značajna razlika u distribuciji nosioca Met alela i Val/Val homozigota između normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece ( $p=0,011$ ).

Kako bi se istražilo koji je genotip odgovoran za značajne razlike dobivene  $\chi^2$  testom, dodatno su izračunate vrijednosti standardiziranih reziduala „R“. Taj je izračun uputio da su razlikama u distribuciji nosioca Met alela prema Val/Val homozigotima ili Val i Met alela između triju skupina djece najviše doprinijeli povećani udio Met alela ( $R=1,96$ ) i povećani udio nosioca Met alela ( $R=1,86$ ) u skupini preuhranjene djece prema ostalim skupinama (Tablica 7).

**Tablica 7. Distribucija alela i genotipova polimorfizma Val66Met gena *BDNF* kod djece podijeljene u tri skupine prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila (normalno uhranjena, preuhranjena i pretila djece).**

<i>BDNF</i> polimorfizam Val66Met	Normalno uhranjena djeca		Preuhranjena djeca		Pretila djeca	
Genotip	N	%	N	%	N	%
Val/Val	48	65,8	2	20	4	40
Val/Met	22	30,1	7	70	5	50
Met/Met	3	4,1	1	10	1	10
$\chi^2=9,190$ ; $df=4$ ; $p=0,057$						
Alel	N	%	N	%	N	%
Val	118	80,8	11	55	13	65
Met	28	19,2	9	45	7	35
$\chi^2=8,091$ ; $df=2$ ; $p=0,017$						
Genotip	N	%	N	%	N	%
Nosioci Met alela	25	34,2	8	80	6	60
Val/Val	48	65,8	2	20	4	40
$\chi^2=9,063$ ; $df=2$ ; $p=0,011$						

Budući da smo željeli istražiti odnose između pojedinih skupina (npr. između normalno uhranjene i pretile djece ili između normalno uhranjene ili preuhranjene djece ili između preuhranjene i pretile djece), unutar rezultata prikazanih u Tablici 7 su uspoređene posebno samo po dvije skupine djece.

Usporedbom samo dviju skupina pokazano je da je distribucija genotipova Val/Val, Val/Met i Met/Met bila značajno različita između između normalno uhranjene i preuhranjene djece ( $\chi^2= 7,690$ ;  $df=2$ ;  $p=0,021$ ), ali se distribucija genotipova nije značajno razlikovala između preuhranjene i pretile djece ( $\chi^2= 1,00$ ;  $df=2$ ;  $p=0,607$ ), ili između normalno uhranjene i pretile djece ( $\chi^2= 2,631$ ;  $df=2$ ;  $p=0,268$ ). Distribucija alela Met i Val bila značajno različita između skupina normalno uhranjene djece i preuhranjene djece ( $\chi^2= 5,363$ ;  $df=1$ ;  $p=0,021$ ), ali podjednaka između normalno uhranjene djece i pretile djece ( $\chi^2= 1,781$ ;  $df=1$ ;  $p=0,182$ ), te između preuhranjene i pretile djece ( $\chi^2= 0,104$ ;  $df=1$ ;  $p=0,747$ ). Nadalje, također je utvrđena značajna razlika u distribuciji nosioca Met alela i Val/Val genotipa između normalno uhranjene i preuhranjene djece ( $\chi^2= 5,896$ ;  $df=1$ ;  $p=0,015$ ). Međutim, nisu pronađene značajne razlike u distribuciji nosioca Met alela i Val/Val genotipa između normalno uhranjene djece i pretile djece ( $\chi^2= 1,514$ ;  $df=$ ;  $p=0,219$ ), ili između preuhranjene i pretile djece ( $\chi^2= 0,238$ ;  $df=1$ ;  $p=0,626$ ).

Ti su rezultati potvrdili da su najveće razlike uočene u distribuciji genotipova, alela i nosica Met prema Val/Val homozigotima, koje su pokazane u Tablici 7, vezane za razlike između normalno uhranjene djece i preuhranjene djece.

**Tablica 8. Distribucija alela i genotipova polimorfizma Val66Met gena *BDNF* kod djece podijeljene u dvije skupine prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila (normalno uhranjena djeca i djeca s prekomjernom tjelesnom masom).**

<i>BDNF</i> polimorfizam Val66Met	Normalno uhranjena djeca		Djeca s prekomjernom tjelesnom masom	
Genotip	N	%	N	%
Val/Val	48	65,8	6	30
Val/Met	22	30,1	12	60
Met/Met	3	4,1	2	10
$\chi^2=8,299$ ; $df=2$ ; $p=0,016$				
Alel	N	%	N	%
Val	118	80,8	24	60
Met	28	19,2	16	40
$\chi^2=6,429$ ; $df=1$ ; $p=0,011$				
Genotip	N	%	N	%
Nosioci Met alela	25	34,2	14	70
Val/Val	48	65,8	6	30
$\chi^2=6,839$ ; $df=1$ ; $p=0,009$				

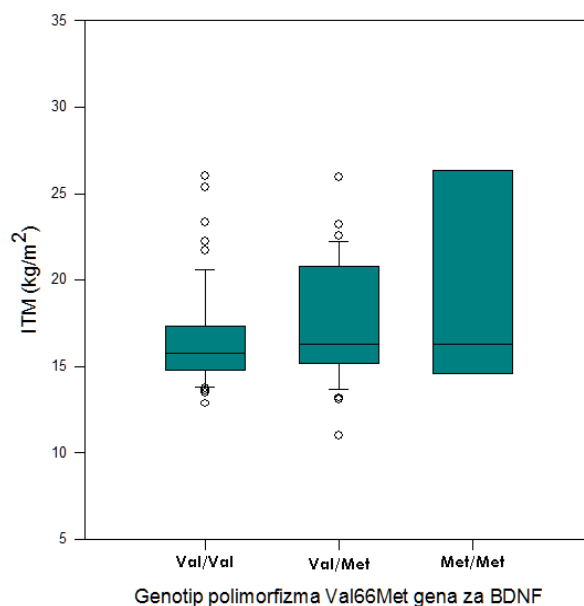
U Tablici 8 prikazana je distribucija genotipova, alela i nosica Met prema Val/Val homozigotima za ispitivani polimorfizam u genu *BDNF* i učestalost njihovog pojavljivanja u skupinama djece podijeljenih prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila u samo dvije skupine: normalno uhranjena djeca i kombinirana skupina djece s prekomjernom tjelesnom masom (koja je uključila preuhranjenu i pretilu djecu).

Rezultati (Tablica 8) su pokazali da postoji značajna razlika ( $p=0,016$ ) u distribuciji genotipova Val/Val, Val/Met i Met/Met između ispitivanih skupina. Distribucija alela Val i Met bila je značajno različita između ispitivanih skupina ( $p=0,011$ ). Nakon što su homozigoti za Met/Met genotip i heterozigoti kombinirani u jednu zajedničku skupinu nosioca Met alela, utvrđena je značajna razlika u distribuciji nosioca Met alela i Val/Val homozigota između normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom ( $p=0,009$ ). Dodatni izračuni vrijednosti standardiziranih reziduala „R“ uputili su da svim dobivenim razlikama u distribuciji genotipova, alela i nosioca Met između dviju skupina djece najviše doprinosi povećani udio djece s Val/Met genotipom ( $R=1,73$ ), povećani udio djece s alelom Met ( $R=2,13$ ) i povećani udio nosioca Met alela ( $R=1,94$ ) u skupini djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu (Tablica 8).

Ti su rezultati potvrdili da su značajne razlike uočene u distribuciji genotipova, alela i nosica Met prema Val/Val homozigotima vezane za razlike između normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.

### **5.2.2. Polimorfizam gena *BDNF* i indeks tjelesne mase (ITM)**

Kako bi se detaljnije provjerila povezanost *BDNF* Val66met polimorfizma i pretjerane tjelesne mase, sva su djeca podijeljena prema svojim vrijednostima ITM-a u tri skupine nosioce Val/Val, Val/Met i Met/Met genotipa. Vrijednosti ITM-a nisu se značajno ( $H=1,769$ ;  $df=2$ ;  $p=0,413$ ; Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova) razlikovale između nosioca Val/Val, Val/Met i Met/Met genotipa obzirom na polimorfizam Val66Met gena *BDNF* (Slika 9). Rezultati su u Slici 9 prikazani na način da pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti ITM-a (vrijednosti koje odstupaju, tzv. „outside“ i „far out“ vrijednosti, prikazane su kao izdvojene točke).



**Slika 9. Indeks tjelesne mase kod djece s obzirom na genotip polimorfizma Val66Met gena *BDNF*.**

Kad su djeca bila podijeljena na način da su homozigoti za Met/Met genotip i heterozigoti kombinirani u jednu zajedničku skupinu nosioca Met alela, prema Val-Val homozigotima, također nije dobivena značajna razlika u distribuciji nosioca Met alela i Val/Val homozigota između normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom ( $p=0,186$ , Mann-Whitney test).

### **5.3 Razina *N*-glikana u plazmi kao pokazatelj prekomjerne tjelesne mase u djece**

#### **5.3.1. Profil *N*-glikana u plazmi razdvojenih na 16 sijaliziranih kromatografskih vršaka (GP serija) metodom HILIC**

Varijabilnosti *N*-glikana plazme između skupina djece podijeljenih prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila analizirana je nakon deglikozilacije tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (HILIC). Promatrani pokazatelji *N*-glikana plazme nakon deglikozilacije su relativni udjeli pojedinih grupa glikana koji su prisutni u određenom integracijskom području u odnosu na cijelu integriranu površinu kromatograma. Dobiveni pokazatelji su dalje statistički analizirani kako bismo utvrdili kolika je varijabilnost pojedinog glikana između skupina djece.

Normalna distribucija svih glikanskih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. S obzirom na odstupanja od normalne distribucije većine varijabli i s obzirom na mali broj ispitanika u skupini

preuhranjene i pretile djece ( $N < 20$ ), za analizu su korišteni neparametrijski testovi (Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova i Mann-Whitney test).

Usporedba svih pokazatelja *N*-glikana plazme ovisno o spolu djeteta pokazala je da se promatrani pokazatelji značajno ( $p \geq 0,05$ ) ne razlikuju između dječaka i djevojčica pa su u svim daljnjim analizama zajedno kombinirani podaci za oba spola.

Razine glikanskih grupa dobivenih nakon HILIC analize uspoređene su između skupina normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece (Tablica 9) te između skupine normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom (Tablica 10).

Djeca su podijeljena u te skupine prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila.



**Tablica 9. Razine glikanskih grupa dobivenih nakon HILIC analize uspoređene u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretila djece.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=73				Preuhranjena djeca N=10				Pretila djeca N=10				Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova df=2	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	H	p
		25%	75%			25%	75%			25%	75%			
GP1	0,07	0,05	0,10	0,09±0,08	0,11	0,05	0,22	0,14±0,13	0,08	0,05	0,11	0,09±0,04	1,770	0,413
GP2	3,60	3,11	4,08	3,70±0,93	4,06	3,12	4,46	3,82±1,05	3,80	3,23	4,58	3,98±1,00	1,433	0,488
GP3	1,72	1,56	1,90	1,75±0,27	1,65	1,54	1,93	1,72±0,23	1,63	1,47	1,77	1,61±0,17	2,355	0,308
GP4	5,76	4,98	6,18	5,72±1,12	6,23	5,14	6,37	5,86±0,92	5,66	5,12	6,04	5,75±1,19	0,776	0,679
GP5	2,15	1,96	2,46	2,26±0,39	2,11	1,95	2,19	2,07±0,15	1,92*	1,77	2,07	1,96±0,26	7,048	<b>0,029</b>
GP6	4,38	4,06	4,92	4,49±0,64	4,42	4,21	4,60	4,40±0,29	4,01	3,80	4,39	4,23±0,78	2,917	0,233
GP7	8,78	8,20	9,32	9,16±2,03	8,59	8,40	9,25	8,79±0,77	8,11*	7,60	8,33	7,99±0,98	7,711	<b>0,021</b>
GP8	11,40	10,65	12,06	11,33±0,97	10,64	9,94	11,01	10,65±1,00	10,34*	9,65	10,96	10,13±1,35	10,105	<b>0,006</b>
GP9	38,23	37,08	39,88	38,17±2,30	39,22	38,14	40,54	39,28±2,53	39,16	38,44	41,29	39,59±2,45	4,692	0,096
GP10	6,22	5,58	6,52	6,13±0,68	6,04	5,73	7,20	6,34±1,03	6,11	5,95	6,45	6,21±0,34	0,041	0,980
GP11	1,02	0,92	1,14	1,04±0,18	1,02	0,91	1,12	1,10±0,33	0,92	0,81	1,08	0,96±0,18	1,939	0,379
GP12	2,09	1,71	2,52	2,12±0,47	1,91	1,48	2,27	1,95±0,49	1,88	1,69	2,38	2,00±0,39	1,737	0,420
GP13	5,88	5,12	6,57	5,94±1,16	6,41	4,62	6,83	6,02±1,15	6,29	5,74	6,63	6,10±0,97	0,603	0,740
GP14	5,57	4,85	6,36	5,67±1,25	5,52	4,89	5,82	5,44±0,93	6,71***	5,95	7,37	6,86±1,26	7,753	<b>0,021</b>
GP15	0,77	0,58	1,04	0,82±0,27	0,79	0,51	1,08	0,79±0,26	0,70	0,54	0,90	0,76±0,26	0,522	0,770
GP16	1,60	1,22	1,96	1,62±0,45	1,51	1,29	2,16	1,63±0,45	1,71	1,51	2,11	1,79±0,45	1,404	0,496

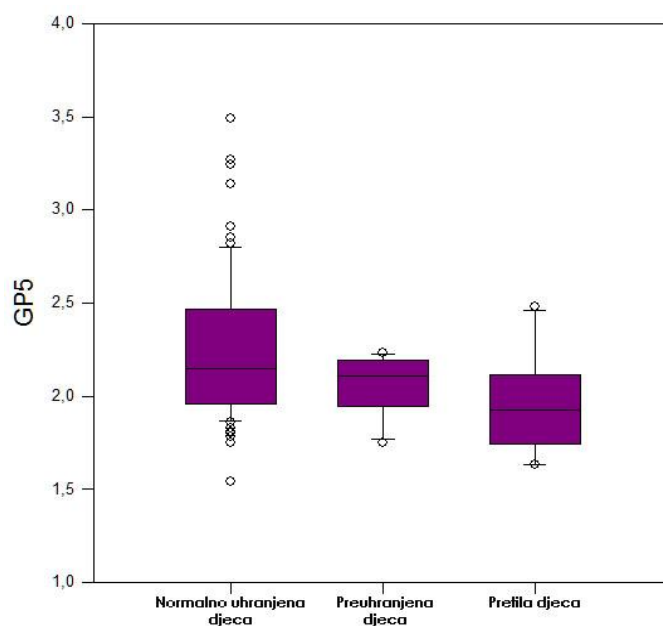
\* p<0,05 u odnosu na normalno uhranjenu djecu

\*\* p<0,05 u odnosu na preuhranjenu djecu

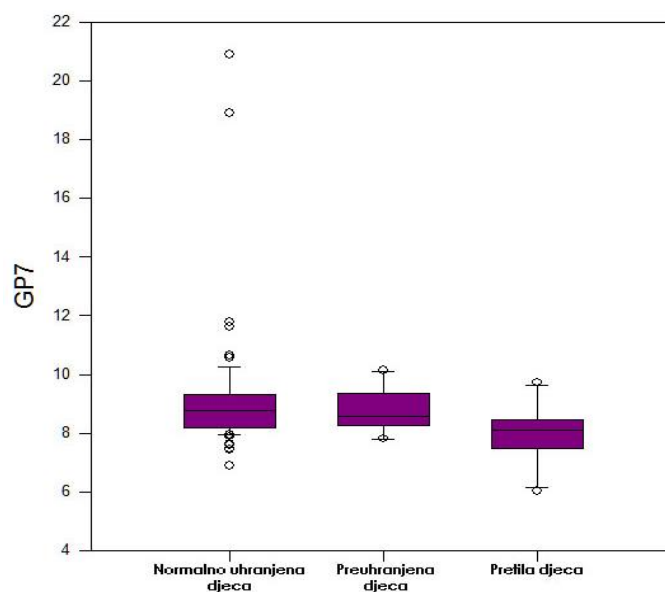
**Tablica 10. Razine glikanskih grupa dobivenih nakon HILIC analize uspoređene u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=73				Djeca s prekomjernom tjelesnom masom N=20				Mann-Whitney test	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Z	p
		25%	75%			25%	75%			
GP1	0,07	0,05	0,10	0,09±0,08	0,09	0,05	0,10	0,12±0,10	-1,315	0,188
GP2	3,60	3,11	4,08	3,70±0,93	3,84	3,18	4,47	3,90±1,00	-1,174	0,241
GP3	1,72	1,56	1,90	1,75±0,27	1,64	1,52	1,81	1,64±1,52	-1,235	0,217
GP4	5,76	4,98	6,18	5,72±1,12	5,91	5,13	6,35	5,81±1,04	-0,594	0,553
GP5	2,15	1,96	2,46	2,26±0,39	2,01	1,92	2,16	2,01±0,22	-2,441	<b>0,015</b>
GP6	4,38	4,06	4,92	4,49±0,64	4,26	3,91	4,59	4,32±0,58	-1,202	0,229
GP7	8,78	8,20	9,32	9,16±2,03	8,36	7,82	9,02	8,39±0,95	-2,020	<b>0,043</b>
GP8	11,40	10,65	12,06	11,33±0,97	10,64	9,81	10,98	10,39±1,18	-3,147	<b>0,002</b>
GP9	38,23	37,08	39,88	38,17±2,30	39,16	38,31	40,92	39,44±2,43	-2,146	<b>0,032</b>
GP10	6,22	5,58	6,52	6,13±0,68	6,11	5,87	6,52	6,28±0,75	-0,196	0,844
GP11	1,02	0,92	1,14	1,04±0,18	1,02	0,82	1,10	1,02±0,27	-0,856	0,392
GP12	2,09	1,71	2,52	2,12±0,47	1,91	1,62	2,33	1,97±0,43	-1,276	0,202
GP13	5,88	5,12	6,57	5,94±1,16	6,31	5,18	6,73	6,06±1,04	-0,748	0,454
GP14	5,57	4,85	6,36	5,67±1,25	5,88	5,42	6,88	6,15±1,30	-1,515	0,130
GP15	0,77	0,58	1,04	0,82±0,27	0,74	0,53	0,94	0,77±0,25	-0,706	0,480
GP16	1,60	1,22	1,96	1,62±0,45	1,61	1,36	2,14	1,71±0,44	-0,907	0,364

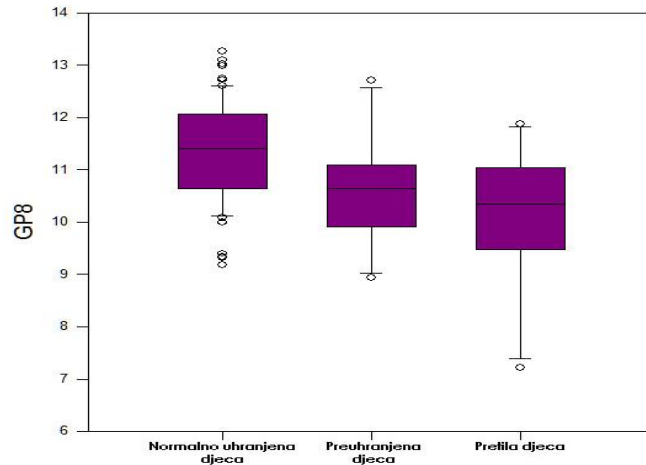
Statistička obrada rezultata je utvrdila promjene u glikanima plazme s obzirom na uhranjenost djece. Pokazano je da postoji smanjenje u razini glikana koji pripadaju grupama GP5 (Slika 10), GP7 (Slika 11) i GP8 (Slika 12) kod pretile djece u odnosu na normalno uhranjenu djecu, te povećanje u razini glikana koji pripadaju grupi GP14 (Slika 13) kod pretile djece u odnosu na normalno uhranjenu i preuhranjenu djecu. Slike promjena glikana u prikazane na način da pravokutnik predstavlja vrijednosti od donjeg do gornjeg kvartila (od 25. do 75. percentila), a središnja linija predstavlja medijan. Horizontalne linije se pružaju od minimalne do maksimalne vrijednosti ITM-a (vrijednosti koje odstupaju (tzv. „outside“ i „far out“ vrijednosti) prikazane su kao izdvojene točke.



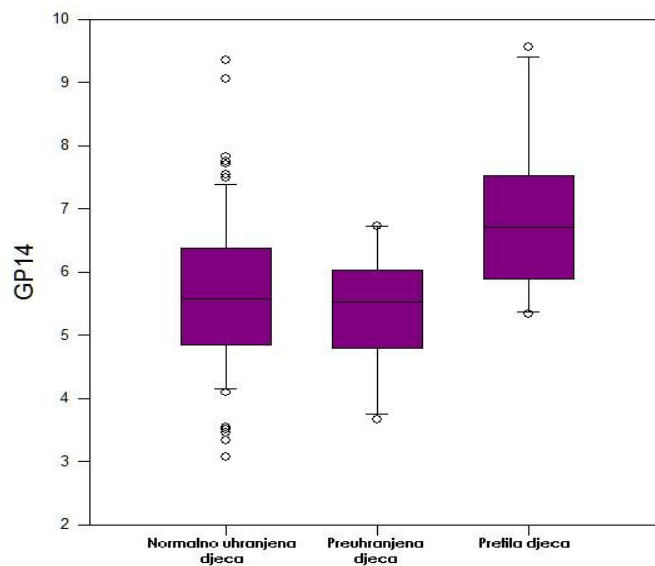
**Slika 10. Razina glikana grupe GP5 u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**



**Slika 11. Razina glikana grupe GP7 u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

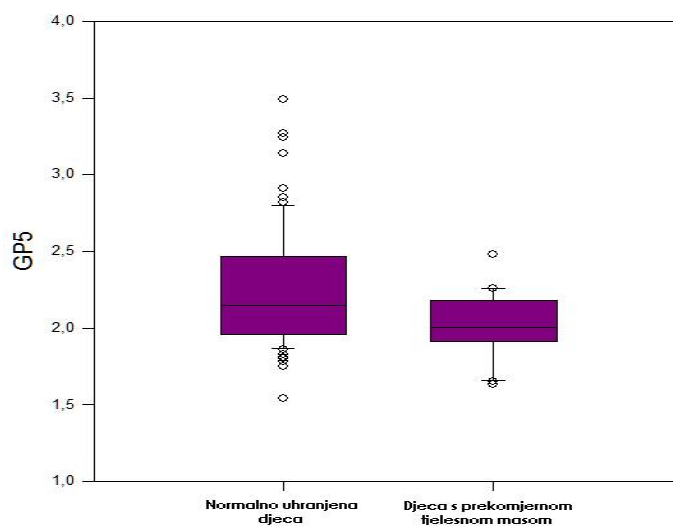


**Slika 12. Razina glikana grupe GP8 u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

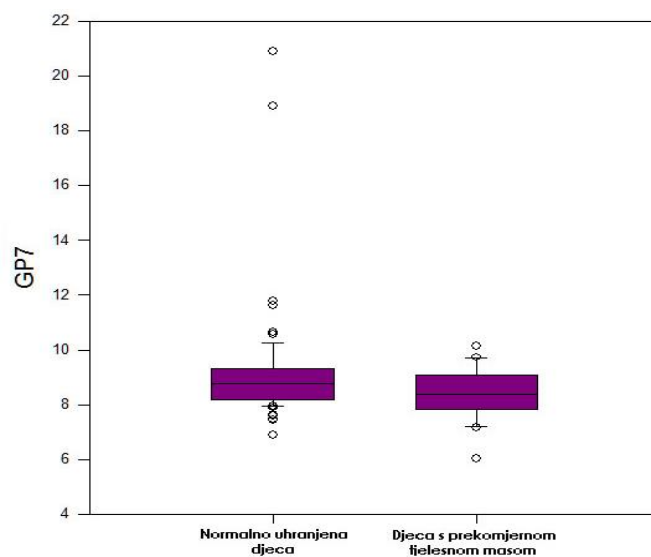


**Slika 13. Razina glikana grupe GP14 u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

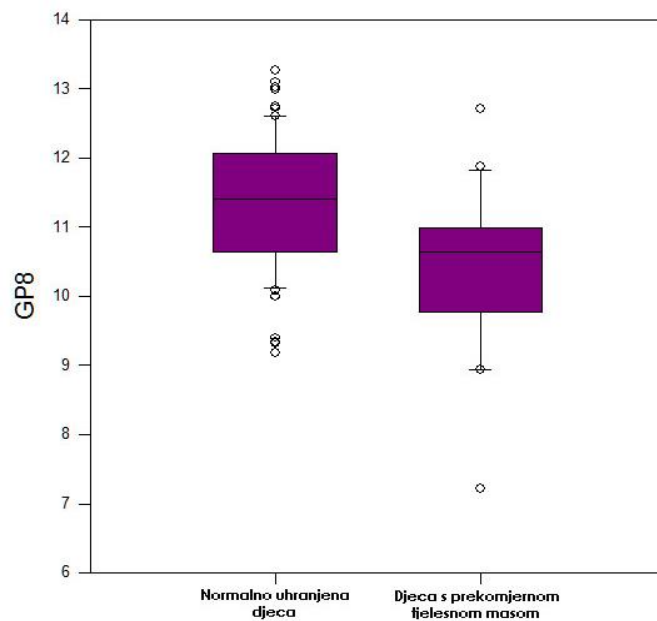
Statistička obrada rezultata pokazala je da postoji i smanjenje u razini glikana koji pripadaju grupama GP5 (Slika 14), GP7 (Slika 15) i GP8 (Slika 16) te povećanje u razini glikana koji pripadaju grupi GP9 (Slika 17) kod djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu.



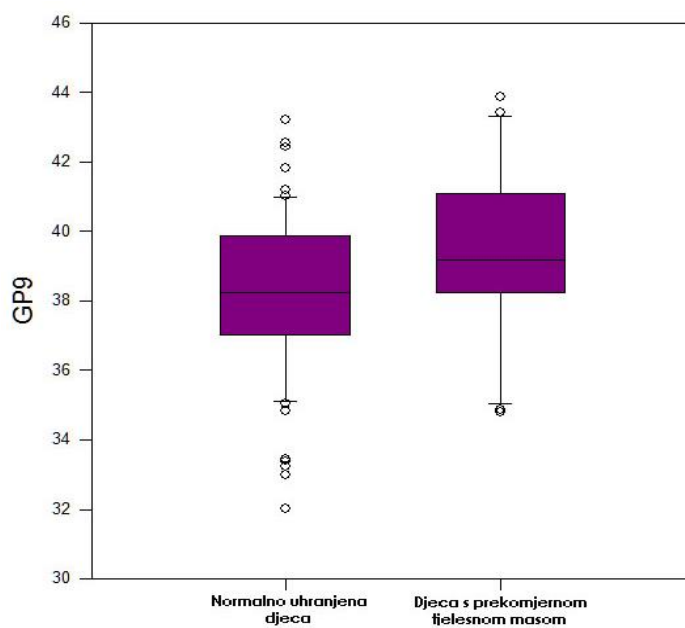
**Slika 14.** Razina glikana grupe GP5 u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.



**Slika 15.** Razina glikana grupe GP7 u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.



Slika 16. Razina glikana grupe GP8 u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.



Slika 17. Razina glikana grupe GP9 u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.

### 5.3.2. Profil N-glikana u plazmi razdvojenih na 13 desijaliziranih kromatografskih vršaka (DG serija) metodom HILIC

Varijabilnosti N-glikana plazme između skupina djece podijeljenih prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila analizirana je dodatno HILIC HPLC-om nakon desijalinizacije. Promatrani

parametri *N*-glikana plazme nakon desijalizacije su relativni udjeli pojedinih grupa glikana koji su prisutni u određenom integracijskom području u odnosu na cijelu integriranu površinu kromatograma. Dobiveni parametri su dalje statistički analizirani kako bi utvrdili kolika je varijabilnost pojedinog glikana između skupina djece.

Normalna distribucija svih 13 glikanskih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom, a zbog odstupanja većine varijabli od normalne distribucije i zbog malog broja ispitanika u skupini preuhranjene i pretile djece ( $N < 20$ ) za analizu su korišteni neparametrijski testovi (Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova i Mann-Whitney test).

Razine glikanskih grupa dobivenih nakon HILIC analize uspoređene su između skupina normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece (Tablica 11) te između skupine normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom (Tablica 12). Djeca su podijeljena u navedene skupine prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila.

**Tablica 11. Razine desijaliziranih glikanskih grupa dobivenih nakon HILIC analize uspoređene u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretila djece.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=73				Preuhranjena djeca N=10				Pretila djeca N=10				Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova df=2	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	H	p
		25%	75%			25%	75%			25%	75%			
DG1	0,01	0,08	0,14	0,12±0,08	0,12	0,08	0,27	0,18±0,13	0,12	0,08	0,14	0,12±0,04	1,664	0,435
DG2	3,68	3,14	4,31	3,88±0,97	4,22	3,31	4,63	3,99±1,00	3,99	3,52	4,66	4,00±0,99	0,906	0,636
DG3	2,45	2,18	2,76	2,49±0,41	2,30	2,11	2,57	2,41±0,37	2,09*	2,01	2,24	2,14±0,18	8,871	<b>0,012</b>
DG4	6,84	5,97	7,41	6,83±1,19	7,16	6,67	7,62	6,96±0,86	6,61	6,05	7,14	6,78±1,30	0,807	0,668
DG5	48,99	46,57	51,86	49,24±4,60	50,76	47,94	53,6	50,11±4,81	48,52	47,42	49,54	48,56±3,17	0,729	0,695
DG6	14,71	12,95	16,62	15,12±2,99	13,36	12,40	14,85	14,21±3,17	13,64	12,83	14,39	13,90±1,99	2,241	0,326
DG7	1,45	1,16	1,78	1,69±1,43	1,39	1,28	2,21	1,63±0,61	1,52	1,08	1,79	1,53±0,62	0,154	0,926
DG8	11,35	9,96	12,68	11,36±1,84	11,86	9,59	12,51	11,32±1,71	12,01	11,25	13,02	12,06±1,54	1,622	0,444
DG9	3,11	2,58	3,90	3,34±1,11	2,83	2,35	3,55	3,01±0,90	3,50	3,15	4,41	3,88±0,99	4,400	0,111
DG10	0,93	0,82	1,06	0,96±0,18	1,04	0,91	1,11	1,02±0,12	1,14*	0,90	1,22	1,08±0,18	7,084	<b>0,029</b>
DG11	2,90	2,38	3,51	2,94±0,73	2,78	2,62	3,58	2,95±0,74	2,84	2,72	3,36	3,14±0,88	0,275	0,872
DG12	0,81	0,72	1,07	0,92±0,38	0,77	0,62	1,10	0,86±0,30	1,16	0,87	1,35	1,14±0,32	4,807	0,090
DG13	0,81	0,71	1,18	1,12±0,89	0,91	0,77	1,31	1,34±1,02	1,06	0,82	1,73	1,65±1,74	4,738	0,094

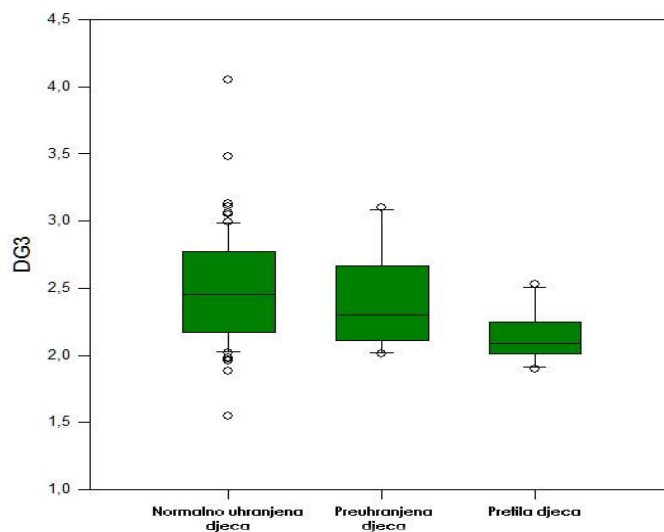
\* p<0,05 u odnosu na normalno uhranjenu djecu



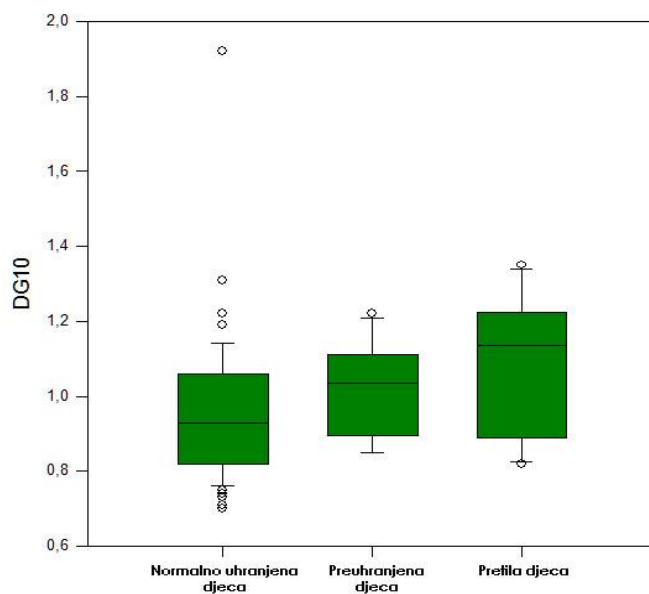
**Tablica 12. Razine desijalizirani glikanskih grupa dobivenih nakon HILIC analize uspoređene u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=73				Djeca s prekomjernom tjelesnom masom N=20				Mann-Whitney test	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Z	p
		25%	75%			25%	75%			
DG1	0,01	0,08	0,14	0,12±0,08	0,12	0,08	0,19	0,15±0,10	-1,178	0,239
DG2	3,68	3,14	4,31	3,88±0,97	4,01	3,42	4,64	4,00±0,97	-0,944	0,345
DG3	2,45	2,18	2,76	2,49±0,41	2,24	2,04	2,38	2,27±0,31	-2,455	<b>0,014</b>
DG4	6,84	5,97	7,41	6,83±1,19	6,88	6,06	7,61	6,87±1,08	-0,327	0,743
DG5	48,99	46,57	51,86	49,24±4,60	48,52	47,56	53,18	49,34±4,05	-0,206	0,837
DG6	14,71	12,95	16,62	15,12±2,99	13,56	12,47	14,62	14,06±2,58	-1,487	0,137
DG7	1,45	1,16	1,78	1,69±1,43	1,41	1,12	1,90	1,58±0,60	-0,136	0,892
DG8	11,35	9,96	12,68	11,36±1,84	11,98	10,69	12,82	11,69±1,63	-0,949	0,343
DG9	3,11	2,58	3,90	3,34±1,11	3,30	2,72	4,13	3,44±1,02	-0,589	0,556
DG10	0,93	0,82	1,06	0,96±0,18	1,06	0,91	1,16	1,05±0,15	-2,568	<b>0,010</b>
DG11	2,90	2,38	3,51	2,94±0,73	2,81	2,66	3,47	3,04±0,80	-0,421	0,674
DG12	0,81	0,72	1,07	0,92±0,38	0,99	0,71	1,17	1,00±0,33	-1,062	0,288
DG13	0,81	0,71	1,18	1,12±0,89	0,96	0,82	1,52	1,50±1,40	-2,123	<b>0,034</b>

Uočeno je da postoji smanjenje u razini glikana koji pripadaju grupi DG3 (Slika 18) te povećanje u razini glikana koji pripadaju grupi GP10 (Slika 19) kod pretile djece u odnosu na normalno uhranjenu djecu.

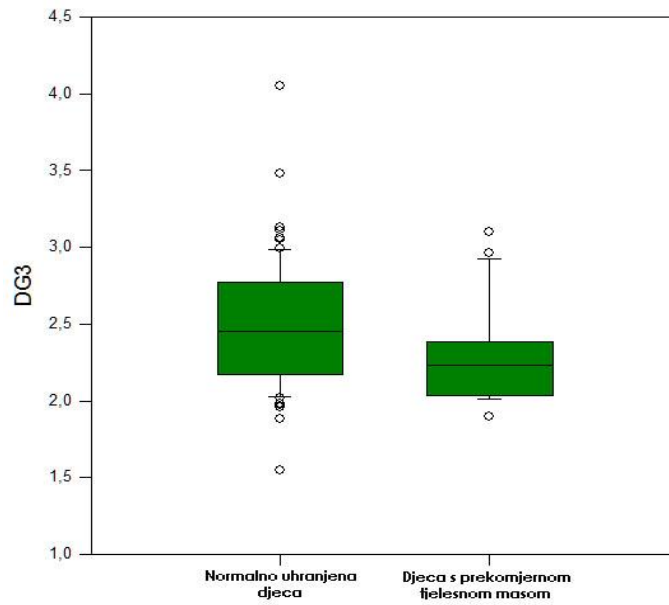


**Slika 18. Razina glikana grupe DG3 u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

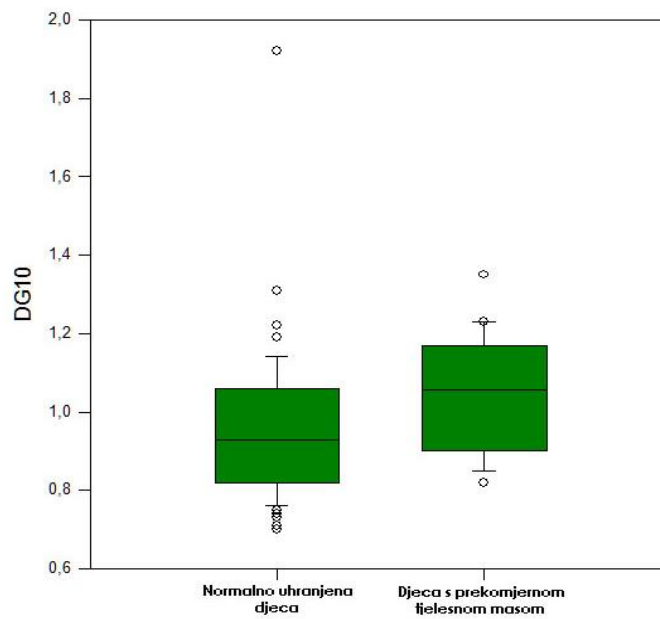


**Slika 19. Razina glikana grupe DG10 u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

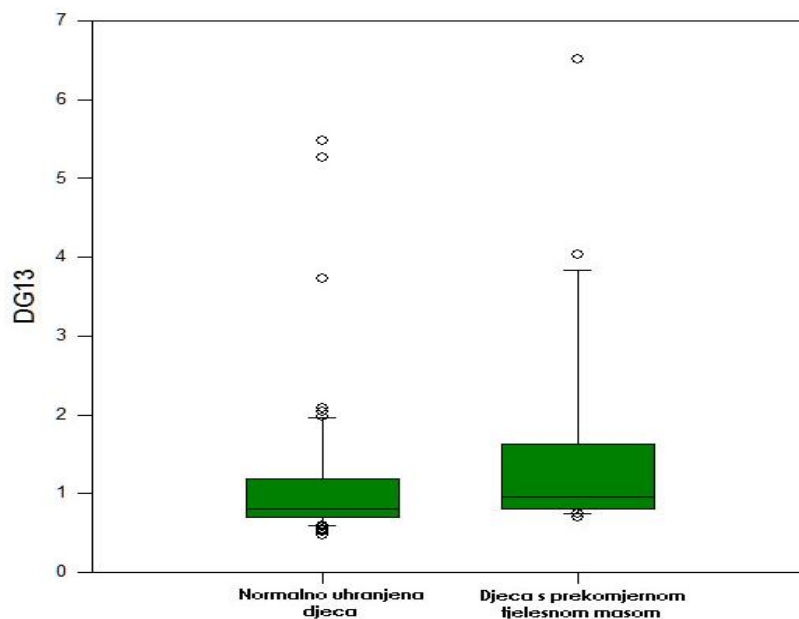
Statistička obrada rezultata je utvrdila da postoji i smanjenje u razini glikana koji pripadaju grupi DG3 (Slika 20) te povećanje u razini glikana koji pripadaju grupama DG10 (Slika 21) i DG13 (Slika 22) kod djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu.



**Slika 20. Razina glikana grupe DG3 u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**



**Slika 21. Razina glikana grupe DG10 u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**



Slika 22. Razina glikana grupe DG13 u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.

### 5.3.3. Profil N-glikana u plazmi koji dijele slične strukturne karakteristike

Tablica 13. Skupine glikana koji dijele iste strukturne karakteristike

Oznaka skupine	Strukturna karakteristika skupine	Glikanske strukture unutar skupine
FUC-C	Glikani s fukoziliranom jezgrom	$DG6/(DG5+DG6)*100$
FUC-A	Antenarno fukozilirani glikani	$DG7/(DG5+DG7)*100$
BAMS	Monosijalizirani biantenarni glikani	$(GP7+GP8)/(DG5+DG6+DG7)*100$
BADS	Disijalizirani biantenarni glikani	$(GP9+GP10+GP11)/(DG5+DG6+DG7)*100$
BA	Biantenarni glikani	$DG1+DG2+DG3+DG4+DG5+DG6+DG7$
TRIA	Triantenarni glikani	$DG8+DG9+DG10$
TA	Tetraantenarni glikani	$DG11+DG12+DG13$
G0	Negalaktozilirani glikani	$DG1+DG2$
G1	Monogalaktozilirani glikani	$DG3+DG4$
G2	Digalaktozilirani glikani	$DG5+DG6+DG7$
G3	Trigalaktozilirani glikani	$GP12+GP13+GP14$
G4	Tetragalaktozilirani glikani	$GP15+GP16$
A2	Biantenarni negalaktozilirani glikani	$(GP1+DG1)/2$

Neki od promatranih parametara *N*-glikana plazme, tj. pojedini *N*-glikani koji se nalaze u kromatografskim vršcima dobivenim analizom HILIC HPLC-om, međusobno dijele slične strukturne karakteristike. Razina glikana koji dijele iste strukturne karakteristike aproksimirana je zbrajajući glikanske strukture (kromatografske vrške) koji dijele iste karakteristike. Na ovaj način su određene skupine glikana koji dijele iste strukturne karakteristike (Tablica 13).

Normalna distribucija svih glikanskih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom, a zbog odstupanja većine varijabli od normalne distribucije i zbog malog broja ispitanika u skupini preuhranjene i pretile djece ( $N < 20$ ), za analizu su korišteni neparametrijski testovi (Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova i Mann-Whitney test).

Razine pojedinih skupina glikana uspoređene su između skupina normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece (Tablica 14) te između skupine normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom (Tablica 15).

**Tablica 14. Usporedba razine glikana, podijeljenih u skupine prema istim strukturnim karakteristikama, između skupina normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=73				Preuhranjena djeca N=10				Pretila djeca N=10				Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova df=2	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	H	p
		25%	75%			25%	75%			25%	75%			
FUC-C	23,28	20,28	26,05	23,57±4,86	20,42	19,09	23,49	22,20±5,41	21,90	20,20	22,62	22,28±3,33	2,251	0,324
FUC-A	2,83	2,39	3,42	3,28±2,68	2,77	2,33	4,08	3,14±1,15	2,93	2,18	3,95	3,06±1,24	0,018	0,991
BAMS	30,80	29,42	31,93	30,98±2,53	29,44	28,51	29,99	29,47±1,69	28,54*	27,66	29,85	28,31±2,25	13,291	<b>0,001</b>
BADS	69,01	67,60	70,00	68,71±2,96	70,70	69,12	72,03	70,87±2,52	71,97*	71,16	74,81	73,10±3,87	15,715	<b>0,001</b>
BA	79,37	77,30	81,08	79,37±2,84	79,40	77,75	80,25	79,49±2,25	77,41*	75,70	78,60	77,04±2,09	6,754	<b>0,034</b>
TRIA	15,73	14,42	16,96	15,65±1,98	15,48	14,78	16,20	15,36±1,45	17,03***	16,03	18,24	17,03±1,05	7,177	<b>0,028</b>
TA	4,91	4,12	5,50	4,98±1,35	4,89	4,52	5,54	5,15±1,26	5,44	4,9	5,97	5,93±1,87	3,541	0,170
G0	3,83	3,26	4,46	4,00±0,97	4,37	3,39	4,90	4,17±1,08	4,07	3,71	4,80	4,13±1,00	0,985	0,611
G1	9,11	8,25	9,85	9,32±1,32	9,63	8,90	10,04	9,37±0,97	8,88	8,06	9,38	8,92±1,40	1,604	0,449
G2	66,01	63,71	67,84	66,04±2,88	65,16	64,06	68,68	65,95±2,68	64,29	62,81	64,42	64,00±2,24	4,640	0,098
G3	13,86	11,74	15,12	13,73±2,22	13,62	12,83	14,25	13,41±1,58	14,73	13,93	16,12	14,96±1,32	3,936	0,140
G4	2,49	1,86	2,96	2,44±0,68	2,18	1,91	3,33	2,42±0,69	2,40	2,18	3,08	2,55±0,69	0,219	0,896
A2	0,08	0,06	0,12	0,11±0,06	0,12	0,06	0,24	0,16±0,13	0,10	0,08	0,12	0,11±0,04	1,209	0,546

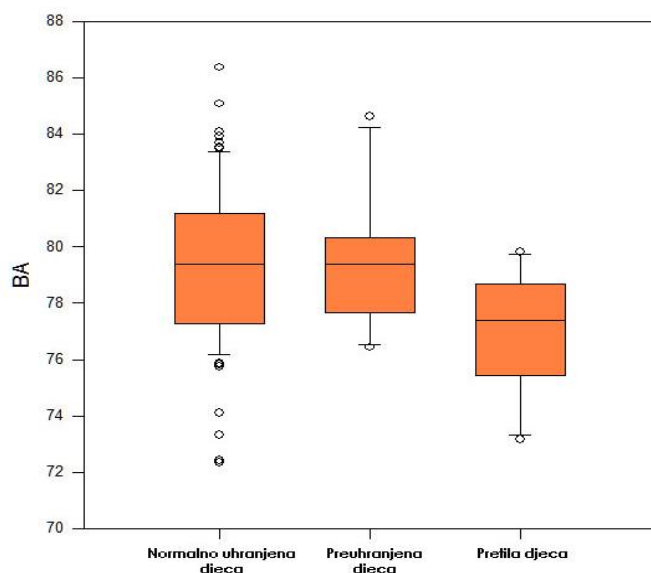
\* p<0,05 u odnosu na normalno uhranjenu djecu

\*\* p<0,05 u odnosu na preuhranjenu djecu

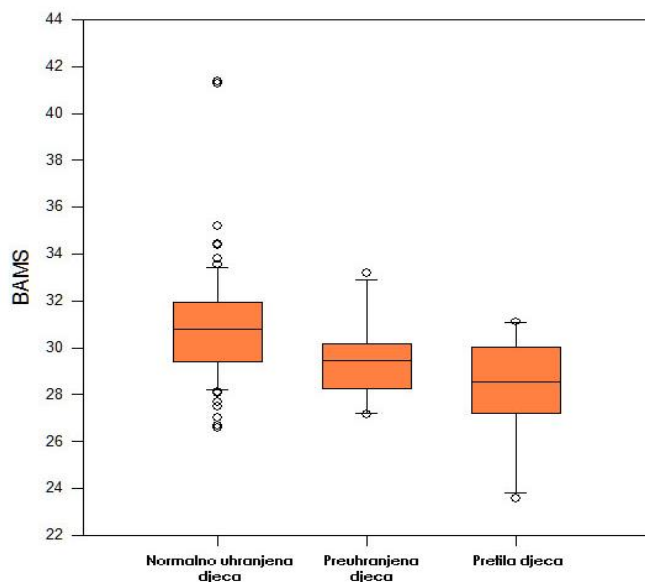
**Tablica 15. Usporedba razine glikana, podijeljenih u skupine prema istim strukturnim karakteristikama, između skupina normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=73				Djeca s prekomjernom tjelesnom masom N=20				Mann-Whitney test	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Z	p
		25%	75%			25%	75%			
FUC-C	23,28	20,28	26,05	23,57±4,86	21,67	19,38	23,06	22,24±4,37	-1,421	0,155
FUC-A	2,83	2,39	3,42	3,28±2,68	2,91	2,29	3,98	3,10±1,16	-0,005	0,996
BAMS	30,80	29,42	31,93	30,98±2,53	28,97	27,79	29,94	28,89±2,03	-3,577	<b>&lt;0,001</b>
BADS	69,01	67,60	70,00	68,71±2,96	71,48	70,24	72,37	71,98±3,38	-3,811	<b>&lt;0,001</b>
BA	79,37	77,30	81,08	79,37±2,84	78,51	76,64	79,64	78,27±2,46	-1,678	0,093
TRIA	15,73	14,42	16,96	15,65±1,98	16,04	15,48	17,28	16,19±1,50	-1,281	0,200
TA	4,91	4,12	5,50	4,98±1,35	5,31	4,58	5,72	5,54±1,60	-1,543	0,123
G0	3,83	3,26	4,46	4,00±0,97	4,09	3,55	4,86	4,15±1,02	-0,963	0,335
G1	9,11	8,25	9,85	9,32±1,32	9,13	8,10	10,02	9,15±1,19	-0,196	0,844
G2	66,01	63,71	67,84	66,04±2,88	64,35	63,23	66,53	64,97±2,60	-1,501	0,133
G3	13,86	11,74	15,12	13,73±2,22	14,20	13,13	15,35	14,18±1,62	-0,865	0,387
G4	2,49	1,86	2,96	2,44±0,68	2,22	2,02	3,08	2,48±0,68	-0,346	0,729
A2	0,08	0,06	0,12	0,11±0,06	0,11	0,07	0,15	0,13±0,10	-1,141	0,254

Rezultati su pokazali da postoji smanjenje u razini glikana koji pripadaju skupini biantenarnih glikana (BA) (Slika 23) i skupini monosijaliziranih biantenarnih glikana (BAMS) (Slika 24) te povećanje u razini glikana koji pripadaju skupini disijaliziranih biantenarnih glikana (BADS) (Slika 25) kod pretile djece u odnosu na normalno uhranjenu djecu. Također je pokazano da postoji povećanje u razini glikana koji pripadaju skupini triantenarnih glikana (TRIA) (Slika 26) kod pretile djece u odnosu na normalno uhranjenu i preuhranjenu djecu.

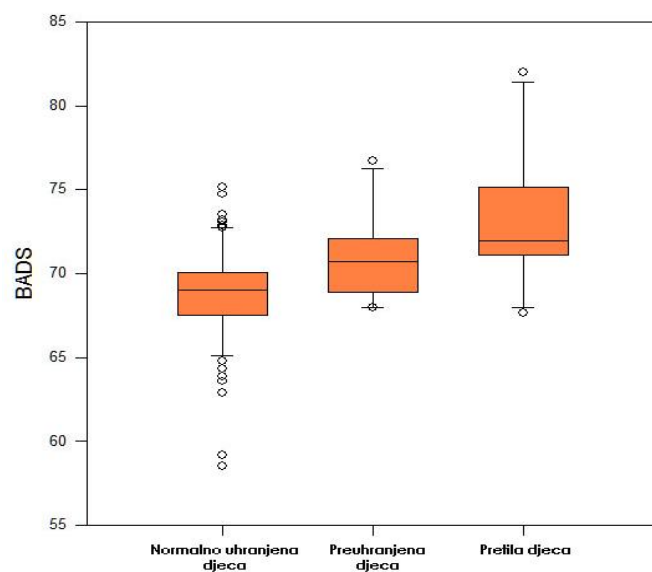


**Slika 23. Razina glikana koji pripadaju skupini biantenarnih glikana (BA) u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

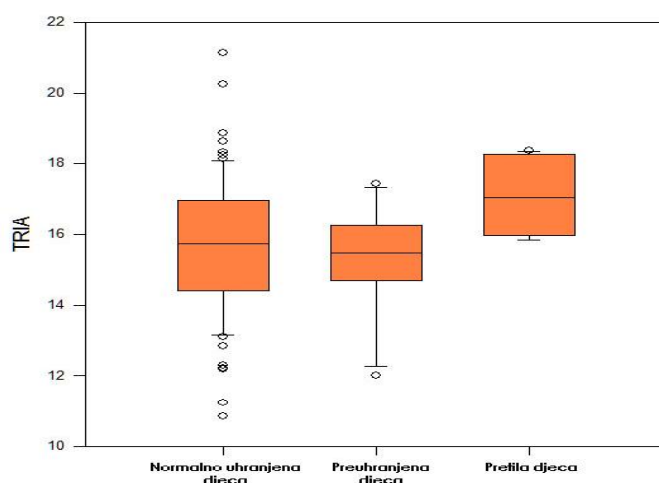


**Slika 24. Razina glikana koji pripadaju skupini monosijaliziranih biantenarnih glikana (BAMS) u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**



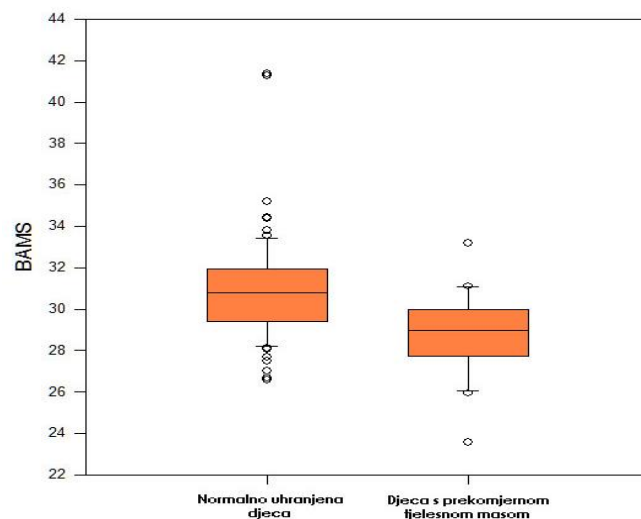


**Slika 25. Razina glikana koji pripadaju skupini disijaliziranih biantenarnih glikana (BADS) u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

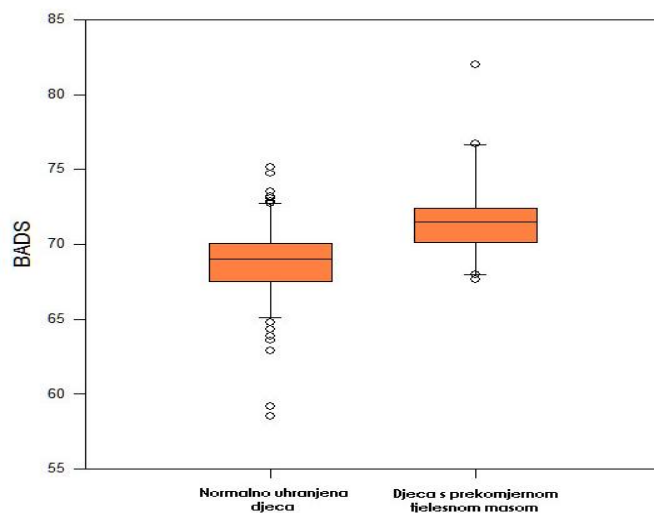


**Slika 26. Razina glikana koji pripadaju skupini triantenarnih glikana (TRIA) u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

Statistička obrada rezultata je utvrdila da postoji smanjenje u razini glikana koji pripadaju skupini monosijaliziranih biantenarnih glikana (BAMS) (Slika 27) te povećanje u razini glikana koji pripadaju skupini disijaliziranih biantenarnih glikana (BADS) (Slika 28) kod djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu.



**Slika 27. Razina glikana koji pripadaju skupini monosijaliziranih biantenarnih glikana (BAMS) u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**



**Slika 28. Razina glikana koji pripadaju skupini disijaliziranih biantenarnih glikana (BADs) u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**

#### 5.3.4. Profil N-glikana u plazmi razdvojenih prema broju sijalinskih kiselina metodom WAX-HPLC

Dodatna analiza glikana koristeći WAX-HPLC omogućila je razdvajanje glikanskih struktura prema broju sijalinskih kiselina na monosijalizirane, disijalizirane, trisijalizirane i tetrasijalizirane glikane. Uspoređene su razine monosijaliziranih, disijaliziranih, trisijaliziranih i tetrasijaliziranih glikana između

skupina normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece (Tablica 16) te između skupine normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom (Tablica 17).

Normalna distribucija monosijaliziranih, disijaliziranih, trisijaliziranih i tetrasijaliziranih glikana testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom, a zbog odstupanja većine varijabli od normalne distribucije i zbog malog broja ispitanika u skupini preuhranjene i pretile djece ( $N < 20$ ), za analizu su korišteni neparametrijski testovi (Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova i Mann-Whitney test).

**Tablica 16. Usporedba razine glikana, podijeljenih u skupine prema prema broju sijalinskih kiselina, između skupina normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=42				Preuhranjena djeca N=3				Pretila djeca N=5				Kruskal Wallis-ova ANOVA rangova df=2	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	H	p
		25%	75%			25%	75%			25%	75%			
Monosijalizirani	21,94	20,30	23,93	22,07±2,37	21,45	20,47	22,27	21,38±1,20	18,53*	18,28	19,58	19,07±1,57	7,447	<b>0,024</b>
Disijalizirani	57,81	56,67	58,70	57,73±1,54	58,63	57,83	58,67	58,29±0,63	58,44	57,22	60,34	58,62±1,94	1,483	0,476
Trisijalizirani	16,30	15,00	17,54	16,44±2,00	16,12	15,78	16,75	16,25±0,66	18,31***	17,80	18,68	18,28±0,52	6,738	<b>0,034</b>
Tetrasijalizirani	3,77	3,36	4,13	3,75±0,62	4,20	3,88	4,25	4,08±0,27	4,15	3,53	4,61	4,03±0,82	2,034	0,362

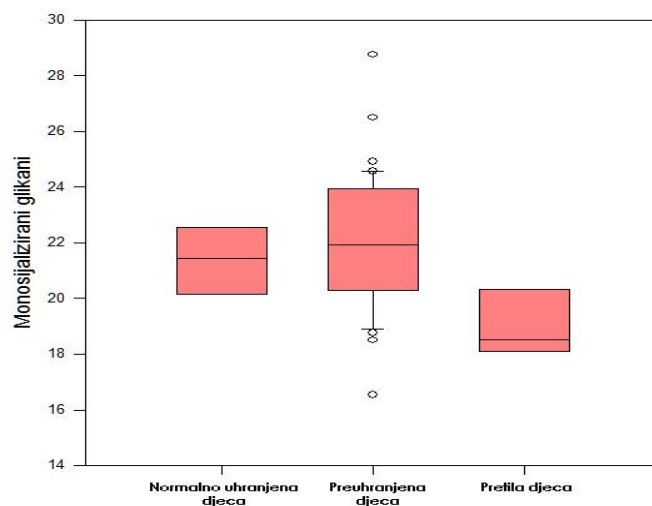
\* p<0,05 u odnosu na normalno uhranjenu djecu

\*\* p<0,05 u odnosu na preuhranjenu djecu

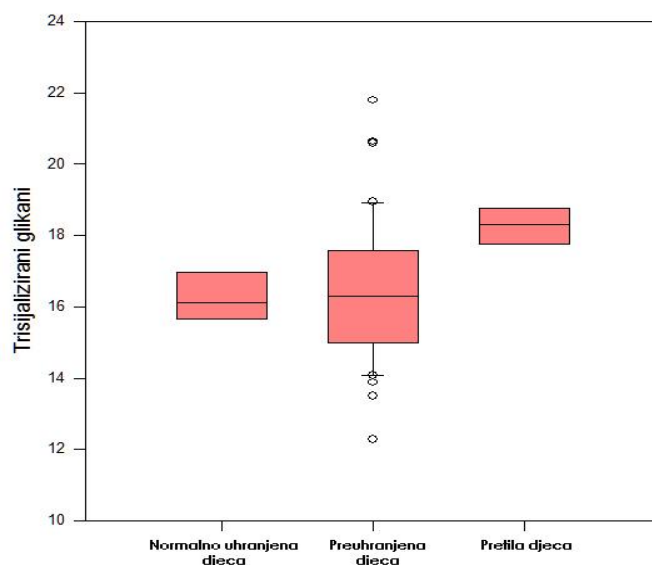
**Tablica 17. Usporedba razine glikana, podijeljenih u skupine prema prema broju sijalinskih kiselina, između skupina normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**

N-glikani	Normalno uhranjena djeca N=42				Djeca s prekomjernom tjelesnom masom N=8				Mann-Whitney test	
	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Medijan	Percentili		$\bar{x} \pm SD$	Z	p
		25%	75%			25%	75%			
Monosijalizirani	21,94	20,30	23,93	22,07±2,37	19,50	18,50	21,62	19,94±1,80	-2,408	<b>0,016</b>
Disijalizirani	57,81	56,67	58,70	57,73±1,54	58,54	57,58	59,42	58,50±1,52	-1,217	0,223
Trisijalizirani	16,30	15,00	17,54	16,44±2,00	17,76	16,54	18,54	17,52±1,17	-1,839	0,066
Tetrasijalizirani	3,77	3,36	4,13	3,75±0,62	4,18	3,78	4,38	4,05±0,64	-1,416	0,157

Rezultati su pokazali da postoji smanjenje u razini monosijaliziranih glikana kod pretile djece u odnosu na normalno uhranjenu djecu (Slika 29) te povećanje u razini glikana koji pripadaju skupini trisijaliziranih glikana (Slika 30) kod pretile djece u odnosu na normalno uhranjenu i preuhranjenu djecu.

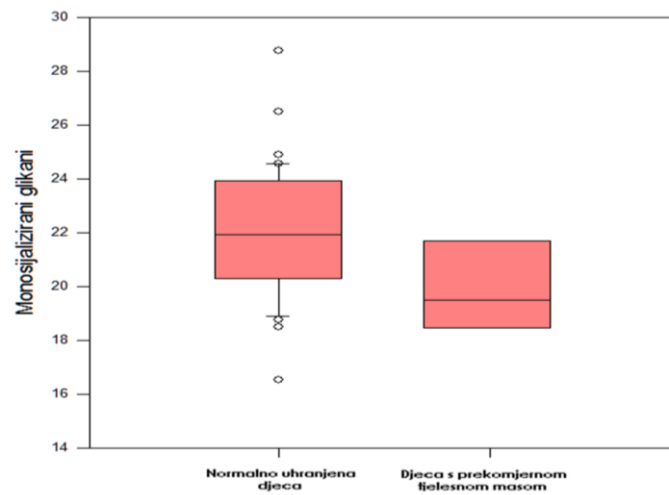


**Slika 29. Razina monosijaliziranih glikana u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**



**Slika 30. Razina trisijaliziranih glikana u skupini normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece.**

Statistička obrada rezultata je utvrdila da postoji smanjenje u razini glikana koji pripadaju skupini monosijaliziranih glikana (Slika 31) kod djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu.



**Slika 31. Razina monosijaliziranih glikana u skupini normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom.**

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Prekomjerna tjelesna masa u djece

Poremećaji jedenja, u vidu ekcesivnog unosa, odnosno smanjenog unosa hrane, u općoj su populaciji prisutni u 30-45% slučajeva (21), od čega na pedijatrijsku zdravu populaciju otpada 25-35% slučajeva (22). Uz pretilost, kao jedan od oblika poremećaja prehrane, osim zdravstvenih rizika, u dječjoj i mladenačkoj dobi vežu se i poremećaji socijalnog i emocionalnog funkcioniranja, pogotovo kod djevojaka (7). Iako se nagli porast broja preuhranjenih i pretilih osoba u posljednjih nekoliko desetljeća povezuje sa životnim stilom današnjice u kojem dominira sjedilački način života, stres, unos nezdrave hrane s visokim udjelom šećera i masnoća te nedostatak kretanja i bavljenja sportom, upravo interakcija genetičkih i različitih okolišnih čimbenika može objasniti zašto pojedinci u istom okruženju imaju veći porast tjelesne mase od ostalih (70).

U našem istraživanju provedenom na uskom geografskom području Vrbovca i Svetog Ivana Zelina, sukladno nacionalnim referentnim vrijednostima i CDC lomnim kriterijima za procjenu uhranjenosti, 78,5% djece imalo je normalnu tjelesnu masu, 10,75% djece bilo je preuhranjeno, a isto toliko ih je bilo pretilo. Slični rezultati dobiveni su i u studiji napravljenoj na 300 zdrave djece i adolescenata u dobi 5-18 godina starosti na području Republike Hrvatske (243) gdje je zabilježeno 71% djece normalne tjelesne mase, 12% preuhranjene, a 12,7% pretile djece, ali uzevši u obzir IOTF kriterije za procjenu uhranjenosti (34). Budući da je na području Republike Hrvatske 2004. godine, sukladno WHO kriterijima, bilo 11,2% preuhranjenih dječaka i 9,8% preuhranjenih djevojčica, a 5,7% dječaka i 5,4% djevojčica u dobi od 7-15 godina bilo je pretilo (23), ovi podaci, iako su temeljeni na 300 ispitanika (243), upućuju na značajno povećanje učestalosti preuhranjenosti i pretilosti u dječjoj dobi. Međutim, ti podaci trebaju biti potvrđeni na većem broju ispitanika. No, epidemijski razmjeri preuhranjenosti i pretilosti u pedijatrijskoj populaciji prisutni su diljem svijeta. Tako je u svijetu još 2001. godine, prema WHO kriterijima za procjenu uhranjenosti, oko 22 milijuna djece u dobi od 5 godina bilo preuhranjeno (398), a krajem posljednjeg desetljeća taj se broj udvostručio na čak 43 milijuna (2).

Iako se spomenuti značajan porast pretilosti u posljednjih nekoliko desetljeća pripisuje promjenama okoliša i stila života (sjedilački način života, nezdrava prehrana i pušenje, manjak tjelesne aktivnosti, vrsta prehrane u novorođenačkoj i dojenačkoj dobi), te drugim okolišnim čimbenicima (prvorođena djeca i djeca bez braće/sestara, socio-ekonomsko stanje roditelja) (399-402), smatra se da upravo genetičke razlike

objašnjavaju zašto neki pojedinci u istim okolišnim uvjetima više dobivaju na tjelesnoj masi (52). S obzirom da 50% djece koja su pretila i nakon dobi od 6 godina te 70-80% pretilih adolescenata ostaje pretilo tijekom čitavog života, što nosi sa sobom brojne negativne fizičke, psihičke i socijalne posljedice vezane uz prekomjernu tjelesnu masu (45,403), spoznaje o tome koji su genetički rizični čimbenici povezani s pojavom prekomjerne tjelesne mase i pretilosti su od ključnog značaja za pravovremenu prevenciju pretilosti i uvođenje zdravih navika u dječjoj dobi.

## **6.2. Povezanost *BDNF* polimorfizma Val66Met i prekomjerne tjelesne mase**

Sadašnje istraživanje je, uz našu nedavno objavljenu studiju (243), jedino istraživanje o povezanosti Val66Met polimorfizma gena *BDNF* (rs6265 ili G196A) i prekomjerne tjelesne mase provedeno na zdravoj dječjoj populaciji oba spola. Naime, iako se u literaturi spominju dvije studije na velikom broju zdrave djece europskog podrijetla (404,405), u njima prekomjerna tjelesna masa ili nije značajno povezana s ovim polimorfizmom (404) ili se povezuje s drugim SNP-om gena *BDNF*, a ne Val66Met polimorfizmom. U studiji napravljenoj na 6078 djece europskog porijekla, u dobi od 0-18 godina, *BDNF* Val66Met polimorfizam nominalno je povezan s porastom ITM-a, ali, nakon korekcije rezultata pomoću Bonferroni metode zbog višestrukog testiranja, taj polimorfizam nije bio više značajno povezan s porastom ITM-a u djece (404). U drugoj studiji koja je uključila 7146 djece bijele rase, praćene od rođenja do 11.-te godina starosti, pokazano je da su, među ostalim, rizični aleli drugog polimorfizma (rs925946) *BDNF* gena povezani s ITM-om u djece (405). Najveći broj studija pratio je povezanost *BDNF* Val66Met polimorfizma i promijenjene tjelesne mase (198,240,242), međutim, za razliku od ovog istraživanja, u tim studijama nisu sudjelovala zdrava djeca i adolescenti, nego djeca i adolescenti s poremećajima u prehrani i/ili s psihičkim poremećajima.

Naši rezultati su pokazali značajne razlike u raspodjeli nosioca Met alela (dakle nosioca kombiniranog Met/Met i Met/Val genotipa) prema Val/Val homozigotima, te značajnu razliku u distribuciji nosioca Val i Met alela između djece podijeljene u tri skupine, normalno uhranjene, preuhranjene i pretile djece, koja su bila razvrstana u te skupine prema nedavno objavljenim nacionalnim referentnim vrijednostima centila (35). Kako bi potvrdili te rezultate, djeca su podijeljena prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila u dvije skupine (normalno uhranjena djeca i kombinirana skupina djece s prekomjernom tjelesnom masom, koja je uključila preuhranjenu i pretilu djecu). Između te dvije skupine djece također je pronađena značajna razlika u distribuciji genotipova Val/Val, Val/Met i Met/Met, nosioca Val i Met alela ili nosioca Met alela prema Val/Val homozigotima između skupina normalno uhranjene djeca i djece s prekomjernom tjelesnom masom. Sve su te značajne razlike nastale radi povećanog udjela djece s jednim ili dva Met alela u skupini djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu.



Upravo radi toga smo očekivali da će se i vrijednosti ITM-a razlikovati između djece podijeljene prema *BDNF* genotipovima. Naime, zbog značajnih razlika u raspodjeli *BDNF* genotipova i alela, pretpostavili smo da će nosioci Met/Met i Met/Val genotipova imati više vrijednosti ITM-a u odnosu na nosioce Val/Val genotipa. Međutim, vrijednosti ITM-a nisu se razlikovale između nosioca Val/Val, Val/Met i Met/Met genotipa polimorfizma Val66Met gena za *BDNF*. Također smo taj podatak ponovo provjerili, podijelivši djecu prema prisustvu Met alela na nosioce Met alela i Val/Val homozigote, i vrijednosti ITM-a također se nisu razlikovale između navedenih skupina djece.

Međutim, povećani udio djece s jednim ili dva Met alela u skupini djece s prekomjernom tjelesnom masom prema normalno uhranjenoj djeci je rezultat koji je nedvojbeno utvrđen na uzorku od 93 djece u sadašnjem istraživanju. Rezultate na ovom relativno malom, ali dostatnom uzorku (snaga statističkog testa iznosi 0.823 ( $\geq 0.800$ ), potrebna veličina uzorka  $N=93$ ), potvrđuje i naša nedavna studija napravljena na većem broju ( $N=300$ ) zdrave djece i adolescenata u kojih je procjena uhranjenosti utvrđena temeljem CDC kriterija (243). Naime, za razliku od ovog istraživanja, u toj smo studiji povećali broj sudionika studije na 300 ispitanika hrvatskog podrijetla, bez ikakvih psihičkih ili fizičkih oboljenja. Međutim, za razliku od ove studije, ispitanici uključeni u tu studiju imali su veći raspon godina, od 5-18 godina, i bili sakupljeni u nekoliko centara. Linearnim regresijskim modelom utvrđena je značajna povezanost Met alela ( $p=0,017$ ) s  $0,123 \text{ kg/m}^2$  povećanjem ITM-a. U pretile djece pronađena je značajno veća učestalost Met/Val genotipova (58%), Met alela (34%) i nosioca Met alela (63%) u odnosu na pothranjenu, normalno uhranjenu i preuhranjenu djecu. I u tom je istraživanju provedenom na većem broju djece i adolescenata višestrukom regresijskom analizom isključen utjecaj spola na *BDNF* genotip i vrijednosti ITM-a (243). Međutim, kao i u ovoj studiji, pronađena je značajna povezanost utjecaja Val66Met polimorfizma gena *BDNF* na vrijednosti ITM-a (243).

Naši sadašnji i prethodno objavljeni (243) rezultati upućuju da je Met alel obzirom na Val66Met polimorfizam gena *BDNF* povezan s prekomjernom tjelesnom masom u djece i adolescenata. Naši se rezultati slažu s rezultatima jedne ranije studije (406), ali koja je provedena na 732 zdravih odraslih ženskih ispitanica belgijskog podrijetla, koja je utvrdila je značajno veću učestalost Met alela u odraslih pretilih žena u odnosu na žene uredne uhranjenosti.

Met alel se povezuje s poremećenim intracelularnim pakiranjem i smanjenom sekrecijom prekursora *BDNF*-a i poremećenim sortiranjem *BDNF*-a u živčane završetke (227,228). Zbog toga se pretpostavlja da je Met alel "hipofunkcionalan", odnosno da je povezan sa smanjenim oslobađanjem *BDNF*-a te sa manjom količinom zrelog *BDNF*-a (227,228). Takvoj pretpostavci u prilog govore i podatci koji pokazuju sniženu koncentraciju

BDNF u serumu pretilih osoba. El-Gharbawy i sur. su u svojoj studiji, provedenoj na 656 djece i adolescenata u dobi 3-19 godina, različitog stupnja uhranjenosti utvrđenog sukladno CDC kriterijima iz 2000. godine, utvrdili 15% niže serumske koncentracije BDNF-a u pretile djece u odnosu na normalno uhranjene ispitanike (208). Niža koncentracija BDNF-a u serumu pretile djece (208) je možda u skladu našim nalazima, jer naši podaci dobiveni na zdravoj djeci i adolescentima u dobi od 5–18 godina upućuju da su nosioci jednog ili dva Met alela, vjerojatno upravo radi smanjene količine zrelog proteina BDNF, češće pretjerane tjelesne mase. Međutim, budući da mi nismo istovremeno pratili i koncentraciju BDNF-a u serumu ili plazmi u naših ispitanika, ne možemo sa sigurnošću prihvatiti ili odbaciti te navode.

U prilog našim nalazima govore i rezultati cjelogenomskih studija koje su pokazale određenu nominalnu, iako ne značajnu, povezanost između *BDNF* Val66Met polimorfizma i pretilosti u 6078 djece europskog porijekla u dobi od 0-18 godina (404) ili u 1792 odraslih filipinskih žena prosječne dobi od 48 godina (407), te u 249796 odraslih osoba europskog porijekla (408). Hardy i sur. su u svojoj longitudinalnoj studiji provedenoj na 1240 muških i 1239 ženskih ispitanika britanskog porijekla u dobi 0-53 godine utvrdili bifazični uzorak povezanosti ITM-a i određenih genotipova pojedinih gena vezanih uz pretilost, gdje se ta povezanost povećava tijekom djetinjstva i adolescencije i postiže maksimum u 20-im godinama, a potom se smanjuje tijekom daljnjeg života (409). Naime, pretpostavlja se da su rizični aleli važniji za razvoj pretilosti u ranom djetinjstvu, dok kasnije, nakon perioda adolescencije, veći utjecaj na tjelesnu masu i ITM imaju čimbenici iz okoline, vrsta hrane, unos energije i potrošnja, sportske navike, vježbanje i aktivnost (52,410). Geni se i različito eksprimiraju tijekom života. Ekspresija gena *BDNF* također se mijenja ovisno o životnoj dobi, a dolazi i do smanjenja broja TrkB receptora tijekom života s posljedičnim smanjenjem djelovanja BDNF-a na ciljna tkiva (52,247). Nedavna studija provedena na 399 ispitanika hrvatskog podrijetla, u dobi od 44-77 godina, nije utvrdila povezanost Val66Met polimorfizma gena *BDNF* s povećanim vrijednostima ITM-a (297). Naime, u toj je studiji povezanost *BDNF* Val66Met i ITM-a praćena u tri vremenske točke u odraslih zdravih osoba prosječne dobi od 44, 54 i 77 godina (297). Nisu pronađene značajne razlike u frekvenciji pojavljivanja *BDNF* Val66Met genotipova, alela ili nosioca Met alela prema Val/Val homozigotima između zdravih odraslih i starijih osoba, koje su bile podijeljene na normalno uhranjene, preuhranjene i pretile i čiji je ITM praćen kroz 35 godina u tri vremenska perioda (297). Jedan od okolišnih čimbenika koji bi mogao utjecati na te rezultate jest i pušenje, koje smanjuje vrijednosti ITM-a, a pokazano je da je ovisnost o nikotinu iz cigareta povezana s Met alelom *BDNF* Val66Met polimorfizma u 320 zdravih dobrovoljaca starih 38 godina njemačkog porijekla (411), i s ITM-om u odraslih hrvatskih ispitanika (297). Taj se nalaz povezanosti pušenja i ITM-a nije potvrdio u starijih hrvatskih ispitanika (297). Hong i sur. (412) su u svojoj studiji provedenoj na 20270 ispitanika srednje životne dobi izvjestili o značajnoj povezanosti između Val/Met genotipa i ITM-a samo u osoba azijskog podrijetla koji su pušači, dok u nepušača spomenuta značajna povezanost između Val/Met genotipa

i vrijednosti ITM-a nije zabilježena. Budući da nije utvrđena značajna povezanost između ITM-a, *BDNF* Val66Met polimorfizma i pušenja u odraslih hrvatskih ispitanika, nije potvrđena niti povezanost čimbenika iz okoline (pušenja) i genetičkih varijanti gena *BDNF* (297). Djeca uključena u ovu studiju nisu bila ovisnici o nikotinu iz cigareta, te je tako mogući utjecaj pušenja na vrijednosti ITM-e i povezanost s *BDNF* Val66Met polimorfizmom isključena. Nedostatak povezanosti ovog polimorfizma s ITM-om u odrasloj i starijoj zdravoj hrvatskoj populaciji slaže se s podacima o nedostatku povezanosti drugih polimorfizama gena povezanih s pretilošću na odraslim zdravim ispitanicima norveškog podrijetla (410). Studije napravljene na velikom broju ispitanika, također su utvrdile da su rizični aleli različitih gena značajno povezani s pretilošću samo u ranom djetinjstvu, između poroda i djetinjstva, odnosno rane adolescencije, dok se ta povezanost gubi u odrasloj dobi (404,409). Tako i rezultati našeg istraživanja potvrđuju tu hipotezu da genetičke varijacije imaju najizraženiji utjecaj na vrijednosti ITM-a upravo u djetinjstvu, jer smo tu povezanost utvrdili kod djece u dobi od 6-7 godina u sadašnjem istraživanju, i u drugoj studiji u ispitanika od 5-18 godina (243), dok u odrasloj dobi čimbenici iz okoline imaju značajniji utjecaj na ITM nego genetički čimbenici. Naime, istaknuto je da će interakcije između različitih okolišnih čimbenika i gena *BDNF* imati značajan učinak na promjene koncentracije *BDNF*-a, te posljedično utjecati na promjene ponašanja i neuroanatomske promjene samo u određenoj dobi (247). Ti rezultati upućuju na zaključak da određen genotip *BDNF* Val66Met može biti rizičan u određenom periodu sazrijevanja, odnosno u određenoj dobi, dok u drugom razvojnem periodu odnosno u kasnijoj dobi isti genotip ili alel može imati protektivnu ulogu (247).

Vrlo je važno istaknuti povezanost spola i *BDNF* Val66Met polimorfizma u odrasloj dobi. U odraslih osoba je meta-analiza Verhagena i sur. (413), provedena na 2814 bolesnika i 10843 kontrolnih odraslih ispitanika, utvrdila veću učestalost *BDNF* Met/Met genotipa i Met alela u muškaraca različite etničke pripadnosti oboljelih od velikog depresivnog poremećaja, ali ista povezanost nije utvrđena kod depresivnih bolesnica ženskog spola. Slična povezanost sa spolom je pokazana i u meta-analizi koju su napravili Fukumoto i sur., a koja je uključivala 4711 pacijenata i 4537 zdravih kontrolnih ispitanika (414). Oni su razvoj Alzheimerove bolesti povezali s Met alelom samo u Met nositeljica ženskog spola. Za razliku od tih rezultata, rezultati istraživanja na našoj populaciji hrvatskog porijekla (211 bolesnika s Alzheimerovom bolesti prosječne dobi od 74 godine i 402 kontrolna ispitanika prosječne dobi od 76 godina) pokazali su da se raspodjela *BDNF* Val66Met genotipova nije razlikovala između muških i ženskih bolesnika s Alzheimerovom bolesti prema zdravim ispitanicima, niti između muških i ženskih bolesnika s ranim ili kasnim početkom Alzheimerove bolesti (82). Međutim, raspodjela genotipova *BDNF* Val66Met značajno se razlikovala prema spolu kod muških i ženskih bolesnika s Alzheimerovom bolešću koji su razvili psihotičke simptome (82). Naime, pokazano je da su muški bolesnici s Alzheimerovom bolešću, koji su nosioci jednog ili dva Met alela, češće razvili pridružene psihotičke simptome unutar Alzheimerove bolesti, nego nosioci Val/Val genotipa. Kod

ženskih bolesnika nije bilo razlike u raspodjeli *BDNF* genotipova između bolesnica koje su razvile psihotičke simptome prema onim bolesnicama koje nisu razvile psihotičke simptome (82). S druge strane, kod 359 žrtava suicida slovenskog porijekla pokazano je da se raspodjela genotipova *BDNF* Val66Met razlikuje samo u ženskih, ali ne i muških žrtava koje su počinile suicid (415). Frekvencija pojavljivanja *BDNF* Val66Met genotipova nije se razlikovala između muških žrtava suicida i kontrolnih muških ispitanika (415). Međutim, pronađena je povećana frekvencija nosioca Met alela (Met/Met i Met/Val genotipa) prema Val/Val homozigotima kod ženskih žrtava suicida prema kontrolnim ženskim ispitanicama, te između ženskih žrtava koje su suicid počinile nasilnim metodama prema onim žrtvama suicida koje suicid nisu počinile nasilnim metodama (415). Svi ti nalazi upućuju na spolno dimorfni učinak *BDNF* polimorfizama na razvoj određenih neuropsihijatrijskih poremećaja, ali u spolno zrelih ispitanika.

Kod djece s ADHD-om je ispitivanje provedeno na 202 djece u dobi od 6,5 do 11,7 godina starosti i u 159 zdravih kontrolnih ispitanika utvrdilo povezanost ADHD-a s drugim polimorfizmom gena *BDNF* (rs11030101) u korejskih djevojčica, međutim ta povezanost nije utvrđena u dječaka (416). Taj rezultat možda upućuje da se učinak genetskih varijanti drugog polimorfizma gena *BDNF* (rs11030101) na razvoj ADHD-a razlikuje po spolu, jer se i sama bolest razlikuje po spolu. Međutim, u našem istraživanju smo provjerili postoje li spolne razlike u učestalosti *BDNF* Val66Met genotipova između djevojčica i dječaka, koji nisu bolovali od ADHD-a. Naši su rezultati pokazali da nema značajne razlike u distribuciji Met/Met, Met/Val i Val/Val genotipova, Val ili Met alela ili Met nosioca prema Val/Val homozigotima ispitanog polimorfizma u genu za *BDNF* između zdravih dječaka i djevojčica. Taj je nalaz uputio da su razlike u distribuciji genotipova za Val66Met značajno povezane s ITM-om, te da nema spolno ovisnih razlika u raspodjeli tih genotipova između normalno uhranjene, pretjerano uhranjene i pretile djece stare 6-7 godina koja još nisu spolno sazrela i koja nisu imala bilo kakve psihijatrijske poremećaje pa tako niti ADHD.

Uključivši u istraživanje isključivo zdravu dječju populaciju usko određene dobi od 6-7 godina, isključili smo mogućnost da *BDNF* Val66Met polimorfizam bude pod utjecajem nekog neuropsihijatrijskog poremećaja. Naime, s obzirom na važnu ulogu BDNF-a u razvoju mozga, staničnom preživljavanju i sinaptičkoj plastičnosti, Val alel se povezuje sa zlouporabom sredstava ovisnosti (83,417) i bipolarnim poremećajima (233), dok se Met alel povezuje s većim rizikom za razvoj različitih oblika poremećaja u prehrani (83), shizofrenijom (83), anksioznim poremećajima, posttraumatskim stresnim poremećajem, depresijom u starosti (418), kao i sa smanjenim kognitivnim sposobnostima (227,234,235,418). Međutim, neki od tih navoda nisu potvrđeni pa se tako *BDNF* Val66Met ne povezuje s alkoholizmom (419) što je pokazano na većem broju ispitanika hrvatskog porijekla. U našoj studiji djeca nisu bolovala od neuropsihijatrijskih poremećaja pa je taj mogući utjecaj na vrijednosti ITM-a isključen.

U dostupnoj literaturi postoji nekoliko studija o povezanosti Val66Met polimorfizma gena *BDNF* s vrijednostima ITM-a provedenih na populaciji djece, adolescenata i odraslih osoba s različitim oblicima poremećaja u prehrani i/ili s psihičkim poremećajima.

Kod osoba s poremećajima hranjenja, utvrđena je povezanost Met alela s tendencijom prema višim vrijednostima ITM-a u 426 mladih djevojaka estonskog podrijetla, koje su prakticirale drastične restriksijske dijetete (240). Veća učestalost spomenutog Met alela Val66Met pronađena je i u 198 odraslih žena azijskog podrijetla oboljelih od restriktivnog oblika anoreksije, kao i purgativnog oblika bulimije u odnosu na 222 zdrave žene (420). Navedeno je u skladu s rezultatima meta-analize 39 različitih studija (83), u kojoj se navodi kako mlade odrasle osobe u dobi 20-26 godina s jednim ili dva Met alela imaju 36% veći rizik za razvoj nekog oblika poremećaja u prehrani od osoba iste dobi s Val/Val genotipom. Nadalje, u istraživanju provedenom na 82 ispitanice u dobi 10-16 godina različite etničke pripadnosti, utvrđena je povezanost povećanog rizika za pojavu depresivnih simptoma u adolescentica nositeljica Met alela s posljedično nižom ekspresijom gena *BDNF* (257). Kod tih je djevojaka fizička aktivnost dovela do povećanja vrijednosti *BDNF*-a i pokazala se protektivnom te smanjila depresivne simptome. S obzirom da se antidepresivi koriste u liječenju poremećaja prehrane (421), koji su često praćeni depresivnim simptomima, a antidepresivni lijekovi utječu i na koncentraciju *BDNF*-a, pretpostavlja se da je *BDNF* Val66Met polimorfizam povezan s podložnošću tih osoba za razvijanjem jednog od oblika poremećaja prehrane (422) i depresije (257,413,423).

S druge strane, postoje studije provedene na djeci i adolescentima koje nisu utvrdile značajnu povezanost *BDNF* Val66Met polimorfizma i pretilosti kod poremećaja hranjenja. U studiji provedenoj na školskoj djeci i adolescentima s raznim oblicima poremećaja u prehrani i/ili psihičkim poremećajima, nije bilo značajne povezanosti *BDNF* Val66Met polimorfizma i pretilosti između 187 pothranjenih, 183 ekstremno pretilih, 88 ispitanika s ADHD-om i 96 kontrolnih ispitanika (198). U toj studiji nije bilo značajne razlike u distribuciji Met/Met, Met/Val i Val/Val genotipova istraživanog polimorfizma Val66Met između pretile djece i adolescenata te pothranjenih studenata i oboljelih od anoreksije, bulimije nervoze ili ADHD-a u odnosu na uredno uhranjene ispitanike (198). Također, kod 258 španjolske djece bijele rase u starosti od 10-13 godina, nije zabilježena povezanost prisutnosti jednog ili dva Met alela s većim rizikom za razvoj poremećaja hranjenja ili sa promijenjenim vrijednostima ITM-a (242). Ti rezultati nisu sukladni s našima u kojima su nosioci Met alela imali veće vrijednosti ITM-a. Postoje i potpuno suprotni rezultati našima koji pokazuju da u populaciji starijih odraslih žena britanskog podrijetla (424) i na velikom broju zdravih odraslih ispitanika oba spola bijele i žute rase (245,412) postoji povezanost Met/Met genotipa s nižim vrijednostima ITM-a. Razlike između navedenih i naših rezultata mogu se obrazložiti različitim poremećajima koje su djeca ili adolescenti

imali u tim studijama u odnosu na našu djecu, koja nisu imala nikakve poremećaje hranjenja. Nadalje, rezultati su različiti i radi različitih dobnih i etničkih skupina uključenih u studije (83, 226, 244).

Osim navedenih, uzrok ovim oprečnim rezultatima mogu biti velike etničke razlike u frekvenciji pojavljivanja Val/Val, Val/Met i Met/Met genotipova među populacijama (83,226,244). Naime, pokazano je da je zastupljenost Met/Met genotipa u muškaraca i žena žute rase 23,4%, dok je u pripadnika bijele rase hrvatskog porijekla njegova učestalost samo 3,4% (226). Nadalje, *BDNF* Val66Met polimorfizam povezuje se s bipolarnim poremećajem u bijele rase (233), dok taj polimorfizam nije povezan s bipolarnim poremećajem u osoba žute rase (423). Svi nalazi upućuju na to kako genetički čimbenici nemaju izravan učinak na određeni fenotip, već je on rezultat uzajamnog djelovanja genetičkih i okolišnih čimbenika pa se i uzrok spomenutim etničkim razlikama u *BDNF* Val66Met polimorfizmu može protumačiti prirodnom selekcijom određenog genotipa kao rezultat djelovanja različitih okolišnih čimbenika, socioekonomskih prilika i kulturoloških razlika (226, 244). No, s obzirom da su sudionici našeg istraživanja bila djeca bjele rase iste etničke pripadnosti i uskog geografskog područja, možemo isključiti utjecaj etničkih razlika pri interpretaciji rezultata.

Utjecaj različitih čimbenika iz okoline mogu izazvati i epigenetske promjene gena. Vjeruje se kako su epigenetske promjene, DNA metilacija i modifikacija histona, način djelovanja okolišnih čimbenika na ekspresiju gena (259,425). Iako su te promjene najznačajnije tijekom ranije životne dobi dok utječu na razvoj neurona, posljedične genetičke promjene reflektiraju se na psihološki razvoj pojedinca tijekom čitavog života (70).

Primjer nalazimo u brojnim studijama na animalnim modelima, gdje pothranjenost ženke u perinatalnom razdoblju mijenja postnatalni porast leptina, ekspresiju gena za proopiomelanokortin, kao i vremenski tijek proliferacije hipotalamičkih i hipokampalnih neurona, čime dolazi do izmjenjene ekspresije gena za *BDNF*, te posljedične promjene u *BDNF* ovisnim funkcijama u odrasloj dobi (262). Također je pokazano da perinatalni stres ženke mijenja koncentraciju *BDNF*-a u hipokampusu mladunaca, što za posljedicu ima promjene u moždanom sazrijevanju te rezultira pojavom ponašanja nalik anksioznom ponašanju koje se povezuje s hiperfagijom (260,261). S druge strane, već prije spomenuti negativni okolišni čimbenici, kao što je stres uzrokovan nepovoljnim okruženjem ili odvajanjem mladunaca od ženke u ranom postnatalnom razdoblju, hipermetilacijom bitne regulatorne regije na genu *BDNF* smanjuju količinu *BDNF* mRNA, a time i razinu zrelog proteina *BDNF* u prefrontalnom korteksu, hipokampalnoj regiji i amigdali (263-268). Suprotno tome, životinje smještene u pozitivnom obogaćenom okruženju i uz majčinu njegu pokazuju povećanu neurogenezu, veću sposobnost učenja i pamćenja, ostvaruju bolji socijalni kontakt u odrasloj dobi (255,269) te ostaju mršavije od onih u standardnom okruženju (138). Navedeni učinci pozitivnih okolišnih čimbenika povezuju se s

povećanom ekspresijom gena *BDNF* u amigdalama i hipokampalnoj regiji i to kao rezultat visokih vrijednosti acetilacije histona na području gena *BDNF* (255,269,270).

Od iznimne važnosti su i rezultati nekih istraživanja koji povezuju različito snažan utjecaj određenih okolišnih čimbenika na povezanost genotipova *BDNF* Val66Met polimorfizma s određenim fenotipom, ovisno o dobi kada ti okolišni čimbenici djeluju. U ranom djetinjstvu odnos između roditelja i djeteta oblikuje djetetovu reakciju na stres, koja se očituje i u neuroendokrinološkim promjenama, a vjeruje se da utječe i na regulaciju unosa hrane (426,427). Naime, učestalost pretilosti bila je 50% veća u trogodišnje djece, te 7-10 puta veća u adolescenata koji su u dobi od 9-10 godina bili zanemarivani od strane roditelja (427,428). Nadalje, čak 30-40% odraslih osoba koje su do punoljetnosti bile verbalno ili fizički zlostavljane imalo je  $ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$  (429). Također, utvrđena je pojačana vulnerabilnost na stres u osoba nosioca Met alela, a izloženost stresu rezultirala je smanjenom ekspresijom gena *BDNF* u hipokampalnoj regiji i povećanom ekspresijom u amigdalama (247). Radi toga se smatra da Met alel u nekim situacijama djeluje protektivno na razvoj određenih psihičkih poremećaja. To se posebice odnosi na stresom izazvane poremećaje u adolescentnoj dobi kada su vrijednosti proteina BDNF najviše, no taj isti Met alel rizični je čimbenik za pojavu stresom izazvanih psihičkih poremećaja u dječjoj dobi, dakle u razdoblju niske razine mRNA gena *BDNF* i proteina BDNF (247).

I drugi okolišni čimbenici su važni za genetički utjecaj na vrijednost ITM-a. U žena je utvrđena značajna pozitivna povezanost povišenog ITM-a između dviju trudnoća s povećanom tjelesnom masom drugorođenog djeteta (271). Naprotiv, djeca rođena od majki koje su drastično izgubile na tjelesnoj masi nakon ugradnje želučane premosnice, manje su sklona razvoju pretilosti od njihove braće rođene prije spomenutog operativnog zahvata (272). Uzrok navedenom transgeneracijskom povećanju razvoja pretilosti leži u DNA hipermetilaciji koja rezultira potiskivanjem transkripcije gena *BDNF* (258).

Testiranja na životinjskim modelima miševa s „agouti“ alelom ( $A^{vy}$ ), čija ekspresija rezultira hiperfagijom i pretilošću, pokazala su kako dijeta bogata metil-suplementom tijekom generacija uzrokuje kumulativnu hipermetilaciju  $A^{vy}$  lokusa, što rezultira represijom transkripcije „agouti“ alela. Potonje saznanje dovodi do zaključka kako su navedene epigenetske mutacije, iako transgeneracijski nasljedne, ipak podložne reverzibilnosti, a time i terapijskom djelovanju.

U literaturi postoje i studije koje su pronašle povezanost sniženih perifernih koncentracija BDNF-a s vrijednostima ITM-a. Budući da se Met alel povezuje sa smanjenom sekrecijom zrelog proteina BDNF-a (227,228), postoji vjerojatnost da su neke od pronađenih povezanosti između sniženih koncentracija

proteina BDNF i ITM-a uzrokovane upravo Val66Met polimorfizmom gena *BDNF*. Lommatzch i sur. (207) u svojoj studiji provedenoj na 140 ispitanika u dobi 20-60 godina starosti izvještavaju o obrnutoj povezanosti periferne koncentracije BDNF-a i vrijednosti ITM-a u odraslih zdravih osoba. Značajno snižene vrijednosti cirkulirajućeg BDNF-a u žena s poremećajima u prehrani (anoreksija, bulimija), u usporedbi sa zdravim ženama iste dobi, zabilježili su u svojoj studiji Nakazato i sur. (237). Nadalje, niske vrijednosti cirkulirajućeg BDNF-a pronađene su i u odraslih pretilih pojedinaca oboljelih od dijabetesa tipa 2 (430), iako druga istraživanja spominju iste rezultate neovisno o stanju uhranjenosti (205,212). Navedeno upućuje na različite mehanizme djelovanja proteina BDNF na ITM i inzulinsku rezistenciju. Rezultate tih studija nije moguće usporediti s našim rezultatima jer u našoj studiji nismo mjerili koncentraciju BDNF-a u plazmi.

Naši rezultati potvrđuju rezultate drugih studija, koje su uputile na važnu ulogu BDNF-a u regulaciji energetskeg metabolizma, ponašanja pri uzimanju hrane i porasta tjelesne težine (83,87,195). Međutim, točni molekularni i stanični mehanizmi pomoću kojih BDNF postiže svoj učinak na ITM i razvoj pretilosti još nisu potpuno jasni (195). Brojna istraživanja na animalnim modelima utvrdila su kako gladovanje dovodi do značajnog smanjenja transkripcije gena *BDNF* u ventromedijalnoj jezgri hipotalamusa (115,133), dok unos hrane (npr. glukoze) već unutar 30 minuta rezultira povećanjem količine BDNF i TrkB mRNA unutar hipotalamusa (115,177). Također, u pozitivnoj energetskeg ravnoteži leptin, inzulini i drugi probavni peptidi koji se otpuštaju tijekom probavljanja hrane stimuliraju transkripciju gena *BDNF* u hipotalamusu koji, potičući ekspresiju visokopotentnih supresora apetita CRH i urokortina, dovodi do smanjenja apetita (195). BDNF možda utječe na anoreksigene signalne puteve pomoću regulacije ekspresije gena i transkripcijskih procesa, ali i translacije lokalnih proteina u sinapsi. Tim mehanizmima BDNF može utjecati i olakšati brze promjene sinaptičkih proteina uključenih u regulaciju hranjenja. Osim toga, radi svojih učinaka na neuroplastičnost u hipokampusu i korteksu, BDNF može olakšati promjene u signalnim putevima pri odgovoru na nutricijske signale koji povećavaju anoreksigene učinke (195). U skladu s time su i nalazi da su osobe sa WAGR sindromom, kod kojih dolazi do delecije *BDNF* gena radi masivnog skraćivanja kromosoma 11, pretile (196).

Zaključno, pokazali smo da je polimorfizam Val66Met BDNF značajno povezan s porastom tjelesne mase u zdrave djece starosti 6-7 godina, neovisno o spolu. Uključena djeca nisu bolovala od bilo kakvih poremećaja hranjenja ili drugih bolesti. Prisustvo jednog ili dva Met alela BDNF Val66Met bilo je češće pronađeno u djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu. Ti rezultati upućuju na zaključak da je Met varijanta proteina BDNF, za koju se smatra da je povezana sa smanjenjom sekrecijom zrelog proteina BDNF (228), povezana s povećanim ITM-om vjerojatno zato jer radi nižih vrijednosti zrelog BDNF-a ne dolazi do zadovoljavajuće supresije apetita, a što rezultira povećanim energetskeg unosom, te je time u



Met nosioca ravnoteža unosa i potrošnje energije pomaknuta prema višim vrijednostima ITM-a. Naši su nalazi u skladu s nalazima koji su uputili na važnu ulogu *BDNF* Val66Met polimorfizma u regulaciji ITM-a, prekomjerne tjelesne mase i pretilosti (408,420,431). Kako bi se utvrdile što adekvatnije i pravovremene intervencije za borbu protiv današnjeg epidemijskog zdravstvenog problema pretilosti, bitno je točnije definirati ostale negativne okolišne čimbenike za koje se vjeruje da utječu na ekspresiju gena *BDNF*-a.

Naši rezultati, ako se potvrde na većem broju ispitanika, nude mogućnost da se lako dostupna pretraga kao što je genotipiziranje *BDNF* Val66Met polimorfizma koristi kao mogući biomarker pretilosti u dječjoj dobi i adolescenciji.

### **6.3. N-glikani i ITM**

U našem istraživanju pretila i preuhranjena zdrava djeca starosti 6-7 godina imala su povišene vrijednosti triantenarnih, tetraantenatnih, kao i trigalaktoziliranih, tetragalaktoziliranih, trisijaliziranih i tetrasijaliziranih formi prema normalno uhranjenoj djeci. Nadalje, vrijednosti biantenarnih, monosijaliziranih biantenarnih, digalaktoziliranih i monosijaliziranih formi *N*-glikana bile su snižene kod pretile i preuhranjene zdrave djece prema normalno uhranjenoj djeci. Detaljna je analiza pokazala različite vrijednosti *N*-glikana plazme, određene nakon deglikozilacije tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti koja se zasniva na hidrofilnim interakcijama. Nadalje, u našem radu nije pronađena razlika u *N*-glikanima koja bi bila vezana za spol. Radi toga su vrijednosti *N*-glikana uspoređene između skupina djece oba spola koja su bila podijeljena na normalno uhranjenu, preuhranjenu i pretilu djecu, ili na normalno uhranjenu djecu i djecu s prekomjernom tjelesnom masom.

Pretila su djeca pokazala pad koncentracije glikana koji pripadaju grupama GP5, GP7 i GP8 u odnosu na normalno uhranjenu djecu. Međutim, pretila djeca su imala povećanu razinu glikana koji pripadaju grupi GP14 u odnosu na normalno uhranjenu i preuhranjenu djecu. Ti su rezultati potvrđeni kada su djeca podijeljena na onu s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu jer su prekomjerno uhranjena djeca imala smanjenju razinu GP5, GP7 i GP8 te povećanu razinu GP9 glikanskih grupa.

Nakon desijalinizacije, dodatno smo analizirali vrijednosti *N*-glikana plazme između skupina djece podijeljenih prema nacionalnim referentnim vrijednostima centila (34) i prikazali rezultate kao relativne udjele pojedinih grupa glikana koji su prisutni u određenom integracijskom području u odnosu na cijelu integriranu

površinu kromatograma. Kod pretile djece pronađena je smanjena razina glikana koji pripadaju grupi DG3 te povećana razina glikana koji pripadaju grupi GP10 u odnosu na normalno uhranjenu djecu. Ti su rezultati također potvrđeni u djece s prekomjernom tjelesnom masom koja su, u odnosu na normalno uhranjenu djecu, imala manje glikana grupe DG3 i više DG10 i DG13 glikana.

Pojedini *N*-glikani koji se nalaze u kromatografskim vršcima dobivenim analizom HILIC HPLC-om međusobno dijele slične strukturne karakteristike. Kod pretile djece je u odnosu na normalno uhranjenu djecu pronađen pad razine biantenarnih glikana (BA) i monosijaliziranih biantenarnih glikana (BAMS) te porast razine disijaliziranih biantenarnih glikana (BADS) i triantenarnih glikana (TRIA). Kad su djeca bila podijeljena na djecu s prekomjernom tjelesnom masom, takva su djeca imala pad razine monosijaliziranih biantenarnih glikana (BAMS) i porast disijaliziranih biantenarnih glikana (BADS) u odnosu na normalno uhranjenu djecu.

Osim navedenih analiza, *N*-glikane smo i razdvojili prema broju sijalinskih kiselina metodom WAX-HPLC. Ta je analiza omogućila razdvajanje glikanskih struktura prema broju sijalinskih kiselina na monosijalizirane, disijalizirane, trisijalizirane i tetrasijalizirane glikane. Pretila djeca su u odnosu na normalno uhranjenu i preuhranjenu djecu imala smanjenje razine monosijaliziranih glikana i povećanje trisijaliziranih glikana. Taj je rezultat potvrđen kad su skupine djece podijeljene na djecu s prekomjernom tjelesnom masom i na normalno uhranjenu djecu, jer je pronađen pad razine monosijaliziranih glikana.

S obzirom da su, suprotno proteinima koji su definirani jednim genom, glikani rezultat interakcije između stotina gena i njihovih produkata, sve promjene u fiziologiji stanica imat će utjecaj na strukturu glikana. Ti nalazi upućuju da iako je profil glikana u određenom psihofizičkom stanju izrazito stabilan (432,433), bilo kakve promjene stanja organizma reflektiraju se preinakama u razinama i kompozicijama *N*-glikana, što ne samo da pridonosi varijabilnosti ljudskog glikoma, već se zbog toga *N*-glikani smatraju potencijalnim biomarkerima određenih patoloških stanja i oboljenja organizma (318,320,321,432,434). Tako su promjene razgranatosti *N*-glikana, sijalizacije, fukozilacije, kao i galaktozilacije, zabilježene u brojnim metaboličkim i upalnim poremećajima te malignim bolestima (283,294,296,305-317). Smanjena galaktozilacija IgG-a, dovodeći do neprimjerene aktivacije komplemenata, karakteristična je za brojne upalne bolesti (286), a među njima i reumatski artritis u kojeg su također zabilježene značajne varijacije u manozilaciji, galaktozilaciji i glukozilaciji kiselog alfa-1 glikoproteina i haptoglobina (295). U djece s ADHD-om pronađena je smanjena razgranatost *N*-glikana (296). Neki glikani, odnosno glikoproteini, tako su već u upotrebi kao biomarkeri tumorskih stanica (320,321), a pojačana sijalizacija, fukozilacija i razgranatost određenih *N*-glikana ujedno se povezuje sa stupnjem maligniteta, kao i stadijem karcinoma (320,322-326). Ipak, analiza svih glikana u serumu pokazala je znatno veću osjetljivost i specifičnost u odnosu na analizu pojedinačnih

glikanskih struktura. Primjerice, kombiniranom analizom svih serumskih glikana s koncentracijom alfa-fetoproteina hepatocelularni karcinom se od ciroze može razlikovati s 90%-tnom specifičnošću i 95%-tnom osjetljivošću (328). Budući da su u našem radu uključena zdrava djeca koja nisu bolovala od metaboličkih, upalnih i malignih bolesti, promjene *N*-glikana ne mogu se povezati s tim poremećajima.

Uz spomenuta različita oboljenja koja uzrokuju promjene u glikozilaciji, fiziologija stanice mijenja se i starenjem, iako sam utjecaj dobi na promjene glikozilacije još uvijek nije potpuno poznat (358,366). Utjecaj dobi na *N*-glikane je u našem radu isključen jer su sva djeca bila u dobi 6-7 godina. Dosadašnjim istraživanjima zabilježen je znatan porast razine triantenarnih, tetraantenarnih, trisijaliziranih i galaktoziliranih *N*-glikana s dobi, dok je razina monosijaliziranih i fukoziliranih *N*-glikana pokazala znatnu negativnu korelaciju s dobi (357-359). Također, usporedo s odrastanjem dolazi do povećanja negalaktoziliranih i disijaliziranih biantenarnih glikana te smanjenja galaktozilacije i sijalizacije, čije su najniže vrijednosti zabilježene u ranoj odrasloj dobi, da bi tijekom daljnjeg života stagnirale ili se vrlo malo mijenjale (334). Tako studije Vanhoorena i sur. (435-437) izvještavaju o porastu sržnih  $\alpha$ -1,6-fukoziliranih biantenarnih i sržnih  $\alpha$ -1,6-fukoziliranih razgranatih biantenarnih *N*-glikana usporedo sa starenjem u belgijskih i talijanskih ispitanika oba spola, a uz pad bigalaktoziliranih sržnih  $\alpha$ -1,6-biantenarnih *N*-glikana samo u žena belgijskog i talijanskog podrijetla. Iste rezultate zabilježila je studija Dinga i sur. (438) na zdravim pojedincima kineskog podrijetla, a Lu i sur. (357) su utvrdili porast G0, G1, G3 i A2 grupe glikana, trisijaliziranih, triantenarnih i tetraantenarnih glikana te pad G2 grupe glikana, biantenarnih, monosijaliziranih i sržnih fukoziliranih glikana sa starenjem. Međutim, spomenuta promjena u glikanskim strukturama ovisno o dobi nije zabilježena za sve glikane. Naime, dok je u GP1, GP2, GP3 i DG2 grupi glikana zabilježena najveća povezanost s dobi, GP6 i GP8 grupa glikana najmanje je podložna promjenama dobi (287). Isto je potvrđeno u skupinama sržno fukoziliranih glikana gdje unutar GP10 grupe glikana nije zabilježen pad fukozilacije sukladno sa starenjem (287), iako druge studije izvještavaju o smanjenju sržne fukozilacije s porastom dobi (358).

Važno je istaknuti kako su spomenute, o dobi ovisne, promjene u glikozilaciji proteina također podložne utjecaju spola (318,357). Primjerice, razine negalaktoziliranih, galaktoziliranih, biantenarnih i triantenarnih glikana u žena se mijenjaju s dobi, dok su u muškaraca navedene promjene gotovo zanemarujuće (357). Nadalje, dok se u žena razina antenarne fukozilacije smanjuje, kod muškaraca je zabilježen porast sa starenjem (318). Sukladno tome, razina monosijaliziranih glikana u muškaraca raste s dobi na račun disijaliziranih i trisijaliziranih glikana, dok se kod žena razina sijalizacije gotovo ne mijenja tijekom života (318). Kako su promjene u fukozilaciji i sijalizaciji zabilježene u raznim upalnim bolestima, imunološkom odgovoru organizma i raznim vrstama karcinoma, različite promjene spomenutih glikana ovisno o spolu, a usporedo sa starenjem, djelom objašnjavaju razlike u prevalenciji određenih bolesti između muškaraca i

žena. Time se objašnjava 2-3 puta veća prevalencija hepatocelularnog karcinoma u muškaraca u odnosu na žene, s obzirom da su u tim vrstama karcinoma zabilježene povećane razine razgranatih oblika  $\alpha$ -1,6-fukoziliranih triantenarnih *N*-glikana (439). Nadalje, budući da su najistaknutije razlike u razinama određenih glikanskih struktura između muškaraca i žena pronađene u dobnim skupinama 40-49 i 50-59 godina (dob kada žene obično ulaze u menopauzu), vjeruje se da su one uzrokovane hormonskim promjenama u žena. Naime, poznato je da razina estrogena negativno korelira s trisijaliziranim antenarnim fukoziliranim glikanskim strukturama (362), kao i da se tijekom trudnoće povećava inače smanjena galaktozilacija IgG-a u žena oboljelih od reumatskog artritisa (364). Kod muškaraca značajne promjene zahvaćaju samo nekoliko glikanskih značajki i javljaju se u starijim dobnim skupinama te se smatra da su upravo te promjene glikanskih struktura realno povezane sa starenjem jer se može isključiti hormonski utjecaj. Jedina iznimka je galaktozilacija, gdje je uočena linearna povezanost između starenja i negalaktoziliranih glikanskih struktura u oba spola. Porast negalaktoziliranih struktura praćen je smanjenjem digalaktoziliranih struktura, dok je razina monogalaktoziliranih struktura nepromijenjena, što potvrđuje jedno od prvih istraživanja glikanskih promjena na IgG-u još prije 20 godina (387). Utjecaj spola na *N*-glikane se može zanemariti u našoj studiji jer uključena djeca nisu još bila spolno zrela, a *N*-glikani u plazmi se nisu razlikovali između dječaka i djevojčica.

Nadalje, s obzirom da je starenje genetički predodređen fiziološki proces koji proizlazi iz stalne interakcije između genoma i okoliša, ne treba zanemariti i utjecaj okolišnih čimbenika na promjene u glikozilaciji. Studija Knežević i sur. (287) utvrdila je da su određene grupe GP1, GP5, GP12, GP13, GP14 glikana te DG1, DG7, DG8, DG9, DG10, DG11 glikana kontrolirane genima, dok je u DG4, DG5, DG6, DG13 te GP7 grupa glikana zabilježen snažan utjecaj okolišnih čimbenika. Ipak, iako i drugi autori izvještavaju o djelovanju okolišnih čimbenika na glikanske strukture (440-442), njihov je utjecaj na većinu glikana ograničen (384). Primjerice, studije na ispitanicima različite etničke pripadnosti i različitih geografskih područja (440-443) utvrdile su iste promjene u strukturi određenih fukoziliranih *N*-glikana. Također, spominje se da način prehrane, socioekonomski čimbenici, pa čak i konzumacija alkohola imaju ograničeni utjecaj samo na pojedine glikanske strukture na način da mijenjaju ekspresiju određenih gena povezanih s procesom glikozilacije. Tako kronična zloraba alkohola, uzrokujući smanjenu ekspresiju gena *ST6GAL1*, dovodi do smanjene sijalizacije apolipoproteina što, zbog defektnog transporta lipoproteina, rezultira alkoholnom steatozom jetre (302,303,332,342). Pušenje, također kao jedan od okolišnih čimbenika, znatno utječe na 14 različitih grupa glikana (287). Ovisno o broju popušanih cigareta povećavaju se razine tetraantenarnih i tetragalaktoziliranih grupa glikana, dok se biantenarne glikanske strukture smanjuju (318). Kako su iste promjene u glikanskim strukturama pronađene u upalnim procesima organizma, smatra se da pušenje zapravo zbog svojih proupalnih svojstava mijenja strukturu glikana (286). U našem radu uključena djeca u dobi od 6-7 godina nisu

bila pušači i nisu zloupotrebljavali alkohol te se utjecaj tih čimbenika iz okoline na promjene *N*-glikana može isključiti.

Rezultati našeg istraživanja sukladni su rezultatima naše prijašnje studija (299), koja je uz naše istraživanje jedina provedena na dječjoj populaciji, ali i adolescentima. U toj studiji je pokazano da u predpubertetskom razdoblju, kao i u našem istraživanju, nisu zamjećene razlike plazmatskih razina *N*-glikana. Tek se s pojavom puberteta razina agalaktoziliranih formi razlikovala između djevojčica i dječaka, što je bilo i očekivano s obzirom na prije spomenute promjene u glikozilaciji koje su ovisne o hormonskom statusu. Ipak, prilikom promatranja samo IgG glikozilacije, spolne razlike su otkrivene još prije puberteta te kod djevojčica pokazuju višu razinu fukoziliranih i sijaliziranih formi. Međutim, mi smo u našem radu pratili promjene ukupnih *N*-glikana u plazmi, a ne onih vezanih na IgG. Također, mnoge značajke glikana mijenjaju se s djetetovim rastom i razvojem tako da je s porastom dobi zabilježeno smanjenje grananja glikana, ali i smanjenje galaktozilacije i sijalizacije. Najviši koeficijent korelacije utvrđen je za tetrasijalizirane glikane koji pokazuju značajan pad u složenosti glikanske strukture usporedo s odrastanjem, a popraćen je porastom disijaliziranih biantenarnih glikana. Razina fukoziliranih i agalaktoziliranih glikana plazme isto se značajno smanjila, dok se razina digalaktoziliranih glikana povećala s porastom dobi. Usporedbom plazmatskih i IgG glikanskih promjena tijekom odrastanja u djece s onima u odraslih osoba, uočeno je kako karakteristike gotovo svih glikana pokazuju trend ili stopu promjene u odraslih. Na primjeru agalaktoziliranih glikana, koji se najčešće istražuju (356,358,365,366), pokazano je kako se razina agalaktoziliranih glikana zapravo smanjuje s odrastanjem kod djece te da je njihova minimalna razina postignuta u ranoj zrelosti. Također, i za mnoge druge značajke glikana uočeno je da se sastav glikana u plazmi u djetinjstvu značajno razlikuje od sastava glikana plazme u odrasloj dobi, štoviše, mijenja se značajno tijekom djetetova rasta. To je vrlo važno, osobito zbog činjenice da su promjene u glikanskim strukturama često proučavane kao dijagnostički biomarkeri te da je još uvijek nerazjašnjeno jesu li promjene u glikozilaciji uzrok ili pak posljedica brojnih različitih stanja i oboljenja s kojima se povezuju.

S obzirom da smo naše istraživanje proveli na zdravoj djeci usko definirane starosne dobi između 6 i 7 godina, isključili smo prethodno spomenuti utjecaj dobi i eventualnih oboljenja na rezultate istraživanja, a budući da se radi o djeci predpubertetske dobi, dobivene rezultate mogli smo analizirati neovisno o spolu. Osim toga, nismo pronašli spolno ovisne razlike u razini *N*-glikana u plazmi djece. Odabravši upravo ovako usko definiranu populaciju djece na malom geografskom području gdje je fluktuacija stanovništva minimalna, također smo pokušali svesti na minimum i potencijalne okolišne čimbenike koji bi mogli utjecati na promjene u glikanskim strukturama, stavljajući naglasak na nasljednu komponentu. Usporedba trenda smanjenja/porasta određenih plazmatskih razina *N*-glikana u našem radu s rezultatima jedinog dosadašnjeg

istraživanja napravljenog na populaciji djece i adolescenata (299), potvrda je relevantnosti određenih glikanskih formi u funkciji biomarkera za razvoj pretilosti. Naime, dok je u zdrave djece usporedo s rastom i razvojem od 6. do 18. godine života utvrđeno smanjenje trisijaliziranih, tetrasijaliziranih, kao i trigalaktoziliranih i tetragalaktoziliranih glikana, uz popraćeni porast disijaliziranih biantenarnih i digalaktoziliranih glikana (299), u našem radu pretela i preuhranjena djeca starosti 6-7 godina imala su suprotnu tendenciju smanjenja/porasta plazmatskih razina spomenutih *N*-glikana. Točnije, u preuhranjene i pretile djece utvrdili smo povišene vrijednosti triantenarnih, tetraantenatnih, kao i trigalaktoziliranih, tetragalaktoziliranih, trisijaliziranih i tetrasijaliziranih formi, dok su vrijednosti biantenarnih, monosijaliziranih biantenarnih, digalaktoziliranih i monosijaliziranih formi *N*-glikana bile snižene. Kako je *N*-glikozilacija usko povezana s adipogenezom i šećernom bolešću provociranom debljinom (318,391,392), a navedene strukturalne promjene *N*-glikana posljedičnim smanjenjem ili pojačanjem enzimske aktivnosti (443) utječu na metabolizam hranjenja te koreliraju s pojavom preuhranjenosti i pretilosti, našim istraživanjem smo potvrdili pretpostavku o povezanosti pretilosti i povećanog ITM-a s određenim strukturama *N*-glikana. Povećanje agalaktoziliranih, trigalaktoziliranih, disijaliziranih biantenarnih, kao i trisijaliziranih i tetrasijaliziranih formi *N*-glikana te smanjenje monogalaktoziliranih i digalaktoziliranih oblika u pretilih osoba zabilježeno je i u dosadašnjim malobrojnim studijama o *N*-glikanima, iako se radilo o odrasloj populaciji (286,318,372,357). Budući da je već utvrđena povezanost kronične upale s promjenama u glikozilaciji, vjeruje se da i u ovoj studiji upravo niski stupanj kronične upale koji se javlja u pretilosti uzrokuje spomenute promjene u glikanskim strukturama. Naime, povišene vrijednosti ITM-a povezane su s nepotpunom galaktozilacijom najistraživanijeg IgG-a, a to dovodi do neprimjerenog proupalnog odgovora koji rezultira aktivacijom komplemenata (385). U pretilih osoba zabilježene su i povišene vrijednosti C-reaktivnog proteina te njegova trisijalizacija i tetrasijalizacija. Masno tkivo također je jedan od izvora spomenutih upalnih parametara (389), ali i drugih endokrinih peptida koji sudjeluju u razvoju komplikacija uslijed pretilosti. Ujedno, HDL kolesterol, koji inače ima protuupalnu ulogu, postaje još jedan proupalni parametar te dodatno povećava upalni odgovor organizma (286,387). Štoviše, povećana razina agalaktoziliranih i disijaliziranih biantenarnih glikana te smanjena razina digalaktoziliranih glikana, povezana je s povećanim postotkom tjelesne masti te hipertenzijom. Također, spomenuti povećani postotak tjelesne masti pozitivno korelira s povećanjem tetragalaktoziliranih, triantenarnih i tetraantenarnih struktura na svim lipoproteinima, osim triglicerida gdje su te strukture glikana bile manje zastupljene (318,381). Vjeruje se da spomenute, znatno više, cirkulirajuće razine upalnih markera i dislipidemija uzrokovana promijenjenom glikozilacijom lipoproteina u pretilih osoba pogoduju stvaranju inzulinske rezistencije, ateroskleroze i hipertenzije, što su sve rizični čimbenici za razvoj metaboličkog sindroma u odrasloj dobi (357).

Iako je naše istraživanje provedeno na relativno malenom broju ispitanika, taj nedostatak nadomjestili smo usko definiranom dobnom skupinom zdrave djece predpubertetskog razdoblja iste etničke pripadnosti koja nisu primala bilo kakve lijekove i u kojih nije zabilježena zloraba alkohola ili ovisnost o nikotinu iz cigareta, odnosno čimbenika koji uzrokuju značajne promjene u *N*-glikozilaciji. Time smo isključili eventualni utjecaj raznih bolesti i njihovih komorbiditeta, različitog hormonalnog statusa, dobi, kao i djelovanje određenih loših životnih navika (pušenje, alkohol) i lijekova na promjene u glikozilaciji proteina. Stoga, razlike koje smo dobili u razinama znatnog broja *N*-glikana već u ranom djetinjstvu upućuju na moguću ulogu *N*-glikanskog profila kao potencijalnog markera za pretilost.

#### **6.4. Ograničenja studije**

Ograničenje naše studije jest prvenstveno malen broj ispitanika. Nadalje, osim dobi i spola, u našem istraživanju nismo uzeli u obzir negativne okolišne čimbenike koji bi mogli utjecati na ekspresiju gena *BDNF*, ili izazvati promjene *N*-glikanskog profila, kao što su primjerice majčin ITM prije i tijekom trudnoće, pušački status majke, gestacijska dob i broj poroda, bračni status roditelja, eventualna mogućnost zlostavljanja ili zanemarivanja djece te ostali potencijalni stresni čimbenici. Nadalje, kako se ovdje radi o presječnoj studiji, ne raspoložemo podacima o vremenskom slijedu događaja, čime i uzročno-posljedična povezanost pretilosti i proteina *BDNF* ili promjena *N*-glikana ostaje nerazjašnjena. Stoga su za daljnju potvrdu dobivenih rezultata, a i za nova saznanja, nužne dodatne kohortne, kao i longitudinalne ili retrospektivne studije s kontrolnim grupama na većem broju djece različite etničke pripadnosti.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Utvrđeno je da je 73,5% dječaka imalo normalnu tjelesnu masu, 16,3% ih je bilo preuhranjnih i 10,2% pretilih, dok je kod djevojčica utvrđeno 84,1% djevojčica sa normalnom tjelesnom masom, 4,5% preuhranjnih i 11,4% pretilih djevojčica.
2. Nije bilo značajnih razlika u dobi, indeksu tjelesne mase, visini, masi, raspodjeli genotipova i alela s obzirom na Val66Met polimorfizam gena za moždani neurotrofni čimbenik (*BDNF*), i svih pokazatelja *N*-glikana plazme između dječaka i djevojčica.
3. Potvrđena je značajna razlika u distribuciji genotipova ( $p=0,016$ ), alela ( $p=0,011$ ) i Met nosioca prema Val/Val homozigotima ( $p=0,009$ ) s obzirom na Val66Met polimorfizam gena *BDNF* između normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom (preuhranjene i pretile djece). Ta je značajna razlika izazvana povećanim udjelom jednog ili dva Met alela u skupini djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu.
4. Potvrđena je hipoteza da je Val66Met polimorfizam gena *BDNF* značajno povezan s prekomjernom tjelesnom masom.
5. Mogući klinički značaj istraživanja jest u eventualnoj primjeni: naime lako dostupna pretraga kao što je genotipiziranje *BDNF* Val66Met polimorfizma mogla bi se koristiti kao mogući biomarker pretilosti u djece.
6. Djelomično je potvrđena hipoteza da je povećan indeks tjelesne mase pozitivno povezan s određenim strukturama *N*-glikana: utvrđena je povezanost povećanog indeksa tjelesne mase s disijaliziranim biantenarnim formama ( $p=0,001$ ).
7. Prekomjerna tjelesna masa i povećan indeks tjelesne mase pozitivno su povezani s triantenarnim ( $p=0,028$ ) i disijaliziranim biantenarnim ( $p=0,001$ ) formama *N*-glikana.
8. Snižene vrijednosti biantenarnih ( $p=0,034$ ) i monosijaliziranih biantenarnih ( $p=0,001$ ) formi *N*-glikana bile su pronađene kod pretile i preuhranjene zdrave djece u odnosu na normalno uhranjenu djecu.
9. Dobiveni rezultati nude mogućnost za definiranje *N*-glikanskog profila kao mogućeg biomarkera pretilosti u ranom djetinjstvu.



## 8. SAŽETAK

Prekomjerna tjelesna masa i pretilost predstavljaju velik javnozdravstveni problem. Okolišni čimbenici utječu na unos i potrošnju kalorija te na pojavnost pretilosti, ali obiteljske studije pokazuju da nasljeđe utječe čak 55-85% na prekomjernu tjelesnu masu i pretilost. Jedan od genetičkih čimbenika koji ima bitnu ulogu u regulaciji unosa hrane, metabolizmu i kontroli indeksa tjelesne mase (ITM) jest moždani neurotrofni čimbenik (*BDNF*, engl. brain derived neurotrophic factor). Polimorfizam *BDNF* Val66Met povezuje se s različitim poremećajima hranjenja, te promjenama u ITM-u u vidu pothranjenosti ili pretilosti. *N*-glikozilacija je usko povezana s adipogenezom i šećernom bolešću provociranom debljinom. Strukturne promjene *N*-glikana, s posljedičnim smanjenjem ili pojačanjem enzimске aktivnosti, utječu na hranjenje i povezane su s pojavom preuhranjenosti i pretilosti. Najviše vrijednosti *N*-glikana u plazmi zamijećene su u ranom djetinjstvu te se njihove vrijednosti smanjuju s odrastanjem. Cilj ovog rada bio je utvrditi na 93 zdrave djece u dobi 6-7 godina iste etničke pripadnosti i uskog demografskog područja, postoji li razlika u distribuciji genotipova, alela i Met nosioca s obzirom na Val66Met polimorfizam gena *BDNF* između normalno uhranjene djece i djece s prekomjernom tjelesnom masom, te mijenja li se koncentracija *N*-glikana u normalno uhranjene djece u odnosu na djecu s prekomjernom tjelesnom masom, a temeljem nacionalnih referentnih vrijednosti centilnih krivulja ITM-a za djevojčice i dječake. Naši rezultati potvrđuju povezanost polimorfizma *BDNF* Val66Met i prekomjerne tjelesne mase. Naime, između normalno uhranjene i djece s prekomjernom tjelesnom masom postoji značajna razlika u distribuciji *BDNF* genotipova ( $p=0,016$ ), alela ( $p=0,011$ ) i nosioca Met alela (kombinirani Met/Met i Met/Val genotip) prema Val/Val homozigotima ( $p=0,009$ ). Razlika nastaje radi povećanog udjela Met alela u skupini djece s prekomjernom tjelesnom masom u odnosu na normalno uhranjenu djecu. Također, utvrdili smo značajnu razliku u razini određenih struktura *N*-glikana između pretile i normalno uhranjene djece. Pronađene su povišene vrijednosti triantenarnih, tetraantenatnih, kao i trigalaktoziliranih, tetragalaktoziliranih, trisijaliziranih i tetrasijaliziranih formi, dok su vrijednosti biantenarnih, monosijaliziranih biantenarnih, digalaktoziliranih i monosijaliziranih formi *N*-glikana bile snižene u preuhranjene i pretile djece prema normalno uhranjenoj djeci. Navedeni rezultati potvrđuju hipotezu o većoj zastupljenosti Met alela kod djece s prekomjernom tjelesnom masom prema normalno uhranjenoj djeci, kao i povezanost značajnog broja *N*-glikanskih formi s prekomjernom tjelesnom masom. Ti nalazi nude mogućnost definiranja lako dostupnih perifernih biokemijskih i genetičkih pokazatelja preuhranjenosti i pretilosti, u svrhu sprječavanja pretilosti i uvođenja zdravih prehrambenih navika u djece.

## 9. SUMMARY

### „Distribution of the brain derived neurotrophic factor (*BDNF*) genotypes and plasma *N*-glycans levels as predictors of overweight in children“

Marijana Turčić Škledar , 2015

Overweight and obesity are growing health-care problems worldwide. Environmental factors contribute to calory intake and consumption and therefore influence the prevalence of overweight and obesity; however family studies show that heritage affects increased body weight and obesity in up to 55-85% of cases. One of the genetic factors that has an important role in food intake regulation, feeding behavior and control of body mass index (BMI) is brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*). *BDNF* Val66Met polymorphism is associated with various eating disorders and changes in BMI, resulting in malnutrition or obesity. *N*-glycosilation is closely associated with adipogenesis and diabetes mellitus induced by obesity. Structural changes in *N*-glycans, with consequent increased or decreased enzymatic activities, impact feeding, and are associated with overweight and obesity. The highest plasma values of *N*-glycans are perceived in early childhood, and these values decrease with aging. The aim of this study was to determine, in 93 healthy children 6-7 old, selected from the narrow demographic area and of the same ethnic background, the association between the *BDNF* Val66Met polymorphism and overweight and obesity, and changes in certain structural variants of *N*-glycans between overweight and obese children compared to normal weight children, subdivided according to the national referral criteria for BMI in boys and girls. Our results confirmed the association between *BDNF* Val66Met polymorphism and overweight and obesity. Namely, there were significant differences in the frequency of the *BDNF* genotypes ( $p=0,016$ ), alleles ( $p=0,011$ ) and Met carriers (the combined Met/Met and Met/Val genotype) and Val/Val homozygotes ( $p=0,009$ ) between children with normal weight, overweight and obese children. Increased proportion of the Met allele in overweight children compared to normal weight children contributed to this significance. In addition, we have found significant differences in *N*-glycan levels between the groups of children with normal weight and obese groups. In obese and overweight children, increased levels of *N*-glycans, specifically triantennary and tetraantennary, as well as trigalactosylated, tetragalactosylated, trisialylated and tetrasialylated *N*-glycans were found, while levels of biantennary, monosialylated biantennary, digalactosylated and monosialylated forms were decreased compared to children with normal weight. The results confirmed our hypothesis of the more frequent presence of the *BDNF* Val66Met Met allele in overweight and obese children compared to normal weight children, and the association between significant number of *N*-glycan forms and obesity. These results offer the opportunity to define easy obtainable peripheral biochemical and genetic biomarkers of obesity and overweight, with aim to prevent obesity and to implement healthy feeding habits in children.

## 10. LITERATURA

1. Bessesen DH. Update on obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2027-2034.
2. 39. De Om, Blossner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:1257-1264.
3. WHO; Facts and figures on childhood obesity. Dostupno na; <http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/en/>
4. Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public-health crisis, common sense cure. *Lancet.* 2002;360:473-482.
5. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ i sur. Diet, Lifestyle and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. *N Engl J Med.* 2001;345:790-797.
6. Chan JM, Rimm EB, Colditz GA. Obesity, fat distribution and weight-gain as risk-factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care.* 1994;17:961-969.
7. Swallen KC, Reither EN, Haas SA, Meier AM. Overweight, obesity, and health-related quality of life among adolescents: The National Longitudinal Study of Adolescent Health. *Pediatrics.* 2005;115:340-347.
8. Schwimmer JS, Burwinkle TM, Varni JW. Health-Related Quality of Life of Severely Obese Children and Adolescents. *JAMA.* 2003;289:1813-1819.
9. He Q, Karlberg J. BMI in childhood and its association with height gain, timing of puberty and final height. *Pediatr Res.* 2001;49:244-251.
10. Stovitz SD, Demerath EW, Hannan PJ, Lytle LA, Himes JH. Growing into obesity: patterns of height growth in those who become normal weight, overweight, or obese as young adults. *Am J Hum Biol.* 2011;23:635-641.
11. Bouchard C. Obesity in adulthood – The importance of childhood and parental obesity. *N Engl J Med.* 1997;337:926-927.
12. Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, Williamson DF, Byers T. Do obese children become obese adults? A review of the literature. *Prev Med.* 1993;22:167-177.
13. Babio N, Canals J, Fernández-Ballart J, Arija V. Non-clinical adolescent girls at risk of eating disorder: under-reporters or restrained eaters? *Nutr Hosp.* 2008;23:27-34.
14. Sancho C, Arija MV, Asorey O, Canals J. Epidemiology of eating disorders: a two year follow up in an early adolescent school population. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2007;16:495-504.

15. Suárez González F, Vaz Leal F, Guisado JA, Gómez Lozano L. Study of eating habits in a female population comparing groups with and without food-related diseases. *Nutr Hosp.* 2003;18:259-263.
16. Canals J, Carbajo G, Fernández J, Martí-Henneberg C, Domènech E. Biopsychopathologic risk profile of adolescents with eating disorder symptoms. *Adolescence.* 1996;31:443-450.
17. Swenne I. Changes in body weight and body mass index (BMI) in teenage girls prior to the onset and diagnosis of an eating disorder. *Acta Paediatr.* 2001;90:677-678.
18. Fairburn CG, Harrison PJ. Eating disorders. *Lancet.* 2003;36:407-416.
19. French SA, Perry CL, Leon GR, Fulkerson JA. Dieting behaviors and weight change history in female adolescents. *Health Psychol.* 1995;14:548-555.
20. Field A, Austin S, Taylor C i sur. Relation between dieting and weight change among preadolescents and adolescents. *Pediatrics.* 2003;112:900-906.
21. Kedesdy J, Budd K. *Childhood Feeding Disorders.* London: Baltimore; Brookes Publishing, 1998.
22. Burklow K, Phelps A, Shultz J, McConnell K, Rudolph C. Classifying complex pediatric feeding disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;27:143-147.
23. Antonić-Degač K, Kaić-Rak A, Mesaroš-Kanjski E, Petrović Z, Capak K. Stanje uhranjenosti i prehrabene navike školske djece u Hrvatskoj. *Paediatr Croat.* 2004;48:9-15.
24. Jureša V, Musil V, Majer M. Epidemiologija debljine u školskoj dobi i adolescenciji. U : Rukavina D. *Debljina – javnozdravstveni problem i medicinski izazov.* Rijeka : Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti; 2014, str. 19-30.
25. Švel I, Grgurić J. *Zdravstvena zaštita djece.* Školska knjiga, Zagreb, 1996:39.
26. Bralić I, Jovančević M, Predavec S, Grgurić J. Pretilost djece - novo područje multidisciplinarnog preventivnog programa. *Paediatr Croat.* 2010;54:25-34.
27. Harrison TR, Fauci AS, Braunwald E i sur. *Harrison's Principles of internal medicine.* 15<sup>th</sup> edition. New York: McGraw Book Company; 2001, str. 479-486.
28. Das UN. Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition.* 2010;26:459-473.
29. World Health Organization. WHO Multicentre Growth Reference Study Group. *WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass indeks-for-age: Methods and development.* Geneva: World Health Organization, 2006.
30. de Onis M, Lobstein T. Defining obesity risk status in the general childhood population: Which cut-offs should we use? *Int J Pediatr Obes.* 2010;5:458-460.

31. Butte NF, Garza C, de Onis M. Evaluation of the feasibility of international growth standards for school-aged children and adolescents. *J Nutr.* 2007;137:153-157.
32. WHO Child Growth Standards. Training Course on Child Growth Assessment, WHO Geneva, 2006.
33. Luciano A, Livieri C, Di Pietro ME, Bergmaschi G, Maffei C. Definition of obesity in childhood: criteria and limits. *Minerva Pediatr.* 2003;55:453-459.
34. Monasta L, Lobstein T, Cole TJ, Vignierova J, Cattaneo A. Defining overweight and obesity in pre-school children: IOTF reference or WHO standard? *Obes Rev.* 2011;12:295-300.
35. Jureša V, Kujundžić Tiljak M, Musil V. Hrvatske referentne vrijednosti antropometrijskih mjera školske djece i mladih. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb: Škola narodnog zdravlja Andrija Štampar; 2011. (<http://bib.irb.hr/prikazi-rad?&rad=452505>)
36. Rajput N, Tuohy P, Mishra S, Smith A, Taylor B. Overweight and obesity in 4-5-year-old children in New Zealand: Results from the first 4 years (2009-2012) of the B4School Check programme. *J Paediatr Child Health.* 2014. doi: 10.1111/jpc.12716.
37. Mendez R, Grissom M. Disorders of childhood growth and development: childhood obesity. *FP Essent.* 2013;410:20-24.
38. Zergollern Lj. Poremećaji rasta i razvoja. U: Zergollern Lj. Reiner-Banovac Ž, Barišić I, Rihter D, Votava-Raić A. *Pedijatrija.* 2. knjiga. Zagreb: Naprijed; 1994, str. 1371-1378.
39. Barišić I, Kurjak S, Zergollern Lj. Rast i razvoj djeteta. U: Zergollern Lj. Reiner-Banovac Ž, Barišić I, Rihter D, Votava-Raić A. *Pedijatrija.* 1. knjiga. Zagreb: Naprijed; 1994, str. 65-139.
40. Dubois L, Girard M, Girard A, Tremblay R, Boivin M, Pérusse D. Genetic and environmental influences on body size in early childhood: A twin birth-cohort study. *Twin Research and Human Genetics.* 2007;10:479-485.
41. Dubois L, Kyvik OK, Girard M i sur. Genetic and Environmental Contributions to Weight, Height, and BMI from Birth to 19 Years of Age: An International Study of Over 12,000 Twin Pairs. *PLoS One.* 2012; 7:e30153.
42. Lajunen HR, Kaprio J, Keski-Rahkonen A i sur. Genetic and environmental effects on body mass index during adolescence: A prospective study among Finnish twins. *Int J Obes.* 2009;33:559-567.
43. Haworth CM, Carnell S, Meaburn EL, Davis OS, Plomin R, Wardle J. Increasing heritability of BMI and stronger associations with the FTO gene over childhood. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:2663-2668.
44. Fernandez JR, Klimentidis YC, Dulin-Keita A, Casazza K. Genetic influences in childhood obesity: recent progress and recommendations for experimental designs. *Int J Obes (Lond).* 2012;36:479-484.
45. Šekerija M, Ajduković D, Poljičanin T. Debljina mladih - problem današnjice ili budućnost (Youth obesity - recent or future problem). *HČJZ.* 2008;4:16.

46. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet.* 1997;27:325-351.
47. Schousboe K, Willemsen G, Kyvik KO i sur. Sex differences in heritability of BMI: a comparative study of results from twin studies in eight countries. *Twin Res.* 2003;6:409-421.
48. Malis C, Rasmussen EL, Poulsen P i sur. Total and regional fat distribution is strongly influenced by genetic factors in young and elderly twins. *Obes Res.* 2005;13:2139-2145.
49. Bulik CM, Sullivan PF, Kendler KS. Genetic and environmental contributions to obesity and binge eating. *Int J Eat Disord.* 2003;33:293-298.
50. Romeis JC, Grant JD, Knopik VS, Pedersen NL, Heath AC. The genetics of middle-age spread in middle-class males. *Twin Res.* 2004;7:596-602.
51. Rankinen T, Perusse L, Weisnagel SJ, Snyder EE, Chagnon YC, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2001 update. *Obes Res.* 2002;10:196-243.
52. Elks CE, Loos RJF, Hardy R i sur. Adult obesity susceptibility variants are associated with greater childhood weight gain and a faster tempo of growth: the 1946 British Birth Cohort Study. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:1150-1156.
53. Hinney A, Nguyen TT, Scherag A i sur.. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One.* 2007;2:e1361.
54. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ i sur. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet.* 2009;41:25-34.
55. Renström F, Payne F, Nordström A i sur. Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet.* 2009;18:1489-1496.
56. Jurvansuu JM, Goldman A. Obesity Risk Gene *TMEM18* Encodes a Sequence-Specific DNA-Binding Protein. *PLoS One.* 2011; 6:e25317.
57. Granell S, Serra-Juhé C, Martos-Moreno GA i sur. A novel melanocortin-4 receptor mutation MC4R-P272L associated with severe obesity has increased propensity to be ubiquitinated in the ER in the face of correct folding. *PLoS One.* 2012; 7:e50894.
58. Kovacs P, Lehn-Stefan A, Stumvoll M, Bogardus C, Baier LJ. Genetic variation in the human winged helix/forkhead transcription factor gene *FOXC2* in Pima Indians. *Diabetes.* 2003;52:1292-1295.
59. Kimm SY, Glynn NW, Aston CE i sur. Racial differences in the relation between uncoupling protein genes and resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:714-719.
60. Mamo JC, Wats GF, Barrett PH, Smith D, James AP, Pal S. Postprandial dyslipidemia in men with visceral obesity: an effect of reduced LDL receptor expression? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281:E626-E632.

61. Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Diez-Caballero A i sur. Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *Faseb J.* 2004;18:215-217.
62. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Salvador J. Leptin-induced lipolysis opposes the tonic inhibition of endogenous adenosine in white adipocytes. *Faseb J.* 2001;15:333-340.
63. Valet P, Berlan M, Beauville M, Crampes F, Montastruc JL, Lafontan M. Neuropeptide Y and peptide YY inhibit lipolysis in human and dog fat cells through pertussis toxin-sensitive G protein. *J Clin Invest.* 1990;85:291-295.
64. Cheng A, Uetani N, Simoncic PD i sur. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell.* 2002;2:497-503.
65. Nadler ST, Stoher JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:11371-11376.
66. Gregorie FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Psychol Rev.* 1998;78:783-809.
67. Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ . *J Biol Chem.* 1998;273:1855-1858.
68. Ruige JB, Ballaux DP, Funahashi T, Mertens IL, Matsuzawa Y, Van Gaal LF. Resting metabolic rate is an important predictor of serum adiponectin concentrations: potential implications for obesity-related disorders. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:21-25.
69. Krakoff J, Ma L, Kobes S i sur. Lower metabolic rate in individuals heterozygous for either a frameshift or a functional missense MC4R variant. *Diabetes.* 2008;57:3267-3272.
70. Rosas-Vargas H, Martínez-Ezquerro JD, Bienvenu T. Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch Med Res.* 2011;42:482-94.
71. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension, and hyperlipidemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 1993;36:62-67.
72. Das UN. A perinatal strategy for preventing adult disease: the role of long-chain polyunsaturated fatty acids. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2002.
73. Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C. The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;300:R1053-R1069.69.)
74. Lebrun B, Bariohay B, Moyse E, Jean A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview. *Auton Neurosci.* 2006;126-127:30-38.
75. Hashimoto K, Koizumi H, Nakazato M, Shimizu E, Iyo M. Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: recent findings and its pathophysiological implications. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005;29:499-504. Review.

76. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:295-318.
77. Tuszynski MH, Gage FH. Neurotrophic factors and diseases of the nervous system. *Ann Neurol.* 1994;35:S9-S12.
78. Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci.* 1997;17:2295-2313.
79. Webster MJ, Herman MM, Kleinman JE, Shannon Weickert C. BDNF and trkB mRNA expression in the hippocampus and temporal cortex during the human lifespan. *Gene Expr Patterns.* 2006;6:941-951.
80. Bariohay B, Lebrun B, Moyse E, Jean A. Brain-derived neurotrophic factor plays a role as an anorexigenic factor in the dorsal vagal complex. *Endocrinology.* 2005;146:5612-5620.
81. Russo-Neustadt A. Brain-derived neurotrophic factor, behavior, and new directions for the treatment of mental disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 2003;8:109-118.
82. Pivac N, Nikolac M, Nedić G i sur. Brain derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and psychotic symptoms in Alzheimer's disease. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35: 356-362.
83. Gratacos M, Gonzalez JR, Mercader JM, de Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met and psychiatric disorders: meta-analysis of case-control studies confirm association to substance-related disorders, eating disorders, and schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2007;61:911-922.
84. Zhang XY, Zhou DF, Wu GY i sur. BDNF levels and genotype are associated with antipsychotic-induced weight gain in patients with chronic schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2008; 33:2200-2205.
85. Pae CU, Chiesa A, Porcelli S i sur. Influence of BDNF variants on diagnosis and response to treatment in patients with major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 2012;65:1-11.
86. Liu J, Zhou Y, Wang C, Wang T, Zheng Z, Chan P. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) genetic polymorphism greatly increases risk of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18:140-143.
87. Hong CJ, Liou YJ, Tsai SJ. Effects of BDNF polymorphisms on brain function and behavior in health and disease. *Brain Res Bull.* 2011;86:287-297.
88. Hofer M, Pagliusi SR, Horn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *Embo J.* 1990;9:2459-2464.
89. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci.* 2010;3:1



90. Lindholm D, Castrén E, Berzaghi M, Blöchl A, Thoenen H. Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain-implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol.* 1994;25:1362-1372.
91. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca<sup>2</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron.* 1994;20:1618-1623.
92. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S i sur. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem.* 2001;276:12660-12666.
93. Klein R, Nanduri V, Jing SA i sur. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 1991;66:395-403.
94. Snider WD. Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell.* 1994;77:627-638.
95. Drake CT, Milner TA, Patterson SL. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci.* 1999;19:8009-8026.
96. Boulanger LM, Poo MM. Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci.* 1999;2:346-351.
97. Li W, Keifer J. Coordinate action of pre- and postsynaptic brain-derived neurotrophic factor is required for AMPAR trafficking and acquisition of in vitro classical conditioning. *Neuroscience.* 2008;155:686-697.
98. Li W, Keifer J. BDNF-induced synaptic delivery of AMPAR subunits is differentially dependent on NMDA receptors and requires ERK. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;91:243-249.
99. Chakravarthy S, Saiepour MH, Bence M i sur. Postsynaptic TrkB signaling has distinct roles in spine maintenance in adult visual cortex and hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:1071-1076.
100. Danzer SC, Kotloski RJ, Walter C, Hughes M, McNamara JO. Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB. *Hippocampus.* 2008;18:668-678.
101. Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science.* 2008;319:1683-1687.
102. Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1995;65:1740-1751.
103. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:1865-1879.
104. Azad N, Iyer A, Vallyathan V i sur. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1203:1-6.

105. Naert G, Ixart G, Tapia-Arancibia L, Givalois L. Continuous icv infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, locomotor activity and body temperature rhythms in adult male rats. *Neuroscience*. 2006;139:779-789.
106. Rage F, Givalois L, Marmigere F, Tapia-Arancibia L, Arancibia S. Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neuroscience*. 2002;112:309-318.
107. Joosten EA, Houweling DA. Local acute application of BDNF in the lesioned spinal cord anti-inflammatory and anti-oxidant effects. *Neuroreport*. 2004;15:1163-1166.
108. Greisen MH, Altar CA, Bolwig TG, Whitehead R, Wortwein G. Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. *J Neurosci Res*. 2005;79:772-778.
109. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW i sur. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2005;64:1152-1156.
110. Ringman JM, Younkin SG, Pratico D i sur. Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;71:85-92.
111. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*. 2004;19:1699-1707.
112. Hock CH, Heese K, Olivieri G i sur. Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2000;59:171-174.
113. Friedman WJ. Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci*. 2000;20:6340-6346.
114. Barrett GL. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*. 2000;61:205-229.
115. Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M. Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J Neurosci*. 2007;27:14265-14274.
116. Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*. 1994;348:41-79.
117. Saper CB, Swanson LW, Cowan WM. The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol*. 1976;169:409-442.
118. Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM. Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci*. 2005;8:1356-1363.
119. Sclafani A, Berner CN, Maul G. Multiple knife cuts between the medial and lateral hypothalamus in the rat: a reevaluation of hypothalamic feeding circuitry. *J Comp Physiol Psychol*. 1975;88:201-207.

120. Lin L, York DA. Amygdala enterostatin induces c-Fos expression in regions of hypothalamus that innervate the PVN. *Brain Res.* 2004;1020:147-153.
121. Luiten PG, Room P. Interrelations between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in the rat. An HRP study. *Brain Res.* 1980;190:321-332.
122. Ter Horst GJ, Luiten PG. Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral, ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat. *Brain Res Bull.* 1987;18:191-203.
123. Rios M. BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci.* 2013;36; 83-90.
124. Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB i sur. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci.* 1999;19:RC26.
125. Haskell-Luevano C, Chen P, Li C i sur. Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology.* 1999;140:1408-1415.
126. Fahrbach SE, Morrell JI, Pfaff DW. Studies of ventromedial hypothalamic afferents in the rat using three methods of HRP application. *Exp Brain Res.* 1989;77:221-233.
127. Luiten PG, Room P. Interrelations between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in rat. An HRP study. *Brain Res.* 1980;190:321-332.
128. Martinez-Marcos A, Lanuza E, Halpern M. Organization of the ophidian amygdala: chemosensory pathways to the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1999;412:51-68.
129. King BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 2006;87:221-244.
130. King BM, Phelps GR, Frohman LA. Hypothalamic obesity in female rats in absence of vagally mediated hyperinsulinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1980;239:E437-E441.
131. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol.* 1995;9:478-486.
132. Shinoda K, Lei H, Yoshii H i sur. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn.* 1995;204:22-29.
133. Tran PV, Akana SF, Malkovska I, Dallman MF, Parada LF, Ingraham HA. Diminished hypothalamic bdnf expression and impaired VMH function are associated with reduced SF-1 gene dosage. *J Comp Neurol.* 2006;498:637-648.
134. Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA i sur. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjugation with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:15239-15244.
135. Feijo FM, Bertoluci MC, Reis C. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. *Rev Assoc Med Bras.* 2011;57:74-77.

136. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J.* 2000;19:1290-1300.
137. Xu B, Goulding EH, Zang K i sur. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci.* 2003;6:736-742.
138. Cao L, Liu X, Lin EJ i sur. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell.* 2010;142:52-64.
139. Cao L, Lin EJ, Cahill MC, Wang C, Liu X, During MJ. Molecular therapy of obesity and diabetes by a physiological autoregulatory approach. *Nat Med.* 2009;15:447-454.
140. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S i sur. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:2005-2010.
141. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V i sur. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 1997;88:131-141.
142. Seeley RJ, Burklow ML, Wilmer KA i sur. The effect of the melanocortin agonist, MT-II, on the defended level of body adiposity. *Endocrinology.* 2005;146:3732-3738.
143. Nicholson JR, Peter JC, Lecourt AC, Barde YA, Hofbauer KG. Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J Neuroendocrinol.* 2007;19:974-982.
144. Komori T, Morikawa Y, Nanjo K, Senba E. Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience.* 2006;139:1107-1115.
145. Wang C, Bomberg E, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Res.* 2010;1336:66-77.
146. Wang C, Bomberg E, Levine A, Billington C, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor in the ventromedial nucleus of the hypothalamus reduces energy intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R1037-R1045.
147. Munzberg H. Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Forum Nutr.* 2010;63:123-132.
148. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M i sur. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995;269: 543-546.
149. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:8878-8883.
150. Chee MJ, Myers MG Jr, Price CJ, Colmers WF. Neuropeptide Y suppresses anorexigenic output from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci.* 2010;30:3380-3390.
151. Mercer RE, Chee MJ, Colmers WF. The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32:398-415.

152. Gelfo F, De BP, Tirassa P i sur. Intraperitoneal injection of neuropeptide Y (NPY) alters neurotrophin rat hypothalamic levels: Implications for NPY potential role in stress-related disorders. *Peptides*. 2011;32:1320-1323.
153. Wang C, Bomberg E, Billington C, Levine A, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R992-R1002.
154. Hewitt SA, Bains JS. Brain-derived neurotrophic factor silences GABA synapses onto hypothalamic neuroendocrine cells through a postsynaptic dynamin-mediated mechanism. *J Neurophysiol*. 2006;95:2193-2198.
155. Verkuyl JM, Karst H, Joels M. GABAergic transmission in the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus is suppressed by corticosterone and stress. *Eur J Neurosci*. 2005;21:113-121.
156. Wang C, Godar RJ, Billington CJ, Kotz CM. Chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reverses obesity induced by high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1320-R1332.
157. Rowsey PJ, Kluger MJ. Corticotropin releasing hormone is involved in exercise-induced elevation in core temperature. *Psychoneuroendocrinology*. 1994; 19: 179–187.
158. Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK i sur. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*. 1996;273:1561-1564.
159. Linthorst AC, Flachskamm C, Hopkins SJ i sur. Long-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral, and cytokine responses to a systemic inflammatory challenge. *J Neurosci*. 1997;17:4448-4460.
160. Givalois L, Naert G, Rage F, Ixart G, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol Cell Neurosci*. 2004;27:280-295.
161. Lechan RM, Fekete C. Central mechanisms for thyroid hormone regulation. *Am J Psychiatry*. 2006;163:1492.
162. Byerly MS, Simon J, Leblhan-Duval E, Duclos MJ, Cogburn LA, Porter TE. Effects of BDNF, T3, and corticosterone on expression of the hypothalamic obesity gene network in vivo and in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R1180-R1189.
163. Ubieta R, Uribe RM, Gonzalez JA i sur. BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus. Properties of the transduction pathway. *Brain Res*. 2007;1174:28-38.
164. Kong WM, Martin NM, Smith KL i sur. Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology*. 2004;145:5252-5258.
165. Davidson TL, Chan K, Jarrard LE, Kanoski SE, Clegg DJ, Benoit SC. Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus*. 2009;19:235-252.

166. Wang GJ, Yang J, Volkow ND i sur. Gastric stimulation in obese subjects activates the hippocampus and other regions involved in brain reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:15641-15645.
167. Davidson TL, Kanoski SE, Walls EK, Jarrard LE. Memory inhibition and energy regulation. *Physiol Behav*. 2005;86:731-746.
168. Greenwood CE, Winocur G. Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: a specific effect of saturated fatty-acid intake. *Behav Neurosci*. 1996;110:451-459.
169. Greenwood CE, Winocur G. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol Aging*. 2005;26(Suppl 1):42-45.
170. Winocur G, Greenwood CE. Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. *Neurobiol Aging*. 2005;26(Suppl 1):46-49.
171. Winocur G, Greenwood CE. The effects of high-fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats. *Behav Brain Res*. 1999;101:153-161.
172. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A i sur. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002;22:1858-1867.
173. Kohjima M, Sun Y, Chan L. Increased food intake leads to obesity and insulin resistance in the tg2576 Alzheimer's disease mouse model. *Endocrinology*. 2010;151:1532-1540.
174. Moraes JC, Coope A, Morari J i sur. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE*. 4:e5045.
175. Kanoski SE, Meisel RL, Mullins AJ, Davidson TL. The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res*. 2007;182:57-66.
176. Gelegen C, van den Heuvel J, Collier DA i sur. Dopaminergic and brain-derived neurotrophic factor signalling in inbred mice exposed to a restricted feeding schedule. *Genes Brain Behav*. 2008;7:552-559.
177. Cordeira JW, Frank L, Sena-Esteves M, Pothos EN, Rios M. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. *J Neurosci*. 2010;30:2533-2541.
178. Cassiman D, Denef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology*. 2001;33:148-158.
179. Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res*. 1996;21:929-938.
180. Pardridge WM, Kang YS, Buciak JL. Transport of human recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier in vivo using vector-mediated peptide drug delivery. *Pharm Res*. 1994;11:738-746.

181. Pilakka-Kanthikeel S, Atluri VSR, Sagar V, Saxena SK, Nair M. Targeted Brain Derived Neurotrophic Factors (BDNF) Delivery across the Blood-Brain Barrier for Neuro-Protection Using Magnetic Nano Carriers: An In-Vitro Study. *PLoS ONE*. 2013;8: e62241.
182. McGarry JD, Takabayashi Y, Foster DW. The role of malonyl-coa in the coordination of fatty acid synthesis and oxidation in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 1978;253:8294-8300.
183. Hulver MW, Dohm GL. The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance. *Proc Nutr Soc*. 2004;63:375-380.
184. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 2007;87:507-520.
185. Houmard JA. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R1111-R1116.
186. Yamanaka M, Itakura Y, Tsuchida A, Nakagawa T, Noguchi H, Taiji M. Comparison of the antidiabetic effects of brain-derived neurotrophic factor and thiazolidinediones in obese diabetic mice. *Diabetes Obes Metab*. 2007;9:879-888.
187. Radziejewski C, Robinson RC, DiStefano PS, Taylor JW. Dimeric structure and conformational stability of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Biochemistry*. 1992;31:4431-4436.
188. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol*. 2004;25:77-107.
189. Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H. Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1992;51:513-532.
190. Bariohay B, Roux J, Tardivel C, Trouslard J, Jean A, Lebrun B. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor type B signaling is a downstream effector of the brainstem melanocortin system in food intake control. *Endocrinology*. 2009;150:2646-2653.
191. Wang CB, Kotz C. Involvement of corticotrophin releasing hormone receptor (CRHR) signaling in BDNF-induced reduction of feeding and body weight gain (Abstract). *Obesity*. 2008;16:S104.
192. Toriya M, Maekawa F, Maejima Y i sur. Long-term infusion of brain-derived neurotrophic factor reduces food intake and body weight via a corticotrophin-releasing hormone pathway in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol*. 2010;22:987-995.
193. Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 1995;136:3743-3750.
194. Lapchak PA, Hefti F. BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *Neuroreport*. 1992;3:405-408.
195. Rios M, Fan G, Fekete C i sur. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1748-1757.

196. Han JC, Liu QR, Jones MI *et al*. Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med*. 2008;359:918-927.
197. Yeo GS, Hung CC, Rochford J *et al*. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci*. 2004;7:1187-1189.
198. Friedel S, Horro FF, Wermter AK *et al*. Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;132B:96-99.
199. Gray J, Yeo GS, Cox JJ *et al*. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes*. 2006;55:3366-3371.
200. Burns B, Schmidt K, Williams SR, Kim S, Girirajan S, Elsea SH. Rai1 haploinsufficiency causes reduced Bdnf expression resulting in hyperphagia, obesity and altered fat distribution in mice and humans with no evidence of metabolic syndrome. *Hum Mol Genet*. 2010;19:4026-4042.
201. Edelman EA, Girirajan S, Finucane B *et al*. Gender, genotype, and phenotype differences in Smith-Magenis syndrome: a meta-analysis of 105 cases. *Clin Genet*. 2007;71:540-550.
202. Mazzeo SE, Bulik CM. Environmental and genetic risk factors for eating disorders: what the clinician needs to know. *Child Adolesc Psychiatr Clin North Am*. 2009;18:67-82.
203. Campbell IC, Mill J, Uher R, Schmidt U. Eating disorders, gene-environment interactions and epigenetics. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35:784-793.
204. Ribasés M, Gratacòs M, Fernández-Aranda F *et al*. Association of BDNF with anorexia, bulimia and age of onset of weight loss in six European populations. *Hum Mol Genet*. 2004;13:1205-1212.
205. Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R *et al*. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50:431-438.
206. Araya AV, Orellana X, Espinoza J. Evaluation of the effect of caloric restriction on serum BDNF in overweight and obese subjects: preliminary evidences. *Endocrine*. 2008;33:300-304.
207. Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K *et al*. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging*. 2005;26:115-123.
208. El-Gharbawy AH, Adler-Wailes DC, Mirch MC *et al*. Serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in lean and overweight children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3548-3552.
209. Monteleone P, Tortorella A, Martiadis V, Serritella C, Fuschino A, Maj M. Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity. *Psychosom Med*. 2004;66:744-748.
210. Saito S, Watanabe K, Hashimoto E, Saito T. Low serum BDNF and food intake regulation: a possible new explanation of the pathophysiology of eating disorders. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009;33:312-316.



211. Nakazato M, Tchanturia K, Schmidt U i sur. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and set-shifting in currently ill and recovered anorexia nervosa (AN) patients. *Psychol Med.* 2009;39:1029-1035.
212. Pedersen BK, Pedersen M, Krabbe KS, Bruunsgaard H, Matthews VB, Febbraio MA. Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Exp Physiol.* 2009;94:1153-1160.
213. Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ i sur. Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36:228-239.
214. Fujimura H, Altar CA, Chen R i sur. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost.* 2002;87:728-734.
215. Mercader JM, Fernandez-Aranda F, Gratacos M i sur. Blood levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with several psychopathological symptoms in anorexia nervosa patients. *Neuropsychobiology.* 2007;56:185-190.
216. Braun A, Lommatzsch M, Mannsfeldt A i sur. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21:537-546.
217. Gielen A, Khademi M, Muhallab S, Olsson T, Piehl F. Increased brain-derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol.* 2003;57:493-497.
218. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L i sur. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med.* 1999;189:865-870.
219. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA i sur. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett.* 2000;470:113-117.
220. Merhi ZO, Minkoff H, Lambert-Messerlian GM, Macura J, Feldman J, Seifer DB. Plasma brain-derived neurotrophic factor in women after bariatric surgery: a pilot study. *Fertil Steril.* 2009;91:1544-1548.
221. Lughetti L, Casarosa E, Predieri B, Patianna V, Luisi S. Plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in children and adolescents. *Neuropeptides.* 2011;45:205-211.
222. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics.* 2007;90:397-406.
223. Timmusk T, Palm K, Metsis M i sur. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron.* 1993;10:475-489.
224. Tognoli C, Rossi F, Di Cola F i sur. Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in *Dicentrarchus labrax*. *BMC Neurosci.* 2010;11:4.

225. Robiou-du-Pont S, Yengo L, Vaillant E i sur. Common variants near BDNF and SH2B1 show nominal evidence of association with snacking behavior in European populations. *Mol Med (Berl)*. 2013;91:1109-1115.
226. Pivac N, Kim B, Nedić G i sur. Ethnic differences in brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in Croatian and Korean healthy participants. *Croat Med J*. 2009;50:43-48.
227. Egan MF, Kojima M, Callicott JH i sur. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 2003;112:257-269.
228. Chen ZY, Patel PD, Sant G i sur. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. *J Neurosci*. 2004;24:4401-4411.
229. Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EH Jr. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Am J Psychiatry*. 2004;161:1698-1700.
230. Hall D, Dhillon A, Charalambous A, Gogos JA, Karayiorgou M. Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet*. 2003; 73:370-376.
231. Chen ZY, Jing D, Bath KG i sur. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science*. 2006;314:140-143.
232. Liu QR, Walther D, Drgon T i sur. Human brain derived neurotrophic factor (BDNF) genes, splicing patterns, and assessments of associations with substance abuse and Parkinson's Disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;134B:93-103.
233. Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG i sur. Familybased association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. *Mol Psychiatry*. 2007;7:579-593.
234. Vakili K, Pillay SS, Lafer B i sur. Hippocampal volume in primary unipolar major depression: a magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*. 2000;47:1087-1090.
235. Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. 2000;157:115-8.
236. Nectoux J, Bahi-Buisson N, Guellec I i sur. The p.Val66Met polymorphism in the BDNF gene protects against early seizures in Rett syndrome. *Neurology*. 2008;70:2145-2151.
237. Nakazato M, Hashimoto K, Shimizu E i sur. Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in female patients with eating disorders. *Biol Psychiatry*. 2003;54:485-490.
238. Ribases M, Gratacos M, Armengol L, De Cid R, Badia A, Jimenez L, Solano R, Vallejo J, Fernandez F, Estivill X. Met66 in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type. *Mol Psychiatry*. 2003;8:745-751.

239. Monteleone P, Zanardini R, Tortorella A i sur. The 196G/A (val66-met) polymorphism of the BDNF gene is significantly associated with binge eating behavior in women with bulimia nervosa or binge eating disorder. *Neurosci Lett*. 2006;406:133-137.
240. Akkermann K, Hiio K, Villa I, Harro J. Food restriction leads to binge eating dependent upon the effect of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism. *Psychiatry Res*. 2011;185: 39-43.
241. Hinney A, Hohmann S, Geller F i sur. Melanocortin-4 receptor gene: Case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4258-4267.
242. Arija V, Ferrer-Barcala M, Aranda N, Canals J. BDNF Val66Met polymorphism, energy intake and BMI: a follow-up study in school children at risk of eating disorders. *BMC Public Health*. 2010;10:363.
243. Škledar M, Nikolac M, Dodig-Ćurković K, Ćurković M, Borovečki F, Pivac N. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met and obesity in children and adolescents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012;36:136-40.
244. Petryshen TL, Sabeti PC, Aldinger KA i sur. Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Mol Psychiatry*. 2010;15:810-815.
245. Gunstad J, Schofield P, Paul RH i sur. BDNF Val66Met polymorphism is associated with body mass index in healthy adults. *Neuropsychobiology*. 2006;53:153-156.
246. von Bohlen und Halbach O. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Front Aging Neurosci*. 2010;2;1-11.
247. Casey BJ, Glatt CE, Tottenham N i sur. Brain-derived neurotrophic factor as a model system for examining gene by environment interactions across development. *Neuroscience*. 2009;24;164:108-120.
248. Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience*. 2005;132:613-624.
249. De Bellis MD, Casey BJ, Dahl RE i sur. A pilot study of amygdala volumes in pediatric generalized anxiety disorder. *Biol Psychiatry*. 2000;48:51-57.
250. Bueller JA, Aftab M, Sen S, Gomez-Hassan D, Burmeister M, Zubieta JK. BDNF Val66Met allele is associated with reduced hippocampal volume in healthy subjects. *Biol Psychiatry*. 2006;59:812-815.
251. Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO. Stressful life events and previous episodes in the etiology of major depression in women: an evaluation of the "kindling" hypothesis. *Am J Psychiatry*. 2000;157:1243-51.
252. Chepenik LG, Fredericks C, Papademetris X i sur. Effects of the brain-derived neurotrophic growth factor val66met variation on hippocampus morphology in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34:944-951.

253. Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS i sur. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci.* 2004;24:10099-102.
254. Matsushita S, Kimura M, Miyakawa T i sur. Association study of brain-derived neurotrophic factor gene polymorphism and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28:1609-1612.
255. Cao L, Jiao X, Zuzga DS i sur. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet.* 2004;36:827-835.
256. Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across the life-span. *Neurobiol Aging.* 2005;26:511-520.
257. Mata J, Thompson RJ, Gotlib IH. BDNF genotype moderates the relation between physical activity and depressive symptoms. *Health Psychol.* 2010;29:130-133.
258. Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes (Lond).* 2008;32:1373-1379.
259. Burdge GC, Lillycrop KA. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annu Rev Nutr.* 2010;30:315-339.
260. Van den Hove DL, Steinbusch HW, Scheepens A i sur. Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience.* 2006;137:145-155.
261. Zuena AR, Mairesse J, Casolini P i sur. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One.* 2008;3:2170.
262. Delahaye F, Breton C, Risold PY i sur. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology.* 2008;149:470-475.
263. Branchi I, Francia N, Alleva E. Epigenetic control of neurobehavioural plasticity: the role of neurotrophins. *Behav Pharmacol.* 2004;15:353-362.
264. Branchi I. The mouse communal nest: investigating the epigenetic influences of the early social environment on brain and behavior development. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33:551-559.
265. Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M, Rees S, Cauchi J, de Medeiros CB, Fleming AS. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: 'stroking' stimulation reverses these effects. *Brain Res.* 2007;1158:11-27.
266. Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci.* 2007;25:3091-3098.
267. Martinowich K, Hattori D, Wu H i sur. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science.* 2003;302:890-893.
268. Roth TL, Lubin FD, Funk AJ, Sweatt JD. Lasting epigenetic influence of early-life adversity on the BDNF gene. *Biol Psychiatry.* 2009;65:760-769.

269. During MJ, Cao L. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res.* 2006;3:29-33.
270. Branchi I, Karpova NN, D'Andrea I, Castrén E, Alleva E. Epigenetic modifications induced by early enrichment are associated with changes in timing of induction of BDNF expression. *Neurosci Lett.* 2011;495:168-172.
271. Villamor E, Cnattingius S. Interpregnancy weight change and risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. *Lancet.* 2006;368:1164-1170.
272. Kral JG, Biron S, Simard S i sur. Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years. *Pediatrics.* 2006;118:1644-1649.
273. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochem Biophys Acta.* 1999;1473:4-8.
274. Hortin GL, Sviridov D, Anderson NL. High abundance polypeptides of the human plasma proteome compri - sing the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem.* 2008;54:1608-1616.
275. Janković M. Glycans as Biomarkers: Status and Perspectives. *J Med Biochem.* 2011;30:213-223.
276. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 1993;3:97-130.
277. Shibata-Koyama M, Iida S, Misaka H i sur. Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for FcγRIIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Exp Hematol.* 2009;37:309-321.
278. Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog.* 2005;21:11-16.
279. Saxon E, Bertozzi CR. Chemical and biological strategies for engineering cell surface glycosylation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:1-23.
280. Lauc G. Sweet secret of the multicellular life. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760:525-526.
281. Spiro R. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implication of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002;12:43-56.
282. Sharon N, Lis H. *Glycoproteins: Structure and Function.* U: Gabius HJ, Gabius S. *Glycoscience: Status and Perspectives.* Weinheim: Chapman&Hall; 1997, str. 133-54.
283. Varki A, Kannagi R, Toole BP. *Glycosylation Changes in Cancer.* U: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology, 2. izd.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009, poglavlje 44. Dostupno na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>
284. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays.* 1999;21:412-21.

285. Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhrer M. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397:3457-3481.
286. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers.* 2008;25:267-278.
287. Knežević A, Polašek O, Gornik O i sur. Variability, Heritability and Environmental Determinants of Human Plasma N-Glycome. *J Proteome Res.* 2009;8:694-701.
288. Yamamoto K. Microbial endoglycosidases for analyses of oligosaccharide chains in glycoproteins. *J Biochem.* 1994;116:229-235.
289. Huang Y, Konse T, Mechref Y, Novotny MV. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry compatible beta-elimination of O-linked oligosaccharides. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16:1199-1204.
290. Gerken TA, Gupta R, Jentoft N. A novel approach for chemically deglycosylating O-linked glycoproteins. The deglycosylation of submaxillary and respiratory mucins. *Biochemistry.* 1992;31:639-648.
291. Zheng Y, Guo Z, Cai Z. Combination of beta-elimination and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the determination of O-glycosylation sites. *Talanta.* 2009;78:358-363.
292. Dwek RA. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev.* 1996;96:683-720.
293. Taylor M, Drickammer C. Introduction to glycobiology. 2. izd. USA: Oxford University Press; 2003, str. 280.
294. Čolak E, Majkić-Singh N. The effect of hyperglycemia and oxidative stress on the development and progress of vascular complications in type 2 diabetes. *J Med Biochem.* 2009;28:63-71.
295. Saroha A, Biswas S, Chatterjee BP, Das HR. Altered glycosylation and expression of plasma alpha-1-acid glycoprotein and haptoglobin in rheumatoid arthritis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879:1839-1843.
296. Pivac N, Knežević A, Gornik O i sur. Human plasma glycome in attention-deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorders. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10, 1-7 10.1074/mcp.M110.004200.
297. Nikolac Perković M, Pučić Baković M, Kristić J i sur. The association between galactosylation of immunoglobulin G and body mass index. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013;48C:20-25.
298. Gornik O, Pavić T, Lauc G. Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820:1318-1326.
299. Pučić M, Mužinić A, Novokmet M i sur. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology.* 2012;22:975-982.

300. Blomme B, Francque S, Trepo E i sur. N-glycan based biomarker distinguishing non-alcoholic steatohepatitis from steatosis independently of fibrosis. *Dig Liver Dis.* 2012;44:315-322.
301. Callewaert N, Van Vlierberghe H, Van Hecke A, Laroy W, Delanghe J, Contreras R. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat Med.* 2004;10:429-434.
302. Lakshman MR, Rao MN, Marmillot P. Alcohol and molecular regulation of protein glycosylation and function. *Alcohol.* 1999;19:239-247.
303. Liinamaa MJ, Hannuksela ML, Rämetsä ME, Savolainen MJ. Defective glycosylation of cholesteryl ester transfer protein in plasma from alcohol abusers. *Alcohol Alcohol.* 2006;41:18-23.
304. Chen C, Schmilovitz-Weiss H, Liu XE i sur. Serum protein N-glycans profiling for the discovery of potential biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis. *J Proteome Res.* 2009;8:463-470.
305. Axford J. The impact of glycobiology on medicine. *Trends Immunol.* 2001;22:237-239.
306. Tabarés G, Radcliffe CM, Barrabés S i sur. Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. *Glycobiology.* 2006;16:132-145.
307. Morelle W, Flahaut C, Michalski JC, Louvet A, Mathurin P, Klein A. Mass spectrometric approach for screening modifications of total serum N-glycome in human diseases: application to cirrhosis. *Glycobiology.* 2006;16:281-293.
308. Goodarzi MT, Turner GA. Decreased branching, increased fucosylation and changed sialylation of alpha-1-proteinase inhibitor in breast and ovarian cancer. *Clin Chim Acta.* 1995;236:161-171.
309. Asao T, Kuwano H, Nakamura J i sur. Tumor cells as the origin of elevated serum 1,3-fucosyltransferase in association with malignancy. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18: 605-610.
310. Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. Biological function of fucosylation in cancer biology. *Biochem.* 2008;143:725-729.
311. Sturiale L, Barone R, Fiumara A i sur. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology.* 2005;15:1268-1276.
312. Nakagoe T, Fukushima K, Nanashima A i sur. Expression of Lewis(a), sialyl Lewis(a), Lewis(x) and sialyl Lewis(x) antigens as prognostic factors in patients with colorectal cancer. *Can J Gastroenterol.* 2000; 14:753-760.
313. Ugorski M, Laskowska A. Sialyl Lewis: a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochim Pol.* 2002;49:303-311.
314. Gornik I, Maravić G, Dumić J, Flögel M, Lauc G. Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 1999;32: 605-608.

315. Hashimoto S, Asao T, Takahashi J i sur. Alpha1-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis. *Cancer*. 2004;101:2825-2836.
316. Edwards M, McKenzie F, O'callaghan S i sur. Prenatal diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG-Ia) by cordocentesis and transferrin isoelectric focussing of serum of a 27-week fetus with non-immune hydrops. *Prenat Diagn*. 2006;26:985-988.
317. Arndt T, Hackler R, Müller T, Kleine TO, Gressner AM. Increased serum concentration of carbohydrate-deficient transferrin in patients with combined pancreas and kidney transplantation. *Clin Chem*. 1997;43:344-351.
318. Knežević A, Gornik O, Polašek O i sur. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*. 2010;20:959-969.
319. Dennis JW, Lau KS, Demetriou M, Nabi IR. Adaptive Regulation at the Cell Surface by N-Glycosylation. *Traffic*. 2009;10:1569-1578.
320. Merchef Y, Yunli H, Aldo G, Ahmed H. Defining putative glycan cancer biomarkers by mass spectrometry. *Bioanalysis*. 2012;4:2457-2469.
321. Solatycka A, Owczarek T, Piller F i sur. MUC1 in human and murine mammary carcinoma cells decreases the expression of core 2  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase and  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase. *Glycobiology*. 2012;22:1042-1054.
322. Kobata A. A retrospective and prospective view of glycopathology. *Glycoconj J*. 1998;15:323-331.
323. Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)-lipid metabolism. *Cancer Res*. 1996;56:5309-5318.
324. Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J i sur. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology*. 2013;57:2314-2325.
325. Saldova R, Reuben JM, Abd Hamid UM, Rudd PM, Cristofanilli M. Levels of specific serum N-glycans identify breast cancer patients with higher circulating tumor cell counts. *Annals Oncol*. 2011;22:1113-1119.
326. Abd Hamid UM, Royle L, Saldova R i sur. A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression. *Glycobiology*. 2008;18:1105-1108.
327. Zhang S, Jiang K, Sun C, Lu H, Liu Y. Quantitative analysis of site-specific N-glycans on sera haptoglobin  $\beta$  chain in liver diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;12(5):1294-1305.
328. Comunale MA, Wang M, Anbarasan N i sur. Total serum glycan analysis is superior to lectin-FLISA for the early detection of hepatocellular carcinoma. *Proteomics Clin Appl*. 2013. doi: 10.1002/prca.201200125.
329. Freeze HH. Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet*. 2006;7:537-551.



330. Davies GJ, Gloster TM, Henrissat B. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15:637-645.
331. Huffman JE, Knezevic A, Vitart V i sur. Polymorphisms in B3GAT1, SLC9A9 and MGAT5 are associated with variation within the human plasma N-glycome of 3533 European adults. *Hum Mol Genet.* 2011;20:5000-5011.
332. Gong M, Garige M, Hirsch K, Lakshman MR. Liver Galbeta1,4GlcNAc alpha2,6-sialyltransferase is down-regulated in human alcoholics: possible cause for the appearance of asialoconjugates. *Metabolism.* 2007;56:1241-1247.
333. Roll P, Rudolf G, Pereira S i sur. SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1195-1207.
334. Pučić M, Pinto S, Novokmet M i sur. Common aberrations from normal human N-glycan plasma profile. *Glycobiology.* 2010;20:970-975.
335. Orntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis.* 1999;20:362-371.
336. Gao Y, Chachadi VB, Cheng PW, Brockhausen I. Glycosylation potential of human prostate cancer cell lines. *Glycoconj J.* 2012;29:525-537.
337. Lowe JB. Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol Rev.* 2002;186:19-36.
338. Simpson MA, Cross H, Proukakis C i sur. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet.* 2004;36:1225-1229.
339. Waite A, De Rosa MC, Brancaccio A, Blake DJ. A gain-of-glycosylation mutation associated with myoclonus-dystonia syndrome affects trafficking and processing of mouse epsilon-sarcoglycan in the late secretory pathway. *Hum Mutat.* 2011;32:1246-1258.
340. Brookes K, Xu X, Chen W i sur. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry.* 2006;11:934-953.
341. Esposito F, Wojcik J, Rodegehr M i sur. MGAT5 and disease severity in progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2011;230:143-147.
342. Garige M, Gong M, Lakshman MR. Ethanol destabilizes liver Gal beta I, 4GlcNAc alpha2,6-sialyltransferase, mRNA by depleting a 3'-untranslated region-specific binding protein. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:1076-1082.
343. Wu Y, McDade TW, Kuzawa CW i sur. Genome-wide association with C-reactive protein levels in CLHS: evidence for the CRP and HNF1A loci and their interaction with exposure to a pathogenic environment. *Inflammation.* 2012;35:574-583.
344. Yuan X, Waterworth D, Perry JR i sur. Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am J Hum Genet.* 2008;83:520-528.

345. Parra EJ, Below JE, Krithika S i sur. Genome-wide association study of type 2 diabetes in a sample from Mexico City and a meta-analysis of a Mexican-American sample from Starr County, Texas. *Diabetologia*. 2011;54:2038-2046.
346. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM i sur. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet*. 2009;41:56-65.
347. Pierce BL, Ahsan H. Genome-wide "pleiotropy scan" identifies HNF1A region as a novel pancreatic cancer susceptibility locus. *Cancer Res*. 2011;71:4352-4358.
348. Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS i sur. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet*. 2009;41:280-282.
349. Johansson A, Marroni F, Hayward C i sur. Linkage and genome-wide association analysis of obesity-related phenotypes: association of weight with theMGAT1 gene. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:803-808.
350. Vleugels W, Haeuptle MA, Ng BG i sur. RFT1 Deficiency in Three Novel CDG Patients. *Hum Mutat*. 2009; 30: 10.1002/humu.21085.
351. Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *J Inherit Metab Dis*. 2003;26:99-118.
352. Mazumder R, Morampudi KS, Motwani M, Vasudevan S, Goldman R. Proteome-wide analysis of single-nucleotide variations in the N-glycosylation sequon of human genes. *PLoS One*. 2012;7:e36212.
353. Aebi M, Helenius A, Schenk B i sur. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. *First International Workshop on CDGS. Glycoconj J*. 1999 Nov;16:669-671.
354. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it! *J Inherit Metab Dis*. 2011;34:853-858.
355. Ostojić S, Perez N, Kapović M. A current genetic and epigenetic view on human aging mechanisms. *Coll Antropol*. 2009;33:687-699.
356. Yamada E, Tsukamoto Y, Sasaki R, Yagyu K, Takahashi N. Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconjugate J*. 1997;14:401-405.
357. Lu JP, Knežević A, Wang YX i sur. Screening novel biomarkers for metabolic syndrome by profiling human plasma N-glycans in Chinese Han and Croatian populations. *J Proteome Res*. 2011;10(Suppl 11): 4959-4969.
358. Vanhooren V, Desmyter L, Liu XE i sur. N-glycomic changes in serum proteins during human aging. *Rejuvenation Res*. 2007;10:521-531a.
359. Przybylo M, Stepień E, Pfitzner R, Lityńska A, Sadowski J. Age effect on human aortic valvular glycoproteins. *Arch Med Res*. 2007;38:495-502.

360. Asano M, Furukawa K, Kido M i sur. Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO J.* 1997;16:1850-1857.
361. Lu Q, Hasty P, Shur BD. Targeted mutation in beta1,4-galactosyltransferase leads to pituitary insufficiency and neonatal lethality. *Dev Biol.* 1997;181:257-267.
362. Brinkman-Van der Linden CM, Havenaar EC, Van Ommen CR, Van Kamp GJ, Gooren LJ, Van Dijk W. Oral estrogen treatment induces a decrease in expression of sialyl Lewis x on alpha 1-acid glycoprotein in females and male-to-female transsexuals. *Glycobiology.* 1996;6:407-412.
363. Saldova R, Huffman JE, Adamczyk B i sur. Association of medication and the human plasma N-glycans. *J Proteome Res.* 2012;11:1821-1831.
364. Van de Geijn FE, Wuhler M, Selman MH i sur. Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R193.
365. Pučić M, Knežević A, Vidić J i sur. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10,10.1074/mcp.M111.010090.
366. Klein A. Human total serum N-glycome. *Adv Clin Chem.* 2008;46:51-85.
367. Lau KS, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. *Glycobiology.* 2008;18:750-760.
368. Matrougui K. Diabetes and microvascular pathophysiology: role of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26:13-16.
369. Axford JS. Glycosilation and rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1455:219-229.
370. De Graaf TW, Van der Stelt ME, Anbergen MG, van Dijk W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid) in human sera. *J Exp Med.* 1993;177:657-666.
371. Qiu Y, Patwa TH, Xu L i sur. Plasma glycoprotein profiling for colorectal cancer biomarker identification by lectin glycoarray and lectin blot. *J Proteome Res.* 2008;7:1693-1703.
372. Thompson S, Matta KL, Turner GA. Changes in fucose metabolism associated with heavy drinking and smoking: a preliminary report. *Clin Chim Acta.* 1991;201:59-64.
373. König P, Niederhofer H, Steurer H i sur. Changes of carbohydrate-deficient transferrin in chronic alcoholism. *Neuropsychobiology.* 1995;32:192-196.
374. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I i sur. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet.* 2009;41:47-55.
375. Ebbert JO, Jensen MD. Fat depots, free Fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients.* 2013;5:498-508.

376. Vinals M, Xu S, Vasile E, Krieger M. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J Biol Chem.* 2003;278:5325-5332.
377. Skropeta D, Settasatian C, McMahon MR i sur. N-Glycosylation regulates endothelial lipase-mediated phospholipid hydrolysis in apoE- and apoA-I-containing high density lipoproteins. *J Lipid Res.* 2007;48:2047-2057.
378. Qu SJ, Fan HZ, Gillard BK, Pownall HJ. N-Glycosylation is required for secretion-competent human plasma phospholipid transfer protein. *Protein J.* 2006;25:167-173.
379. Vukmirica J, Nishimaki-Mogami T, Tran K i sur. The N-linked oligosaccharides at the amino terminus of human apoB are important for the assembly and secretion of VLDL. *J Lipid Res.* 2002;43:1496-1507.
380. Harazono A, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T. Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS. *Glycobiology.* 2005;15:447-462.
381. Igl W, Polašek O, Gornik O i sur. Glycomics meets lipidomics--associations of N-glycans with classical lipids, glycerophospholipids, and sphingolipids in three European populations. *Mol Biosyst.* 2011;7:1852-1862.
382. Ceska R, Vrablík M, Sucharda P. Dyslipidemia and obesity 2011. Similarities and differences. *Vnitr Lek.* 2011;57:248-253.
383. International diabetes federation. Criteria for metabolic syndrom in children and adolescents. Dostupno na; <http://www.idf.org/metabolic-syndrome/children/criteria>
384. Lauc G, Essafi A, Huffman JE i sur. Genomics meets glycomics--the first GWAS study of human N-Glycome identifies HNF1alpha as a master regulator of plasma protein fucosylation. *PLoS Genet.* 2010;6:e1001256.
385. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatic arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med.* 1995;1:237-243.
386. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I i sur. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet.* 2010;42:105-116.
387. Parekh RB, Roitt IM, Isenberg DA, Dwek RA, Ansell BM, Rademacher TW. Galactosylation of IgG associated oligosaccharides: reduction in patients with adult and juvenile onset rheumatoid arthritis and relation to disease activity. *Lancet.* 1988;1:966-969.
388. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC i sur. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995;96:2758-2767.
389. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F i sur. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr.* 2011;106(Suppl 3):S5-78.
390. Saito I, Yonemasu K, Inami F. Association of body mass index, body fat, and weight gain with inflammation markers among rural residents in Japan. *Circ J.* 2003;67:323-329.

391. Dusaulcy R, Rancoule C, Grès S i sur. Adipose-specific disruption of autotaxin enhances nutritional fattening and reduces plasma lysophosphatidic acid. *J Lipid Res.* 2011;52:1247-1255.
392. Pradère JP, Tarnus E, Grès S, Valet P, Saulnier-Blache JS. Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771:93-102.
393. Boucher J, Quilliot D, Praderes JP i sur. Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia.* 2005;48:569-577.
394. Ferry G, Tellier E, Try A i sur. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem.* 2003;278:18162-18169.
395. Gesta S, Simon MF, Rey A i sur. Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis. *J Lipid Res.* 2002;43:904-910.
396. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR i sur. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:131-136.
397. Saulnier-Blache JS. Secretion and role of autotaxin and lysophosphatidic acid in adipose tissue. *J Soc Biol.* 2006;200:77-81.
398. Deckelbaum RJ, Williams CL. Childhood obesity: the health issue. *Obes Res.* 2001;9(Suppl 4):239S-243S.
399. Gopinath B, Baur LA, Burlutsky G, Robaei D, Mitchell P. Socio-economic, familial and perinatal factors associated with obesity in Sydney schoolchildren. *J Paediatr Child Health.* 2012;48:44-51.
400. Regnault N, Botton J, Forhan A i sur. Determinants of early ponderal and statural growth in full-term infants in the EDEN mother-child cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:594-602.
401. Vafa M, Moslehi N, Afshari S, Hossini A, Eshraghian M. Relationship between breastfeeding and obesity in childhood. *J Health Popul Nutr.* 2012;30:303-310.
402. Baird J, Fisher D, Lucas P, Kleijnen J, Roberts H, Law C. Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *BMJ.* 2005;331:929.
403. Moller H, Mellempgaard A, Lindvig K, Olsen JH. Obesity and Cancer Risk – A Danish Record-Linkage Study. *Eur J Cancer.* 1994;30A:344-350.
404. Zhao J, Bradfield JP, Li M i sur. The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:2254-2257.
405. Elks CE, Loos RJ, Sharp SJ i sur. Genetic markers of adult obesity risk are associated with greater early infancy weight gain and growth. *PLoS Med.* 2010;7:e1000284.

406. Beckers S, Peeters A, Zegers D, Mertens I, Van Gaal L, Van Hul W. Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women. *Mol Genetics Metab.* 2008;95:110-112.
407. Croteau-Chonka DC, Marvelle AF, Lange EM, et al. Genomewide association study of anthropometric traits and evidence of interactions with age and study year in Filipino women. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19:1019–1027.
408. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, et al. Loos, Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* 2010; 42: 937–948.
409. Hardy R, Wills AK, Wong A et al. Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum Mol Genet.* 2010;19:545-552.
410. Rzehak P, Scherag A, Grallert H, et al., GINI and LISA Study Group Associations between BMI and the FTO gene are age dependent: results from the GINI and LISA birth cohort studies up to age 6 years. *Obes Facts.* 2010;3:173–180
411. Lang UE, Sander T, Lohoff FW et al. Association of the met 66 allele of brain-derived neurotrophic factor (bdnf) with smoking. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;190:433-439.
412. Hong KW, Lim JE, Go MJ et al. Recapitulation of the association of the Val66Met polymorphism of BDNF gene with BMI in Koreans. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20:1871-1875.
413. Verhagen M, van der Meij A, van Deurzen PA et al. Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Mol Psychiatry.* 2010;15:260-271.
414. Fukumoto N, Fujii T, Combarros O et al. Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis. *Am J Med Genet B: Neuropsychiatr Genet.* 2010;153B:235-242.
415. Pregelj P, Nedic G, Videtič Paska A, et al. The association between brain-derived neurotrophic factor polymorphism (BDNF Val66Met) and suicide. *J Affect Disord.* 2011; 128: 287-290.
416. Cho SC, Kim HW, Kim BN et al., Genderspecific association of the brain-derived neurotrophic factor gene with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry Invest.* 2010;7:285-290.
417. Cheng CY, Hong CJ, Yu YW, Chen TJ, Wu HC, Tsai SJ. Brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) genetic polymorphism is associated with substance abuse in males. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;140:86-90.
418. Taylor WD, Züchner S, McQuoid DR, Steffens DC, Speer MC, Krishnan KR. Allelic differences in the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in late-life depression. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2007;15:850-857.
419. Nedic G, Nikolac Perkovic M, Nenadic Sviglin K et al. Brain-derived neurotrophic factor Val<sup>66</sup>Met polymorphism and alcohol-related phenotypes. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013; 40: 193-198.

420. Koizumi H, Hashimoto K, Itoh K i sur. Association between the brain-derived neurotrophic factor 196G/A polymorphism and eating disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;127B:125-127.
421. Becker A, Grinspoon S, Klibanski A, Herzog DB. Eating disorders. *New Eng J Med.* 1999;340:1092-1098.
422. Kaye WH, Klump KL, Frank GKW, Strober M. Anorexia and Bulimia Nervosa. *Ann Rev Med.* 2000;51:299-313.
423. Nakata K, Ujike H, Sakai A i sur. Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2003;337:17-20.
424. Shugart YY, Chen L, Day IN i sur. Two British women studies replicated the association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BMI. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1050-1055.
425. Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299:R711-R722.
426. Caldji C, Diorio J, Meaney MJ. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry.* 2000;48:1164-1174.
427. Whitaker RC, Phillips SM, Orzol SM, Burdette HL. The association between maltreatment and obesity among preschool children. *Child Abuse Negl.* 2007;31:1187-1199.
428. Lissau I, Sørensen TI. Parental neglect during childhood and increased risk of obesity in young adulthood. *Lancet.* 1994;343:324-327.
429. Williamson DF, Thompson TJ, Anda RF, Dietz WH, Felitti V. Body weight and obesity in adults and self-reported abuse in childhood. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:1075-1082.
430. Fujinami A, Ohta K, Obayashi H i sur. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship to glucose metabolism and biomarkers of insulin resistance. *Clin Biochem.* 2008;41:812-817.
431. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF i sur. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 2009;41:18-24.
432. Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1764:1853-1869.
433. Zaia J. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev.* 2004;23:161-227.
434. Mechref Y, Hu Y, Garcia A, Hussein A. Defining Putative Glycan Cancer Biomarkers by Mass Spectrometry. *Bioanalysis.* 2012;4:2457-2469.
435. Vanhooren V, Laroy W, Libert C, Chen C. N-glycan profiling in the study of human aging. *Biogerontology.* 2008;9:351-356.

436. Vanhooren V, Liu XE, Franceschi C i sur. N-glycan profiles as tools in diagnosis of hepatocellular carcinoma and prediction of healthy human ageing. *Mech Ageing Dev.* 2009;130:92-7.
437. Vanhooren V, Dewaele S, Libert C i sur. Serum N-glycan profile shift during human ageing. *Exp Gerontol.* 2010;45:738-743.
438. Ding N, Nie H, Sun X i sur. Human serum N-glycan profiles are age and sex dependent. *Age Ageing.* 2011;40:568-575.
439. Naugler WE, Sakurai T, Kim S i sur. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007;317:121-124.
440. Ota H, Nakayama J, Momose M i sur. Helicobacter pylori infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch.* 1998;433:419-426.
441. Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:12045-12050.
442. Barišić K, Lauc G, Dumić J, Pavlović M, Flogel M. Changes of glycoprotein patterns in sera of humans under stress. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996;34:97-101.
443. Skropeta D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. *Bioorgan Med Chem.* 2009;17:2645-2653.



# 11. ŽIVOTOPIS

## Osobni podaci

**Ime i prezime:** Marijana Turčić

**Datum i mjesto rođenja:** 23.05.1979., Rijeka, Hrvatska

**Narodnost:** Hrvatica

**Adresa prebivališta:** Ivana Mažuranića 18, 10 290 Zaprešić

**e-mail:** turcic.m.ri@gmail.com

## Obrazovanje

1993 - 1997.g. Jezična gimnazija "Lucijan Vranjanin", Zagreb

1997 - 2003.g. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2006.g. Transplant procurement Management tečaj, Sveučilište u Barceloni

2006 - 2013.g. Znanstveni poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo Medicinskog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu

2010 - 2014.g. Specijalizacija iz Školske i sveučilišne medicine

## Strani jezici

Engleski jezik

Njemački jezik

## Radno iskustvo

2003 - 2004.g. Pripravnički staž, KB "Sestre milosrdnice", Zagreb

2004 - 2009.g. Ordinacija opće prakse, Zagreb i Zagrebačka županija

2009.g. do danas voditelj tima, specijalist školske medicine u ambulanti školske i sveučilišne  
medicine, Zavod za javno zdravstvo Zagrebačke županije, ispostava Zaprešić

## Nagrade

2001.g. Stipendija Grada Zaprešića

2002.g. Stipendija Sveučilišta u Zagrebu

2002.g. Dekanova nagrada

### **Profesionalna aktivnost**

- 1999 - 2010.g. Sudjelovanje u znanstvenim aktivnostima i projektima Zavoda za patologiju "Ljudevit Jurak" KB "Sestre milosrdnice"
- 2003.g. Sudjelovanje u realizaciji projekta "Organizacija i evaluacija patoanatomskog tumorskog registra i banke tumora" (broj projekta 0134002/02)
- 2003.g. Obrana studentskog znanstvenog rada "Učestalost sekundarnih primarnih malignih tumora u bolesnika s primarnim karcinomom bubrega" (objavljen u časopisu "Acta Medica Croatica")
- 2006.g. Sudjelovanje u implementaciji DOPKI projekta Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi, a u suradnji s Vijećem Europe

### **Znanstveni radovi**

1. Krušlin B, **Turčić M**, Čupić H, Novosel I, Reljić A, Ružić B, Belicza M. Importance of determination of different histologic components of testicular germ cells. *Liječ Vjesn.* 2003; 125:242-245.
2. **Turčić M**, Znaor A, Novosel I, Reljić A, Belicza M, Krušlin B. Učestalost drugih primarnih tumora u bolesnika s primarnim karcinomom bubrežnih stanica. *Acta Med Croatica.* 2005; 59: 91-95.
3. Krušlin B, Gall-Trošelj K, Čizmić A, Čupić H, **Turčić M**, Belicza M. Loss of heterozygosity of p53 in congenital sacrococcygeal teratomas. *Paediatr Croat.* 2005;49:15-18.
4. Novosel I, **Turčić M**, Prskalo I, Reljić A, Krušlin B. What can we learn from studies about multiple primaries? *Libri Oncologici.* 2007;35:7-15.
5. **Škledar M**, Nikolac M, Dodig-Ćurković K, Ćurković M, Borovečki F, Pivac N. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met and obesity in children and adolescents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;36:136-40.
6. Pučić M, Mužinić A, Novokmet M, **Škledar M**, Pivac N, Lauc G, Gornik O. Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence. *Glycobiology.* 2012; 22:975-982.
7. **Turčić Škledar M**, Milošević M. Breastfeeding and Time of Complementary Food Introduction as Predictors of Obesity in Children. *Cent Eur J Public Health.* 2015;23:26-31.

### **Kongresni sažeci**

1. Krušlin B, **Turčić M**, Novosel I, Reljić A, Čupić H, Ružić B, Belicza M. Assessment of different components of nonseminomatous testicular germ cell tumors. 12<sup>th</sup> Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, Zagreb 2001.

2. Novosel I, **Turčić M**, Čupić H, Reljić A, Belicza M, Krušlin B. Second primary tumors in the patients with primary renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002;41:51.
3. Krušlin B, Gall-Trošelj K, Čizmić A, **Turčić M**, Belicza M. LOH of p53 in congenital sacrococcygeal teratomas. *Mod Pathol*. 2002;15:312A.
4. Kozlović S, **Turčić M**, Fegeš-Bedić Ž, Kopjar A, Sladojević M, Čupić H, Krušlin B. Correlation between nuclear grade and cell type in renal cell carcinoma. *Acta clin Croat*. 2002;41:175-6A.
5. Zarubica J, Gabelić T, Bulimbašić S, **Turčić M**, Trnski D, Krušlin B. Myofibroblasts in invasive and in situ urothelial carcinoma of the bladder. 14<sup>th</sup> Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, Zagreb 2003.
6. Novosel I, **Turčić M**, Znaor A, Reljić A, Strnad M, Belicza M, Krušlin B. Second primary malignant tumors in patients with primary renal cell carcinoma. *Virchows Archiv*. 2003;443: 271-O-083.
7. Novosel I, **Turčić M**, Znaor A, Reljić A, Prskalo I, Krušlin B. Can the urologist benefit from studies of multiple primaries in patients with PRCC? 2<sup>nd</sup> Congress of Croatian oncological society with international participation, June 20-23, 2004.
8. Krajačić G, Romac I, Srbanić M, Kunjko K, **Turčić M**, Kos M, Balićević D, Krušlin B. Second primary malignant tumors in patients with primary colorectal adenocarcinoma. *Acta Clin Croat*. 2004;43:241.
9. Krušlin B, Tomić K, **Turčić M**, Tomas D, Kos M, Belicza M. Renal artery changes in patients with primary adenocarcinoma of the kidney. *Pathol International*. 2004;54:A36.
10. Planinc D, Gabrić ID, Trbušić M, **Turčić M**, Štambuk K, Mihatov Š. Kardiovaskularni čimbenici rizika u bolesnika s aortnom stenozom. *Liječ Vjesn*. 2004;126: 11.
11. Planinc D, Lukinac Lj, Gabrić ID, Trbušić M, **Turčić M**, Erdeljić V, Štambuk K, Mihatov Š. Klinički značaj serumske razine natriuretskih peptida u bolesnika s dilatacijskom kardiomiopatijom. *Liječ Vjesn*. 2004;126: 39.
12. Trbušić M, Gabrić ID, **Turčić M**, Planinc D, Mihatov Š. Sy. Dressler – zaboravljeni entitet. *Liječ Vjesn*. 2004;126:93.
13. **Škledar M**, Novosel I, Tomas D, Čupić H, Bulimbašić S, Reljić A, Belicza M, Krušlin B. Frequency and localization of metastases in patients with primary renal cell carcinoma who developed second primary tumors. *Pathologica*. 2007; Vol.99-N.5:337-338.
14. Pivac N, Nikolac M, Nedić G, Dodig-Ćurković K, Ćurković M, **Škledar M**, Muck-Šeler D. Molecular markers of behavioral and emotional disorders. *Period Biol*. 2010;112:31.
15. Nedić G, Hercigonja-Novković V, Dodig-Ćurković K, Ćurković M, **Škledar M**, Nikolac M, Muck-Šeler D, Pivac N. Dopaminergic mechanisms in attention deficit hyperactivity disorders in children. *Period Biol*. 2010; 112:34.