Utjecaj interakcija gena i okolišnih čimbenika na pojavnost metaboličkoga sindroma

Božina, Tamara

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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:105:477714

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository



Središnja medicinska knjižnica

Božina, Tamara (2014) ***Utjecaj interakcija gena i okolišnih čimbenika na pojavnost metaboličkoga sindroma.*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/2097

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Tamara Božina

Utjecaj interakcija gena i okolišnih čimbenika na pojavnost metaboličkoga sindroma

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Tamara Božina

Utjecaj interakcija gena i okolišnih čimbenika na pojavnost metaboličkoga sindroma

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena u Zavodu za kemiju i biokemiju Katedre za kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkoj jedinici za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb u okviru znanstvenog projekta „Funkcijska genomika i proteomika rizičnih čimbenika ateroskleroze“ Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (šifra projekta: 108-1080134-0136), čiji je voditelj prof. dr. sc. Jadranka Sertić.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Jadranka Sertić

Prije svega zahvaljujem se svim ispitanicima koji su sudjelovali u istraživanju.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof.dr.sc. Jadranki Sertić na podršci i korisnim savjetima, ne samo prilikom izrade ove disertacije, nego i tijekom cjelokupne zajedničke suradnje.

Zahvaljujem se djelatnicima Kliničke jedinice za molekularnu dijagnostiku te svim suradnicima i prijateljima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj obitelji koja mi je tijekom izrade ovog rada, kao i uvijek do sada, pružala podršku i razumijevanje.

Hvala Mislavu na ljubavi...

Sadržaj

Popis upotrijebljenih kratica

1.UVOD 1
1.1. Definicija i kratka povijest metaboličkoga sindroma 1
1.2. Epidemiologija metaboličkoga sindroma 3
1.3. Rizični čimbenici povezani s razvojem metaboličkoga sindroma 4
1.3.1. Promjenjivi rizični čimbenici (okolišni čimbenici) 5
1.3.1.1. Debljina 6
1.3.1.2. Prehrana 8
1.3.1.3. Inzulinska rezistencija 10
1.3.1.4. Hipertenzija 10
1.3.1.5. Upala 12
1.3.2. Nepromjenjivi rizični čimbenici 13
1.3.2.1. Dob i spol 13
1.3.2.2. Nasljeđivanje metaboličkoga sindroma 14
1.3.2.3. Genetička istraživanja metaboličkoga sindroma 15
1.3.2.4. Geni kandidati za metabolički sindrom 18
1.3.2.5. Nutrigenetika 19
1.4. Geni kandidati odabrani za ovo istraživanje 21
1.4.1. Gen *PPARγ* 21
1.4.2. Gen *LPL* 25
1.4.3. Gen *IL6* 26
1.4.4. Geni sustava renin-angiotenzin, *ACE* i *AT1R* 28
2. HIPOTEZA 31
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 31
4. ISPITANICI I METODE 32
4.1. Ispitanici 32
4.2. Metode 33
4.2.1. Analitički uzorci 33
4.2.2. Biokemijske analize 33
4.2.3. Analiza DNA 34
4.2.3.1. Izdvajanje DNA metodom isoljavanja 36
4.2.3.2. Genotipizacija 37

4.3. Statistička obrada podataka 44
5. REZULTATI 45
5.1. Opis uzorka 45
5.2. Odnos prehrane i ostalih ispitivanih parametara 48
5.3. Čimbenici rizika za metabolički sindrom 50
5.4. Čimbenici rizika za povišenu razinu glukoze natašte 54
5.4.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom 54
5.4.2. Zdrave kontrole 59
5.5. Čimbenici rizika za razvoj debljine 60
5.5.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom 60
5.5.2. Zdrave kontrole 65
5.6. Čimbenici rizika za povećan opseg struka 66
5.6.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom 66
5.6.2. Zdrave kontrole 68
5.7. Čimbenici rizika za povišene vrijednosti triglicerida 71
5.7.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom 71
5.7.2. Zdrave kontrole 74
5.8. Čimbenici rizika za snižen HDL kolesterol 76
5.8.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom 76
5.8.2. Zdrave kontrole 79
5.9. Čimbenici rizika za visok krvni tlak 81
5.9.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom 81
5.9.2. Zdrave kontrole 83
6. RASPRAVA 86
7. ZAKLJUČCI 100
8. SAŽETAK 101
9. SUMMARY 102
10. LITERATURA 103
11. ŽIVOTOPIS 125
12. BIBLIOGRAFIJA 126

POPIS UPOTRIJEBLJENIH KRATICA

ACE – angiotenzin-konvertirajući enzim

ADIPOQ – gen za adiponektin

APOA – apolipoprotein A

APOC – apolipoprotein C

AT1R – angiotenzin II tip 1 receptor

BDNF (engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) – moždani neurotrofni čimbenik

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

BRAP (engl. *BRCA1 associated protein*)

CETP (engl. *Cholesteryl Ester Transfer Protein*) – kolesterol-ester transportni protein

CRP – C-reaktivni protein

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

FTO (engl. *Fat Mass and Obesity-Associated Gene*)

GRS (engl. G*enetic Risk Score*) – zbir genetičkog rizika

GWAS (engl. *Genome-Wide Association Study)* - cjelogenomske studije povezanosti

HDL (engl. *High-Density Lipoprotein*) – lipoprotein visoke gustoće

HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije

IDF (engl. *International Diabetes Federation*) – Međunarodno udruženje za dijabetes

IL6 – interleukin 6

KCTD15 (engl. *Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 15*)

LDL (engl. *Low-Density Lipoprotein*) – lipoprotein niske gustoće

LPL – lipoprotein lipaza

LTA – limfotoksin-α

MC4R (engl. *Melanocortin 4 Receptor*) – melanokortin-4 receptor

MCP-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) – monocitni kemotaktični protein-1

MTCH2 (engl. *Mitochondrial Carrier 2*)

MUFA (engl. *Monounsaturated Fatty Acids*) – mononezasićene masne kiseline

NCEP-ATPIII (engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) – Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu

NEGR1 (engl. *Neuronal Growth Regulator 1*)

NR3C1 (engl. *Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1*)

PAI-1 – inhibitor aktivatora plazminogena-1

PCR (engl. P*olymerase Chain Reaction*) – lančana reakcija polimerazom

PCR-RFLP (engl. *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphisms*) – lančana reakcija polimerazom - polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka

PLCG1 (engl. *Phospholipase C, Gamma 1*)

PPARγ (engl. *Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ*) – receptor za aktivator proliferacije peroksisoma γ

PUFA (engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*) – polinezasićene masne kiseline

RAS – renin-angiotenzin sustav

ROS (engl. R*eactive Oxygen Species*) – reaktivni kisikovi spojevi

RXR (engl. *Retinoid X Receptor*) – receptor za retinoide X

SAT (engl. *subcutaneous adipose tissue*) – supkutano masno tkivo

SFA (engl. *Saturated Fatty Acids*) – zasićene masne kiseline

SH2B1 (engl. *SH2B Adaptor Protein 1*)

SMK – slobodne masne kiseline

SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) – polimorfizam jednog nukleotida

T2DM (engl. *Type 2 Diabetes Mellitus*) – šećerna bolest tipa 2

TMEM18 (engl. *Transmembrane Protein 18*)

TNF-α – čimbenik nekroze tumora α

TNNI3K (engl. C*ardiac Troponin I-Interacting Kinase*)

TRIB1 (engl. *Tribbles Pseudokinase 1*)

VAT (engl. *visceral adipose tissue*) – viscelarno masno tkivo

VLDL (engl. *Very Low-Density Lipoprotein*) – lipoprotein vrlo niske gustoće

WHO (engl. *World Health Organization*) – Svjetska zdravstvena organizacija

ZNF259 (engl. *Zinc Finger Protein 259*)

1. Uvod

Zbog uloge koju ima u povećanju rizika od kardiovaskularnih bolesti (engl. *Cardiovascular Diseases*, CVD) i šećerne bolesti tipa 2 (engl. *Type 2 Diabetes Mellitus*, T2DM), metabolički sindrom (MetS) je rastući globalni javnozdravstveni problem. Čini ga skup promjenljivih rizičnih čimbenika uključujući hipertenziju, abdominalnu pretilost, dislipidemiju i inzulinsku rezistenciju, udruženih s nepromjenljivim rizičnim čimbenicima kao što su dob, spol i genetičko naslijeđe. Premda je prepoznata važnost naslijeđa u razvoju MetS, uloga pojedinačnih gena te njihovih međusobnih interakcija uz varijabilne okolišne čimbenike još nije sasvim jasna. Postoje značajni prijepori epidemiologa i genetičara oko pitanja postoji li MetS kao odvojen sindrom i kako bi trebao biti definiran. Prema kliničkoj definiciji, osobe s MetS imaju najmanje pet puta povećan rizik za razvoj T2DM i dva puta veći rizik za CVD.

1.1. Definicija i kratka povijest metaboličkoga sindroma

1988. godine Gerald Reaven iznosi stajalište kako inzulinska rezistencija i kompenzatorna hiperinzulinemija mogu dovesti do različitih metaboličkih poremećaja, T2DM i kardiovaskularnih poremećaja (Reaven, 1988). Udruživanje ovih poremećaja prvotno se naziva ″sindrom X″ i ″sindrom inzulinske rezistencije″, dok je danas poznatiji pod nazivom MetS. Originalna definicija sastavnica MetS uključivala je poremećenu toleranciju glukoze, hiperinzulinemiju, snižene razine HDL kolesterola, povišene razine VLDL kolesterola i triglicerida te arterijsku hipertenziju, s naglaskom da je inzulinska rezistencija poveznica - osnovni uzrok ovog sindroma. U zadnja dva desetljeća postalo je jasno da ti čimbenici nisu uvijek tijesno povezani isključivo preko inzulinske rezistencije, premda je ona ključna sastavnica. Uvedene su dodatne definicije MetS koje su uključivale alternativne sastavnice poput centralnog tipa debljine (povećan opseg struka), mikroalbuminurije i protrombotskih čimbenika. Učinjeni su dodatni napori u stvaranju kliničkih i dijagnostičkih kriterija i smjernica za MetS kako bi se omogućila objektivna procjena ovog stanja na temelju standardiziranih kriterija (Tablica 1). Pokušaji standardizacije definicije MetS rezultirali su prvom radnom definicijom Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) iz 1999. godine koja kao osnovni uvjet za postavljanje dijagnoze MetS navodi inzulinsku rezistenciju (WHO, 1999). Međutim, ova definicija nije naišla na široku primjenu u kliničkoj praksi niti u populacijskim istraživanjima. Jedan od razloga je bio i u

određivanju koncentracije inzulina u krvi pomoću euglikemijske spone što je složen i neprikladan postupak za kliničku praksu. Osim toga, za određivanje debljine je predložen omjer opsega struka i bokova koji se pokazao lošijim pokazateljem ukupne količine masnog tkiva u abdomenu, u odnosu na mjeru opsega struka.

Tablica 1. Različite definicije metaboličkoga sindroma

Uvjet	Svjetska zdravstvena organizacija (WHO)	Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu (NCEP-ATPIII)	Međunarodno udruženje za dijabetes (IDF)
Obavezan uvjet	Dijabetes ili intolerancija glukoze ili inzulinska rezistencija plus bilo koja dva ili više drugih uvjeta	Bilo koja kombinacija od tri ili više uvjeta	Povećan opseg struka plus bilo koja dva ili više drugih uvjeta
Debljina	ITM ≥30 kg/m^2 i/ili omjer struka i bokova: ≥0,9 (M); ≥0,85 (Ž)	Opseg struka ≥102 cm (M) Opseg struka ≥88 cm (Ž)	Opseg struka ≥94 cm (M) Opseg struka ≥80 cm (Ž)
Trigliceridi	≥1,7 mmol L^{-1}	≥1,7 mmol L^{-1}	≥1,7 mmol L^{-1} *
HDL kolesterol	<0,9 mmol L^{-1} (M) <1,0 mmolL^{-1} (Ž)	<1,036 mmol L^{-1} (M) <1,295 mmol L^{-1} (Ž)	<1,036 mmol L^{-1} (M) <1,295 mmol L^{-1} (Ž) *
Arterijski tlak	≥140/90 mmHg *	≥130/85 mmHg *	≥130/85 mmHg *
Koncentracija glukoze na tašte		≥6,1 mmol L^{-1} *	≥5,6 mmol L^{-1} *

KRATICE: ITM – indeks tjelesne mase; M – muškarci; Ž – žene; * – ili uzimanje lijekova

Danas su u upotrebi uglavnom dva od više različitih predloženih kriterija za definiciju MetS. Jedan je ustanovila skupina stručnjaka Međunarodnog udruženja za dijabetes (engl. *International Diabetes Federation*, IDF), a drugi prijedlog kriterija dolazi od Nacionalnog programa obrazovanja o kolesterolu (engl. *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, NCEP-ATP III) iz Sjedinjenih američkih država. Ova radna skupina je predložila pet kriterija, od kojih su tri dovoljna za kliničku identifikaciju sindroma: abdominalna debljina, povišeni trigliceridi, nizak HDL kolesterol, krvni tlak ≥ 130/85 mmHg i glukoza natašte ≥ 6,1 mmol/L (NCEP-ATP III, 2001). Glavna razlika između navedena dva sustava kriterija za MetS odnosi se na granične vrijednosti nekih parametara poput

abdominalne debljine i uvjeta pod kojima se njihova prisutnost smatra obligatornom komponentom MetS u sustavu IDF kriterija. Provedene su komparativne studije o prevalenciji MetS ovisno o primijenjenim kriterijima. Kako su granične vrijednosti opsega struka za identifikaciju abdominalne pretilosti niže u IDF kriterijima u usporedbi s istima objavljenima u NCEP-ATP III, učestalost MetS je bila viša u prvom slučaju. 2009. godine publicirani su objedinjeni kriteriji za MetS koji su rezultat dogovora između nekoliko glavnih organizacija (Alberti i sur., 2009). Dogovorene su granične vrijednosti za sve sastavnice MetS osim za opseg struka. Zbog velike međuetničke varijabilnosti, zaključeno je da ne treba inzistirati na jednoj graničnoj vrijednosti za opseg struka.

1.2. Epidemiologija metaboličkoga sindroma

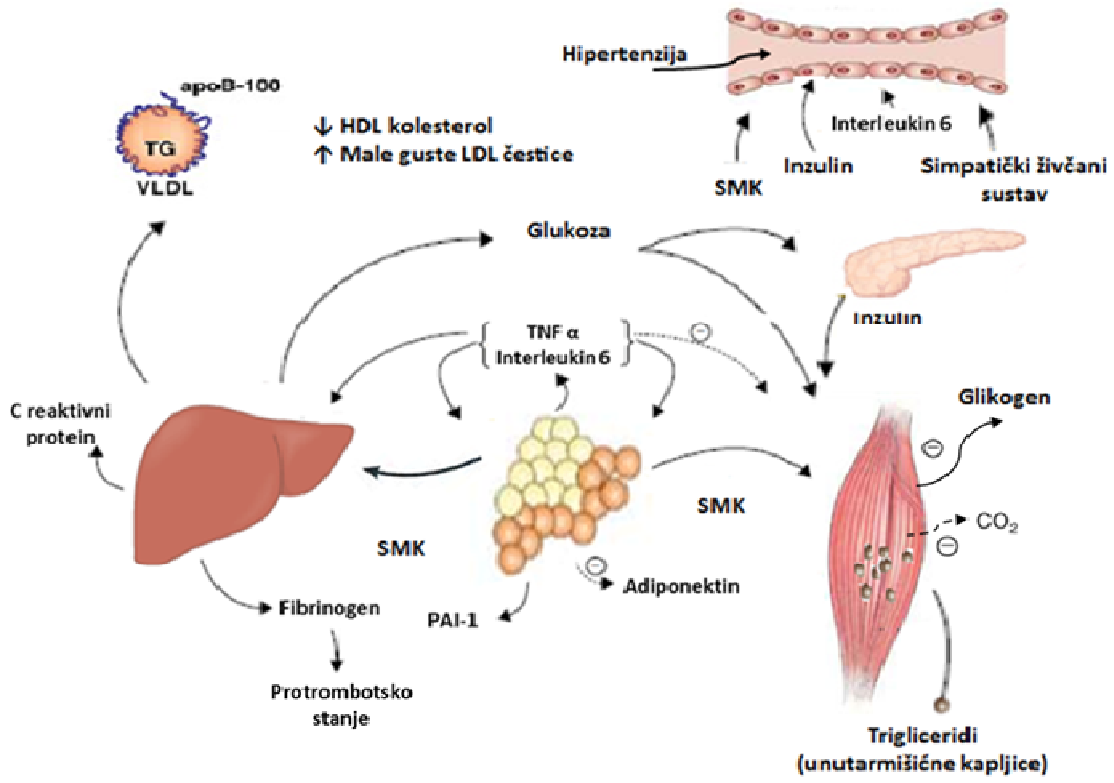
MetS je vrlo raširen diljem svijeta i prevalencija na globalnoj razini raste, a povezana je s rastućom prevalencijom pretilosti. Procjena prevalencije MetS u svijetu ovisi o definiciji koja se koristi kao i o sastavu ispitivanog stanovništva (spol, dob, rasa, nacionalnost) (Cornier i sur., 2008). Dostupni podaci govore o zahvaćenosti između 20% do 30% odrasle populacije u većini razvijenih zemalja (Grundy, 2008; Gurka i sur., 2013). U Sjedinjenim američkim državama oko 25% odraslih u dobi iznad 20 godina i 40% u dobi iznad 60 godina ima znakove MetS (Ervin i sur., 2013). Donedavno se smatralo da su T2DM i MetS bolesti odraslih. Ipak, povećanjem učestalosti pretilosti u mladih ljudi jasno je da bolest može početi u bilo kojoj dobi i u svim etničkim skupinama. Prevalencija MetS raste sa stupnjem debljine, a može doseći i 50% u vrlo pretilih mladih ljudi. Svako povećanje BMI za pola jedinice povećava rizik razvoja MetS u osoba s povećanom tjelesnom masom i onih pretilih (omjer rizika - 1,55). U toj populaciji već su prisutni biomarkeri povećanog rizika za opasna kardiovaskularna događanja (Cornier i sur., 2009).

Prevalencija MetS u Republici Hrvatskoj je 39-42% u žena i 28-35% u muškaraca s razlikama koje ovise o regiji, kao i o kriteriju koji se koristio (Poljičanin i sur., 2012). U istraživanju na uzorku populacije devet dalmatinskih otoka prevalencija MetS prema definiciji NCEP-ATP III iznosila je 34% s većom prevalencijom kod žena (39%) u odnosu na muškarce (28%) (Kolčić i sur., 2006). Prevalencija MetS prema prilagođenoj definiciji NCEP-ATP III u regiji Baranje iznosila je 40% (35% kod muškaraca i 42% kod žena) (Tucak-Zorić i sur., 2008). U istraživanju populacije za koju skrbe liječnici obiteljske medicine grada Zagreba, dijagnostičke kriterije za MetS prema definiciji SZO zadovoljavalo je 6,01% ispitanika i

6,78% ispitanica (Marković i sur., 2007). Ovako niska prevalencija se može pripisati malom postotku zabilježenih postupaka i laboratorijskih pretraga u zdravstvenom kartonu pacijenata. U nedavno provedenoj studiji na starijoj institucionaliziranoj populaciji (561 ispitanik prosječne dobi 79 godina) utvrđena je prevalencija MetS od 20,8% (Nevajda i sur., 2013).

1.3. Rizični čimbenici povezani s razvojem metaboličkoga sindroma

Patofiziologija MetS je vrlo složena i samo je djelomično razjašnjena (Slika 1). Većina bolesnika je starija, pretila, slabo tjelesno aktivna, sa sjedilačkim navikama i određenim stupnjem inzulinske rezistencije. Postoje prijepori jesu li debljina ili inzulinska rezistencija uzroci MetS ili su oni posljedica uznapredovale metaboličke disfunkcije.



Slika 1. Patofiziologija metaboličkoga sindroma (inzulinska rezistencija) (modificirano prema Eckel i sur., 2005)

Slobodne masne kiseline (SMK) se oslobađaju u izobilju iz proširene mase masnog tkiva. U jetri, SMK izazivaju povećanu proizvodnju glukoze, triglicerida (TG) i lučenje lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL). Povezani poremećaji lipida/lipoproteina uključuju smanjenje

lipoproteina visoke gustoće (HDL) i veću zastupljenost lipoproteina niske gustoće (LDL). SMK također smanjuju osjetljivost na inzulin u mišiću inhibirajući inzulinom posredovano preuzimanje glukoze. Povezani nedostaci uključuju smanjeno stvaranje glikogena i povećano nakupljanje lipida u obliku TG. Povećanje cirkulirajuće glukoze, a do neke mjere i povećanje SMK povećava sekreciju inzulina iz gušterače što rezultira hiperinzulinemijom i može dovesti do pojačane reapsorpcija natrija i povećane aktivnosti simpatičkog živčanog sustava i doprinijeti hipertenziji što može povećati razinu cirkulirajućih SMK. Inzulinskoj rezistenciji nastaloj zbog povećanih SMK dodatno doprinosi i parakrini i endokrini učinak proupalnog stanja. Pojačano izlučivanje interleukina 6 (IL 6) i čimbenika nekroze tumora alfa (TNF-α) u različitim stanicama u masnom tkivu, uključujući adipocite i makrofage nastale iz monocita, uz ostale čimbenike dovodi do još veće otpornosti na inzulin i lipolize TG pohranjenih u adipoznom tkivu u cirkulirajuće SMK. IL 6 i drugi citokini također su povišeni u cirkulaciji, a mogu povećati stvaranje glukoze i VLDL-a u jetrima i inzulinsku rezistenciju u mišićima. Citokini i SMK također povećavaju stvaranje fibrinogena i inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) u jetrima nadopunjujući hiperprodukciju PAI-1 u masnom tkivu. Sve to rezultira protrombotskim stanjem. Smanjenje proizvodnje antiupalnog i inzulinom senzibilizirajućeg citokina adiponektina je također povezano s patofiziologijom MetS.

Rizični čimbenici za razvoj bilo koje bolesti mogu se u najširem smislu podijeliti na vanjske/okolišne i genetičke. U vanjske čimbenike svrstavaju se dob, spol, navike i životni stil, socioekonomski i psihosocijalni uvjeti, itd. Poznat je niz rizičnih čimbenika čije međudjelovanje može dovesti do razvoja MetS, ali zbog složenosti njihovih mogućih interakcija ne može se jednoznačno odrediti koji čimbenik uzrokuje MetS, premda je postalo jasno da to nije samo jedan čimbenik, poput npr. inzulinske rezistencije ili debljine. Najznačajniji čimbenici su redom: i) starenje ii) genetičko ustrojstvo iii) dnevne navike i životni stil.

1.3.1. Promjenjivi rizični čimbenici (okolišni čimbenici)

Vanjski/okolišni čimbenici rizika za razvoj MetS su međusobno snažno isprepleteni i ovisni jedni o drugima (Viguerie i sur., 2012). Debljina je povezana s prehrambenim navikama i vrstama namirnica koje konzumiramo te s tjelesnom aktivnosti, dok su različiti socioekonomski pokazatelji povezani s gotovo svim rizičnim čimbenicima za razvoj MetS, ali i kardiovaskularnih bolesti. Kvaliteta fetalne prehrane se smatra potencijalno važnim okolišnim čimbenikom za razvoj MetS (Vuguin i sur., 2013). Ustanovljena je obrnuta

povezanost između porođajne težine i CVD. Rani životni stresori, poput siromašne prehrane majke, maternalna pretilost te brzo postnatalno dobivanje na težini, mogu programirati metaboličku prilagodbu za preživljavanje u nutrijentima siromašnom okolišu. Zato, ako postporođajni okoliš nije siromašan nutrijentima, takvo programiranje može dovesti do razvoja MetS u odrasloj dobi.

1.3.1.1. Debljina

U prošlosti debljina je bila prednost i uvjet za preživljavanje naših predaka. Teorija štedljivog gena (engl. *thrifty gene hypothesis*) temelji se na prirodnoj selekciji gena koji su ljudima osiguravali energiju iz zaliha energije tijekom razdoblja bez mogućnosti pribavljanja hrane, a mogućnost nastanka inzulinske rezistencije pridonosila je osiguravanju glukoze za potrebe središnjeg živčanog sustava u vrijeme gladovanja.

Prije dvadeset godina Hales i Barker su publicirali pionirske radove u kojima iznose hipoteze o '*thrifty phenotype hypothesis'*. Iznijeli su postulat o fetalnom programiranju kao važnom čimbeniku u nastanku T2DM, MetS i kardiovaskularnih bolesti (Hales i sur., 1992; Barker i sur., 1993). Kasnije su studije na identičnim blizancima i životinjskim modelima potvrdile ovaj koncept o važnosti ranog programiranja. Međutim, tek se u današnje vrijeme detaljno opisuju mehanizmi koji objašnjavaju kako fenomeni koji su se desili u ranoj životnoj dobi mogu imati dugoročne učinke na staničnu funkciju i posredno na metabolizam. Ti mehanizmi uključuju 1) stalne strukturne promjene u organu koje rezultiraju suboptimalnim koncentracijama faktora u važnom razvojnom razdoblju, na primjer, trajno smanjenje mase β stanica u endokrinom dijelu gušterače 2) stalne promjene u epigenetičkim modifikacijama (npr. metilacija DNA i modifikacija histona) koje mogu rezultirati promjenama u genskoj ekspresiji (nekoliko je transkripcijskih faktora osjetljivo na programirane promjene genske ekspresije putem ovih mehanizama) i 3) stalni utjecaj na regulaciju staničnog starenja (npr. povećanje oksidacijskog stresa koji može dovesti do makromolekularnih oštećenja, uključujući DNA i telomere) (Tarry-Adkins i sur., 2011; Lazar, 2005).

Masno se tkivo donedavno smatralo metabolički neaktivnim i opisivano je samo kao energetsko skladište organizma, kao izvor masnih kiselina u sitom stanju te toplinski izolator i mehanički "jastuk" u sisavaca. Danas se zna da je to endokrini organ koji komunicira sa središnjim živčanim sustavom i perifernim tkivima. Endokrinim, parakrinim ili autokrinim signalima masne stanice – adipociti reguliraju rad drugih masnih stanica smještenih u mozgu,

mišićima, jetri ili gušterači (Scherer, 2006). Uz to, masno je tkivo aktivno uključeno i u metaboličke procese kao što su angiogeneza, adipogeneza, stvaranje i razgradnja ekstracelularnog matriksa, steroidni metabolizam, imunosni odgovor organizma i hemostaza (Bays i sur., 2008). Masno tkivo sadrži različite tipove stanica. Jednu trećinu čine adipociti, a ostale stanice su fibroblasti, makrofagi, stromalne stanice, monociti i preadipociti. Diferencijacija preadipocita u adipocite je regulirana pomoću složene mreže transkripcijskih faktora koji koordiniraju ekspresiju stotine proteina odgovornih za uspostavu fenotipa zrelih masnih stanica. U središtu ove mreže su dva glavna faktora adipogeneze, PPARγ i C/EBPα, koji nadgledaju cijeli proces terminalne diferencijacije (Farmer, 2006).

Iako se debljina definira kao stanje prekomjernog nakupljanja masnog tkiva u organizmu, u procjeni kardiovaskularnog rizika važnija je raspodjela nego količina tjelesne masti. Još je 1947. godine Vague uočio dva oblika raspodjele masti u ljudskome tijelu. Prvi, androidni (ili muški, centralni, visceralni, abdominalni, pretilost trupa ili gornjeg dijela tijela, jabukoliki) i drugi, ginoidni (ili ženski, periferni, gluteofemoralni, pretilost donjeg dijela tijela, kruškoliki) oblik (Žmire, 2004).

Abdominalno masno tkivo sastoji se od supkutanog (potkožnog) i intraabdominalnog masnog tkiva (visceralnog), koje se nalazi unutar trbušne šupljine. Raspodjela abdominalne masti nije identična u različitih osoba te se razlikuje među osobama s jednakom ukupnom količinom masnog tkiva. Količina intraabdominalne masti povećava se sa životnom dobi u oba spola, izraženije u muškaraca nego u žena. Do šezdesete godine života u žena dominira supkutano masno tkivo, a kasnije poprima androidni, centralni tip (Enzi i sur., 1986), što se objašnjava povišenom androgenom aktivnosti u žena u menopauzi. Nakupljanje masnog tkiva u muškaraca tijekom čitavog života ima tendenciju zahvaćanja intraabdominalnog prostora. Na temelju magnetske rezonance procijenjeno je da muškarci mogu oko 15-18%, a žene 7-8% od njihove ukupne tjelesne masti sadržavati u trbušnoj šupljini (Garg, 2004).

Različitoj lokalizaciji i raspodjeli masnog tkiva odgovara i različita funkcija, ali oba djeluju povezano. Potkožno masno tkivo ima uglavnom ulogu toplinske izolacije, iako ima i neke metaboličke funkcije koje su osobito izražene u pretilih osoba. Naprimjer, povećanu visceralnu lipolizu, potkožno masno tkivo kompenzira pohranom viška neesterificiranih masnih kiselina (Yang i Smith, 2007). Neumjerena metabolička aktivnost visceralnog masnog tkiva povezuje se s inzulinskom rezistencijom, dislipidemijom, hipertenzijom, hiperkoagulabilnošću i kardiovaskularnim rizikom (Jensen, 2006). To je tkivo i metabolički najaktivnije i luči brojne hormone i citokine, kao što su leptin, adiponektin, rezistin, serpin, lipocalin-2, PAI-1, Zn α-2 glikoprotein, vaspin, visfatin, omentin, apelin, kemerin koji imaju

sistemsko djelovanje te TNF-α, IL 6 i monocitni kemotaktični protein-1 (MCP-1) koji sudjeluju u upalnim reakcijama (MacDougald i Burant, 2007). U ispitivanju ekspresije gena u visceralnom (engl. *visceral adipose tissue*, VAT) u odnosu na supkutano masno tkivo (engl. *subcutaneous adipose tissue*, SAT) koristeći metode mikropostroja (engl. *microarrays*), identificirana su 294 gena koja su pokazivala različitu ekspresiju između VAT i SAT, te su nadalje analizirane funkcionalne korelacije. Publicirani podaci ukazuju na povećanu zastupljenost puteva koji se povezuju s upalom i oksidativnim stresom u VAT, dok su putevi uključeni u inzulinsku homeostazu kao i putevi koji se odnose na nekoliko faktora rasta više zastupljeni u SAT (Koršić i sur., 2012).

Postoji nekoliko načina mjerenja prekomjerne tjelesne težine i debljine. Najčešće korišteni parametar za procjenu statusa uhranjenosti je indeks tjelesne mase (engl. *body mass indeks*, BMI). Za procjenu središnjeg (abdominalnog) nakupljanja masti koristi se opseg struka (engl. *waist circumference*, WC) ili omjer opseg struka i bokova (engl. *waist to hip ratio*, WHR). Brojna istraživanja su utvrdila da su pokazatelji središnjeg nakupljanja masti bolji diskriminatori kardiovaskularnih čimbenika rizika (hipertenzija, T2DM i dislipidemija) u odnosu na BMI. Postoje mišljenja da je najbolja mjera opseg struka jer on procjenjuje količinu intraabdominalnog masnog tkiva koje je i najodgovornije za metaboličke promjene koje se događaju kod pretilih osoba. Najnoviji kriteriji za dijagnozu MetS služe se upravo opsegom struka kao pokazateljem središnje raspodjele masti.

1.3.1.2. Prehrana

Mnoge epidemiološke i kliničke studije potvrđuju kako promjena stila života, uključujući promjene prehrambenih navika mogu imati ključnu ulogu u prevenciji MetS. Dok je redukcija suvišne tjelesne težine i smanjenje unosa kalorija jedan od glavnih pristupa u liječenju MetS, poboljšanje kvalitete prehrane se pokazao kao bolji i lakše izvediv pristup liječenju. Mediteranska prehrana (MedDiet) je dijetetski pristup koji je već pokazao svoje kardioprotektivne učinke kao i pozitivne učinke na pretilost i T2DM. Studija provedena među stanovništvom Krete u Grčkoj je pokazala da je, unatoč visokom unosu masti, zabilježena vrlo niska stopa koronarne bolesti i nekih vrsta raka te duži životni vijek (Nestle, 1995).

Definiranje MedDiet je zahtjevno, s obzirom na široko geografsko područje koje uključuje najmanje 16 zemalja uz Sredozemno more. Tijekom godina, MedDiet je promovirana kao model za zdravu prehranu. Glavne karakteristike MedDiet uključuju obilje biljne hrane: voće, povrće, cjelovite žitarice, orašasti plodovi, mahunarke; maslinovo ulje kao glavni izvor masti;

konzumacija ribe i peradi; relativno niska potrošnja crvenog mesa te umjerena konzumacija vina, obično uz obroke. U svim slučajevima, omjer mononezasićenih prema zasićenim mastima je puno veći nego u drugim mjestima u svijetu, uključujući i Sjevernu Europu i Sjevernu Ameriku (Giugliano i Esposito, 2005). Prvi dokazi iz kliničkih ispitivanja u prilog zdravstvenim prednostima MedDiet dolaze iz studije u kojoj je bolesnicima s infarktom miokarda nasumično dodijeljena mediteranska dijeta ili kontrolna prehrana koju predlaže Američko udruženje za srce (engl. *American Heart Association*). Rizik od novog akutnog infarkta miokarda ili pojave angine pektoris isto kao i broj novih dijagnoza zatajenja srca su smanjeni za 70 % u skupini ispitanika na MedDiet (de Lorgeril i sur., 1999).

U randomiziranoj studiji Esposita i suradnika nasumično je raspoređeno 180 bolesnika s MetS na MedDiet (dobili upute o povećanju dnevne potrošnje cjelovitih žitarica, povrća, voća, orašastih plodova i maslinovog ulja; n = 90) nasuprot ispitanicima na preporučenoj prehrani za srčane bolesnike (engl. *cardiac-prudent diet*) sa unosom manjim od 30% masti (kontrolna skupina; n = 90). Fizička aktivnost je povećana podjednako u obje skupine. Nakon 2 godine, tjelesna težina je smanjena više u intervencijskoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, a osim toga, razina upalnih biljega i inzulinska rezistencija pala je više u intervencijskoj, nego u kontrolnoj skupini, te je poboljšana funkcija endotela (Esposito i sur., 2004).

Neka su istraživanja pokazala da je nekoliko parametara MedDiet obrnuto povezano s BMI ili opsegom struka. To je bio slučaj za cjelovite žitarice i vlakna. U velikoj multietničkoj studiji (Insulin Resistance Atherosclerosis Study), konzumacija tamnog kruha i povećani unos vlakana bio je povezan sa nižim opsegom struka (Liese i sur., 2004). Rezultati studija također ističu povezanost visokog unosa prehrambenih vlakana s manjom centralnom pretilosti (Wirfalt i sur., 2001).

U literaturi nalazimo nekoliko epidemioloških istraživanja koja su analizirala odnos između MedDiet i pojavnosti MetS. U studiji Alvarez Leona i suradnika nisu ustanovili povezanost (Alvarez Leon i sur., 2003). Međutim, zapaženo je da su ispitanici u trećem tromjesječju pridržavanja MedDiet imali za 70% manju prevalenciju povišenog krvnog tlaka i 2,5 puta višu prevalenciju euglikemije u odnosu na prvo tromjesečje. Ostale studije u kojima je analiziran taj odnos ističu koristan učinak MedDiet na MetS. Primjerice, u studiji Panagiotakosa i suradnika pokazano je da pridržavanje MedDiet smanjuje za 20% izglede nastanka MetS, bez obzira na dob, spol, tjelesnu aktivnost, lipidni status i krvni tlak (Panagiotakos i sur., 2004). Druga prospektivna studija također ističe nižu pojavnost MetS među ispitanicima koji su se bolje pridržavali MedDiet (Tortosa i sur., 2007).

1.3.1.3. Inzulinska rezistencija

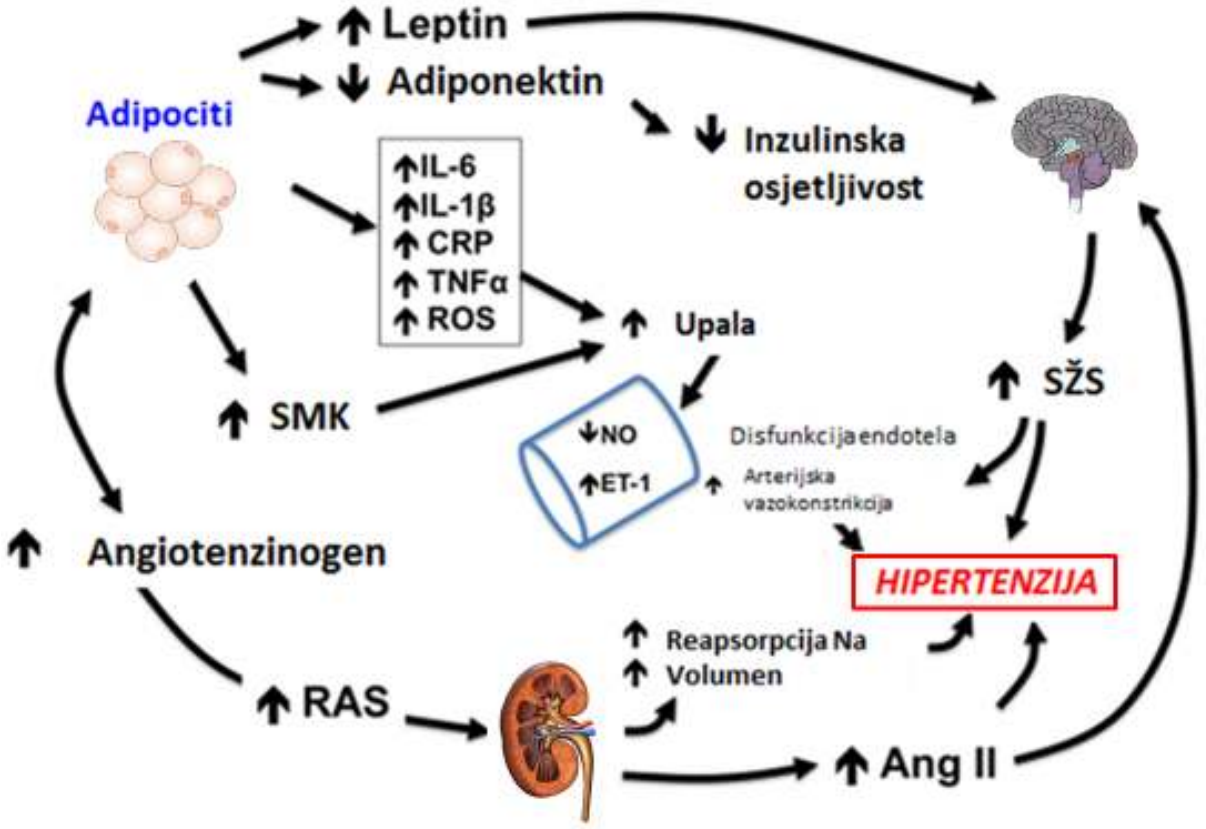
Inzulinska rezistencija predstavlja opće prihvaćeni koncept patofizioloških procesa povezanih s MetS. Inzulinska rezistencija opisuje poremećaj u kojem hiperinzulinemija održava euglikemiju. Glavni čimbenik koji doprinosi inzulinskoj rezistenciji je prekomjerna količina cirkulirajućih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline vezane na albumin u plazmi dolaze uglavnom iz trigliceridnih zaliha u masnom tkivu, a oslobađaju se pomoću enzima lipaze. Masne kiseline također nastaju lipolizom trigliceridima bogatih lipoproteina u tkivima djelovanjem LPL. Inzulin je važan i za antilipolizu i stimulaciju LPL. Najosjetljiviji metabolički put djelovanja inzulina je inhibicija lipolize u masnom tkivu. Stoga se s razvojem inzulinske rezistencije povećava lipoliza pohranjenih molekula triacilglicerola pri čemu se stvara još više masnih kiselina što dodatno može inhibirati antilipolitičke učinke inzulina stvarajući dodatnu lipolizu. Ulaskom u tkiva osjetljiva na inzulin, prekomjerne masne kiseline dovode do inzulinske rezistencije povećavajući dostupnost supstrata i modifikacijom signalizacije naniže.

1.3.1.4. Hipertenzija

Odnos hipertenzije i inzulinske rezistencije dobro je poznat, a objašnjava se s nekoliko različitih mehanizama. Važno je znati da je inzulin, primijenjen intravenski u ljudi s normalnom tjelesnom masom, vazodilatator sa sekundarnim učincima na reapsorpciju natrija u bubrezima. Taj je učinak opažen u ljudi bijele rase s MetS, ali ne i u afričkoj ili azijskoj populaciji (Barbato i sur., 2004). U uvjetima inzulinske rezistencije vazodilatatorni učinci inzulina se mogu izgubiti, dok renalni učinci na reapsorpciju natrija ostaju. Masne kiseline mogu posredovati u vazokonstrikciji. Inzulin također povećava aktivnost simpatičkog živčanog sustava i taj učinak ostaje nepromijenjen u uvjetima inzulinske rezistencije. Ipak, prema procjeni koncentracije inzulina natašte, HOMA inzulinski indeks rezistencije (engl. *homeostasis model assessment-estimated insulin resistance*, HOMA-IR), doprinos inzulinske rezistencije povećanoj prevalenciji hipertenzije u MetS je skroman (Eckel i sur., 2005).

Debljina također potiče zadržavanje natrija i povećava ekstracelularni volumen što bi trebalo inhibirati otpuštanje renina i stvaranje angiotenzina II. Međutim, u pretilih osoba je pojačana aktivnost renin-angiotenzinskog sustava (RAS) jer zbog snižene koncentracije natrija dolazi do njegove pojačane reapsorpcije u Henleovoj petlji i stimuliranja stvaranja renina (Slika 2).

Pojačana simpatička aktivnost i stvaranje angiotenzinogena u masnom tkivu dodatno pridonosi aktivaciji RAS-a (Vuković Lela i Jelaković, 2011).



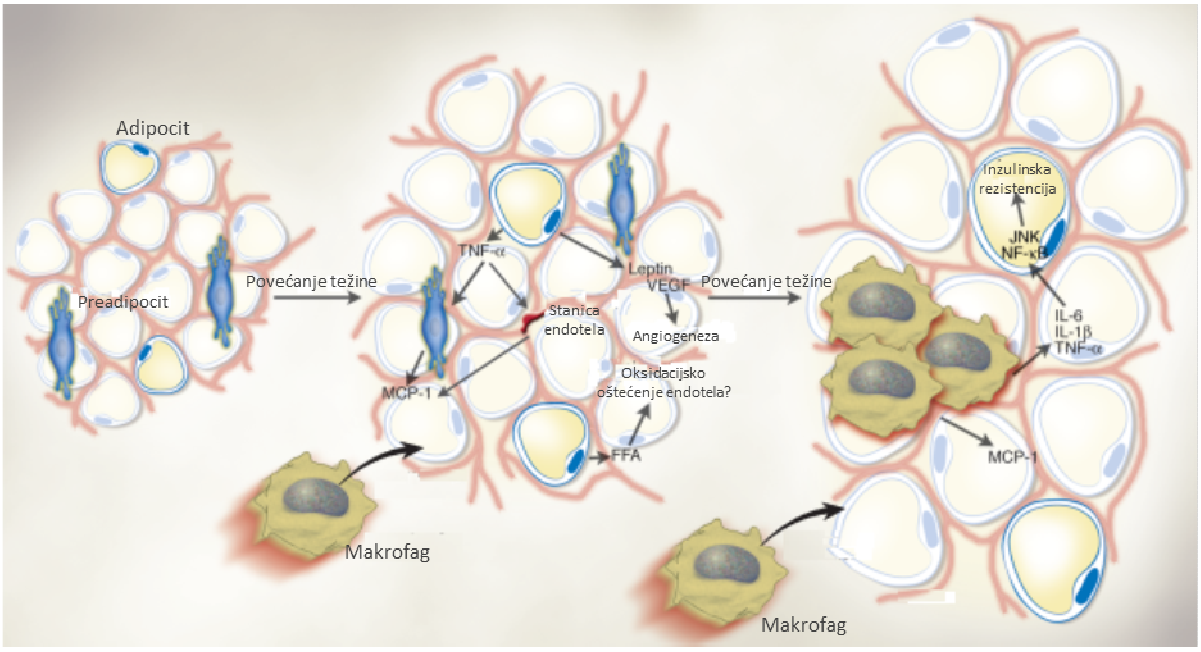
Slika 2. Predloženi mehanizmi uključeni u patogenezu hipertenzije inducirane debljinom

KRATICE: IL-6 – interleukin-6; IL-1β – interleukin-1β; CRP – C-reaktivni protein; TNFα – čimbenik nekroze tumora α; ROS – reaktivni kisikovi spojevi; SMK – slobodne masne kiseline; NO – dušikov oksid; ET-1 – endotelin-1; RAS – renin-angiotenzin sustav; SŽS – simpatički živčani sustav; Ang II – angiotenzin II (modificirano prema Kotsis i sur., 2010).

1.3.1.5. Upala

Iako nije uključena u definicije MetS, upala je jedan od ključnih procesa u podlozi metaboličkih poremećaja u osoba s prekomjernom tjelesnom masom. Masno tkivo je aktivni endokrini organ koji luči različite humoralne čimbenike (adipokine) koji u stanju debljine pospješuju stvaranje i oslobađanje proupalnih citokina. Adiponektin je visoko izražen u masnom tkivu, a snižene razine cirkulirajućeg adiponektina opažamo u stanjima debljine, inzulinske rezistencije udružene s T2DM te u koronarnoj srčanoj bolesti. Niske razine

adiponektina obrnuto koreliraju s općim pokazateljem upale, povišenim vrijednostima C-reaktivnog proteina (CRP) u bolesnika s T2DM i CVD. Koncentracije CRP mogu varirati ovisno o tjelesnoj aktivnosti pojedinca, a uočena je i međuetnička varijabilnost. Odnos između debljine i supkliničke upale prvi je put opisan 2003. godine, ukazujući na pozitivnu korelaciju između količine masnog tkiva i ekspresije TNF-α (Hotamisligil, 2003). Stvaranje proupalnih citokina uključujući IL 6, IL 8, TNF-α, IL 1β, rezistin, kao i upalni odgovor u akutnoj fazi (inhibitor aktivatora plazminogena-1, haptoglobin i serumski amiloid) koji se mogu detektirati u osoba s prekomjernom tjelesnom masom doprinose stanju trajne niske sistemske upale, a koja se opaža u kroničnim patološkim stanjima povezanima s MetS (poput ateroskleroze). Promjene u masnom tkivu u uvjetima MetS favoriziraju lučenje molekularnih posrednika koji su sposobni aktivirati ili suprimirati različite transkripcijske faktore (PPAR, C/EBPs, CCAAT) koji reguliraju metaboličke puteve udružene s MetS.



Slika 3. Adipociti i upala

KRATICE: SMK – slobodne masne kiseline; IL – interleukin; JNK – Jun N-terminalne kinaze; MCP – monocitni kemotaktični protein; NF – nuklearni faktor; TNF – čimbenik nekroze tumora; VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (modificirano prema Wellen i Hotamisligil, 2003).

Debelo masno tkivo je karakterizirano upalom i progresivnom infiltracijom makrofaga s razvojem pretilosti. Promjene u adipocitima i veličini masnih pločica vode do fizičkih promjena u okolnom području i modifikacije parakrine funkcije adipocita. Primjerice, u pretilosti adipociti počinju lučiti niske razine TNF-α, što može stimulirati preadipocite na

proizvodnju MCP-1. Isto tako, endotelne stanice također luče MCP-1, kao odgovor na lučenje citokina. Dakle, bilo preadipociti ili endotelne stanice mogu biti odgovorni za privlačenje makrofaga u masno tkivo. Rana ekspresija MCP-1 prije svih drugih biljega tijekom razvoja pretilosti također ukazuje da MCP1 u početku osim makrofaga stvaraju i druge stanice. Povećano izlučivanje leptina (i/ili smanjena proizvodnja adiponektina) iz adipocita također može pridonijeti nakupljanju makrofaga poticanjem transporta makrofaga u masno tkivo i promicanjem prianjanja makrofaga na endotelne stanice. Također je vrlo vjerojatno da fizička oštećenja endotela, uzrokovana bilo promjenama u veličini i učinku bilo oksidacijskim oštećenjem nastalim zbog sve većeg lipolitičkog okruženja, mogu imati ulogu u regrutiranju makrofaga, nalik onom u aterosklerozi. Bez obzira na to koji je početni podražaj za privlačenje makrofaga u masno tkivo, jednom kad su te stanice prisutne i aktivne, one zajedno sa adipocitima i ostalim tipovima stanica mogu produžiti začarani krug regrutiranja makrofaga, proizvodnju proupalnih citokina i narušavanje funkcije adipocita (Slika 3).

1.3.2. Nepromjenjivi rizični čimbenici

1.3.2.1. Dob i spol

Mnoge su epidemiološke studije dokazale porast prevalencije MetS s dobi, a ustanovljena je i značajna varijabilnost ovisna i o spolu. Ti se parametri zbog svoje važnosti na pojavnost MetS u istraživanjima uzimaju u obzir kao važni čimbenici koji dovode do posredne povezanosti (engl. *confounding factors*). Rizik za razvoj poremećaja unutar pojedinih sastavnica koje rezultiraju MetS raste s dobi, a posljedica su promjena u koncentraciji spolnih hormona i njihove uloge u organizmu. Na primjer, nakupljanje prekomjernog masnog tkiva u muškaraca je povezano s niskom razinom androgena, dok je smanjena razina estrogena i progestina koja se dešava u menopauzi povezana s povećanom centralnom raspodjelom masti u žena.

Osim porasta količine masnog tkiva za vrijeme prijelaza iz premenopauze u razdoblje postmenopauze, opisane su i promjene u koncentraciji serumskih lipida koje dovode do povećane aterogenosti, s povećanom koncentracijom LDL-kolesterola i triglicerida te smanjenom koncentracijom HDL kolesterola, uz promjene u metabolizmu glukoze i inzulina, koje rezultiraju porastom njihovih koncentracija.

Žene i muškarci se razlikuju u osjetljivosti prema MetS i njegovim sastavnicama, uključujući debljinu, inzulinsku rezistenciju, CVD i hipertenziju. Razlika između muškaraca i žena u inzulinskoj rezistenciji čini se da je povezana s razlikama u anatomskoj raspodjeli masnog

tkiva. Muškarci su skloniji akumulirati više visceralne masti koja se povezuje s inzulinskom rezistencijom, dok žene odlažu više masti potkožno. Nekoliko hipoteza pokušava objasniti vezu između visceralne masti i inzulinske rezistencije. Jedna je mogućnost da se osobine visceralne nasuprot potkožnoj masti razlikuju, što rezultira povećanom lipolizom u visceralnom masnom tkivu, aktivnosti glukokortikoidnog receptora i povećanim izlučivanjem proupalnih citokina te smanjenom sekrecijom na inzulin osjetljivog adiponektina. Alternativno, visceralni odjeljak može oslobađati SMK, proupalne citokine i druge metabolite masnog tkiva direktno u portalnu cirkulaciju. Istraživanja profiliranja genske ekspresije upućuju da postoje prirođene molekularne razlike između visceralnih i potkožnih skladišta masnog tkiva u ljudi i miševa. Štoviše, transplantacija potkožnog masnog tkiva u intraabdominalni odjeljak, u eksperimentalnom životinjskom modelu, dovela je do ukupnog smanjenja tjelesne masti i poboljšanja homeostaze glukoze. Studije upućuju na zaključak da su visceralna i potkožna masna skladišta mogla nastati iz različitih progenitorskih populacija, što se podudara sa zapažanjima u humanoj lipodistrofiji uzrokovanoj rijetkim mutacijama gena.

S obzirom na važne metaboličke razlike između visceralnog i potkožnog nakupljanja masti, važno je razumjeti genetičku pozadinu njihovog nastanka u žena i muškaraca.

1.3.2.2. Nasljeđivanje metaboličkoga sindroma

Razumijevanje genetičkih čimbenika koji povezuju pojedine sastavnice MetS i njihove međuodnose u MetS klinički je vrlo važno. Sva obilježja MetS su pod snažnom genetičkom kontrolom. Genetički čimbenici mogu utjecati na svaku pojedinu sastavnicu sindroma kao i na sam sindrom. Za većinu čimbenika nasljednost je oko 40%, dok za osobine poput pretilosti i razine HDL kolesterola nasljednost prema nekim istraživanjima doseže i do 70% (Monda i sur., 2010; Lusis, 2008). Ipak procjene nasljednosti su aproksimativne i često ne uzimaju u obzir interakcije gena i okoliša, gena i spola te gena i gena, jer ih je u humanoj populaciji teško razlučiti. Nadalje, procjene se odnose za određene ispitivane populacije i stoga odražavaju populacijsku različitost te raznolikost okolišnih čimbenika. Prva razumijevanja genetičke predispozicije za razvoj MetS dolaze iz ispitivanja svojstava koja se nasljeđuju po Mendelu ili iz ispitivanja gena koji su definirani biokemijskom svojstvima. Premda su ta istraživanja doprinijela razumijevanju molekularne razine procesa u homeostatskim mehanizmima, nisu objasnila međusobne interakcije gena te gena i okoliša.

Važnost genetičke uloge u razvoju MetS je ispitivana modelom grupiranja sastavnica u studijama koje su uključivale cijele obitelji ili blizance. U studiji na 2508 muških parova blizanaca, podudaranje grupiranja tri sastavnice MetS (hipertenzije, dijabetesa i pretilosti) ustanovljeno je u 31,6 % kod jednojajčanih parova u odnosu na 6,3 % kod dvojajčanih parova (Carmelli i sur., 1994). U skladu s tim nalazom u ispitivanju ženskih blizanačkih parova, procjene nasljednosti korištenjem klasičnog nemolekularnog pristupa za pretilost, inzulin/glukozu i dislipidemiju su bile redom 0,61, 0,87 i 0,25, što ukazuje na značajan genetički doprinos za pojavnost pojedine sastavnice (Edwards i sur., 1997).
U studijama genetičke predispozicije za MetS najčešće se istražuju četiri tipa povezanosti: 1) pojedinačni SNP i MetS, 2) SNP i osobine sastavnica MetS, 3) SNP i čimbenici MetS s kombinacijom pokazatelja za različite osobine sastavnica, 4) MetS i ukupan genetički zbir (engl. *genetic risk score*, GRS) izveden iz lokusa koji su povezani s jednom ili više osobina MetS (Kristiansson i sur., 2012)

1.3.2.3. Genetička istraživanja metaboličkoga sindroma

Istraživanja koja su se bavila genetičkom osnovom MetS su brojna i ukazuju na to da je MetS poligenska i multifaktorijelna bolest uvjetovana složenim međudjelovanjem brojnih gena i čimbenika okoliša, zbog čega istraživanje njegove genetičke podloge predstavlja velik izazov (Vattikuti i sur., 2012). Nesuglasja oko specifičnih definicija MetS su zakomplicirala kako klinička tako i genetička istraživanja, te se postavlja pitanje je li vrijedno istraživati sindrom kao specifičan entitet mimo istraživanja pojedinačnih njegovih sastavnica (Sjogren, 2008). Mnogi znanstvenici drže upitnom vrijednost dijagnoze MetS, nasuprot nespornoj vrijednosti dijagnosticiranja i liječenja pojedinih poremećaja, poput dislipidemije, hipertenzije, inzulinske rezistencije. Ističe se kako entitet MetS ne treba shvaćati u patofiziološkom smislu, već više kao pragmatični pristup, za postizanje boljeg kliničkog ishoda. Ipak, nije upitno da je koncept MetS upozorio i liječnike i javnost na važne interakcije kao što je veza između pretilosti i bolesti te povoljnih učinaka tjelovježbe na sve sastavnice MetS. Koncept MetS također je snažno potaknuo istraživanje ovih odnosa. Istraživanja gena koji reguliraju neke osobine MetS, koristeći analize povezanosti (engl. *linkage analysis*) nisu polučile veći uspjeh prvenstveno zbog male snage i slabe rezolucije neparametrijskih analiza povezanosti, kao i zbog neočekivane složenosti pojedinih svojstava.
Nakon dovršetka sekvenciranja humanog genoma, katalogizacijom čestih varijanti u humanoj populaciji te poboljšanjem metoda genotipizacije, cjelogenomske studije povezanosti (engl.

Genome-Wide Association Study, GWAS) su postale izgledne. Asocijacijske studije imaju veću snagu i imaju bolju rezoluciju od "*linkage*" pristupa. U mnogim je studijama s nejednakim uspjehom potvrđena uloga različitih gena u razvoju pojedinih sastavnica MetS, a otkriveni su i novi geni i genski lokusi. Ipak, te potvrđene povezanosti s čestim i rijetkim genskim varijantama odnose se na manji dio širokog spektra osobina MetS i objašnjavaju samo dio uloge nasljeđa koja može biti za neke osobine vrlo visoka, i do 90%, a za MetS ~30% (Fall i sur., 2014). Istraživanja provedena u obiteljima ukazuju da još neotkriveni genski lokusi mogu posredovati u klasteriranju sastavnica MetS premda neki istraživači nisu uspjeli identificirati objedinjujuće čimbenike (Kristiansson i sur., 2012). U nekim je istraživanjima MetS analiziran preko dihotomnih svojstava uz uporabu prihvaćenih definicija slučajeva i kontrola, pri čemu se uspjelo identificirati gene povezane sa određenim metaboličkim putevima, a koji imaju značajnu ulogu za različite fenotipove MetS (Kraja i sur., 2011). U tim asocijacijskim studijama sa svim fenotipovima MetS najčešće je ustanovljena snažna povezanost s jednom ili dvije fenotipske osobine MetS. Podaci o MetS kao entitetu se još uvijek temelje na kliničkim podacima o pojedinim njegovim sastavnicama, a ne na biološkim podacima koji bi povezivali gene koji ukazuju na podložnost za MetS s metaboličkim putevima značajnima za širi spektar komponenata MetS.

Pojedina obilježja MetS su visoko nasljedna - učestala su među srodnicima ovisno o stupnju srodnosti. Studije koje su koristile GWA pokazuju da ta obilježja nastaju kao rezultat kombinacije čestih i rijetkih genetičkih varijanti od kojih svaka doprinosi malim rizikom. Genetička istraživanja su identificirala neke ključne gene i ukazala na metaboličke puteve koji su krivo regulirani u MetS. Ipak, nužan je sistemski pristup koji će integrirati istodobne doprinose različitih polimorfizama brojnih gena, da bi se rasvijetlila ukupna uloga genetičkog naslijeđa za razvoj MetS. Za gene koji imaju utjecaj na više fenotipskih osobina kažemo da imaju pleiotropne učinke. Takvi geni se smatraju vrlo poželjnim ciljevima u liječenju, a doprinose i boljoj karakterizaciji različitih zajedničkih metaboličkih puteva. Postoje primjeri gdje pojedinačni geni posjeduju pleiotropne učinke na različite fenotipske osobine MetS. Primjer je gen *NR3C1* koji kodira glukokortikoidni receptor za koji je dokazana povezanost s debljinom, hipertenzijom i inzulinskom rezistencijom (Newton, 2013). *ADIPOQ* se povezuje s dijabetesom, hipertenzijom i dislipidemijom (Peters, 2013; Karmelić i sur., 2012). Studije GWA su otkrile mnoge gene povezane s debljinom, pretilošću centralnog tipa, krvnim tlakom, lipidima i glikemijskim svojstvima, od kojih neki pokazuju značajan učinak na više osobina. Među njima je ustanovljeno da gen za FTO (engl. *fat mass and obesity-associated gene*)

utječe ne samo na BMI već čini predispoziciju i za T2DM (Frayling i sur., 2007; Jacobsson i sur., 2012; Sallman i sur., 2013).

Cjelogenomske studije povezanosti (GWAS)

Prvi nacrt humanog genoma je publiciran u okviru Projekta Humanog Genoma (engl. *Human Genome Project*) i prva sveobuhvatna mapa čestih haplotipova je objavljena u okviru projekta HapMap. Većina parova baza u humanom genomu je zajednička svim ljudima stoga se genetičke asocijacijske studije fokusiraju na razlike u pojavnosti varijantnih oblika gena, najčešće jednonukleotidnih polimorfizama (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs). Dovršetkom Projekta Humanog Genoma i Projekta HapMap te razvojem tehnika genotipizacije visoke protočnosti (engl. *high-throughput genotyping techniques*), uz sofisticirane statističke i računarske metode, postignuti su uvjeti za opsežne studije GWA, u kojima se ispituje povezanost velikog broja genskih varijanti s različitim fenotipskim osobinama. U svrhu prilagodbe za velik broj testova provedenih u studijama GWA, provodili su se postupci poput korekcija za višestruko testiranje i replikacijske studije s neovisnim uzorcima, te je na taj je način minimiziran broj pogrešnih zaključaka. Povezanosti između ispitivane osobine i SNP-a koje su se održale nakon provedbe navedenih postupaka smatrale su se značajnima na razini genoma (engl. *genome-wide significant*). Za sada se povezanosti s varijantama gena koje dosežu statističku značajnost $p \leq 5x10^{-8}$ smatraju značajnima na razini genoma.

1.3.2.4. Geni kandidati za metabolički sindrom

MetS je fenotipski vrlo složen stoga su nužne genomske studije s velikim brojem ispitanika za pravilno utvrđivanje njegovih genetičkih odrednica. Najnovije asocijacijske studije su dale prve rezultate o mogućim genetičkim biljezima MetS. U studijama su korišteni SNP markeri širom genoma. Različite SNP varijante su izabrane među genima-kandidatima za koje se pretpostavlja da bi mogli biti uključeni u patogenezu. Tako su odabrani geni koji reguliraju lučenje adipokina, metabolizam lipoproteina, upalu, osjetljivost na inzulin i metabolizam ROS (engl. *reactive oxygen species*).

Provedeno je više studija s ciljem ispitivanja genetičke predispozicije za MetS. Pristup je bio različit. Nekoliko je studija mapiralo genske varijante povezane s pojedinim komponentama MetS, ispitujući svaku komponentu zasebno, poput krvnog tlaka, glikemijskih osobina i koncentracije lipida u plazmi. Druga su istraživanja provedena na način da je testiran MetS kroz binarna svojstva ili su ispitivane komponente koristeći bivarijatne ili multivarijatne metode. Bivarijatne metode se mogu smatrati na neki način paradoksnima, jer se za definiciju MetS koristi prisutnost tri ili više sastavnica.

Velika studija GWA provedena u indijskoj muškoj populaciji koja ima visoku prevalenciju MetS nije rezultirala značajnijim dokazima o zajedničkoj genetičkoj osnovi za sastavnice MetS (Zabaneh i sur., 2010). U drugačijem pristupu (Kraja i sur., 2011) u kojem je provedena bivarijatna GWA analiza, fenotipovi MetS su kombinirani u svim mogućim kombinacijama parova i osobe koje su premašile prag za oba testirana svojstva su se smatrale zahvaćenima. 28 SNP je bilo povezano s MetS ili s parom svojstava MetS. Varijante su locirane u ili blizu 15 gena povezanih s binarnim svojstvima ili sa samim MetS na razini značajnosti za čitav genom. Sve osim dvije od tih bivarijatnih povezanosti su uključivale poremećaje lipida. Varijante s najvećim utjecajem su bile u ili blizu genskih lokusa *LPL*, *CETP*, *APOA5*, *ZNF259* i *TRIB1*. Genske varijante koje su utjecale svaka zasebno na MetS su uključivale *LPL*, *CETP* i klaster *APOA* (*APOA5*, *ZNF259* i *BUD13*) i za sve je dokazana važna ulogu u metabolizmu lipida. I drugi autori upućuju na zaključke da su genetički učinci na razini lipida izraženiji u odnosu na ostale osobine MetS (Kristiansson i sur., 2012). U drugačijem pristupu, kombiniranjem 6 fenotipskih domena (aterogena dislipidemija, vaskularna disfunkcija, vaskularna upala, protrombotsko stanje, centralna pretilost i povišena glukoza) uključujući 19 kvantitativnih svojstava ispitana je povezanost s naglaskom na analizu pojedine sastavnice u europsko-američkoj populaciji (Avery i sur., 2011). Potom je primijenjena multivarijatna analiza koja je ispitala odnose osam glavnih sastavnica iz šest glavnih domena. Identificirani su značajni SNP predstavljajući 15 lokusa s značajnosti povezanosti na razini $p < 5 \times 10^{-8}$. Mnogi od tih lokusa bili su povezani samo s jednim svojstvom. Uz već poznate lokuse poput *FTO* i njegove povezanosti s centralnim tipom debljine, identificirana su i tri nova lokusa u ili blizu *APOC1*, *BRAP* i *PLCG1* povezana s više fenotipskih domena. Najjači novi pleiotropni signal je uočen za rs4420638 ($p = 1,7 \times 10^{-57}$), lociran blizu *APOC1* a povezuje se s povišenom glukozom, aterogenom dislipidemijom, vaskularnom upalom i centralnom pretilosti. Ako se ovi pleiotropni lokusi potvrde u replikacijskim studijama mogu pomoći u karakterizaciji poremećene metaboličke regulacije te definiranju ciljeva za terapijske intervencije.

U izvješću skupine za izradu genske mape debelih osoba (engl. *human obesity gene map*) navedeno je 127 gena s najmanje jednom pozitivnom povezanošću s fenotipovima vezanim uz pretilost (Rankinen i sur., 2006). Među njima, 22 gena su potvrđena u najmanje pet replikacijskih studija.

Provedena je studija GWA za MetS i njegove sastavnice u finskoj populaciji (2637 ispitanika s MetS i 7927 kontrolna ispitanika) te su prikupljeni podaci transkriptoma i NMR-om dobiveni metabolomski podaci. Nadalje, pomoću faktorske analize testirana je povezanost lokusa s višestrukim sastavnicama MetS te je izračunat zbroj rizika za MetS (Kristiansson i sur., 2012). Potvrđena je povezanost od ranije poznatog lipidnog lokusa, regije genskog klastera *APOA1/C3/A4/A5* (SNP rs964184) s MetS. Povezanost je dalje potkrijepljena analizom serumskih metabolita, gdje je ustanovljena veza između rs964184 i VLDL, TG i HDL metabolita ($p = 0{,}024\text{-}1{,}88\times10^{-5}$). Također su potvrđena već ranije identificirana 22 lokusa povezana s pojedinačnim sastavnicana MetS. Najčešće s radilo o povezanosti s lipidnim fenotipovima. (Puni nazivi navedenih gena nalaze se u popisu kratica.)

1.3.2.5. Nutrigenetika

Dugo već postoje spoznaje o individualnim razlikama u odnosima gena i nutrijenata, međutim tek je dovršenje Projekta Humanog Genoma značajno unaprijedilo naše znanje o recipročnim odnosima gena i nutrijenata te rezultiralo pojavom nove discipline, nutricijske genomike (Fenech i sur., 2011). Interakcije između prehrane i gena treba promatrati u dva smjera: utjecaj nutricijskih čimbenika na gensku regulaciju i ekspresiju predmet je istraživanja nutrigenomike (Kang, 2012). S druge strane, nutrigenetika ispituje na koji način genske varijante predodređuju nutritivne potrebe i preferencije pojedinca u fiziološkim, ali i određenim patofiziološkim uvjetima (Simopoulos, 2010; Ferguson, 2009). Utjecaj prehrane na tijek genetičkih informacija može se dešavati na različitim regulatornim mjestima. Napredak u genomici, transkriptomici, proteomici, metabolomici i epigenomici omogućio je brže i sveobuhvatnije razumijevanje procesa kojima bioaktivni sastojci hrane mogu utjecati na ljudsko zdravlje. Tako je pokazano da već *in utero*, nutricijski poremećaji mogu na epigenetičkoj razini modulirati *imprinting* na tkivno specifičan način. Anomalije u imprintingu se povezuju između ostalog s razvojem karcinoma, debljine, šećerne bolesti i poremećaja hranjenja (Bartolomei i Tilghman, 1997).

Genomske informacije uz primjenu tehnologija ‘omik’ donose nove spoznaje i bolje razumijevanje interakcija gena i nutijenata, a s krajnjim ciljem razvoja personaliziranih

smjernica za pravilnu prehranu koja može doprinijeti održavanju zdravlja i prevenciji bolesti (Ordovas i Corella, 2004).

Genetičke varijante mijenjaju osjetljivost na bolest preko modulacije učinaka modernog urbanog okoliša na fiziološke procese pojedinca. Ilustrativan primjer je česta genetička varijanta gena *FTO*, SNP rs9939609, u prvom intronu gena. Prisutnost genske varijante u različitim je populacijama povezana s povećanim rizikom za razvoj debljine i T2DM (Dina i sur., 2007; Frayling i sur., 2007). Kako bi bolje razumjeli mehanizme podložnosti debljini, znanstvenici su ispitivali razlike u prehrambenim navikama unosa hrane u djece sa i bez te genske varijante (Cecil i sur., 2008). U slučaju neograničenog pristupa hrani, djeca nosioci varijante *FTO* koja je povezana s debljinom konzumirala su više kalorija. Važno je bilo i zapažanje da je veći unos energije bio postignut ne zbog povećane količine konzumirane hrane, već zbog odabira kaloričnijih namirnica.

Polimorfizam u genu *PLIN* (kodira protein s važanom ulogom u pohrani masti u masnom tkivu) modulira odnos između unosa zasićenih masti i inzulinske rezistencije, neovisno o deblji (Corella i sur., 2006; Tai i Ordovas, 2007). Stoga je razložno zaključiti da pojedinci mogu različitim mehanizmima razviti debljinu i inzulinsku rezistenciju. To nadalje ukazuje na potrebu primjene individualizirnih pristupa i primjenu različitih dijetetičkih preporuka o vrsti dijete u pojedinaca s inzulinskom rezistencijom ili debljinom. Važno je naglasiti da su interakcije gena i nutrijenata vrlo složene i ovise o nizu čimbenika.

Istraživanja su ukazala na složenost interakcija između nutrijenata i bioaktivnih sastojaka hrane i genoma. U španjolskoj populaciji konzumiranje mononezasićenih masnih kiselina, MUFA (engl. *monounsaturated fatty acids*,) uglavnom iz maslinovog ulja, doprinosi varijabilnosti u vrijednostima HOMA-IR. Taj nalaz je dalje upućivao na postojanje interakcije između *PPARγ* Pro12Ala i količine MUFA iz hrane, pri čemu su debeli ljudi s alelom Ala12 imali više vrijednosti HOMA-IR, posebno u slučaju niske konzumacije MUFA (Soriguer i sur., 2006). U studiji provedenoj u talijanskoj dječjoj populaciji, u skupini pretile normolipemične djece Pro12Ala je bio povezan s većom osjetljivosti na inzulin i većim udjelom polinezasićenih masnih kiselina, PUFA (engl. *polyunsaturated fatty acids*) dugog lanca te razinom fosfolipida u plazmi (Scaglioni i sur., 2006).

Studije o genu *FTO* koji se povezuje s debljinom, jasno pokazuju kako okolišni čimbenici poput prehrane i tjelesne aktivnosti mogu modificirati podložnost pojedinca prema razvoju debljine (Andreasen i sur., 2008; 2012; Sonestedt i sur., 2011; 2009). Opisana je interakcija gen-dijeta (Luan i sur., 2001), između uzimanja PUFA i intermedijarnih fenotipova povezanih s debljinom i inzulinskom rezistencijom. Interakcija *PPARγ* Pro12Ala i PUFA/SFA

modulirala je vrijednosti BMI i inzulina na tašte. U drugoj replikacijskoj studiji u kineskoj populaciji, ovaj nalaz nije potvrđen (Tai i sur., 2004). Prema dostupnoj literaturi vrlo malo značajnih interakcija je potvrđeno u replikacijskim studijama.

1.4. Geni kandidati odabrani za ovo istraživanje

1.4.1. Gen *PPARγ*

Transkripcijski faktori, receptori za aktivator proliferacije peroksisoma – PPAR (engl. *peroxisome proliferator-activated receptor*) (PPARα, PPARδ i PPARγ) pripadaju superporodici jezgrenih receptora. Nakon vezanja određenog liganda tvore heterodimere s još jednim nuklearnim receptorom, receptorom za retinoide X (RXR, engl. *retinoid X receptor*). Taj se heterodimer veže za elemente odgovora unutar promotorske regije specifičnih-ciljnih gena i na taj način inducira gensku ekspresiju između ostalih gena uključenih u metabolizam lipida i glukoze, transport masnih kiselina, diferencijaciju adipocita i upalu (Ide i sur., 2003; Bell-Parikh i sur., 2003). Zbog alternativnog spajanja mRNA, pojavljuju se dvije izoforme proteina PPARγ1 i PPARγ2 (Fajas i sur., 1997). Dok se PPARγ1 nalazi posvuda u tijelu (Braissant i sur., 1996), PPARγ2 je uglavnom prisutan u masnom tkivu i crijevima. Među ligande PPARγ pripadaju različiti endogeni spojevi poput prostaglandina PGJ2, linolenske i arahidonske kiseline, te egzogeni spojevi poput tiazolidindiona i nesteroidnih protuupalnih lijekova. Studije *in vitro* i *in vivo* potvrđuju vrlo važnu ulogu PPARγ u reguliranju diferencijacije adipocita i skladištenju lipida (Rangwala i Lazar, 2000; Kletzien i sur., 1992); štoviše PPARγ je uključen u regulaciju lipidne homeostaze i osjetljivosti na inzulin (Olefsky, 2000). PPARγ je ciljno mjesto djelovanja tiazolidindiona (Lehmann i sur., 1995), lijekova koji poboljšavaju inzulinsku osjetljivost. Tijekom diferencijacije preadipocita u adipocite dolazi do indukcije PPARγ koja je najizraženija u bijelom i smeđem masnom tkivu. Također postoje dokazi koji upućuju da je PPARγ izražen u ključnim regijama mozga za kardiovaskularnu i autonomnu regulaciju (Yu i sur., 2012)

Izoforme PPARγ, velik broj ciljnih gena koje regulira, ligandi i koregulatori doprinose složenosti njegove funkcije. Uz to i genska varijabilnost PPARγ utječe na ekspresiju ciljnih gena.

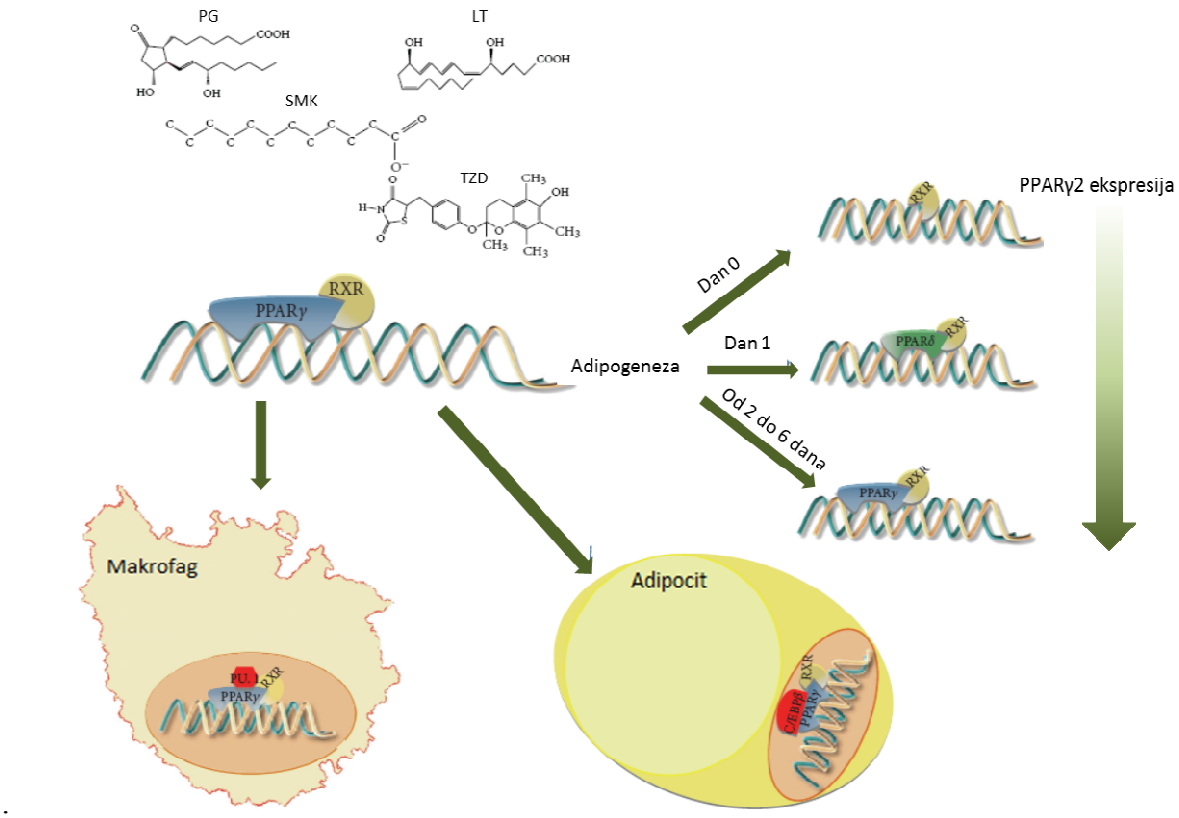
Gen *PPARγ* je lociran na kromosomu 3p25 i kodira transkripcijski faktor uključen u ekspresiju velikog broja gena. Između različitih varijanata *PPARγ* najučestaliji i najviše

istraživan je polimorfizam Pro12Ala (rs1801282) (Yen i sur., 1997). Učestalost varijante 12Ala varira od 2% do 18% i ovisi o rasnoj i etničkoj pripadnosti. U bijeloj rasi učestalost je oko 13% (Paracchini i sur., 2005). Supstitucija prolina u alanin u kodonu 12 doprinosi modulaciji transkripcijske aktivnosti (Deeb i sur., 1998). Ova supstitucija se nalazi uz NH_2-terminalni kraj proteina u domeni neovisnoj o ligandu, a aktivnost se pojačava preko fosforilacije inzulinom. Zamjena aminokiselina Pro12Ala može utjecati na strukturu i posljedično funkciju proteina jer alanin favorizira formaciju α-heliksa dok prolin to sprječava. Varijanta Ala ima smanjen afinitet prema elementu odgovora u ciljnim genima što u konačnici rezultira manje učinkovitom stimulacijom ciljnih gena (He, 2009). Dokumentirana je povezanost varijanti PPARγ s debljinom (Ochoa i sur., 2004), smanjenim BMI (Bouhaha i sur., 2008; Damcott i sur., 2004; Deeb i sur., 1998; Rosado i sur., 2007), povećanim BMI (Fornage i sur., 2005; Masud i sur., 2003). Različite meta analize povezanosti polimorfizma Pro12Ala i dijabetesa upućuju na smanjeni rizik za šećernu bolest u nosioca varijante 12Ala u odnosu na one koji imaju varijantu s Pro12 (Gouda i sur., 2010; Huguenin i Rosa, 2010), ali se također ističe da je povezanost između Pro12Ala i šećerne bolesti tipa 2 pod snažnim utjecajem i drugih genetičkih, ali i okolišnih čimbenika poput lipida u prehrani (Scacchi i sur., 2007) pa i intrauterinih uvjeta (de Rooij i sur., 2006).

Najnovija istraživanja uloge polimorfizama *PPARγ* upućuju na važnost ispitivanja interakcija polimorfnih varijanti gena s ciljnim genima (poput *LPL*, *IL6*, *AT1R*, *APOE*) jer su uzajamni učinci na različite fenotipske osobine MetS premašivali učinke pojedinačnih gena. Nedostatak PPARγ ima jak utjecaj na lipidnu homeostazu i time mijenja inzulinsku osjetljivost. Molekularni mehanizam koji stoji u pozadini antiaterogenih svojstava PPARγ uključuje stimulaciju izlaska kolesterola iz makrofaga u plazmu i inhibiciju nakupljanja monocita u aterosklerotskoj leziji. U patološkim uvjetima, kao što je pretilost, adipozno tkivo je stalno pod metaboličkim stresom, što vodi do aktivacije stresnih i upalnih putova. Proupalni makrofagi infiltriraju masno tkivo, pogoršavaju lokalnu upalu i dovode do inzulinske rezistencije. U ovim uvjetima, premda PPARγ nije nužan za diferencijaciju makrofaga ili fagocitnu aktivnost, njegov se nedostatak povezuje s nastankom upalnog miljea. Sve navedeno rezultira pojačanom podložnosti prema prehranom induciranoj pretilosti, nepodnošenju glukoze i inzulinskoj rezistenciji. Interakcije gena i gena i okoliša (dijeta, tjelovježba) mogu značajno modulirati učinke PPARγ na rezultirajući fenotip.

Ispitivanja odnosa između varijanati *PPARγ* i debljine ili MetS rezultirala su kontradiktornim rezultatima ovisnima o nizu čimbenika poput, etničke pripadnosti, spola, dobi. Tako je u iranskoj populaciji ustanovljena veza između Pro12Ala SNP i debljine, pri čemu prisutnost

alela Ala predviđa veći BMI (Mirzaei i sur., 2009). U brazilskoj muškoj populaciji europskog podrijetla (Mattevi i sur., 2007), kao i u muškoj talijanskoj populaciji (Morini i sur., 2008), alel Ala u interakciji sa spolom značajno doprinosi podložnosti za razvoj debljine. Slično je i u grčke djece ustanovljena podložnost prema debljini ovisna o spolu i varijantama Pro12Ala (Dedoussis i sur., 2009). Međutim, u francuskoj populaciji istraživanja u dječjoj i odrasloj dobi nisu dokazala povezanost SNP Pro12Ala s debljinom, ali su potvrdila značaj navedene varijante u podložnosti za razvoj T2DM s naglašenom značajnosti u debelih osoba, u kojih alel 12Ala pogoršava IR i doprinosi povećanim razinama inzulina natašte (Ghoussaini i sur., 2005). U poljskoj pretiloj populaciji s anamnezom T2DM u trajanju 10 godina, nije ustanovljena povezanost između Pro12Ala SNP i promjene u tjelesnoj masi tijekom bolesti, niti razlika u IR te učestalosti i progresiji komplikacija dijabetesa (Stefanski i sur., 2006). U drugoj studiji, trigliceridi i inzulin mjereni natašte i nakon obroka kao i HOMA-IR bili su značajno niži u skupini ispitanika s genotipom Ala12Ala u odnosu na vrijednosti tih parametara u skupini s genotipom Pro12Pro izmjerenih nakon obroka s miješanom hranom (Helwig i sur., 2007). Drugi su potvrdili povezanost između alela Ala i niže stope učestalosti debljine u predpubertetske djece uz snažnu vezu između ovog SNP i postotka tjelesne masti (Cecil i sur., 2006). SNP Pro12Ala nije bio povezan s BMI u poljskih žena u postmenopauzi, premda je prisutnost alela Ala značila nepovoljniji lipidni profil u ovoj populaciji (Milewicz i sur., 2009). Uz povezanost alela Ala sa smanjenim rizikom za T2DM (Moon i sur., 2005), njegova prisutnost rezultira povećanom oksidacijom masti i većim stupnjem zasićenosti ukazujući na važne učinke kontrole unosa hrane (Rosado i sur., 2007). U skladu s tim nalazom, u istraživanju provedenom u populaciji španjolskih pretilih žena također je dokazana povezanost SNP Pro12Ala s povećanom oksidacijom masti (Rosado i sur.,2006)



.

Slika 4. Novi uvid u svijet PPARγ kroz nove pristupe

U prisutnosti liganda (PG, LT, SMK, TZD…), PPARγ se veže na PPRE kao heterodimer s RXR kako bi aktivirao ili suzbio ekspresiju ciljnih gena. Slika prikazuje novi molekularni mehanizam PPARγ dobiven pomoću ChIP-sekvenciranja (engl. *chromatin immunoprecipitation sequencing*). PPARγ i RXR vezna mjesta pronađena ChIP-sekvenciranjem otkrivaju drugačiju prostornu i vremensku aktivaciju različitih metaboličkih procesa i promjene u sastavu RXR dimera tijekom adipogeneze (desni dio slike).

PPARγ u adipocitima i makrofazima: tkivno-specifične regulatorne regije upotrebljavaju koregulatore specifične za pojedine tipove stanica – C/EBPβ u adipocitima i PU.1 u makrofazima (donji dio slike).

KRATICE: PG – prostaglandini; LT – leukotrieni; SMK – slobodne masne kiseline; TZD – tiazolidindioni (modificirano prema Costa i sur., 2010).

Agonistima potaknuta aktivacija PPARγ uz antidijabetičke učinke doprinosi sprječavanju progresije različitih kardiovaskularnih poremećaja poput hipertenzije, ateroskleroze i kronične bubrežne bolesti preko procesa koji smanjenjuju upalu i regulacijom na niže angiotenzinom II inducirane ekspresije receptora AT1R (Sugawara i sur., 2012).

1.4.2. Gen *LPL*

Lipoprotein lipaza (LPL) sudjeluje u metabolizmu i transportu lipida. Enzim ima važnu ulogu u hidrolizi triglicerida u hilomikronima i lipoproteina vrlo niske gustoće (engl. *very low-density lipoproteins*, VLDL), pri čemu nastaju ostaci hilomikrona i lipoproteini intermedijarne gustoće (engl. *intermediate-density lipoproteins*, IDL) (Goldberg i Merkel, 2001). LPL također unaprjeđuje izmjenu lipida između lipoproteina, stoga ima važnu ulogu u kinetici većine lipoproteinskih čestica u plazmi (Long i sur., 2006). Štoviše, molekule LPL mogu djelovati kao ligandi za lipoproteinske receptore i tako poboljšati unos lipoproteinskih čestica (Seo i sur., 2000). Različite fiziološke funkcije LPL zajedno reguliraju opskrbu masnih kiselina u različita tkiva za pohranu ili oksidaciju.

Gen *LPL* je mapiran na kromosomu 8p22 (Sparkes i sur., 1987). Otkriveno je više mutacija te je ispitivana njihova povezanost s razinom lipida u plazmi i uloga u razvoju kardiovaskularnih bolesti (Angelakopoulou i sur., 2012). Polimorfizam *LPL Pvu*II (-/+) (rs285) je definiran s odsutnosti (-) ili prisutnosti (+) tranzicije C→T na poziciji 497 u intronu 6. Promjena CAG CTG -> TAG CTG može interferirati s ispravnim spajanjem (engl. *splicing*) mRNA, što rezultira smanjenom enzimskom aktivnosti.

Aktivacija PPARγ putem liganda utječe na ekspresiju LPL. Kompleks PPARγ/RXR se veže na element vezanja (PPRE) koji se nalazi u promotorskoj regiji gena *LPL* i na taj način povećava ekspresiju gena LPL. Indukcija sinteze LPL pomoću PPARγ se uglavnom dešava u zrelim adipocitima s ciljem povećanog stvaranja slobodnih masnih kiselina. Ligandi PPARγ povećavaju ekspresiju LPL, koja oslobađa SMK i razinu prijenosnika masnih kiselina (engl. *fatty acid transport protein*, FATP i CD36), što rezultira povećanim tijekom SMK u adipocite. Masne kiseline se zatim esterificiraju u trigliceride. Glicerol-3-fosfat potreban za proizvodnju triglicerida nastaje gliceroneogenezom pomoću fosfoenol piruvat karboksikinaze uz fosforilaciju egzogenog glicerola pomoću glicerol kinaze. Pri visokim koncentracijama glukoze u krvi glukoza ulazi u masne stanice i iz intermedijera glikolize nastaje glicerol-3-fosfat koji se koristi za sintezu triacilglicerola.

Inzulin je također uključen u biosintezu LPL i ima značajan učinak na aktivnost LPL u adipoznom tkivu za vrijeme diferencijacije adipocita djelujući na transkripciju gena *LPL* (Semenkovich i sur., 1989). Učinak ide preko signalnog puta koji aktivira PPARγ, koji se zatim veže na PPRE na promotorskom dijelu gena *LPL* i na taj način regulira na više (engl. *upregulation*) ekspresiju *LPL*. Glukoza također pospješuje aktivnost LPL u masnom tkivu.

Rezultati nekih studija ukazuju na povezanost između polimorfizma *LPL* PvuII (-/+) s vrijednostima triglicerida i HDL kolesterola dok druga ispitivanja nisu uspjela pronaći značajnu povezanost s niti jednim lipidnim parametrom. U studiji provedenoj u hrvatskoj populaciji u skupini ispitanika s hipertrigliceridemijom, ispitanici s genotipom PvuII +/+ su imali više vrijednosti koncentracija triglicerida (Pašalić i sur., 2001). Premda još uvijek nije jasno imaju li povišene vrijednosti triglicerida aterogenu ulogu rezultati mnogih studija upućuju da su bez sumnje važan biljeg za koronarnu srčanu bolest (Reiner i sur., 2012).

1.4.3. Gen *IL6*

Interleukin 6 (IL6) je multifunkcionalan citokin kojeg sintetiziraju različite stanice poput endotelnih, keratinocita, osteoblasta, miocita, adipocita, β-stanica gušterače, monocita, makrofaga, te brojna druga tkiva uključujući i neke tumore. Ovaj citokin ima važnu ulogu u smanjenju upalnih procesa poticanjem stvaranja protuupalnih citokina i negativnom regulacijom upalnih ciljeva. Stoga se ovaj protein klasificira i kao pro- i protuupalni; do određene razine može djelovati kao obrambeni mehanizam, ali u kroničnoj upali ima uglavnom proupalna svojstva. U ljudi, visoke koncentracije IL 6 u serumu se povezuju s debljinom i nakupljanjem visceralnog masnog tkiva, povećanim rizikom poremećaja podnošenja glukoze, T2DM i visokim krvnim tlakom. IL 6 je prisutan u najranijoj fazi upale, značajan je posrednik upalnog odgovora, stimulira stanice jetre na stvaranje reaktanata akutne faze upale, a među njima i C reaktivnog proteina (CRP). Visceralno masno tkivo uz to što luči oko dva do tri puta više IL 6 nego potkožno tkivo, potiče i lučenje drugih molekula koje potiču daljnje stvaranje IL 6. Osim toga IL 6 smanjuje aktivnost LPL u masnom tkivu, što dovodi do smanjenog unosa TG.

Povezanosti između čestih varijanti gena *IL6* i debljine su ispitivane u mnogim studijama. Gen za IL 6 smješten je na kratkom kraku kromosoma 7 (7p21). Istraživani su različiti SNP u promotorskoj regiji, a za *IL6* -174G>C (rs1800795) je ustanovljena najveća učestalost i važna biološka uloga zbog funkcije koju ima u transkripciji. Učestalost varijantnog alela je visoka i iznosi oko 0,5 u bjelačkoj populaciji i 0,93 u Afro-Amerikanaca (Huang i sur., 2007). Prisutnost C alela se povezuje s povećanim rizikom razvoja debljine, visokim BMI, visokim opsegom struka i visokim vrijednostima leptina. I u švedskoj i u kanadskoj populaciji potvrđena je povezanost alela C s pokazateljima debljine. Nosioci genotipa CC imali su nižu potrošnju energije i osjetljivost na inzulin, što ih je činilo podložnijima za razvoj IR i debljine. U ispitanika s T2DM, ali ne i u zdravih ispitanika alel C je bio povezan s višim BMI.

Neke druge studije, kao što je jedna provedena u španjolskoj-bjelačkoj populaciji su pokazale povezanost genotipa GG sa T2DM te je G alel bio više zastupljen u ispitanika s hiperglikemijom i smanjenom osjetljivosti na inzulin te sa poremećajima u lipidnom profilu. Međutim, i drugačiji nalazi se mogu naći u literaturi. Tako u tuniskoj populaciji u ispitivanju bolesnika s T2DM i zdravih kontrolnih ispitanika, *IL6* -174G<C polimorfizam nije bio povezan s T2DM niti s rizikom za razvoj debljine (Bouhaha i sur., 2010). U znanstvenoj literaturi je dokumentirano i da je u osoba s normalnom tjelesnom masom (BMI < 25 kg/m^2) zabilježena veća učestalost alela G (Berthier i sur., 2003). Nadalje, neke studije ističu povezanost alela C s višim razinama IL 6 u plazmi, naročito u upalnim stanjima, a u studiji koja je uključivala debele muškarce autori zaključuju da SNP -174G<C doprinosi varijabilnosti koncentracija CRP u plazmi nakon provedene dijete i gubitka na težini (Eklund, 2006). Studija s 504 španjolska adolescenta nije pokazala razlike u raspodjeli genotipova u odnosu na antropometrijske parametre i koncentraciju markera u plazmi. SNP -174G<C također utječe i na korelaciju između količine tjelesne masti i koncentracije glukoze u plazmi. Nadalje, nosioci alela C imali su više vrijednosti lipoproteina i CRP koje su korelirale s povećanjem tjelesne masti (Moleres, 2009). Publicirani su i rezultati koji iznose veću učestalost alela C (p = 0,032) u osoba koje su dobro regulirale tjelesnu masu (< 10% ponovnog povrata težine). Štoviše, prisutnost alela *PPARγ* Ala12 zajedno s alelom *IL6* -174C pojačava protektivnu ulogu (p = 0,043), ukazujući na sinergističke učinke obje varijante na održavanje tjelesne mase pri primjeni dijete za smanjivanje tjelesne mase (Goyenechea, 2006). U istraživanju Fernandez-Real i suradnika u zdravih nosioca alela *IL6* -174G uočene su dva puta više koncentracije triglicerida u odnosu na nosioce alela C, sugerirajući da je učinak rezultat veće sekrecije IL 6 koji može dovesti do poremećaja metabolizma lipida (Fernandez-Real i sur., 2000). Noviji nalazi pokazuju da pojedinci s određenim polimorfizmima mogu imati različite učinke nakon provedene dijete u odnosu na ispitanike bez polimorfizama. Također je ispitana povezanost 42 česta polimorfizma i varijabilnost u oksidaciji masti u pretilih osoba. Osobe s genotipom -174GC su imale veću sposobnost povećati oksidaciju masti nakon uzimanja hrane bogate mastima (p = 0,01) (Corpeleijn, 2010). U španjolskoj populaciji s visokim kardiovaskularnim rizikom ispitujući učinke mediteranske prehrane kroz tri godine, ustanovljeno je da ispitanici s genotipom -174CC imaju najveću sposobnost smanjiti tjelesnu masu. Ti su ispitanici također na početku ispitivanja imali najvišu tjelesnu masu i BMI (Razquin i sur., 2010).

Dakle, postoji niz pokazatelja o povezanosti polimorfizama u genu *IL6* s varijabilnosti metaboličkih parametara i razine citokina, što može rezultirati poremećenom homeostazom

glukoze i lipida, kardiometaboličkim rizikom i promijenjenim odgovorom organizma na unos masti. Međutim, ima dosta proturječnih rezultata te su nužna daljnja istraživanja i novi pristupi ovoj problematici.

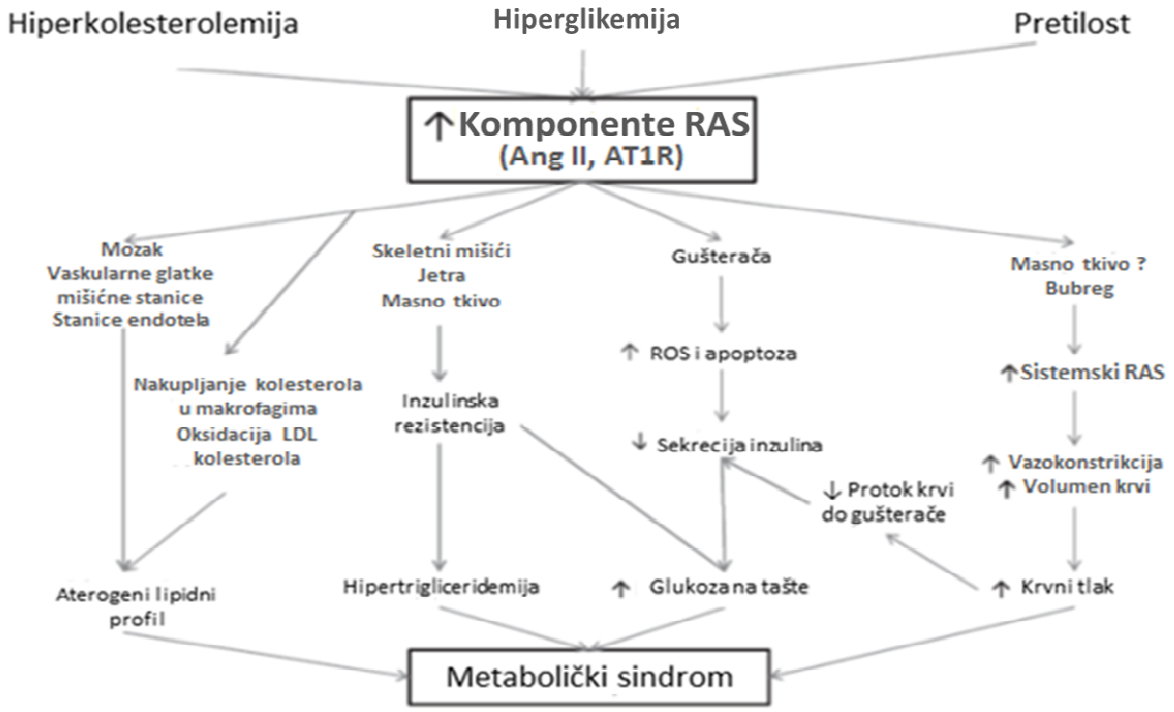
1.4.4. Geni sustava renin-angiotenzin, *ACE* i *AT1R*

Sustav renin-angiotenzin (RAS) ima niz funkcija, a najvažnija je regulacija krvnog tlaka i intravaskularnog volumena. Većina fiziološki značajnih učinaka RAS vrši se preko ključnog efektorskog peptida, angiotenzina II, koji nastaje iz angiotenzinogena nizom proteolitičkih reakcija. Angiotenzinogen se sintetizira prvenstveno u jetri i izlučuje u cirkulaciju gdje ga renin cijepa u angiotenzin I. Angiotenzin konvertirajući enzim (ACE) zatim cijepa angiotenzin I u aktivni oktapeptid angiotenzin II koji je snažan vazokonstriktor, a svoje učinke postiže preko dva receptora, AT1 i AT2 (de Kloet i sur., 2010). Općenito se smatra da je AT1R dominantan receptor u kardiovaskularnom sustavu. RAS preko AT1R regulira različite hemodinamske procese (homeostazu tekućine, stvaranje aldosterona, bubrežnu funkciju, kontrakciju glatkih mišića krvnih žila) i nehemodinamske fiziološke odgovore (indukciju citokina, reaktivne kisikove spojeve, stimulaciju sinteze kolagena, apoptozu i hipertrofiju). Nehemodinamsko djelovanje angiotenzina II ima središnju ulogu ne samo u etiologiji povišenog krvnog tlaka već i u patofiziologiji hipertrofije srca i remodeliranja, zatajenja srca, zadebljanja krvnih žila i ateroskleroze. Iz literaturnih podataka zaključujemo o važnoj ulozi koju ima RAS u patofiziologiji debljine i pridružene hipertenzije (Engeli i sur., 2000). Angiotenzin II može inhibirati adipogenu diferencijaciju i stoga se pretpostavlja da blokada sustava RAS pospješujući diferencijaciju adipocita može pomoći u sprječavanju procesa koji dovode do razvoja šećerne bolesti.

AT1R je izražen u različitim organima uključujući srce, skeletne mišiće, mozak, jetru, pluća i adrenalne žlijezde. Ovaj receptor je spregnut s G proteinom (Duncan i sur., 2001; Murphy i sur., 1991). Gen *AT1R* se nalazi na 3q23–24 i sastoji se od 60 kb uključujući pet eksona i četiri introna (Gemmill i Drabkin, 2001). Ekson 5 je najveći i jedini kodirajući ekson, dok četiri prva eksona kodiraju 5' netranslatiranu regiju (UTR) (Guo i sur., 1994; Antonellis i sur., 2002; Takayanagi i sur., 1992). Identificirani su različiti polimorfizmi u genu *AT1R*. Najviše je istraživan SNP *AT1R* A1166C (rs5186) koji se nalazi u 3' UTR mRNA. Povećana učestalost alela 1166 C povezuje se s različitim fenotipskim učincima kao što su esencijalna hipertenzija (Bonnardeaux i sur., 1994; Wang i sur., 1997), sistolički krvni tlak, infarkt miokarda (Tiret i sur., 1994), hipertrofija lijevog ventrikula (Osterop i sur., 1998), bolesti

koronarnih arterija (CAD), preeklampsija i moždani udar i povećana razina oksidativnog stresa u zatajenju srca (Cameron i sur., 2006). Moczulski i suradnici u studiji na *discordant siblings* su identificirali regiju na dugom kraku kromosoma 3 s genom *AT1R*, koja sadrži glavni lokus koji se povezuje s dijabetičkom nefropatijom (Moczulski i sur., 1998). Nadalje postoje izvješća o interakciji između angiotenzina II i inzulinskog receptora u vaskulaturi, u kojoj angiotenzin II inhibira inzulinom stimulirano stvaranje dušičnog oksida, a učinak je posredovan preko AT1R (Andreozzi i sur., 2004; Folli i sur., 1997). Također su dokazani sinergistički učinci *AT1R* A1166C i *ACE* I/D na CAD (Ye i sur., 2003). Zanimljiv nalaz zabilježen je u skupini bolesnika s CAD nosioca genotipa *AT1R* 1166CC, kod kojih je uočen pojačan odgovor na angiotenzin II (van Geel i sur., 2000). Uz to farmakološka blokada AT1R potiče indukciju receptora PPARγ koji dalje potiče diferencijaciju u adipocitima (Schupp i sur., 2004). Prema Abdollahu i suradnicima (2005) koji su u ispitanika s MetS testirali povezanosti s *AT1R*, genotip 1166 CC predstavlja genetičku predispoziciju za povoljne učinke na antropometrijska i metabolička svojstva, a koja su važna u procjeni kardiovaskularnog rizika. Naime genotip 1166 CC je bio povezan sa značajno nižim vrijednostima BMI u muškoj populaciji ispitanika (za 1,7 jedinica) ($p = 0,03$), nižom tjelesnom masom u oba spola ($p = 0,01$), nižim opsegom struka i omjerom struka i bokova u muškaraca ($p = 0,01$), s istim trendom u žena. Uz to je genotip CC i/ili alel C bio povezan s nižim vrijednostima inzulina i glukoze natašte, te glukoze mjerene nakon 30 i 120 minuta u skupini muških ispitanika ($p = 0,08$; 0,04; 0,01; 0,06 za svaki pojedinačno). Također su u nosioca genotipa AT1R 1166CC u oba spola uočene niže vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka,kolesterola i triglicerida, premda nisu dosegle statističku značajnost. Gen za ACE je smješten na kromosomu 17q23. Najčešća varijanta gena *ACE* je insercijsko/delecijski (I/D) polimorfizam (rs 4646994), koji se nalazi unutar introna 16 gena *ACE*. Prisutnost (I) ili odsutnost (D) ulomka od 287 parova baza Alu ponavljajućeg slijeda unutar introna 16 određuje tri različita genotipa: II, ID i DD. Alel D se povezuje s većim koncentracijama ACE (Rigat i sur., 1990; Tiret i sur., 1992). Polimorfizam *ACE* I/D je također bio u središtu istraživanja kao mogući kandidat za šećernu bolest (Hsieh i sur., 2000), hipertenziju (Tiret i sur., 1998), kardiovaskularne bolesti (Pujia i sur., 1994) i dijabetičku nefropatiju (Ahluwalia i sur., 2009). S obzirom da su istraživanja ukazala da bi RAS mogao biti uključen u patofiziologiju debljine i pridružene hipertenzije (Engeli i sur., 2000) gen *ACE* se nametnuo kao dobar kandidat za MetS. Također su istraživani i učinci I/D polimorfizma na metabolizam. Literaturni podaci izvještavaju o povezanosti *ACE* I/D s MetS. Poznato je da ACE inhibitori smanjuje rizik razvoja dijabetesa. Štoviše, radovi izvještavaju kako insercijski alel doprinosi boljoj fizičkoj izdržljivosti te zaključuju da genotip I/I više

doprinosi pozitivnom energetskom balansu za vrijeme napornih vježbi ukazujući na bolju metaboličku efikasnost u nosioca ACE insercija (Montgomery i sur., 1997). Transkripcijski faktori PPAR moduliraju RAS preko transkripcijske kontrole renina, angiotenzinogena, ACE i AT1R (Roszer i Ricote, 2010).



Slika 5. Odnosi RAS-a i metaboličkoga sindroma

Specifični čimbenici MetS (hiperkolesterolemija, hiperglikemija, debljina definirana kao povišeni opseg struka) reguliraju ekspresiju komponenata RAS koje aktiviraju stvaranje angiotenzina II (Ang II) i odgovor u određenim vrstama tkiva/stanica. Regulirana sinteza, katabolizam ili izlučivanje komponenti RAS iz ključnih tipova stanica (stanica glatkog mišića, stanica endotela, adipocita, gušterače, bubrega i moždanih stanica) rezultiraju angiotenzinom posredovanim mehanizmima koji potom pojačavaju ili doprinose razvoju specifičnih osobina metaboličkoga sindroma (Putnam i sur., 2012).

2. Hipoteza

S obzirom na skromnu ulogu pojedinačnih polimorfizama kao čimbenika složenih osobina metaboličkoga sindroma, interakcije genskih varijanti transkripcijskog faktora *PPARγ,* njegovih ciljnih gena *LPL, IL6, ACE* i *AT1R*, te čimbenika okoliša mogu pružiti saznanja od većeg kliničkog značaja u prosudbi genetičke podložnosti za razvoj metaboličkoga sindroma ili neke njegove fenotipske osobine u određenoj populaciji.

3. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja je ispitati interakcije između varijanti gena transkripcijskog faktora *PPARγ* i njegovih ciljnih gena *LPL, IL6, ACE* i *AT1R*, te čimbenika okoliša i njihovu povezanost s metaboličkim sindromom i pojedinim njegovim sastavnicama u hrvatskoj populaciji.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti učestalost polimorfizma *PPARγ Pro12Ala, LPL Pv*uII (-/+)*, IL6* -174G>C*, ACE I/D* i *AT1R 1166A>C*. Ispitati pojedinačnu ulogu polimorfizama navedenih gena te učinke interakcija gen-gen na nastanak metaboličkoga sindroma ili pojedinih njegovih sastavnica.

2. Ispitati interakcije između navedenih gena i okolišnih čimbenika u vidu prehrambenih navika te procijeniti njihov utjecaj na nastanak metaboličkoga sindroma ili pojedinih njegovih sastavnica.

3. Testirati razlike po spolu i dobi u odnosu na genetičke i okolišne varijable i predispoziciju za razvoj metaboličkoga sindroma ili njegovih sastavnica.

4. Ispitanici i metode

4.1. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo ukupno 527 ispitanika (343 žene i 184 muškaraca) hrvatskog podrijetla, uključujući 265 bolesnika s MetS i 262 zdrava ispitanika. Ispitanici s MetS su regrutirani među ambulantnim bolesnicima u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, dok su zdravi ispitanici odabrani između bolničkog osoblja i ostalih stanovnika grada Zagreba koji su obavljali redoviti sistematski pregled. Istraživanje je provedeno u razdoblju između ožujka 2010. i listopada 2012. godine. Zdravi su ispitanici po dobi, spolu i podrijetlu odgovarali skupini ispitanika s MetS. Za definiranje MetS koristili su se kriteriji NCEP-ATP III. Za ispitanike koji su uzimali lijekove, primijenjene su formule radi korekcije onih biokemijskih parametara na koje su lijekovi mogli utjecati. Primjenjene formule su rezultat većeg broja kliničkih ispitivanja (Kraja i sur., 2006; Wu i sur., 2007). Tako su koncentracije triglicerida i HDL kolesterola u ispitanika koji su uzimali antilipemike korigirane prema formuli: TG/(1-15,2/100) i HDL/(1+6,1/100). Vrijednosti sistoličkog (SBP) i dijastoličkog (DBP) krvnog tlaka za ispitanike koji su uzimali antihipertenzive modificirane su prema formuli: SBP+14,8 i DBP+10,5 (mm Hg).

U istraživanje nisu bili uključeni bolesnici sa šećernom bolesti, trudnice, bolesnici s Cushingovom bolesti i hipo- ili hipertiroidizmom.

Svaki ispitanik je ispunio upitnik o obiteljskoj anamnezi: o kardiovaskularnim bolestima, hipertenziji, debljini, zatim o uzimanju lijekova i vrsti prehrane (mediteranski, kontinentalni i mješoviti tip prehrane). Mediteranska prehrana je podrazumijevala svakodnevnu konzumaciju maslinovog ulja, voća i povrća, ribe dva do tri puta tjedno, bijelog mesa umjesto crvenog i orašastih plodova barem tri puta tjedno. Kontinentalni tip prehrane se sastojao od crvenog mesa i mesnih prerađevina, manjih količina voća i povrća, rijetke konzumacije ribe, bez maslinovog ulja. Dijeta koja je uključivala elemente mediteranske i kontinentalne prehrane kategorizirana je kao mješovita.

Antropometrijska mjerenja su uključivala mjerenje tjelesne težine, visine i opsega struka te mjerenje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka. BMI je izračunat dijeljenjem tjelesne mase izražene u kilogramima s kvadratom tjelesne visine izražene u metrima.

Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici upoznati su sa svrhom i ciljevima navedenog istraživanja te je zatražen njihov pristanak. Ukoliko su se odlučili na sudjelovanje u

istraživanju svaki ispitanik je potpisao dokument o informiranosti i pristanku. Etička povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb su odobrila predloženo istraživanje.

4.2. Metode

4.2.1. Analitički uzorci

Za biokemijske analize svim ispitanicima je uzeto 5 mL krvi natašte u epruvete bez antikoagulansa. Za izdvajanje DNA korištena je puna krv sa antikoagulansom EDTA (5 mL svježe krvi, pohranjene na +4 ºC najduže četiri dana ili pohranjene na –70 ºC).

4.2.2. Biokemijske analize

Standardnim biokemijskim metodama na automatskom analizatoru Olympus AU2700 (Olympus, Tokyo, Japan) određivane su koncentracije ukupnog kolesterola (TC), triglicerida (TG), HDL kolesterola, LDL kolesterola i glukoze u serumu.

Koncentracija TC-a u serumu je određivana spektrofotometrijski s kolin-esterazom (CHOD-PAP metoda), enzimskim kolorimetrijskim testom za kliničko-kemijske analizatore uz korištenje komercijalnog kompleta reagensa Olympus System reagent 800.

Koncentracija TG-a u serumu je određivana spektrofotometrijski s glicerolfosfat-oksidazom (GPO-PAP metoda), enzimskim kolorimetrijskim testom za kliničko-kemijske analizatore uz korištenje komercijalnog kompleta reagensa Olympus System reagent 800.

Koncentracija HDL kolesterola je određivana iz seruma Quantolip taložnom metodom na automatskom analizatoru uz korištenje komercijalnog Quantolip Immuno AG kompleta reagensa (Vienna, Austria).

Koncentracija LDL kolesterola u serumu određivana je računski neizravnom metodom prema Friedewaldovoj jednadžbi:

$$c(\text{LDL-C}) = c(\text{TC}) - [c(\text{TG})/2{,}2] - c(\text{HDL-C})$$

NAPOMENA: Jednadžba se ne može primijeniti ako su u serumu prisutni hilomikroni i ako su koncentracije TG-a u serumu veće od 4,6 mmol L^{-1} (izračunate vrijednosti za LDL kolesterola su preniske). U tom slučaju LDL kolesterol je određen homogenom metodom s kolesterol-esterazom i kolesterol-oksidazom (Randox Laboratories, Crumlin, UK.).

Koncentracija glukoze u serumu određivana je spektrofotometrijski (pri valnoj duljini od 500 nm) s glukoza-oksidazom (GOD-PAP metoda) uz korištenje komercijalnog kompleta reagensa Olympus System Reagent 800.
Navedene biokemijske analize provedene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

4.2.3. Analiza DNA

Pribor

- Sterilne plastične epruvete od 50 mL sa čepom za izdvajanje DNA (GE Healthcare, Švedska)
- Sterilne epruvete od 2 mL sa čepom za izdvajanje i pohranu DNA (Eppendorf, Njemačka)
- Sterilne polipropilenske epruvete od 0,2 mL za umnožavanje DNA (Eppendorf, Njemačka)
- Sterilna Pasteurova pipeta (staklena, brušena)
- Sterilno stakleno posuđe: Erlenmayerova tikvica, čaša
- Automatske pipete volumena od 1-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- Sterilni nastavci za automatske pipete (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije za izdvajanje DNA

- Otopina za hemolizu (za pripremu 1000 mL otopine):
  NH_4Cl (155 mM) 82,9 g (Merk)
  $KHCO_3$ (10 mM) 10 g (Merk)
  Na_2EDTA (1 mM) 3,72 g (Kemika)
  Sterilna, destilirana H_2O, dopuniti do 1000 mL
- STE-otopina za raspršivanje staničnog taloga (S-sodium; T-tris; E-EDTA) (za pripremu 1000 mL otopine):
  Tris (10 mM) 12,1 g (Merk)
  NaCl (75 mM) 43,83 g (Merk)
  Na_2EDTA (24 mM) 89,33 g (Kemika)
  Sterilna, destilirana H_2O, dopuniti do 1000 mL

- Zasićena otopina NaCl (za pripremu 100 mL otopine):

  NaCl 35 g

  Sterilna, destilirana H_2O, dopuniti do 100 mL
- Otopina pronaze - enzim za razgradnju proteina (za pripremu 50 mL otopine):

  Na 1 g pronaze izdvojene iz vrste Streptomyces griseus (Roche) dodati sterilnu, destiliranu vodu do volumena 50 mL. Autodigestirati u termostatu 2 h na 37 ºC. Razdijeliti otopinu u plastične epruvetice volumena 1,5 mL. Čuvati pri temperaturi -20 ºC.
- 10 %-tna otopina natrijevog dodecil-sulfata (SDS) (za pripremu 500 mL otopine):

  SDS 50 g (Roche)

  Sterilna, destilirana H_2O, dopuniti do 500 mL.
- 100 %-tni etanol
- Tris-EDTA pufer (TE-pufer) (za pripremu 1000 mL pufera):

  Tris (10 mM) 1,21 g (Merk)

  Na_2EDTA (1 mM) 0,37 g (Kemika)

  Sterilna, destilirana H_2O, dopuniti do 1000 mL

  Podesiti pH na 7,5 sa HCl.

Kemikalije za umnažanje DNA

- *Taq* DNA polimeraza (Roche Diagnostics, Njemačka)
- 10x PCR pufer, 25 mM $MgCl_2$ (Roche Diagnostics, Njemačka)
- dNTP smjesa: 100mM ATP, 100mM TTP, 100mM GTP i 100 mM CTP (Roche Diagnostics, Njemačka)
- Početnice (Tib MolBiol, Njemačka)
- Restrikcijske endonukleaze sa pripadajućim puferom (Roche, NewEngland Biolabs)
- Molekularni biljeg XIII (Roche Diagnostics, Njemačka)
- Agaroza (Invitrogen, SAD)
- H_2O sterilna destilirana

Oprema

- Uređaj za centrifugiranje s hlađenjem, Centrifuge 5810R (Eppendorf, Njemačka)
- Termostat, Heratherm (Thermo Scientific, SAD)
- Centrifuga, Heraeus Biofuge Pico (Thermo Scientific, SAD)

- Termoblok GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD)
- Vibracijska miješalica, Techno Kartell (Koetterman, Njemačka)
- Uređaj za vorteksiranje (BioRad, SAD)
- Vodena kupelj, HumAqua 5 (Human, Njemačka)
- Sustav za elektroforezu (Sub-Cell 96, BioRad, SAD)
- Uređaj za vizualizaciju i snimanje gelova, G-Box (Syngene, Velika Britanija)

4.2.3.1. Izdvajanje DNA metodom isoljavanja

Izdvajanje DNA iz pune krvi provodilo se makro metodom isoljavanja (Miller i sur., 1988). Metoda se temelji na lizi stanica te enzimskoj i kemijskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula, nakon čega slijedi taloženje DNA u apsolutnom alkoholu.

Postupak

U sterilnim epruvetama sa čepom volumena 50 mL pomiješano je 5 mL krvi svakog ispitanika s 40 mL (1x) otopine za hemolizu. Sadržaj epruvete je pažljivo promiješan i inkubiran 20 minuta na ledu (-20 ºC), a nakon toga centrifugiran 10 minuta na 4000 rpm pri temperaturi +4 ºC. Supernatant je odstranjen, a preostali talog je još dva puta pažljivo ispran otopinom za hemolizu te ponovno centrifugiran 10 minuta na 4000 rpm pri temperaturi +4 ºC. Čisti talog je zatim snažnim protresanjem raspršen u 3 mL STE-liza pufera. Nakon toga dodano je 400 µL 10 %-tne otopine SDS-a te 200 µL pronaze. Smjesa se lagano promiješa i inkubira na 37 ºC preko noći. Nakon inkubacije proteini i ostaci stanica uklonjeni su isoljavanjem koje je provedeno dodavanjem 1 mL zasićene otopine NaCl te snažnim miješanjem i centrifugiranjem 10 minuta na 4000 rpm. Nakon centrifugiranja supernatant je prenesen u čistu epruvetu od 50 mL te mu je oprezno dodano 10 mL hladnog apsolutnog etanola. Laganim okretanjem epruvete na površinu je isplivala DNA koja je pažljivo pomoću pipete prenesena u tubicu od 1,5-2 mL i stavljena na sušenje u termostat na +37 °C 1 sat dok etanol ne ishlapi. Nakon toga DNA je otopljena u 500 µL TE pufera i stavljena na inkubaciju preko noći na 37 ºC. Tako izdvojena DNA se čuva na +4 ºC otopljena u TE-puferu ili na -20 ºC u apsolutnom etanolu.

4.2.3.2. Genotipizacija

Postupak

Genotipizacija polimorfizma *ACE* I/D provodi se metodom PCR (engl. *polymerase chain reaction*).

Genotipizacija polimorfizama *PPARγ2* Pro12Ala*, LPL* PvuII*, IL6* -174G/C i *AT1R* 1166A/C provodi se metodom PCR-RFLP (lančana reakcija polimerazom - polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka, engl. *polymerase chain reaction - restriction fragments length polymorphisms*).

Osnovni princip reakcije PCR je u eksponencijalnom umnažanju dijelova DNA koji sadrže gene od interesa. Na umnoženim produktima provodi se analiza mogućih genskih promjena (mutacija, delecija, translokacija). Za umnažanje određenih ulomaka DNA, 100 ng DNA, DNA-polimeraza, deoksiribonukleotid trifosfati (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i dvije početnice (uzvodna i nizvodna) podvrgavaju se inkubaciji pod specifičnim uvjetima. Postupak PCR se sastoji od tri faze:

1. Denaturacija DNA zagrijavanjem na 94-96 ºC pri čemu nastaje jednolančana DNA.
2. Vezanje početnica pri temperaturi 50-65 ºC.
3. Sinteza novog lanca komplementarnog DNA regiji omeđenoj početnicama pomoću termostabilne polimeraze na temperaturi od 72 ºC.

U sljedećem ciklusu, novostvorene molekule DNA postaju kalup. Da bi se dobilo dovoljno genetičkog materijala za daljnje analize umnažanje se provodi kroz 25-35 ciklusa. Optimalni uvjeti za svaku reakciju PCR tj. koncentracije DNA-polimeraze, početnica, Mg^{2+} i genomske DNA te temperature i vrijeme pojedinih faza ciklusa ovise o analitičkom sastavu i ispituju se za svaki pojedini ulomak DNA. Nakon umnažanja 5 μL PCR umnoška analizira se u 2 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom. U slučaju metode PCR-RFLP pozitivni uzorci se podvrgavaju daljnjoj analizi, odnosno razgradnji inkubacijom s odgovarajućim restrikcijskim endonukleazama, što rezultira ulomcima različite duljine ovisno o genotipu. Heterozigotne osobe imaju ulomke tipične za „divlji tip“ (engl. *wild type*) i mutirane alele. Digestirani uzorak razdvaja se u 2-4 % gelu. Zajedno s uzorcima na gel se nanosi i molekularni biljeg od 50-750 pb (molekularni biljeg XIII) koji služi kao standard duljine ulomaka. Nakon provedene elektroforeze na uređaju za vizualizaciju gelova (G-box), uspoređuju se vrpce DNA uzoraka s vrpcama molekularnog biljega DNA.

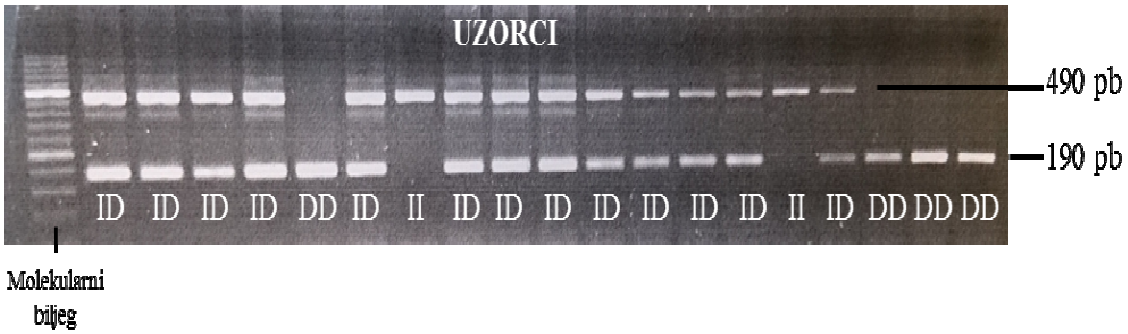
Reakcije PCR provedene su na uređaju GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) pri uvjetima nevedenim u tablici 2.

Tablica 2. Empirijski utvrđeni uvjeti umnažanja pojedinih ulomaka DNA metodom PCR

Gen	Početna denaturacija T ºC / t'	Broj ciklusa	Denaturacija T ºC / t‘	Vezanje početnica T ºC / t'	Sinteza novog lanca T ºC / t'	Završna sinteza T ºC / t'
ACE	94 ºC / 7'	25	94 ºC / 1'	58 ºC / 1'	72 ºC / 2'	72 ºC / 7'
PPARγ	94 ºC / 10'	30	94 ºC / 1'	60 ºC / 35"	72 ºC / 1'	72 ºC / 10'
LPL	95 ºC / 5'	25	95 ºC / 1'	58 ºC / 1'	72 ºC / 1'	72 ºC / 10'
IL6	94 ºC / 10'	30	94 ºC / 1'	55 ºC / 35"	72 ºC / 1'	72 ºC / 10'
AT1R	94 ºC / 5'	35	94 ºC / 40"	64 ºC /1'	72 ºC / 1'	72 ºC / 10'

Genotipizacija polimorfizma *ACE* I/D

Dokazivanje alela *ACE* I i D provedeno je metodom PCR (Rigat i sur., 1992).
Reakcijska smjesa sadržavala je 10x PCR pufer sa $MgCl_2$, 0,5 mM pojedinog dNTP, 0,5 μM pojedine početnice, 300 ng genomske DNA i 2 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25 μL. Lančanom reakcijom polimerazom umnoženi su odsječci DNA duljine 490 pb i 190 pb, a analiza rezultata umnažanja provedena je elektroforezom na 1,5 %-tnom agaroznom gelu. Umnoženi uzorak s insercijom Alu sekvenci odgovara veličini fragmenta od 490 pb (genotip II), a ulomak DNA od 190 pb identificira deleciju sekvenci (genotip DD). Pojava oba fragmenta ukazuje na heterozigotnu varijantu (genotip ID) (slika 6).



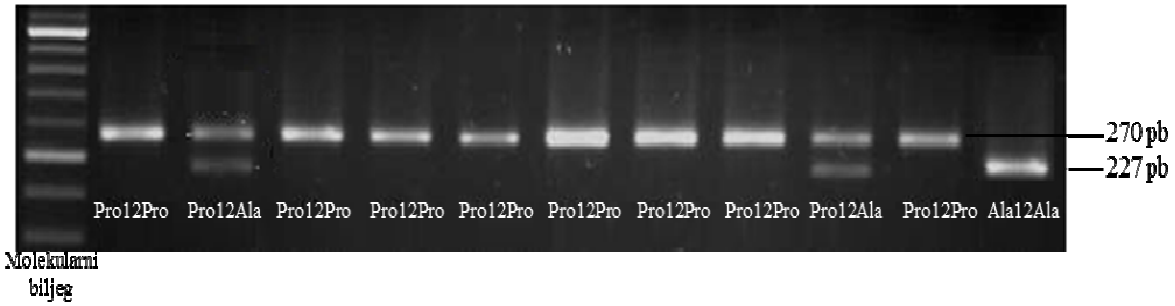
Slika 6. Analiza polimorfizma *ACE* I/D

KRATICE: I - insercija, D - delecija ulomka od 287 parova baza Alu ponavljajućeg slijeda unutar introna 16

Genotipizacija polimorfizma *PPARγ* Pro12Ala

Za dokazivanje alela *PPARγ* Pro i Ala korištena je metoda PCR-RFLP (Oh i sur., 2000). Reakcijska smjesa sadržavala je 10x PCR pufer sa $MgCl_2$, 0,25 mM pojedinog dNTP, 0,1 μM pojedine početnice, 100 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25 μL. Kvaliteta umnoženih PCR-ulomaka analizirana je elektroforezom u 2 % gelu agaroze s etidijevim bromidom. Elektroforeza u trajanju od pola sata odvija se na 110 V. Veličina migrirajućih ulomaka PCR genomske DNA utvrđena je pomoću molekularnog biljega XIII koji se stavlja na gel paralelno s uzorcima.

Dobiveni ulomak *PPARγ* veličine 270 pb podvrgava se razgradnji s restrikcijskom endonukleazom Bstu1. Reakcijska smjesa je sadržavala 10 μL PCR produkta, 1 μL enzima Bstu1 (10 $U\mu L^{-1}$), 2 μL 10x NE 1 pufera te 7 μL destilirane H_2O u ukupnom volumenu od 20 μL. Digestija se odvija preko noći na 60 °C. Nakon digestije provedena je analiza dobivenih ulomaka elektroforezom na 2 %-tnom gelu agaroze. Dobiveni fragmenti su veličine 270 pb za genotip Pro12Pro, 227 i 43 pb za genotip Ala12Ala i 270, 227 i 43 bp za heterozigote (genotip Pro12Ala) (slika 7).

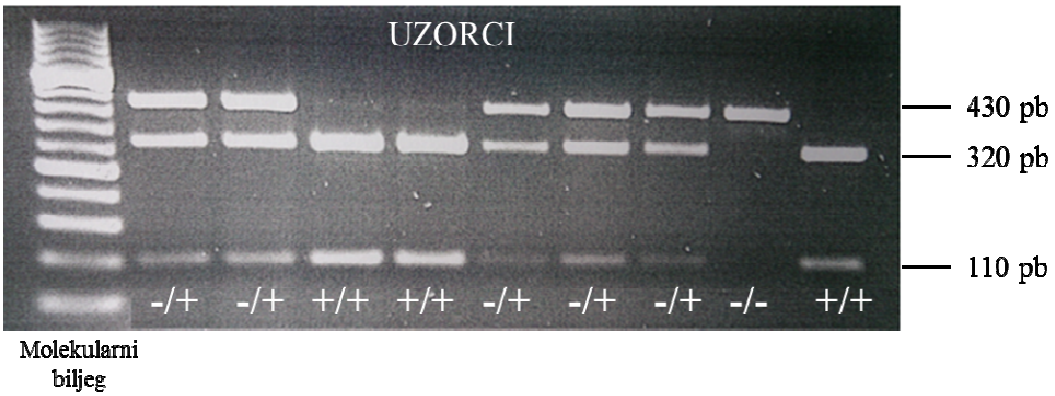


Slika 7. Analiza polimorfizma *PPARγ* Pro12Ala

Genotipizacija polimorfizma *LPL* PvuII

Za dokazivanje alela *LPL PvuII* + i *PvuII* - korištena je metoda PCR-RFLP (Xu i sur., 2008). Reakcijska smjesa sadržavala je 10x PCR pufer sa $MgCl_2$, 0,25 mM pojedinog dNTP, 1,2 μM pojedine početnice, 250 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25 μL. Dobiveni ulomak *LPL* veličine 430 pb podvrgnuo se razgradnji s restrikcijskom endonukleazom PvuII. Reakcijska smjesa sadržavala je 10 μL PCR produkta, 0,5 μL enzima PvuII (10 $U\mu L^{-1}$), 1 μL 10x M pufera u ukupnom volumenu od 20 μL. Digestija se odvijala preko noći na 37 °C. Nakon digestije provedena je analiza dobivenih ulomaka elektroforezom

na 2 %-tnom gelu agaroze. Ukoliko je prisutno polimorfno mjesto, dobivaju se produkti veličine 320 pb i 110 pb (slika 8).

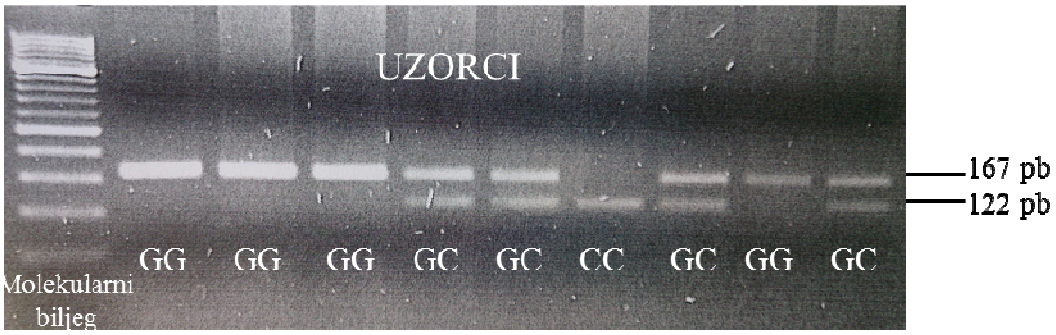


Slika 8. Analiza polimorfizma *LPL* PvuII (-/+)

KRATICE: (-) odsutnost, (+) prisutnost tranzicije C→T na poziciji 497 u intronu 6

Genotipizacija polimorfizma *IL6* -174G<C

Za dokazivanje alela *IL6* -174G/C korištena je metoda PCR-RFLP (Fishman i sur., 1998). Reakcijska smjesa sadržavala je 10x PCR pufer sa $MgCl_2$, 0,25 mM pojedinog dNTP, 0,1 μM pojedine početnice, 100 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25 μL. Dobiveni ulomak *IL6* veličine 167 pb podvrgnuo se razgradnji s restrikcijskom endonukleazom NlaIII. Reakcijska smjesa sadržavala je 10 μL PCR produkta, 1 μL enzima NlaIII (10 $U\mu L^{-1}$), 2 μL 10x NE 4 pufera, 4 μL 10x BSA, 3 μL H_2O u ukupnom volumenu od 20 μL. Digestija se odvijala preko noći na 37 °C. Nakon digestije provedena je analiza dobivenih ulomaka elektroforezom na 2 %-tnom gelu agaroze. Dobiveni fragmenti su veličine 167 pb za genotip GG, 122 pb za genotip CC te 167 i 122 pb za heterozigote (genotip GC) (slika 9).

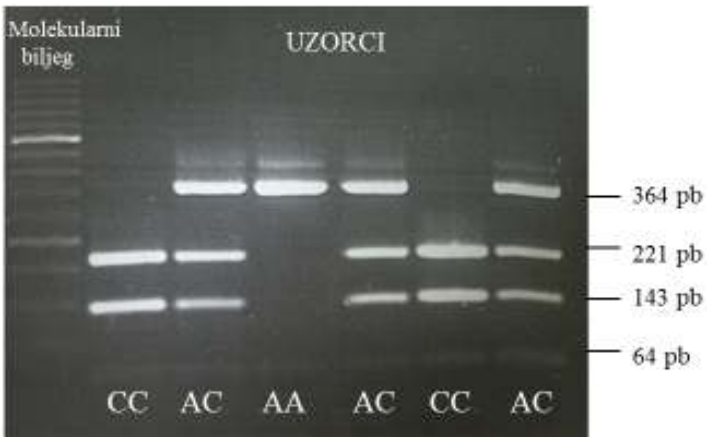


Slika 9. Analiza polimorfizma *IL6* -174G<C

Genotipizacija polimorfizma *AT1R* 1166A<C

Za dokazivanje alela *AT1R* 1166A i 1166C korištena je metoda PCR-RFLP (Hilgers i sur., 1999).

Reakcijska smjesa sadržavala je 1x PCR pufer sa $MgCl_2$, 0,25 mM pojedinog dNTP, 0,8 µM pojedine početnice, 100 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25 µL. Dobiveni ulomak *AT1R* veličine 428 pb podvrgnuo se razgradnji s restrikcijskom endonukleazom DdeI. Reakcijska smjesa sadržavala je 8 µL PCR produkta, 1 µL enzima DdeI (10 $U\mu L^{-1}$), 1 µL 10x H pufera u ukupnom volumenu od 10 µL. Digestija se odvijala 1 sat na 37 °C. Nakon digestije provedena je analiza dobivenih ulomaka elektroforezom na 3 %-tnom gelu agaroze. Dobiveni fragmenti su veličine 364 pb i 64 pb za genotip AA, 221 pb, 143 pb i 64 pb za genotip CC te 364 pb, 221 pb, 143 pb i 64 pb za heterozigote (genotip AC) (slika 10).



Slika 10. Analiza polimorfizma *AT1R* 1166A<C

U Tablici 3 navedeni su uvjeti restrikcijskih reakcija za pojedine enzime, a u Tablici 4 specifične početnice za umnažanje ulomaka gena, očekivani produkti i duljine restrikcijskih ulomaka.

Tablica 3. Uvjeti restrikcijskih reakcija za pojedine enzime

Restrikcijski enzim U/µM	**Volumen restrikcijskog enzima µL**	**Pufer**	**Volumen pufera x10 µL**	**Sterilna destilirana voda µL**	**Volumen PCR umnoška µL**	**Temperatura inkubacije °C**	**Vrijeme inkubacije**
BstuI	1	NE 1	2	7	10	60 °C	preko noći
Pvu II	0,5	M	1	8,5	10	37 °C	preko noći
NLA III	4	NE 4	2	4	10	37 °C	preko noći
DdeI	1	H	1	-	8	37 °C	1 h

Tablica 4. Specifične početnice za umnažanje ulomaka gena, očekivani produkti i duljine restrikcijskih ulomaka

Gen **Alel**	**Nukleotidni slijed početnica**	**Umnošci PCR pb**	**Restrikcijski enzimi**	**Restrikcijski ulomci pb**
PPARγ **Pro** **Ala**	f 5'- GCC AAT TCA AGC CCA GTC -3' r 5'- GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G -3'	270	BstuI	Pro alel – 270 Ala alel – 227, 43
LPL **PvuII -** **PvuII +**	f 5'- ATG GCA CCC ATG TGT AAG GTG -3' r 5'- GTG AAC TTC TGA TAA CAA TCT C -3'	430	PvuII	PvuII - alel – 430 PvuII + alel – 320, 110
IL6 **-174G** **-174C**	f 5'- TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG T -3' r 5'- CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG -3'	167	NlaIII	G alel – 167 C alel –122, 45
AT1R **1166A** **1166C**	f 5'- TTC CCC CAA AAG CCA AAT CCC AC -3' r 5'- CAG GCT AGG GAG ATT GCA TTT CTG TCA G -3'	428	DdeI	A alel – 364, 64 C alel – 221, 143, 64
ACE **I** **D**	f 5'- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT -3' r 5'- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'	I alel – 490 D alel – 190	-	-

f = engl. *forward* (uzvodna početnica)
r = engl. *reverse* (nizvodna početnica)

4.3. Statistička obrada podataka

Razina statističke značajnosti određena je na 5% te su u svim slučajevima korišteni dvosmjerni testovi statističke značajnosti. Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže testirano je putem metode Markovljevih lanaca (Guo i Thompson, 1992) implemetirane u Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier i Lischer, 2010).

Normalnost raspodjela kontinuiranih varijabli testirana je putem Kolmogorov-Smirnov testa kod uzoraka većih od n=30, odnosno putem Shapiro-Wilk testa kod manjih uzoraka. Budući da su u većini slučajeva raspodjele rezultata statistički značajno odstupale od normalne, medijan i interkvartilni raspon korišteni su kao mjere centralne tendencije i raspršenja za sve kontinuirane varijable. Za testiranje razlika u kontinuiranim varijablama korišten je Mann-Whitneyev U test te je u slučaju statistički značajnih razlika dan AUC, kao standardizirana mjera veličine učinka. Skupine su s obzirom na kategorijske varijable uspoređene putem χ^2-testa, a u slučaju statistički značajne razlike dan je φ koeficijent asocijacije. Povezanost dviju kontinuiranih varijabli određena je putem Spearmanovog koeficijenta korelacije. Za univarijatno i multivarijatno predviđanje MetS, njegovih komponenata te pretilosti korištena je binarna logistička regresija te su za svaku varijablu dani omjeri izgleda (engl. *odds ratio*) s 95%-tnim intervalima pouzdanosti. Za analizu interakcija između dvaju gena te između gena i prehrane korištena je hijerarhijska eliminacija unatrag (engl. *hierarchical backward elimination approach*) (Kleinbaum i Klein, 2002), pri čemu je inicijalni model sadržavao sve prediktore te interakcije. Iz takvog, punog, prediktivnog modela najprije je izbačena ona interakcija koja je bila najmanje statistički značajna, odnosno imala je najvišu razinu statistički značajnosti (p) te je provjereno doprinosi li ona statistički značajno predikciji kriterija. Ukoliko njezin doprinos nije bio statistički značajan, ona je isključena iz prediktivnog modela. Nakon toga je u novonastalom, reduciranom, regresijskom modelu određena sljedeća najmanje značajna interakcija te je ona izbačena. Postupak je ponovljen za svaku interakciju iz modela nastalih na ovaj način. Ukoliko je analizom utvrđena statistički značajna interakcija, regresijski koeficijenti za varijable od kojih se ona sastojala određeni su redefiniranjem njihovih referentnih grupa budući da se regresijski koeficijenti za varijable u interakciji odnose na referentnu grupu druge varijable od koje se interakcija sastoji (Jaccard, 2001). Za analizu je korišten programski paket SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. Rezultati

5.1. Opis uzorka

Analize su napravljene za ukupno 527 ispitanika (343 žene i 184 muškaraca), uključujući 265 bolesnika s MetS i 262 zdrava ispitanika. U Tablici 5 prikazani su osnovni antropometrijski i biokemijski pokazatelji ispitanika.

Ispitanici s MetS su imali statistički značajno viši BMI (Mann-Whitney U=6110,0; p<0,001; AUC=0,09) i opseg struka (Mann-Whitney U=4821,0; p<0,001; AUC=0,08). Oni su također imali statistički značajno višu razinu triglicerida (Mann-Whitney U=6954,0; p<0,001; AUC=0,11), ukupnog kolesterola (Mann-Whitney U=23124,5; p<0,001; AUC=0,37), LDL kolesterola (Mann-Whitney U=23178,0; p<0,001; AUC=0,37), glukoze (Mann-Whitney U=16261,0; p<0,001; AUC=0,26), sistoličkog (Mann-Whitney U=9391,0; p<0,001; AUC=0,14) i dijastoličkog krvnog tlaka (Mann-Whitney U=13931,5; p<0,001; AUC=0,21) te nižu razinu HDL kolesterola (Mann-Whitney U=11405,5; p<0,001; AUC=0,18) u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika. Dvije skupine ispitanika nisu se razlikovale prema dobi i spolu.

Tablica 5. Antropometrijski i biokemijski pokazatelji ispitanika

	MetS Medijan (IQR)	Kontrolna skupina Medijan (IQR)	P	Učinak
Dob (godine)	54,0 (46,8-60,0)	53,0 (46,0-59,0)	0,384	
Spol (N muških ispitanika/svi)	99/265	85/262	0,237	
BMI (kg/m^2)	31,9 (28,7-35,0)	24,0 (22,0-26,6)	**<0,001**	0,09
Opseg struka (cm)	106,0 (99,3-113,0)	85,0 (77,0-94,0)	**<0,001**	0,08
Trigliceridi (mmol/L)	2,2 (1,7-3,2)	1,1 (0,8-1,4)	**<0,001**	0,11
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,9 (5,3-6,6)	5,4 (4,8-6,1)	**<0,001**	0,37
HDL kolesterol (mmol/L)	1,2 (1,0-1,4)	1,7 (1,4-2,0)	**<0,001**	0,18
LDL kolesterol (mmol/L)	3,6 (3,1-4,3)	3,2 (2,7-3,8)	**<0,001**	0,37
Glukoza (mmol/L)	5,6 (5,0-6,6)	4,9 (4,6-5,4)	**<0,001**	0,26
Visok krvni tlak (N ispitanika s visokim tlakom/svi)	236/260	71/255	**<0,001**	0,64
Sistolički krvni tlak	148,4 (134,9-164,8)	120,0 (120,0-130,0)	**<0,001**	0,14
Dijastolički krvni tlak	91,3 (80,0-105,3)	80,0 (77,0-80,0)	**<0,001**	0,21

KRATICE: IQR – interkvartilni raspon; P – razina statističke značajnosti; rezultat Mann-Whitneyevog U testa u slučaju kontinuiranih varijabli, odnosno χ^2 testa u slučaju kategorijalnih (spola i visokog krvnog tlaka); učinak – standardizirana mjera veličine učinka dana za statistički značajne rezultate; u slučaju Mann-Whitneyevog testa AUC=U/(m*n), pri čemu je U rezultat testa, dok su m i n veličine uzoraka; u slučaju χ^2 testa φ koeficijent asocijacije

Nisu nađene statistički značajne razlike u raspodjeli ispitivanih genotipova između ispitanika s MetS i kontrolnih ispitanika (tablica 6).

Tablica 6. Raspodjela ispitivanih genotipova u skupini ispitanika sa MetS i kontrolnoj skupini

	MetS n (%)	Kontrolna skupina n (%)	OR	(95% CI)
ACE I/D				
DD	72 (27,2)	81 (30,9)	1	
ID	132 (49,8)	130 (49,6)	1,14	(0,77-1,70)
II	61 (23,0)	51 (19,5)	1,35	(0,83-2,19)
PPARγ Pro12Ala				
Pro12Pro	200 (75,5)	199 (76,0)	1	
Pro12Ala	62 (23,4)	60 (22,9)	1,03	(0,69-1,53)
Ala12Ala	3 (1,1)	3 (1,1)	1,03	(0,69-1,53)
IL6 -174G>C				
GG	85 (32,1)	91 (34,7)	1	
GC	130 (49,1)	137 (52,3)	1,02	(0,69-1,49)
CC	50 (18,9)	34 (13,0)	1,57	(0,93-2,67)
AT1R 1166A>C				
AA	136 (51,3)	134 (51,1)	1	
AC	114 (43,0)	110 (42,0)	1,02	(0,72-1,46)
CC	15 (5,7)	18 (6,9)	0,82	(0,40-1,70)
LPL PvuII				
-/-	62 (23,4)	71 (27,1)	1	
-/+	124 (46,8)	132 (50,4)	1,08	(0,71-1,64)
+/+	79 (29,8)	59 (22,5)	1,53	(0,95-2,48)

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Frekvencije ispitivanih genotipova nisu odstupale od Hardy-Weinbergove ravnoteže niti na razini pojedine skupine ispitanika, niti na razini cijelog uzorka (tablica 7).

Tablica 7. Egzaktni test Hardy-Weinbergove ravnoteže putem metode Markovljevog lanca (1000000 iteracija)

	MetS	Kontrolna skupina	Cijeli uzorak
ACE I/D	>0,999	>0,999	>0,999
PPARγ Pro12Ala	0,591	0,777	0,430
IL6 -174G>C	>0,999	0,151	0,322
AT1R 1166A>C	0,214	0,539	0,156
LPL PvuII -/+	0,323	0,903	0,543

Nakon provedenog testiranja značajnosti interakcija između *PPARγ* i njegovih ciljnih gena *LPL, IL6, ACE* i *AT1R* na pojavnost MetS i njegovih sastavnica, odvojeno u skupini s i bez MetS, ustanovljeno je nekoliko statistički značajnih interakcija gena u skupini ispitanika s MetS (tablica 8). Interakcija između *PPARγ* i *LPL* PvuII(-/+) je bila statistički značajno povezana s MetS (Wald χ^2=7,1; df=1; p=0,008), interakcija između *PPARγ* i *ACE* I/D je bila statistički značajno povezana s BMI (Wald χ^2=6,65; df=1; p=0,010) te interakcija između *PPARγ* i *IL6* -174G>C je bila statistički značajno povezana s razinom glukoze u krvi (Wald χ^2=10,30; df=1; p=0,001).

Tablica 8. Statistički značajne interakcije gena u skupini ispitanika s MetS

Kriterij	Interakcija	P (interakcija)	P (razlika između modela)
MetS	*PPARγ* x *LPL* PvuII	**0,008**	**0,007**
BMI	*PPARγ* x *ACE* I/D	**0,010**	**0,004**
Glukoza	*PPARγ* x *IL6* -174G>C	**0,001**	**<0,001**

KRATICE: p (interakcija) – razina statističke značajnosti za interakciju, rezultati Waldovog χ^2 testa; p (razlika između modela) – razina statističke značajnosti, usporedba modela koji sadrži danu interakciju i onoga koju ju ne sadrži

5.2. Odnos prehrane i ostalih mjerenih parametara

Budući da je postojao mali broj sudionika čija je prehrana bila mediteranska, originalna varijabla rekodirana je na način da su spojeni oni sudionici čija je prehrana bila mediteranska s onima čija je prehrana bila mješovita. U multivarijatnom predviđanju prehrane, u inicijalni prediktivni model uključeni su antropometrijski, biokemijski i genetički prediktori, te interakcije gena. Iz inicijalnog prediktivnog modela najprije je izbačena interakcija između genotipova *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,24; df=1; p=0,627) jer je imala najvišu razinu statističke značajnosti. Iz reduciranog modela zatim je izbačena interakcija između genotipova *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,37; df=1; p=0,545), a unutar modela nastalog isključivanjem navedene interakcije najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,82; df=1; p=0,366) te je i ona isključena iz multivarijatnog predviđanja. Iz novonastalog modela zatim je isključena interakcija između *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=2,99; df=1; p=0,084) te nakon nje interakcija između *PPARγ* i *ACE* budući da ni ona nije bila statistički značajno povezana s prehranom (Wald χ^2=2,62; df=1; p=0,106).

Tablica 9. Univarijatna i multivarijatna analiza povezanosti prehrane s mjerenim varijablama

	Mediteranska ili mješovita	Kontinentalna	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	52,0 (45,0-59,0)	53,0 (47,0-59,0)	0,99 (0,97-1,01)	0,394	1,01 (0,98-1,04)	0,431
Spol						
muški	20 (17,1)	97 (82,9)	1		1	
ženski	101 (36,2)	178 (63,8)	**2,75 (1,60-4,72)**	**<0,001**	1,24 (0,56-2,72)	0,597
ACE I/D						
DD	37 (33,9)	72 (66,1)	1		1	
ID ili II	84 (29,3)	203 (70,7)	0,81 (0,50-1,29)	0,367	0,61 (0,32-1,15)	0,123
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	95 (32,1)	201 (67,9)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	26 (26,0)	74 (74,0)	0,74 (0,45-1,24)	0,254	1,12 (0,57-2,19)	0,744
IL6 -174G>C						
GG	42 (30,0)	98 (70,0)	1		1	
GC ili CC	79 (30,9)	177 (69,1)	1,04 (0,67-1,63)	0,859	1,38 (0,75-2,56)	0,306
AT1R 1166A>C						
AA	55 (26,1)	156 (73,9)	1		1	
AC ili CC	66 (35,7)	119 (64,3)	**1,57 (1,02-2,42)**	**0,039**	**2,24 (1,24-4,05)**	**0,007**
LPL PvuII						
-/-	31 (30,4)	71 (69,6)	1		1	
-/+ ili +/+	90 (30,6)	204 (69,4)	1,01 (0,62-1,65)	0,967	1,18 (0,61-2,29)	0,628
BMI*	24,0 (22,0-26,8)	29,4 (25,8-33,7)	**0,80 (0,76-0,85)**	**<0,001**	1,03 (0,92-1,14)	0,644
Opseg struka*	82,0 (75,0-92,0)	101,0 (92,0-110,0)	**0,90 (0,88-0,92)**	**<0,001**	**0,91 (0,87-0,95)**	**<0,001**
Ukupni kolesterol*	5,4 (4,7-6,0)	5,8 (5,1-6,7)	**0,63 (0,51-0,79)**	**<0,001**	0,58 (0,21-1,56)	0,279
LDL kolesterol*	3,2 (2,7-3,7)	3,6 (2,9-4,3)	**0,64 (0,50-0,82)**	**<0,001**	1,53 (0,56-4,13)	0,407
Trigliceridi*	1,01 (0,78-1,54)	1,75 (1,15-2,40)	**0,30 (0,21-0,45)**	**<0,001**	**0,57 (0,33-0,97)**	**0,037**
HDL kolesterol*	1,59 (1,34-1,85)	1,40 (1,18-1,69)	**2,86 (1,68-4,90)**	**<0,001**	0,44 (0,13-1,51)	0,192
Sistolički krvni tlak*	120,0 (120,0-132,4)	144,8 (128,4-162,8)	**0,95 (0,94-0,97)**	**<0,001**	**0,96 (0,93-0,98)**	**0,001**
Dijastolički krvni tlak*	80,0 (80,0-85,0)	90,5 (80,0-102,5)	**0,95 (0,94-0,97)**	**<0,001**	1,06 (0,92-1,10)	0,106
Glukoza*	5,0 (4,5-5,4)	5,3 (4,9-6,0)	**0,45 (0,33-0,63)**	**<0,001**	0,72 (0,47-1,12)	0,148

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

Multivarijatnim predviđanjem utvrđena je statistički značajna povezanost između prehrane te triglicerida, opsega struka i sistoličkog krvnog tlaka te genotipa *AT1R* 1166A<C. Mediteranski ili mješoviti tip prehrane bio je povezan s nižim vrijednostima triglicerida (OR=0,57; 95% CI: 0,33-0,97) i opsega struka (OR=0,91; 95% CI: 0,87-0,95). Kad je riječ o krvnom tlaku, ovaj tip prehrane bio je povezan s nižim vrijednostima sistoličkog krvnog tlaka (OR=0,96; 95% CI: 0,93-0,98). Uz kontrolu drugih varijabli, mediteranska ili mješovita

prehrana bila je učestalija kod nositelja genotipa *AT1R* 1166AC ili CC u odnosu na genotip *AT1R* 1166AA (OR=2,24; 95% CI: 1,24-4,05) (tablica 9).

5.3. Čimbenici rizika za metabolički sindrom

U multivarijatnom predviđanju MetS, u inicijalni prediktivni model uključeni su antropometrijski, biokemijski i genetički prediktori te interakcije gena. Iz inicijalnog prediktivnog modela najprije je izbačena interakcija između genotipova *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,01; df=1; p=0,940) jer je imala najvišu razinu statističke značajnosti. Iz novonastalog, reduciranog modela zatim je izbačena interakcija između genotipova *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,06; df=1; p=0,803), a unutar modela nastalog isključivanjem navedene interakcije najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,15; df=1; p=0,703) te je i ona isključena iz multivarijatnog predviđanja. Zatim je iz novonastalog modela isključena interakcija između *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=1,42; df=1; p=0,233) te je u modelu ostala samo interakcija između *PPARγ* i *LPL* koja je bila statistički značajno povezana s MetS (Wald χ^2=7,1; df=1; p=0,008). Interakcija između *PPARγ* Pro12Ala i *LPL* PvuII (-/+) značajno je unaprijedila predviđanje MetS, preko i iznad predviđanja temeljenog na modelu koji nije sadržavao interakcije (χ^2=7,22; df=1; p=0,008). Uključivanje ove interakcije u model bez interakcije povećao je Nagelkerkeov R^2 sa 0,66 na 0,67.

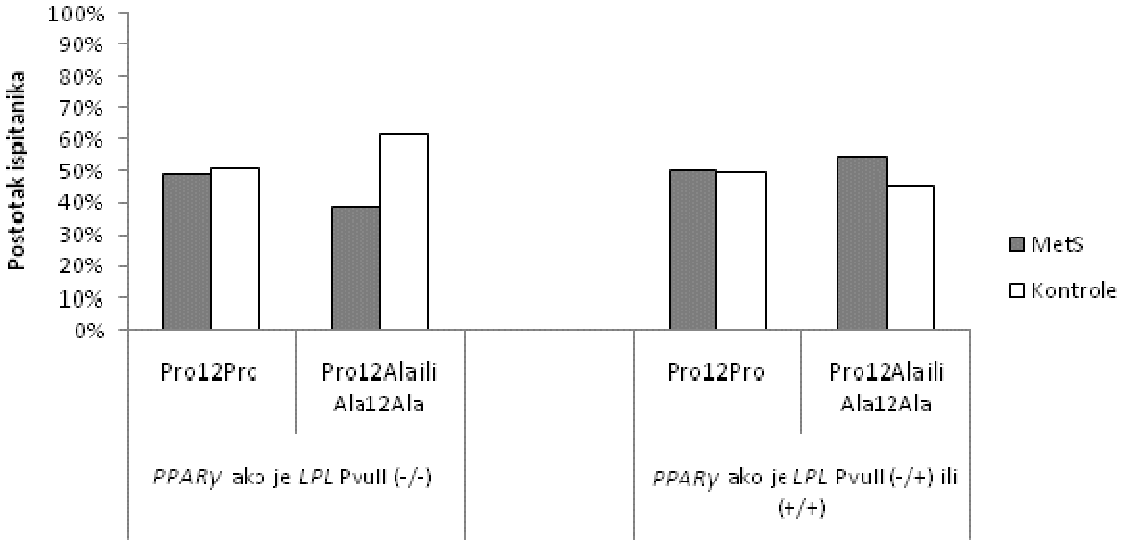
Tablica 10. Ukupan prediktivni model za MetS

	MetS	Kontrole	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	54,0 (46,8-60,0)	53,0 (46,0-59,0)	1,00 (0,99-1,02)	0,874	**0,97 (0,94-0,99)**	**0,012**
Spol						
ženski	166 (48,4)	177 (51,6)	1		1	
muški	99 (53,8)	85 (46,2)	1,24 (0,87-1,78)	0,237	1,27 (0,70-2,29)	0,427
ukupno	265 (100,0)	262 (100,0)				
ACE I/D						
DD	72 (47,1)	81 (52,9)	1		1	
ID ili II	193 (51,6)	181 (48,4)	1,20 (0,82-1,75)	0,344	1,04 (0,56-1,92)	0,909
ukupno	265 (100,0)	262 (100,0)				
PPARγ ako je LPL Pvu (-/-)						
Pro12Pro	50 (49,0)	52 (51,0)	1		1	
Pro12Ala / Ala12Ala	12 (38,7)	19 (61,3)	0,66 (0,29-1,49)	0,315	**0,12 (0,03-0,52)**	**0,005**
ukupno	62 (100,0)	71 (100,0)				
PPARγ ako je LPL (-/+)/(+/+)						
Pro12Pro	150 (50,5)	147 (49,5)	1		1	
Pro12Ala / Ala12Ala	53 (54,6)	44 (45,4)	1,18 (0,75-1,87)	0,480	1,11 (0,54-2,25)	0,781
ukupno	203 (100,0)	191 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	85 (48,3)	91 (51,7)	1		1	
GC ili CC	180 (51,3)	171 (48,7)	1,13 (0,78-1,62)	0,518	0,80 (0,45-1,44)	0,803
ukupno	265 (100,0)	262 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	136 (50,4)	134 (49,6)	1		1	
AC ili CC	129 (50,2)	128 (49,8)	0,99 (0,71-1,40)	0,968	0,69 (0,39-1,20)	0,185
ukupno	265 (100,0)	262 (100,0)				
LPL PvuII ako je *PPARγ* Pro12Pro						
(-/-)	50 (49,0)	52 (51,0)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	150 (50,5)	147 (49,5)	1,06 (0,68-1,66)	0,796	0,67 (0,32-1,41)	0,290
ukupno	200 (100,0)	199 (100,0)				
LPL PvuII ako je *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala						
(-/-)	12 (38,7)	19 (61,3)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	53 (54,6)	44 (45,4)	1,91 (0,84-4,36)	0,125	**5,98 (1,46-24,47)**	**0,013**
ukupno	65 (100,0)	63 (100,0)				
BMI*	31,9 (28,7-35,0)	24,0 (22,0-26,6)	**1,60 (1,48-1,73)**	**<0,001**	**1,69 (1,54-1,85)**	**<0,001**
Ukupni kolesterol*	5,9 (5,3-6,6)	5,4 (4,8-6,1)	**1,55 (1,29-1,85)**	**<0,001**	1,32 (0,82-1,12)	0,248
LDL kolesterol*	3,6 (3,1-4,3)	3,2 (2,7-3,8)	**1,64 (1,33-2,02)**	**<0,001**	1,41 (0,86-2,31)	0,170
PPARγ x *LPL*					8,92 (1,77-44,88)	**0,008**

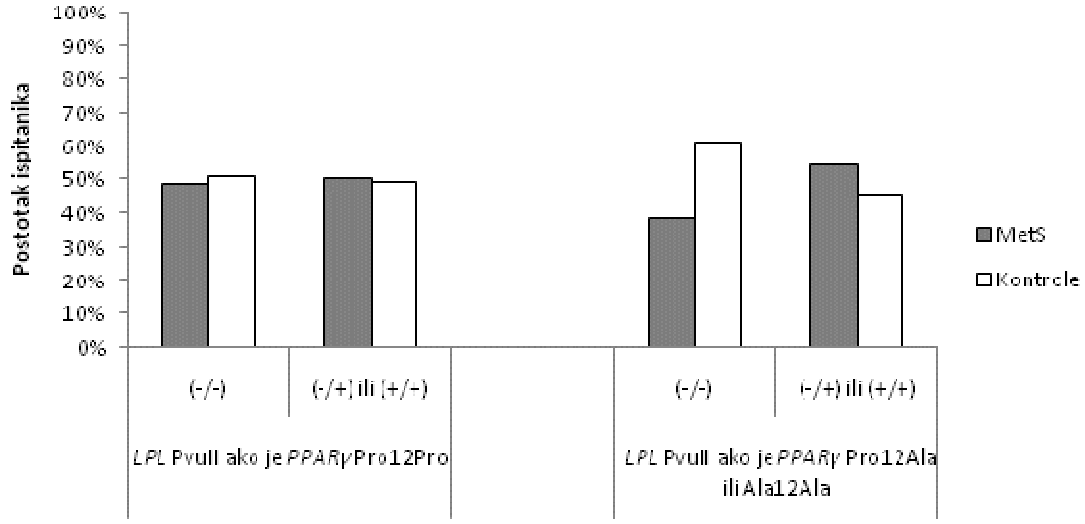
KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

U skupini s genotipom *LPL* PvuII (-/-), nosioci genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala su imali manji rizik za razvoj MetS u odnosu na ispitanike s genotipom Pro12Pro (OR=0,12;

95% CI: 0,03-0,52, p=0,005). U skupini ispitanika koji su bili nosioci genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala, oni ispitanici koji su također imali varijantu *LPL* PvuII (-/+) ili PvuII (+/+) imali su značajno veći rizik za razvoj MetS (OR=5,98; 95% CI: 1,46-24,47, p=0,013) u odnosu na ispitanike s genotipom *LPL* PvuII (-/-) (grafički prikazi 1a i 1b).



Grafički prikaz 1a. Metabolički sindrom s obzirom na učestalost genotipova *PPARγ* u ovisnosti o genotipovima *LPL* PvuII



Grafički prikaz 1b. Metabolički sindrom s obzirom na učestalost genotipova *LPL* PvuII u ovisnosti o genotipovima *PPARγ*

U multivarijatnom predviđanju, nakon prilagodbe za sve druge varijable, dob (p=0,012) i BMI (p<0,001) su također bili značajno povezani s MetS. Sa svakom godinom starosti,

izgledi za MetS opadali su za 3% (OR=0,97; 95% CI: 0,94-0,99). Sa svakom jedinicom porasta BMI izgledi za MetS povećavali su se više od 1,5 puta (OR=1,69; 95% CI: 1,54-1,85) (tablica 10).

Tablica 11. Metabolički sindrom s obzirom na prehranu

	MetS	Kontrole	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)		OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	12 (9,9)	109 (90,1)	121 (100,0)	1	
Kontinentalna	189 (68,7)	86 (31,3)	275 (100,0)	**19,96 (10,44-38,18)**	**<0,001**

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom utvrđeno je da su ispitanici čija je prehrana bila kontinentalna imali statistički značajno veće izglede za MetS u odnosu na one čija je prehrana bila mediteranska ili mješovita (OR=19,96; 95% CI: 10,44-38,18; p<0,001) (tablica 11).

Kad je riječ o multivarijatnoj analizi koja je uključivala prehranu, iz prediktivnog modela koji je sadržavao sve interakcije najprije je izbačena ona između prehrane i genotipa *PPARγ* (Wald χ^2=0,01; df=1; p=0,925). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,01; df=1; p=0,906) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između prehrane i *LPL* (Wald χ^2=0,02; df=1; p=0,899), zatim *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,02; df=1; p=0,893), prehrana i *AT1R* (Wald χ^2=0,07; df=1; p=0,791), prehrana i *IL6* (Wald χ^2=0,13; df=1; p=0,719), *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,15; df=1; p=0,697), *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,62; df=1; p=0,430) te prehrana i *ACE* (Wald χ^2=2,16; df=1; p=0,142). Iako je interakcija između *PPARγ* i *LPL* genotipova ostala posljednja u prediktivnom modelu, u ovoj analizi ona nije bila statistički značajno povezana s MetS (Wald χ^2=2,79; df=1; p=0,095) te je i ona isključena iz multivarijatnog predviđanja. Nakon što su iz prediktivnog modela izbačene sve ispitivane interakcije, utvrđeno je da su statistički značajni prediktori MetS dob, prehrana te BMI. Pri tome su se, sa svakom godinom porasta u dobi, izgledi za MetS smanjivali za 8% (OR=0,92; 95% CI: 0,89-0,96; p<0,001). Ispitanici čija je prehrana bila kontinentalna imali su gotovo 14 puta veće izglede za MetS u odnosu na one kojima je prehrana bila mediteranska ili mješovita (OR=13,86; 95% CI: 5,69-33,78; p<0,001).

Također, sa svakim jediničnim pomakom u BMI, izgledi za MetS povećavali su se oko 60% (OR=1,57; 95% CI: 1,42-1,75; p<0,001).

5.4. Čimbenici rizika za povišenu razinu glukoze natašte

5.4.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom

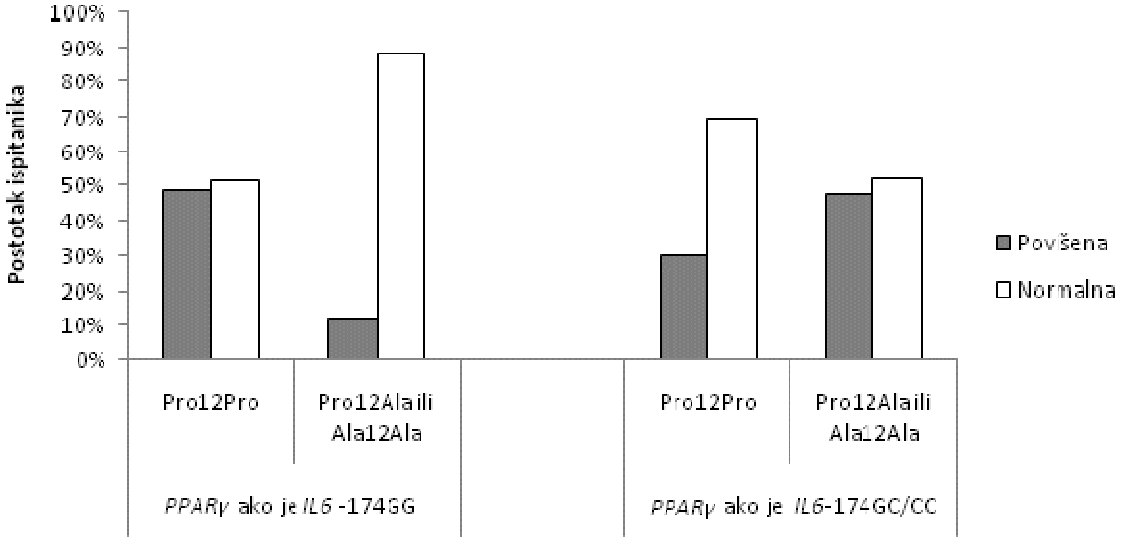
U multivarijatnom predviđanju povišene razine glukoze, u inicijalni prediktivni model uključeni su antropometrijski, biokemijski i genetički prediktori te interakcije gena. Iz tog inicijalnog prediktivnog modela najprije je izbačena interakcija između genotipova *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,67; df=1; p=0,413) jer je imala najvišu razinu statističke značajnosti. Iz reduciranog modela zatim je izbačena interakcija između genotipova *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,82; df=1; p=0,364), a unutar modela nastalog isključivanjem navedene interakcije najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=1,13; df=1; p=0,287) te je i ona isključena iz multivarijatnog predviđanja. Iz novonastalog modela zatim je isključena interakcija između *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=1,13; df=1; p=0,289) te je u modelu ostala samo interakcija između *PPARγ* i *IL6* koja je bila statistički značajno povezana s glukozom (Wald χ^2=10,30; df=1; p=0,001). Interakcija između *PPARγ* Pro12Ala i *IL6* -174G>C značajno je unaprijedila predviđanje visokih razina glukoze natašte u skupini ispitanika s MetS, preko i iznad predviđanja temeljenog na modelu koji nije sadržavao interakcije (χ^2=13,99; df=1; p=0,001). Uključivanje ove interakcije u model bez interakcije povećao je Nagelkerkeov R^2 sa 0,21 na 0,27.

Tablica 12. Univarijatno i multivarijatno predviđanje povišene razine glukoze natašte u ispitanika s MetS

	Povišena	Normalna	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	57,0 (51,0-62,0)	52,0 (45,0-59,0)	**1,05 (1,02-1,07)**	**0,001**	**1,06 (1,02-1,09)**	**0,001**
Spol						
ženski	52 (53,6)	113 (68,5)	1		1	
muški	45 (46,4)	52 (31,5)	**1,88 (1,12-3,15)**	**0,017**	**2,08 (1,02-4,26)**	**0,045**
ukupno	97 (100,0)	165 (100,0)				
ACE I/D						
DD	24 (24,7)	47 (28,5)	1		1	
ID ili II	73 (75,3)	118 (71,5)	1,21 (0,68-2,15)	0,511	1,92 (0,95-3,89)	0,071
ukupno	97 (100,0)	165 (100,0)				
PPARγ ako je *IL6* -174GG						
Pro12Pro	33 (94,3)	35 (70,0)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	2 (5,7)	15 (30,0)	**0,14 (0,03-0,67)**	**0,013**	**0,10 (0,02-0,57)**	**0,010**
ukupno	35 (100,0)	50 (100,0)				
PPARγ ako je *IL6* -174GC/CC						
Pro12Pro	39 (62,9)	90 (78,3)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	23 (37,1)	25 (21,7)	**2,12 (1,08-4,19)**	**0,030**	**2,39 (1,11-5,17)**	**0,026**
ukupno	62 (100,0)	115 (100,0)				
IL6 ako je *PPARγ* Pro12Pro						
GG	33 (45,8)	35 (28,0)	1		1	
GC iliCC	39 (54,2)	90 (72,0)	**0,46 (0,25-0,84)**	**0,012**	**0,41 (0,20-0,83)**	**0,013**
ukupno	72 (100,0)	125 (100,0)				
IL6 ako je *PPARγ* ProAla/AlaAla						
GG	2 (8,0)	15 (37,5)	1		1	
GC ili CC	23 (92,0)	25 (62,5)	**6,90 (1,42-33,51)**	**0,017**	**10,13 (1,66-61,89)**	**0,012**
ukupno	25 (100,0)	40 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	49 (50,5)	86 (52,1)	1		1	
AC ili CC	48 (49,5)	79 (47,9)	1,07 (0,65-1,76)	0,802	0,96 (0,53-1,74)	0,893
ukupno	97 (100,0)	165 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	21 (21,6)	39 (23,6)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	76 (78,4)	126 (76,4)	1,12 (0,61-2,05)	0,712	1,01 (0,49-2,05)	0,989
ukupno	97 (100,0)	165 (100,0)				
BMI*	31,2 (28,7-36,0)	32,0 (28,7-34,3)	1,01 (0,96-1,06)	0,744	1,01 (0,92-1,12)	0,781
Ukupni kolesterol	5,9 (5,3-6,5)	5,9 (5,2-6,7)	0,92 (0,73-1,15)	0,455	**0,53 (0,36-0,79)**	**0,002**
Opseg struka*	107,0 (101,5-115,5)	106,0 (99,0-112,0)	1,02 (1,00-1,04)	0,102	1,01 (0,97-1,06)	0,615
Trigliceridi*	2,20 (1,63-3,49)	2,20 (1,77-3,06)	1,09 (0,97-1,22)	0,155	**1,30 (1,11-1,53)**	**0,001**
LDL kolesterol*	3,7 (3,0-4,2)	3,6 (3,1-4,3)	0,92 (0,73-1,17)	0,497	1,14 (0,84-1,55)	0,400
HDL kolesterol	1,22 (1,00-1,50)	1,20 (0,98-1,39)	1,63 (0,76-3,48)	0,207	**7,60 (2,38-24,25)**	**0,001**
Sistolički krvni tlak*	153,0 (136,0-167,0)	145,0 (132,0-161,8)	1,01 (1,00-1,02)	0,066	1,02 (1,00-1,03)	0,120
Dijastolički krvni tlak*	91,0 (82,0-102,5)	92,0 (80,0-105,5)	1,00 (0,99-1,02)	0,695	0,98 (0,95-1,02)	0,330
PPARγ x *IL6*					**24,81 (3,49-176,38)**	**0,001**

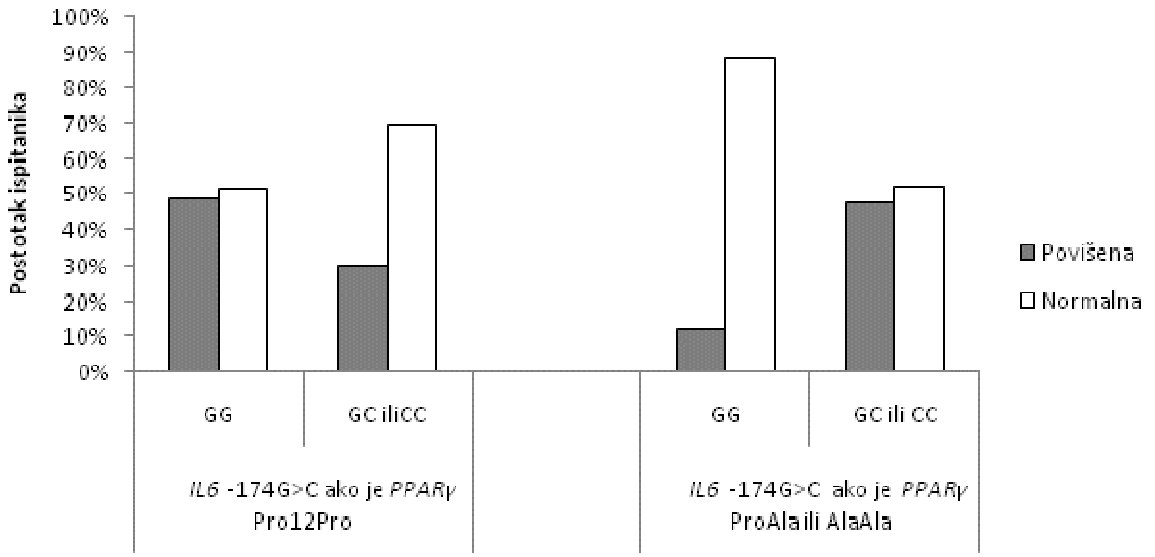
KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

U skupini pacijenata s genotipom *IL6* -174GG, nosioci genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala (promatrani zajedno) imali su manje izglede za visoku razinu glukoze u usporedbi s nosiocima genotipa Pro12Pro (OR=0,10; 95% CI: 0,02-0,57, p=0,01). U skupini pacijenata s genotipom *IL6* -174GC ili CC, nosioci genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala (promatrani zajedno) imali su veće izglede za povišenu razinu glukoze u odnosu na nosioce genotipa Pro12Pro (OR=2,39; 95% CI: 1,11-5,17, p=0,026) (grafički prikaz 2a).



Grafički prikaz 2a. Udio ispitanika s povišenom i normalnom razinom glukoze natašte s obzirom na učestalost genotipova *PPARγ* u ovisnosti o genotipovima *IL6* -174G>C

U skupini pacijenta s genotipom *PPARγ* Pro12Pro, nosioci genotipa *IL6* -174GC ili CC (promatrani zajedno) imali su manje izglede za visoke razine glukoze u odnosu na genotip *IL6* -174GG (OR=0,41; 95% CI: 0,20-0,83, p=0,013). U skupini pacijenata s genotipom *PPARγ* Pro12Ala ili AlaAla, nosioci genotipa *IL6* -174GC ili CC imali su statistički značajno veće izglede za visoke razine glukoze u odnosu na nosioce genotipa *IL6* -174GG (OR=10,13; 95% CI: 1,66-61,89) (grafički prikaz 2b).



Grafički prikaz 2b. Udio ispitanika s povišenom i normalnom razinom glukoze natašte s obzirom na učestalost genotipova *IL6* -174G>C u ovisnosti o genotipovima *PPARγ*

U multivarijatnom predviđanju, nakon prilagodbe za sve druge varijable, također je ustanovljena povezanost visokih razina glukoze natašte s dobi (p=0,001), spolom (p=0,045) i trigliceridima (p=0,001). Sa svakom godinom starosti izgledi za povišene razine glukoze su se povećavali za 6% (OR=1,06; 95% CI: 1,02-1,09), a muški ispitanici su imali više od dva puta veće izglede za njezine povišenu razinu (OR=2,08; 95% CI: 1,02-4,26). Sa svakom jedinicom porasta triglicerida povećavali su se i izgledi za povišenu razinu glukoze 1,3 puta (OR=1,3; 95% CI: 1,11-1,53) (tablica 12).

Tablica 13. Razina glukoze natašte s obzirom na prehranu u skupini ispitanika s MetS

	Povišena	Normalna	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	4 (33,3)	8 (66,7)	12 (100,0)	1	
Kontinentalna	67 (35,4)	122 (64,6)	189 (100,0)	1,10 (0,32-3,78)	0,882

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između prehrane i razine glukoze natašte (tablica 13).

U multivarijatnoj analizi koja je uključivala prehranu, pri ispitivanju interakcija u multivarijatnom predviđanju povišene razine glukoze interakcije između prehrane i gena bile su visoko povezane s genima od kojih su se sastojale, što je dovelo do visokih pogrešaka

regresijskih koeficijenata. Iz tih razloga interakcije između gena i prehrane nisu ispitane. Iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije između gena, najprije je isključena interakcija između *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,14; df=1; p=0,713). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,48; df=1; p=0,490) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima zatim su izbačene interakcije između *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,91; df=1; p=0,340) te između *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=1,39; df=1; p=0,239). U prediktivnom modelu ostala je interakcija između *PPARγ* i *IL6* koja je bila statistički značajno povezana s razinom glukoze (Wald χ^2=8,48; df=1; p=0,004). Ova interakcija je statistički značajno doprinijela predviđanju povišene razine glukoze u skupini pacijenata s MetS, iznad i preko predviđanja koje nije uključivalo tu interakciju (χ^2=10,77; df=1; p=0,001). Nagelkerkeov R^2 iz prediktivnog modela koji je sadržavao interakciju iznosio je 0,29, dok je u sklopu modela bez interakcije iznosio 0,23.

U skupini bolesnika s genotipom *IL6* -174GC ili CC, *PPARγ* nije bio statistički značajan prediktor povišene razine glukoze, međutim smjer povezanosti bio je jednak kao u analizi koja nije uključivala prehranu (OR=2,29; 95% CI: 0,92-5,70; p=0,075). U skupini bolesnika s genotipom *IL6* -174GG , nositelji genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su za 89% manje izglede za povišenu razinu glukoze u odnosu na nositelje genotipa *PPARγ* Pro12Pro (OR=0,11; 95% CI: 0,02-0,68; p=0,017), kao i u analizi koja nije uključivala prehranu.

U skupini nositelja *PPARγ* Pro12Pro genotip *IL6* -174G>C nije bio statistički značajan prediktor povišene razine glukoze, međutim smjer povezanosti bio je jednak kao i u analizi koja je uključivala prehranu (OR=0,53; 95% CI: 0,23-1,21; p=0,132). S druge strane, u skupini nositelja genotipova *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala, ispitanici s genotipom *IL6* -174GC ili CC imali su statistički značajno veće izglede za povišenu razinu glukoze u odnosu na bolesnike s genotipom *IL6* -174GG (OR=10,97; 95% CI: 1,72-69,88; p=0,011).

Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su negenetički faktori rizika za povišenu razinu glukoze u skupini bolesnika s MetS dob, ukupni kolesterol, trigliceridi te HDL kolesterol. Pri tome su se sa svakom godinom porasta u dobi izgledi za povišenu razinu glukoze povećavali za 7% (OR=1,07; 95% CI: 1,02-1,12; p=0,003). Kad je riječ o trigliceridima, sa svakim jediničnim pomakom u razini triglicerida izgledi za povišenu razinu glukoze povećavali su se oko 30% (OR=1,29; 95% CI: 1,07-1,55; p=0,008). Spol nije bio statistički značajan prediktor u analizi koja je uključivala prehranu, međutim, smjer povezanosti bio je jednak kao i u analizi koja ju nije uključivala (OR=1,93; 95% CI: 0,84-4,44; p=0,123). Prehrana nije bila

statistički značajno povezana s povišenom razinom glukoze (OR=0,91; 95% CI: 0,21-3,86; p=0,895).

5.4.2. Zdrave kontrole

Interakcije između gena nisu ispitane jer je broj ispitanika s povišenom razinom glukoze bio premali (n=11).

Tablica 14. Univarijatno i multivarijatno predviđanje povišene razine glukoze natašte u kontrolnoj skupini

	Povišena	Normalna	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	55,0 (46,5-61,8)	53,0 (47,3-59,0)	1,02 (0,96-1,08)	0,581	1,06 (0,96-1,16)	0,253
Spol						
ženski	6 (3,6)	163 (96,4)	1		1	
muški	5 (7,4)	63 (92,6)	2,16 (0,64-7,32)	0,218	1,89 (0,15-24,35)	0,624
ACE I/D						
DD	3 (4,2)	69 (95,8)	1		1	
ID ili II	8 (4,8)	157 (95,2)	1,17 (0,30-4,55)	0,819	0,43 (0,07-2,60)	0,359
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	10 (5,6)	169 (94,4)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	1 (1,7)	57 (98,3)	0,30 (0,04-2,37)	0,251	0,79 (0,07-8,52)	0,847
IL6 -174G>C						
GG	4 (4,8)	79 (95,2)	1		1	
GC ili CC	7 (4,5)	147 (95,5)	0,94 (0,27-3,31)	0,924	3,01 (0,34-26.44)	0,320
AT1R 1166A>C						
AA	3 (2,5)	115 (97,5)	1		1	
AC ili CC	8 (6,7)	111 (93,3)	2,76 (0,72-10,68)	0,141	3,59 (0,47-27,71)	0,220
LPL PvuII						
-/-	2 (3,2)	61 (96,8)	1		1	
-/+ ili +/+	9 (5,2)	165 (94,8)	1,66 (0,35-7,92)	0,523	0,76 (0,10-5,62)	0,790
BMI*	23,1 (21,8-26,3)	24,0 (22,0-26,3)	0,93 (0,76-1,14)	0,492	1,12 (0,75-1,67)	0,577
Ukupni kolesterol*	6,0 (4,6-6,6)	5,4 (4,8-6,1)	1,20 (0,69-2,09)	0,523	2,57 (0,06-120,82)	0,631
LDL kolesterol*	3,7 (2,7-4,1)	3,2 (2,7-3,8)	1,33 (0,70-2,52)	0,380	0,43 (0,01-23,02)	0,674
Opseg struka*	75,0 (70,0-85,8)	84,0 (76,5-90,5)	0,95 (0,88-1,02)	0,165	0,92 (0,80-1,06)	0,228
Trigliceridi*	1,14 (1,01-1,70)	1,04 (0,78-1,40)	1,37 (0,78-2,38)	0,270	0,84 (0,20-3,50)	0,805
HDL kolesterol*	1,41 (1,24-1,85)	1,67 (1,40-1,96)	0,37 (0,07-1,90)	0,234	0,13 (0,00-10,82)	0,361
Sistolički krvni tlak*	120,0 (109,0-120,0)	120,0 (120,0-130,0)	**0,92 (0,87-0,98)**	**0,008**	**0,82 (0,68-0,98)**	**0,033**
Dijastolički krvni tlak*	80,0 (70,0-80,0)	80,0 (75,1-80,4)	0,97 (0,91-1,04)	0,381	1,15 (0,94-1,41)	0,190

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

Budući da prehrana niti jednog od ispitanika s povišenom razinom glukoze nije bila kontinentalna, nije bilo moguće izračunati omjer izgleda. Iz istih razloga te uzimajući u obzir da su podaci o prehrani postojali za samo pet ispitanika s povišenom razinom glukoze, ova varijabla nije uključena u multivarijatno predviđanje povišene razine glukoze (tablica 15).

Tablica 15. Razina glukoze natašte s obzirom na prehranu u kontrolnoj skupini

	Povišena	Normalna	Ukupno
	n (%)	n (%)	n (%)
Mediteranska ili mješovita	5 (4,8)	99 (95,2)	104 (100,0)
Kontinentalna	0 (0,0)	85 (100,0)	85 (100,0)

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

5.5. Čimbenici rizika za razvoj debljine

5.5.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom

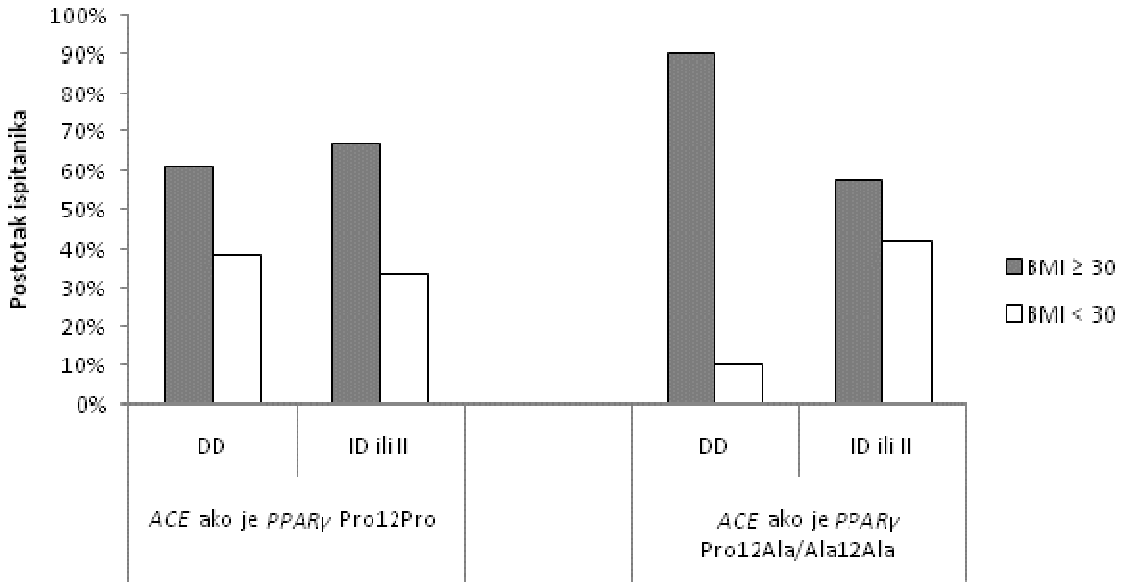
U multivarijatnom predviđanju BMI, u inicijalni prediktivni model uključeni su antropometrijski, biokemijski i genetički prediktori te interakcije gena. Iz inicijalnog prediktivnog modela najprije je izbačena interakcija između genotipova *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,87; df=1; p=0,351) jer je imala najvišu razinu statističke značajnosti. Iz novonastalog, reduciranog modela zatim je izbačena interakcija između genotipova *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,80; df=1; p=0,370), a unutar modela nastalog isključivanjem navedene interakcije najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=1,28; df=1; p=0,258) te je i ona isključena iz multivarijatnog predviđanja. Zatim je iz novonastalog modela isključena interakcija između *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=1,92; p=0,166) te je u modelu ostala samo interakcija između *PPARγ* i *ACE* koja je bila statistički značajno povezana s BMI (Wald χ^2=6,65; df=1; p=0,010). Interakcija između *PPAR*γ Pro12Ala i *ACE* I/D značajno je unaprijedila predviđanje razvoja debljine u skupini ispitanika s MetS, preko i iznad predviđanja temeljenog na modelu koji nije sadržavao interakcije (χ^2=8,08; df=1; p=0,004). Uključivanje ove interakcije u model bez interakcije povećao je Nagelkerkeov R^2 sa 0,51 na 0,53.

Tablica 16. Univarijatno i multivarijatno predviđanje BMI u ispitanika s MetS

	BMI ≥ 30	BMI < 30	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	54,0 (46,0-59,0)	54,5 (47,0-62,0)	0,99 (0,97-1,02)	0,648	0,99 (0,96-1,03)	0,582
Spol						
ženski	104 (59,8)	61 (67,8)	1		1	
muški	70 (40,2)	29 (32,2)	1,42 (0,83-2,42)	0,204	**0,30 (0,12-0,74)**	**0,009**
ukupno	174 (100,0)	90 (100,0)				
ACE ako je *PPARγ* Pro12Pro						
DD	32 (24,6)	20 (29,0)	1		1	
ID ili II	98 (75,4)	49 (71,0)	1,25 (0,65-2,41)	0,505	2,36 (0,93-6,01)	0,072
ukupno	130 (100,0)	69 (100,0)				
ACE ako je *PPARγ* Pro12Ala/Ala12Ala						
DD	18 (40,9)	2 (9,5)	1		1	
ID ili II	26 (59,1)	19 (90,5)	**0,15 (0,03-0,74)**	**0,019**	**0,11 (0,01-0,88)**	**0,038**
ukupno	44 (100,0)	21 (100,0)				
PPARγ ako je *ACE* DD						
Pro12Pro	32 (64,0)	20 (90,9)	1		1	
Pro12Ala iliAla12Ala	18 (36,0)	2 (9,1)	**5,63 (1,18-26,88)**	**0,030**	**9,98 (1,18-84,14)**	**0,034**
ukupno	50 (100,0)	22 (100,0)				
PPARγ ako je *ACE* ID/DD						
Pro12Pro	98 (79,0)	49 (72,1)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	26 (21,0)	19 (27,9)	0,68 (0,35-1,36)	0,277	0,44 (0,17-1,15)	0,094
ukupno	124 (100,0)	68 (100,0)				
*IL6 -174*G>C						
GG	51 (29,3)	33 (36,7)	1		1	
GC ili CC	123 (70,7)	57 (63,3)	1,40 (0,82-2,39)	0,225	1,16 (0,55-2,46)	0,698
ukupno	174 (100,0)	90 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	90 (51,7)	45 (50,0)	1		1	
AC ili CC	84 (48,3)	45 (50,0)	0,93 (0,56-1,55)	0,791	1,14 (0,56-2,31)	0,722
ukupno	174 (100,0)	90 (100,0)				
LPL PvuII (-/+)						
(-/-)	43 (24,7)	18 (20,0)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	131 (75,3)	72 (80,0)	0,76 (0,41-1,42)	0,390	0,77 (0,33-1,81)	0,550
ukupno	174 (100,0)	90 (100,0)				
Ukupni kolesterol*	5,8 (5,3-6,4)	6,1 (5,2-6,7)	0,88 (0,70-1,11)	0,268	0,91 (0,49-1,70)	0,777
LDL kolesterol*	3,6 (3,1-4,2)	3,7 (3,2-4,3)	0,91 (0,73-1,14)	0,404	0,93 (0,50-1,74)	0,813
Opseg struka*	110,0 (104,0-117,0)	99,0 (93,8-103,0)	**1,21 (1,15-1,27)**	**<0,001**	**1,26 (1,18-1,34)**	**<0,001**
Trigliceridi*	2,32 (1,77-3,44)	2,04 (1,71-2,72)	1,06 (0,93-1,21)	0,367	1,04 (0,83-1,30)	0,730
HDL kolesterol*	1,18 (0,96-1,39)	1,25 (1,04-1,51)	**0,44 (0,20-0,96)**	**0,038**	**0,24 (0,06-0,96)**	**0,043**
Sistolički krvni tlak*	150,0 (136,6-165,9)	145,0 (131,5-162,3)	1,01 (1,00-1,02)	0,241	1,02 (0,99-1,04)	0,197
Dijastolički krvni tlak*	92,3 (81,0-105,5)	90,0 (80,0-100,5)	1,01 (0,99-1,02)	0,437	0,99 (0,96-1,03)	0,719
Glukoza*	5,6 (5,0-6,7)	5,5 (4,9-6,5)	1,06 (0,94-1,20)	0,367	0,90 (0,73-1,11)	0,309
PPARγ x *ACE* I/D					**0,04 (0,004-0,47)**	**0,010**

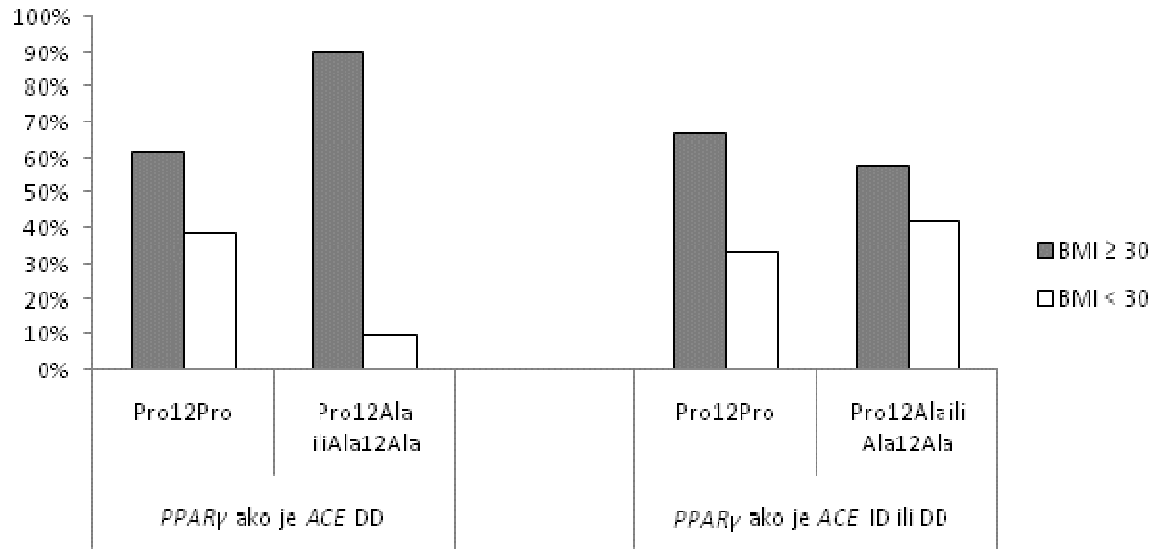
KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

U skupini s genotipom *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala, pacijenti s genotipom *ACE* ID ili II imali su manje izglede za razvoj debljine u odnosu na ispitanike s genotipom *ACE* DD (OR=0,11; 95% CI: 0,01-0,88, p=0,038) (grafički prikaz 3a).



Grafički prikaz 3a. BMI s obzirom na učestalost genotipova *ACE* u ovisnosti o genotipovima *PPARγ*

Premda je interval pouzdanosti za omjer izgleda bio vrlo velik zbog malog broja slučajeva, u skupini pacijenata s genotipom *ACE* DD, nosioci genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su statistički značajno veće izglede za razvoj debljine u odnosu na nosioce genotipa *PPARγ* Pro12Pro (OR=9,98; 95% CI: 1,18-84,14; p=0,034) (grafički prikaz 3b).



Grafički prikaz 3b. BMI s obzirom na učestalost genotipova *PPARγ* u ovisnosti o genotipovima *ACE*

U multivarijatnom predviđanju još su ustanovljene povezanosti BMI sa spolom (p=0,009), opsegom struka (p<0,001) i HDL kolesterolom (p=0,043). Muški ispitanici su imali manje izglede za razvoj debljine (OR=0,30; 95% CI=0,12-0,74). Sa svakom jedinicom porasta u opsegu struka izgledi za razvoj debljine povećavali su se 1,26 puta (OR=1,26; 95% CI: 1,18-1,34), a sa svakom jedinicom porasta HDL kolesterola izgledi za debljinu su se smanjivali za 76% (OR=0,24; 95% CI: 0,06-0,96) (tablica 16).

Tablica 17. BMI s obzirom na prehranu u skupini ispitanika s MetS

	BMI ≥ 30	BMI < 30	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	4 (33,3)	8 (66,7)	12 (100,0)	1	
Kontinentalna	124 (66,0)	64 (34,0)	188 (100,0)	**3,88 (1,12-13,36)**	**0,032**

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom utvrđeno je da su ispitanici čija je prehrana bila kontinentalna imali gotovo četiri puta veće izglede za pretilost u odnosu na one čija je prehrana bila mediteranska ili mješovita (OR=3,88; 95% CI: 1,12-13,36; p=0,032) (tablica 17).

Kad je riječ o predviđanju koje je uključivalo prehranu, zbog malog broja ispitanika čija je prehrana bila mediteranska ili mješovita te visokih povezanosti interakcija gena i prehrane s danim genom koja je vodila velikim pogreškama regresijskih koeficijenata, ove interakcije nisu ispitane. Iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije između gena, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,37; df=1; p=0,544). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *IL6 -174* G<C (Wald χ^2=0,40; df=1; p=0,526) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,70; df=1; p=0,402), zatim *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=1,35; df=1; p=0,245). U prediktivnom modelu ostala je interakcija između *PPARγ* i *ACE* te je ona bila statistički značajno povezana s debljinom (Wald χ^2=5,53; df=1; p=0,019). Ova interakcija je statistički značajno doprinijela predviđanju pretilosti u skupini pacijenata s MetS, iznad i preko predviđanja koje nije uključivalo tu interakciju (χ^2=6,49; df=1; p=0,011). Nagelkerkeov R^2 prediktivnog modela koji je sadržavao interakciju iznosio je 0,57, dok je u sklopu modela bez interakcije iznosio 0,54.

U skupini bolesnika s genotipom *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala, *ACE* nije bio statistički značajan prediktor pretilosti, no smjer povezanosti bio je jednak kao i u analizi koja nije uključivala prehranu (OR=0,14; 95% CI: 0,01-1,31; p=0,085). S druge strane, u skupini bolesnika s genotipom *PPARγ* Pro12Pro, nositelji genotipa *ACE* ID ili II imali su preko tri puta veće izglede za pretilost u odnosu na nositelje genotipa *ACE* DD (OR=3,38; 95%CI: 1,01-11,32; p=0,048).

U skupini ispitanika s genotipom *ACE* ID ili II, *PPARγ* nije bio statistički značajan prediktor pretilosti. Kao i u analizi koja nije uključivala prehranu, u skupini bolesnika s genotipom *ACE* DD, nositelji genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su statistički značajno veće izglede za pretilost u odnosu na nositelje genotipa *PPARγ* Pro12Pro (OR=13,16; 95% CI: 1,24-140,26; p=0,033).

Multivarijatnom analizom utvrđeno je da su u skupini bolesnika s MetS, uz interakciju između genotipova *PPARγ* i *ACE*, statistički značajni prediktori debljine spol i opseg struka. Pri tome su bolesnici muškog spola, u odnosu na one ženskog spola, imali 71% manje izglede za razvoj debljine (OR=0,29; 95% CI: 0,10-0,83; p=0,021). Također, jedinični porast u opsegu struka povećavao je izglede za pretilost za 26% (OR=1,26; 95% CI: 1,17-1,36; p<0,001). Iako u ovoj analizi HDL kolesterol nije bio statistički značajan prediktor pretilosti, smjer povezanosti bio je jednak kao i u analizi koja nije uključivala prehranu (OR=0,31; 95%

CI: 0,05-2,11; p=0,233). U multivarijatnoj analizi prehrana nije bila statistički značajan prediktor pretilosti (OR=3,79; 95% CI: 0,58-24,68; p=0,163).

5.5.2. Zdrave kontrole

U multivarijatnom predviđanju pretilosti u kontrolnoj skupini, zbog premalog broja pretilih ispitanika te visokih povezanosti interakcija s ostalim prediktorima, interakcije nisu ispitane.

Tablica 18. Univarijatno i multivarijatno predviđanje BMI u kontrolnoj skupini

	BMI ≥ 30	BMI < 30	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	55,0 (45,0-61,5)	53,0 (45,8-59,0)	1,01 (0,97-1,06)	0,488	1,02 (0,93-1,12)	0,712
Spol						
muški	6 (7,1)	78 (92,9)	1		1	
ženski	16 (9,3)	156 (90,7)	1,33 (0,50-3,54)	0,564	**142,79 (5,97-3413,1)**	**0,001**
ACE I/D						
DD	7 (8,8)	73 (91,3)	1		1	
ID ili II	15 (8,5)	161 (91,5)	0,97 (0,38-2,48)	0,952	1,37 (0,21-9,15)	0,744
*PPARγ*Pro12Ala						
Pro12Pro	15 (7,7)	179 (92,3)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	7 (11,3)	55 (88,7)	1,52 (0,59-3,91)	0,387	0,65 (0,13-3,31)	0,607
IL6 -174G>C						
GG	6 (6,8)	82 (93,2)	1		1	
GC ili CC	16 (9,5)	152 (90,5)	1,44 (0,54-3,82)	0,465	3,12 (0,55-17,84)	0,200
AT1R 1166A>C						
AA	10 (7,7)	120 (92,3)	1		1	
AC ili CC	12 (9,5)	114 (90,5)	1,26 (0,53-3,04)	0,602	1,43 (0,32-6,31)	0,639
LPL PvuII						
-/-	4 (5,8)	65 (94,2)	1		1	
-/+ ili +/+	18 (9,6)	169 (90,4)	1,73 (0,56-5,31)	0,337	0,52 (0,09-3,12)	0,474
Ukupni kolesterol*	5,5 (4,2-6,2)	5,4 (4,9-6,1)	0,70 (0,42-1,16)	0,168	2,39 (0,02-353,15)	0,733
LDL kolesterol*	3,2 (2,5-3,9)	3,2 (2,7-3,8)	0,76 (0,42-1,34)	0,340	0,31 (0,002-41,90)	0,641
Opseg struka*	96,0 (88,5-103,0)	83,0 (75,5-91,5)	**1,13 (1,07-1,18)**	**<0,001**	**1,25 (1,11-1,41)**	**<0,001**
Trigliceridi*	1,18 (1,02-1,53)	1,02 (0,78-1,40)	1,17 (0,69-1,99)	0,556	0,50 (0,03-10,05)	0,653
HDL kolesterol*	1,43 (1,30-1,60)	1,69 (1,41-2,00)	**0,21 (0,05-0,82)**	**0,024**	0,11 (0,0-41,93)	0,470
Sistolički krvni tlak*	125,0 (120,0-134,9)	120,0 (120,0-127,9)	**1,03 (1,01-1,10)**	**0,020**	**1,08 (1,003-1,17)**	**0,041**
Dijastolički krvni tlak*	80,0 (77,5-87,5)	80,0 (76,9-80,0)	1,03 (0,98-1,08)	0,293	0,99 (0,90-1,09)	0,781
Glukoza*	5,1 (4,6-5,6)	4,9 (4,6-5,3)	1,15 (0,63-2,11)	0,642	0,52 (0,14-1,87)	0,313

KRATICE: OR = omjer izgleda; 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su ženske ispitanice imale statistički značajno veće izglede za razvoj debljine u odnosu na muške ispitanike (OR=142,79; 95% CI: 5,97-3413,1). Također, jedinični porast u opsegu struka povećavao je izglede za razvoj debljine za 25% (OR=1,25; 95% CI: 1,11-1,41), dok ih je jedinični pomak u sistoličkom krvnom tlaku povećavao za 8% (OR=1,08; 95% CI: 1,003-1,17) (tablica 18).

Tablica 19. BMI s obzirom na prehranu u kontrolnoj skupini

	BMI ≥ 30	BMI < 30	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	8 (7,3)	101 (92,7)	109 (100,0)	1	
Kontinentalna	7 (8,1)	79 (91,9)	86 (100,0)	1,12 (0,39-3,22)	0,835

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između prehrane i debljine u kontrolnoj skupini (tablica 19).

U multivarijatnoj analizi koja je uključivala prehranu, ona nije bila statistički značajno povezana s debljinom (OR=0,96; 95% CI: 0,17-5,39; p=0,966). I u ovoj analizi žene su imale statistički značajno veće izglede za razvoj debljine u odnosu na muškarce (OR=162,69; 95% CI: 5,58-4739,7; p=0,003). Također, jedinični porast u opsegu struka povećavao je izglede za razvoj debljine za 23% (OR=1,23; 95% CI: 1,10-1,38; p<0,001). U ovoj analizi sistolički krvni tlak nije bio statistički značajan prediktor debljine, no smjer povezanosti bio je jednak kao i u analizi koja nije uključivala prehranu (OR=1,06; 95% CI: 0.98-1,14; p=0,142).

5.6. Čimbenici rizika za povećan opseg struka

5.6.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom

Budući da je samo šest pacijenata s normalnim opsegom struka imalo *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala genotip, interakcije između ovog gena i ostalih nisu testirane. Interakcija između *ACE* i *AT1R* također nije testirana jer je svega četvero pacijenata imalo *ACE* DD genotip i normalan opseg struka.

Tablica 20. Univarijatno i multivarijatno predviđanje povećanog opsega struka u ispitanika s MetS

	Povećan	Normalan	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	54,0 (46,0-60,0)	55,0 (51,0-62,0)	0,96 (0,91-1,00)	0,059	0,97 (0,88-1,07)	0,547
Spol						
muški	82 (33,5)	17 (89,5)	1		1	
ženski	163 (66,5)	2 (10,5)	**16,90 (3,81-74,90)**	**<0,001**	**46,0 (2,12-995,41)**	**0,015**
ukupno	245 (100,0)	19 (100,0)				
ACE I/D						
DD	68 (27,8)	4 (21,1)	1		1	
ID ili II	177 (72,2)	15 (78,9)	0,69 (0,22-2,17)	0,529	0,18 (0,01-4,16)	0,285
ukupno	245 (100,0)	19 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	186 (75,9)	13 (68,4)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	59 (24,1)	6 (31,6)	0,69 (0,25-1,89)	0,467	0,28 (0,03-2,57)	0,261
ukupno	245 (100,0)	19 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	78 (31,8)	6 (31,6)	1		1	
GC ili CC	167 (68,2)	13 (68,4)	0,99 (0,36-2,70)	0,981	1,18 (0,11-12,95)	0,895
ukupno	245 (100,0)	19 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	127 (51,8)	8 (42,1)	1		1	
AC ili CC	118 (48,2)	11 (57,9)	0,68 (0,26-1,74)	0,416	1,82 (0,23-14,30)	0,568
ukupno	245 (100,0)	19 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	56 (22,9)	5 (26,3)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	189 (77,1)	14 (73,7)	1,21 (0,42-3,49)	0,731	3,12 (0,30-32,24)	0,340
ukupno	245 (100,0)	19 (100,0)				
BMI*	32,0 (29,3-35,3)	28,0 (25,8-28,1)	**1,44 (1,22-1,69)**	**<0,001**	**2,77 (1,67-4,61)**	**<0,001**
Ukupni kolesterol*	5,8 (5,2-6,6)	6,3 (5,3-6,7)	0,93 (0,61-1,41)	0,729	0,59 (0,16-2,24)	0,438
LDL kolesterol*	3,6 (3,1-4,2)	4,2 (3,3-4,3)	0,81 (0,60-1,09)	0,165	0,96 (0,52-1,77)	0,900
Trigliceridi*	2,20 (1,72-3,14)	2,33 (1,98-4,80)	**0,84 (0,73-0,97)**	**0,017**	0,92 (0,61-1,39)	0,686
HDL kolesterol*	1,18 (0,96-1,39)	1,25 (1,04-1,51)	**0,44 (0,20-0,96)**	**0,038**	**0,24 (0,06-0,96)**	**0,043**
Sistolički krvni tlak*	148,4 (133,1-164,8)	146,8 (140,0-160,0)	1,00 (0,99-1,02)	0,734	0,96 (0,88-1,04)	0,309
Dijastolički krvni tlak*	92,3 (80,0-105,5)	90,0 (84,5-99,0)	1,02 (0,98-1,05)	0,327	1,04 (0,93-1,17)	0,495
Glukoza*	5,5 (5,0-6,5)	6,4 (5,8-7,9)	**0,85 (0,73-0,99)**	**0,031**	0,77 (0,41-1,45)	0,420

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

U multivarijatnom predviđanju, uz kontrolu drugih varijabli, ženske ispitanice su imale statistički značajno veće izglede za povećan opseg struka (OR=46,0; 95% CI: 2,12-995,41). S jediničnim porastom u BMI, izgledi za povećan opseg struka povećavali su se gotovo tri puta (OR=2,77; 95% CI: 1,67-4,61). Sa svakom jedinicom porasta HDL kolesterola izgledi za povećan opseg struka su se smanjivali za 76% (OR=0,24; 95% CI: 0,06-0,96) (tablica 20).

Tablica 21. Opseg struka s obzirom na prehranu u skupini ispitanika s MetS

	Povećan	Normalan	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)		OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	11 (91,7)	1 (8,3)	12 (100,0)	1	
Kontinentalna	179 (95,2)	9 (4,8)	188 (100,0)	1,81 (0,21-15,58)	0,590

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između opsega struka i prehrane (tablica 21).

Uključivanjem varijable koja se odnosila na prehranu u multivarijatno predviđanje, uzorak bolesnika s normalnim opsegom struka sveo bi se na njih 10, stoga ova varijabla nije uključena u tu analizu.

5.6.2. Zdrave kontrole

Iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,00; df=1; p=0,958). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između *PPARγ* i *AT1R* genotipova (Wald χ^2=0,09; df=1; p=0,763) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=1,83; p=0,176), zatim *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=2,25; p=0,134) te *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=2,85; df=1; p=0,091).

Tablica 22. Univarijatno i multivarijatno predviđanje povećanog opsega struka u kontrolnoj skupini

	Povećan	Normalan	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	53,0 (41,5-59,0)	54,0 (47,0-60,0)	0,98 (0,95-1,02)	0,316	1,03 (0,97-1,10)	0,326
Spol						
muški	13 (31,7)	59 (32,1)	1		1	
ženski	28 (68,3)	125 (67,9)	1,02 (0,49-2,10)	0,965	**5,53 (1,17-26,07)**	**0,031**
ukupno	41 (100,0)	184 (100,0)				
ACE I/D						
DD	11 (26,8)	57 (31,0)	1		1	
ID ili II	30 (73,2)	127 (69,0)	1,22 (0,57-2,61)	0,601	2,27 (0,69-7,45)	0,176
ukupno	41 (100,0)	184 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	27 (65,9)	142 (77,2)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	14 (34,1)	42 (22,8)	1,75 (0,84-3,64)	0,133	**3,86 (1,24-12,06)**	**0,020**
ukupno	41 (100,0)	184 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	13 (31,7)	70 (38,0)	1		1	
GC ili CC	28 (68,3)	114 (62,0)	1,32 (0,64-2,72)	0,448	1,23 (0,40-3,79)	0,715
ukupno	41 (100,0)	184 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	22 (53,7)	93 (50,5)	1		1	
AC ili CC	19 (46,3)	91 (49,5)	0,88 (0,45-1,74)	0,718	0,57 (0,20-1,64)	0,298
ukupno	41 (100,0)	184 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	7 (17,1)	52 (28,3)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	34 (82,9)	132 (71,7)	1,91 (0,80-4,59)	0,146	1,93 (0,47-7,84)	0,359
ukupno	41 (100,0)	184 (100,0)				
BMI*	28,0 (26,1-30,1)	23,8 (22,0-25,1)	**1,48 (1,30-1,68)**	**<0,001**	**1,72 (1,40-2,13)**	**<0,001**
Ukupni kolesterol*	5,6 (4,8-6,5)	5,5 (4,8-6,1)	1,02 (0,72-1,47)	0,897	1,01 (0,11-9,22)	0,992
LDL kolesterol*	3,5 (2,8-4,0)	3,2 (2,7-3,8)	1,14 (0,76-1,73)	0,523	1,13 (0,12-11,06)	0,916
Trigliceridi*	1,21 (1,00-1,53)	1,00 (0,78-1,38)	1,46 (0,94-2,26)	0,094	1,57 (0,74-3,30)	0,240
HDL kolesterol*	1,47 (1,30-1,84)	1,70 (1,43-2,05)	**0,32 (0,11-0,92)**	**0,034**	0,94 (0,08-11,32)	0,959
Sistolički krvni tlak *	120,0 (120,0-126,0)	120,0 (120,0-133,0)	0,98 (0,95-1,01)	0,140	0,98 (0,93-1,03)	0,389
Dijastolički krvni tlak*	80,0 (71,5-80,0)	80,0 (75,5-83,5)	0,96 (0,93-1,00)	0,057	**0,91 (0,84-0,98)**	**0,014**
Glukoza*	4,9 (4,6-5,4)	5,0 (4,6-5,4)	1,15 (0,66-1,99)	0,626	0,80 (0,37-1,74)	0,578

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

U multivarijatnom predviđanju, nakon prilagodbe za sve druge varijable, žene su imale veće izglede za povišen struk u odnosu na muškarce (OR=5,53; 95% CI: 1,17-26,07). Nosioci genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su veće izglede za povećan opseg struka u odnosu na nosioce genotipa *PPARγ* Pro12Pro (OR=3,86; 95% CI: 1,24-12,06). Sa svakom jedinicom porasta u BMI rizik za povećan opseg struka povećavao se gotovo dva puta

(OR=1,72; 95% CI: 1,40-2,13). Kad je riječ o dijastoličkom krvnom tlaku, s njegovim porastom izgledi za povećan opseg struka su se smanjivali (OR=0,91; 95 CI: 0,84-0,98) (tablica 22).

Tablica 23. Opseg struka s obzirom na prehranu u kontrolnoj skupini

	Povećan	Normalan	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)		OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	16 (15,0)	91 (85,0)	107 (100,0)	1	
Kontinentalna	15 (17,4)	71 (82,6)	86 (100,0)	1,20 (0,56-2,59)	0,640

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između prehrane i opsega struka u kontrolnoj skupini (tablica 23).

Kad je riječ o analizi koja je uključivala prehranu, iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0.07; df=1; p=0.796). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,26; df=1; p=0,612) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između prehrane i *ACE* (Wald χ^2=0,63; df=1; p=0,429), zatim *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,39; df=1; p=0,535), prehrana i *PPARγ* (Wald χ^2=1,62; df=1; p=0,203), prehrana i *IL6* (Wald χ^2=1,36; df=1; p=0,243), prehrana i *LPL* (Wald χ^2=1,52; df=1; p=0,217), *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=3,34; df=1; p=0,068), prehrana i *AT1R* (Wald χ^2=3,63; df=1; p=0,057) te *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=3,21; df=1; p=0,073).

U multivarijatnom predviđanju koje je uključivalo prehranu, ona nije bila statistički značajan prediktor povećanog opsega struka (OR=1,00; 95% CI: 0,32-3,10; p=0,999). Od ostalih varijabli, statistički značajni prediktori bile su iste varijable kao i u predviđanju koje nije uključivalo prehranu. Pri tome su, uz kontrolu drugih varijabli, ispitanice u odnosu na ispitanike imale gotovo šest puta veće izglede za povećan opseg struka (OR=5,89; 95% CI: 1,16-29,93; p=0,033), dok su nositelji *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala genotipa imali preko četiri puta veće izglede za povećan opseg struka u odnosu na nositelje *PPARγ* Pro12Pro genotipa (OR=4,10; 95% CI: 1,29-13,10; p=0,017). Jedinični porast u BMI povećavao je izglede za povećan opseg struka za 65% (OR=1,65; 95% CI: 1,33-2,04; p<0,001), a jedinični

porast u dijastoličkom krvnom tlaku ih je smanjivao za 9% (OR=0,91; 95% CI: 0,84-0,99; p=0,032).

5.7. Čimbenici rizika za povišene vrijednosti triglicerida

5.7.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom

Iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,02; df=1; p=0,897). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,47; df=1; p=0,494) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,80; df=1; p=0,370), zatim *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=1,40; df=1; p=0,237) te *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=2,86; df=1; p=0,091).

Tablica 24. Univarijatno i multivarijatno predviđanje povišenih triglicerida u ispitanika s MetS

	Povišeni	Normalni	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	54,0 (47,0-61,0)	53,0 (43,0-58,0)	1,03 (1,00-1,06)	0,057	1,01 (0,97-1,05)	0,576
Spol						
ženski	125 (59,2)	40 (78,4)	1		1	
muški	86 (40,8)	11 (21,6)	**2,50 (1,22-5,15)**	**0,013**	2,13 (0,82-5,55)	0,122
ukupno	211 (100,0)	51 (100,0)				
ACE I/D						
DD	59 (28,0)	12 (23,5)	1		1	
ID ili II	152 (72,0)	39 (76,5)	0,79 (0,39-1,62)	0,523	0,54 (0,22-1,33)	0,179
ukupno	211 (100,0)	51 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	160 (75,8)	37 (72,5)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	51 (24,2)	14 (27,5)	0,84 (0,42-1,68)	0,627	0,68 (0,29-1,59)	0,372
ukupno	211 (100,0)	51 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	68 (32,2)	17 (33,3)	1		1	
GC ili CC	143 (67,8)	34 (66,7)	1,05 (0,55-2,01)	0,880	1,08 (0,49-2,39)	0,848
ukupno	211 (100,0)	51 (100,0)				
AT1R 1166 A>C						
AA	110 (52,1)	25 (49,0)	1		1	
AC ili CC	101 (47,9)	26 (51,0)	0,88 (0,48-1,63)	0,690	0,61 (0,29-1,29)	0,195
ukupno	211 (100,0)	51 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	47 (22,3)	13 (25,5)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	164 (77,7)	38 (74,5)	1,19 (0,59-2,42)	0,624	1,39 (0,58-3,36)	0,465
ukupno	211 (100,0)	51 (100,0)				
BMI*	32,0 (28,9-35,0)	30,8 (28,3-35,8)	1,02 (0,95-1,09)	0,620	1,09 (0,96-1,22)	0,186
Ukupni kolesterol*	6,0 (5,3-6,7)	5,4 (4,8-6,1)	**2,38 (1,63-3,48)**	**<0,001**	**5,31 (2,79-10,11)**	**<0,001**
LDL kolesterol*	3,7 (3,2-4,3)	3,4 (2,8-3,9)	**1,64 (1,12-2,39)**	**0,011**	0,61 (0,62-1,02)	0,011
Opseg struka*	106,0 (99,0-112,0)	104,0 (99,0-115,0)	1,00 (0,97-1,03)	0,997	0,97 (0,92-1,02)	0,214
HDL kolesterol*	1,19 (0,96-1,41)	1,24 (1,12-1,58)	**0,27 (0,11-0,69)**	**0,006**	**0,08 (0,02-0,31)**	**<0,001**
Sistolički krvni tlak*	146,0 (132,2-163,7)	154,9 (138,0-174,8)	0,99 (0,98-1,00)	0,058	1,00 (0,98-1,03)	0,932
Dijastolički krvni tlak*	90,0 (80,0-102,9)	96,8 (86,8-110,5)	**0,98 (0,96-0,99)**	**0,011**	0,97 (0,94-1,01)	0,179
Glukoza*	5,5 (4,9-6,6)	6,1 (5,2-6,5)	0,99 (0,87-1,14)	0,935	1,02 (0,81-1,28)	0,860

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

U multivarijatnom predviđanju, uz kontrolu drugih varijabli, s jediničnim porastom u razini ukupnog kolesterola izgledi za povišene trigliceride povećavali su se preko pet puta (OR=5,31; 95% CI: 2,79-10,11). HDL kolesterol je također bio statistički značajan prediktor razine triglicerida, pri čemu su se s jediničnim porastom u njegovoj razini izgledi za povišene trigliceride smanjivali (OR=0,08; 95% CI: 0,02-0,31) (tablica 24).

Tablica 25. Trigliceridi s obzirom na prehranu u skupini ispitanika s MetS

	Povišeni	Normalni	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	7 (58,3)	5 (41,7)	12 (100,0)	1	
Kontinentalna	143 (75,7)	46 (24,3)	189 (100,0)	2,22 (0,67-7,33)	0,191

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između triglicerida i prehrane (tablica 25).

Kad je riječ o multivarijatnoj analizi koja je uključivala prehranu, pri ispitivanju interakcija u multivarijatnom predviđanju povišenih triglicerida, interakcija između prehrane i *PPARγ* genotipa je bila visoko povezana s *PPARγ* genotipom, dok je interakcija između prehrane i *LPL* bila visoko povezana s *LPL* genotipom. To je dovelo do visokih pogrešaka regresijskih koeficijenata te nemogućnosti izračuna omjera izgleda za te dvije interakcije, kao i za gene od kojih se pojedina interakcija sastojala. Iz tih razloga te dvije interakcije izbačene su iz daljnjih analiza. Iz punog modela koji je sadržavao ostale ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između prehrane i *AT1R* (Wald χ^2=0,00; df=1; p=0,992). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,08; df=1; p=0,777) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,18; df=1; p=0,673), zatim prehrana i *IL6* (Wald χ^2=0,19; df=1; p=0,666), prehrana i *ACE* (Wald χ^2=0,21; df=1; p=0,650), *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,80; df=1; p=0,371), *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=1,71; df=1; p=0,192) te *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=2,62; df=1; p=0,106).

U multivarijatnom predviđanju prehrana nije bila statistički značajna prediktor povišenih vrijednosti triglicerida (OR=2,20; 95% CI: 0,50-9,62; p=0,294). Statistički značajni prediktori utvrđeni multivarijatnom analizom bile su iste varijable kao i u analizi koja nije uključivala prehranu. Pri tome su se sa svakim jediničnim pomakom u razini ukupnog kolesterola izgledi za povišene trigliceride povećavali oko 5,45 puta (OR=5,5; 95% CI: 2,77-10,72; p<0,001). Sa svakim jediničnim pomakom u razini HDL kolesterola izgledi za povišene trigliceride smanjivali za 84% (OR=0,16; 95% CI: 0,04-0,74; p=0,019).

5.7.2. Zdrave kontrole

Budući da je postojalo samo 6 ispitanika s genotipom *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala te povišenim trigliceridima, interakcije između ovog polimorfizma i ostalih nisu testirane. Iako je samo osam ispitanika imalo genotip *AT1R* 1166AA i povišene trigliceride, interakcija između *AT1R* i *ACE* uključena je u multivarijatno predviđanje te je utvrđeno da nije statistički značajno povezana s trigliceridima (Wald χ^2=2,27; df=1; p=0,132), stoga je isključena iz prediktivnog modela.

Tablica 26. Univarijatno i multivarijatno predviđanje povišenih triglicerida u kontrolnoj skupini

	Visoki	Normalni	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	54,0 (49,0-61,5)	53,0 (47,0-59,0)	1,02 (0,99-1,06)	0,208	1,03 (0,96-1,10)	0,425
Spol						
ženski	16 (53,3)	157 (74,4)	1		1	
muški	14 (46,7)	54 (25,6)	**2,54 (1,17-5,56)**	**0,019**	1,70 (0,38-7,64)	0,491
ukupno	30 (100,0)	211 (100,0)				
ACE I/D						
DD	10 (33,3)	63 (29,9)	1		1	
ID ili II	20 (66,7)	148 (70,1)	0,85 (0,38-1,92)	0,699	0,30 (0,08-1,11)	0,070
ukupno	30 (100,0)	211 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	24 (80,0)	159 (75,4)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	6 (20,0)	52 (24,6)	0,76 (0,30-1,97)	0,579	0,70 (0,17-2,82)	0,616
ukupno	30 (100,0)	211 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	8 (26,7)	76 (36,0)	1		1	
GC ili CC	22 (73,3)	135 (64,0)	1,55 (0,66-3,65)	0,317	2,10 (0,58-7,64)	0,262
ukupno	30 (100,0)	211 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	8 (26,7)	112 (53,1)	1		1	
AC li CC	22 (73,3)	99 (46,9)	**3,11 (1,33-7,30)**	**0,009**	**8,05 (1,85-35,0)**	**0,005**
ukupno	30 (100,0)	211 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	11 (36,7)	54 (25,6)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	19 (63,3)	157 (74,4)	0,59 (0,27-1,33)	0,205	0,62 (0,15-2,52)	0,500
ukupno	30 (100,0)	211 (100,0)				
BMI*	24,0 (23,0-26,5)	24,0 (22,0-26,1)	1,07 (0,96-1,20)	0,198	0,96 (0,73-1,26)	0,781
Ukupni kolesterol*	5,5 (4,9-6,4)	5,4 (4,8-6,1)	**1,46 (1,03-2,07)**	**0,036**	**2,70 (1,40-5,24)**	**0,003**
Opseg struka*	86,0 (82,5-91,5)	83,0 (75,0-90,0)	1,03 (0,98-1,07)	0,234	0,99 (0,91-1,09)	0,897
HDL kolesterol*	1,36 (1,20-1,52)	1,70 (1,43-2,02)	**0,05 (0,01-0,19)**	**<0,001**	**0,01 (0,00-0,08)**	**<0,001**
Sistolički krvni tlak*	120,0 (120,0-120,0)	120,0 (120,0-130,5)	0,98 (0,94-1,01)	0,132	0,90 (0,82-1,17)	0,092
Dijastolički krvni tlak*	80,0 (80,0-80,0)	80,0 (75,0-80,3)	1,02 (0,98-1,07)	0,348	1,12 (0,99-1,28)	0,080
Glukoza*	5,1 (4,6-5,8)	4,9 (4,6-5,3)	1,13 (0,67-1,88)	0,651	0,62 (0,28-1,36)	0,233

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

U kontrolnoj skupini ukupni i LDL kolesterol su bili u visokoj međusobnoj povezanosti (Spearman r=0,90; p<0,001). Budući da je na univarijatnoj razini LDL kolesterol bio u manjoj mjeri povezan s trigliceridima (OR=1,24, 95% CI: 0,82-1,89; p=0,309) nego ukupni kolesterol (OR=1,46; 95% CI: 1,03-2,07; p=0,036), LDL kolesterol je isključen iz multivarijatnog predviđanja.

U multivarijatnom predviđanju, nakon prilagodbe za sve druge varijable, kontrolni ispitanici s genotipom *AT1R* 1166AC ili CC imali su veći rizik za povišene trigliceride u odnosu na nosioce genotipa AA (OR=8,05; 95% CI: 1,85-35,0). Sa svakom jedinicom porasta ukupnog kolesterola izgledi za povišene vrijednosti triglicerida povećavali su se više od 2,5 puta (OR=2,70; 95% CI: 1,40-5,24). Izgledi za povišene vrijednosti triglicerida smanjivali su se s porastom HDL kolesterola (OR=0,01; 95% CI: 0,00-0,08) (tablica 26).

Tablica 27. Trigliceridi s obzirom na prehranu u kontrolnoj skupini

	Povišeni	Normalni	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	12 (11,2)	95 (88,8)	107 (100,0)	1	
Kontinentalna	8 (9,3)	78 (90,7)	86 (100,0)	0,81 (0,32-2,09)	0,665

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Na univarijatnoj razini prehrana nije bila statistički značajno povezana s trigliceridima u kontrolnoj skupini (tablica 27).

Kad je riječ o multivarijatnoj analizi, zbog premalog broja ispitanika s povišenom razinom triglicerida te visokih povezanosti interakcija s ostalim prediktorima, interakcije nisu ispitane.

U multivarijatnom predviđanju koje je uključivalo prehranu, ona nije bila statistički značajan prediktor povišenih vrijednosti triglicerida (OR=1,43; 95% CI: 0,31-6,63; p=0,644). Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su u skupini zdravih ispitanika statistički značajni prediktori povišenih triglicerida genotip *AT1R*, ukupni kolesterol te HDL kolesterol. Pri tome su ispitanici s genotipom *AT1R* 1166AC ili CC imali preko 6,5 puta veće izglede za povišene trigliceride u odnosu na ispitanike s genotipom *AT1R* 1166AA (OR=6,76; 95% CI: 1,32-34,69; p=0,022). Sa svakim jediničnim pomakom u razini ukupnog kolesterola izgledi za povišene trigliceride povećavali su se oko 2,5 puta (OR=2,46; 95% CI: 1,17-5,14; p=0,017),

dok su se sa svakim jediničnim pomakom u razini HDL kolesterola ti izgledi smanjivali 99% (OR=0,99; 95% CI: 0,001-0,25; p=0,004).

5.8. Čimbenici rizika za snižen HDL kolesterol

5.8.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom

Iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,14; df=1; p=0,710). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,21; df=1; p=0,645) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,63; df=1; p=0,428), zatim *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=1,50; p=0,221) te *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=2,59; df=1; p=0,107).

Tablica 28. Univarijatno i multivarijatno predviđanje sniženog HDL kolesterola u ispitanika s MetS

	Snižen	Normalan	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	52,0 (45,0-62,0)	54,5 (50,0-60,0)	0,99 (0,97-1,01)	0,325	1,03 (1,00-1,07)	0,084
Spol						
muški	51 (35,2)	45 (38,8)	1		1	
ženski	94 (64,8)	71 (61,2)	1,17 (0,71-1,94)	0,547	**2,14 (1,04-4,37)**	**0,038**
ukupno	145 (100,0)	116 (100,0)				
ACE I/D						
DD	41 (28,3)	30 (25,9)	1		1	
ID ili II	104 (71,7)	86 (74,1)	0,89 (0,51-1,54)	0,663	1,11 (0,55-2,21)	0,777
ukupno	145 (100,0)	116 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	109 (75,2)	87 (75,0)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	36 (24,8)	29 (25,0)	0,99 (0.56-1,74)	0,974	0,81 (0,40-1,66)	0,569
ukupno	145 (100,0)	116 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	45 (31,0)	39 (33,6)	1		1	
GC ili CC	100 (69,0)	77 (66,4)	1,13 (0,67-1,90)	0,657	1,54 (0,80-2,96)	0,194
ukupno	145 (100,0)	116 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	73 (50,3)	62 (53,4)	1		1	
AC ili CC	72 (49,7)	54 (46,6)	1,13 (0,69-1,85)	0,618	1,21 (0,66-2,21)	0,539
ukupno	145 (100,0)	116 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	28 (19,3)	32 (27,6)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	117 (80,7)	84 (72,4)	1,59 (0,89-2,84)	0,116	1,44 (0,70-2,97)	0,325
ukupno	145 (100,0)	116 (100,0)				
BMI*	32,0 (28,7-35,5)	31,4 (28,6-34,6)	1,03 (0,98-1,08)	0,297	1,06 (0,96-1,17)	0,248
Ukupni kolesterol*	5,5 (5,1-6,2)	6,4 (5,6-7,0)	**0,51 (0,38-0,67)**	**<0,001**	**0,15 (0,06-0,34)**	**<0,001**
LDL kolesterol*	3,4 (3,1-3,9)	4,0 (3,2-4,6)	**0,67 (0,51-0,89)**	**0,006**	**2,61 (1,05-6,45)**	**0,038**
Opseg struka*	107,0 (100,0-112,8)	106,0 (99,0-113,0)	1,00 (0,98-1,03)	0,805	0,99 (0,95-1,03)	0,597
Trigliceridi*	2,36 (1,76-3,54)	2,05 (1,72-2,73)	**1,25 (1,05-1,48)**	**0,011**	**2,15 (1,56-2,96)**	**<0,001**
Sistolički krvni tlak*	140,4 (130,0-158,2)	152,8 (140,0-173,0)	**0,98 (0,97-0,99)**	**<0,001**	0,98 (0,96-1,00)	0,075
Dijastolički krvni tlak*	90,0 (80,0-101,8)	96,5 (88,0-108,5)	**0,98 (0,96-0,996)**	**0,012**	1,00 (0,97-1,04)	0,812
Glukoza*	5,42 (4,9-6,5)	5,9 (5,1-6,6)	0,97 (0,87-1,08)	0,527	**0,83 (0,71-0,98)**	**0,029**

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su statistički značajni prediktori sniženog HDL kolesterola spol, ukupni te LDL kolesterol, trigliceridi i glukoza. Pri tome su ženske ispitanice imale preko dva puta veće izglede za snižen HDL kolesterol (OR=2,14; 95% CI: 1,04-4,37). Jedinični porast u razini ukupnog kolesterola je, uz kontrolu drugih varijabli, smanjivao izglede za snižen HDL kolesterol (OR=0,15; 95% CI: 0,06-0,34), kao i porast u razini glukoze

(OR=0,83; 95% CI: 0,71-0,98). Kad je riječ o LDL kolesterolu i trigliceridima, jedinični porast u razini LDL kolesterola povećavao je izglede za snižen HDL preko 2,5 puta (OR=2,61; 95% CI: 1,05-6,45), dok ih je jedinični porast u razini triglicerida povećavao preko dva puta (OR=2,15; 95% CI: 1,56-2,96) (tablica 28).

Tablica 29. HDL kolesterol s obzirom na prehranu u skupini ispitanika s MetS

	Snižen	Normalan	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	7 (58,3)	5 (41,7)	12 (100,0)	1	
Kontinentalna	81 (42,9)	108 (57,1)	189 (100,0)	0,54 (0,16-1,75)	0,301

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom nije utvrđena statistički značajna povezanost između HDL kolesterola i prehrane (tablica 29).

Kad je riječ o analizi koja je uključivala prehranu, zbog malog broja ispitanika čija je prehrana bila mediteranska ili mješovita te visokih povezanosti interakcija gena i prehrane s danim genom koja je vodila velikim pogreškama regresijskih koeficijenata, ove interakcije nisu ispitane. Iz punog modela koji je sadržavao sve preostale interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,02; df=1; p=0,884). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,17; df=1; p=0,684) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,28; df=1; p=0,600), zatim *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,28; df=1; p=0,597) te *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,54; df=1; p=0,461). Unutar ovog prediktivnog modela prehrana nije bila statistički značajan prediktor sniženog HDL kolesterola (OR=0,37; 95% CI: 0,09-1,57; p=0,176). Ovim multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su statistički značajni prediktori sniženog HDL kolesterola spol, ukupni kolesterol, trigliceridi te glukoza, kao i u prethodnoj analizi. Pri tome su ženske ispitanice imale preko 6,5 puta veće izglede za snižen HDL kolesterol u odnosu na muške ispitanike (OR=6,65; 95% CI: 2,43-18,19; p<0,001). Sa svakim jediničnim pomakom u razini ukupnog kolesterola izgledi za sniženu razinu HDL kolesterola smanjivali su se 86% (OR=0,14; 95% CI: 0,05-0,44; p=0,001), dok su s jediničnim pomakom u razini triglicerida izgledi za snižen HDL kolesterol povećavali preko dva puta (OR=2,30; 95% CI: 1,55-3,42; p<0,001). Kad je riječ o glukozi, sa jediničnim pomakom u njezinoj razini

izgledi za snižen HDL kolesterol smanjivali su se za 24% (OR=0,76; 95% CI: 0,59-0,98; p=0,034). Za razliku od prethodne analize, u ovoj LDL kolesterol nije bio statistički značajan prediktor sniženog HDL kolesterola, no smjer povezanosti bio je jednak kao i u analizi koja nije uključivala prehranu (OR=2,67; 95% CI: 0,82-8,64; p=0,102).

5.8.2. Zdrave kontrole

S obzirom na to da je postojalo 20 ispitanika sa sniženim HDL kolesterolom te su interakcije između gena bile u visokoj povezanosti s genima od kojih su se sastojale, interakcije nisu ispitane.

U kontrolnoj skupini ukupni i LDL kolesterol bili su u visokoj međusobnoj povezanosti (Spearman r=0,90; p<0,001). Budući da je na univarijatnoj razini LDL kolesterol bio u manjoj mjeri povezan s HDL kolesterolom (OR=0,89; 95% CI: 0,52-1,52; p=0,668), nego ukupni kolesterol (OR=0,49; 95% CI: 0,29-0,85; p=0,012), LDL kolesterol je isključen iz multivarijatnog predviđanja.

Tablica 30. Univarijatno i multivarijatno predviđanje sniženog HDL kolesterola u kontrolnoj skupini

	Snižen	Normalan	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	49,5 (45,3-58,3)	54,0 (48,0-59,0)	0,96 (0,91-1,01)	0,121	0,98 (0,91-1,06)	0,589
Spol						
muški	2 (10,0)	66 (29,9)	1		1	
ženski	18 (90,0)	155 (70,1)	3,83 (0,87-16,99)	0,077	**16,49 (1,08-252,89)**	**0,044**
ukupno	20 (100,0)	221 (100,0)				
ACE I/D						
DD	5 (25,0)	68 (30,8)	1		1	
ID ili II	15 (75,0)	153 (69,2)	1,33 (0,47-3,82)	0,592	3,25 (0,59-17,81)	0,175
ukupno	20 (100,0)	221 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	16 (80,0)	167 (75,6)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	4 (20,0)	54 (24,4)	0,77 (0,25-2,41)	0,658	1,06 (0,24-4,65)	0,944
ukupno	20 (100,0)	221 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	7 (35,0)	77 (34,8)	1		1	
GC ili CC	13 (65,0)	144 (65,2)	0,99 (0,38-2,59)	0,989	0,78 (0,20-2,97)	0,712
ukupno	20 (100,0)	221 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	14 (70,0)	106 (48,0)	1		1	
AC ili CC	6 (30,0)	115 (52,0)	0,40 (0,15-1,07)	0,067	**0,14 (0,03-0,68)**	**0,015**
ukupno	20 (100,0)	221 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	3 (15,0)	62 (28,1)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	17 (85,0)	159 (71,9)	2,21 (0,63-7,81)	0,218	1,08 (0,21-5,43)	0,927
ukupno	20 (100,0)	221 (100,0)				
BMI*	26,0 (24,0-27,0)	24,0 (22,0-26,0)	**1,16 (1,02-1,31)**	**0,021**	1,10 (0,89-1,37)	0,362
Ukupni kolesterol*	4,9 (4,4-5,6)	5,5 (4,9-6,1)	**0,49 (0,29-0,85)**	**0,012**	**0,33 (0,14-0,76)**	**0,009**
Opseg struka*	85,0 (79,0-93,0)	83,0 (75,3-90,0)	1,03 (0,98-1,08)	0,263	1,04 (0,97-1,12)	0,294
Trigliceridi*	1,47 (0,92-1,69)	1,02 (0,78-1,39)	**1,96 (1,24-3,10)**	**0,004**	**5,94 (1,90-18,57)**	**0,002**
Sistolički krvni tlak*	120,0 (120,0-120,0)	120,0 (120,0-130,0)	0,97 (0,93-1,01)	0,142	1,00 (0,94-1,06)	0,891
Dijastolički krvni tlak*	80,0 (70,0-80,0)	80,0 (76,0-80,0)	0,96 (0,91-1,01)	0,094	0,93 (0,85-1,02)	0,109
Glukoza*	5,0 (4,7-5,7)	4,9 (4,6-5,3)	1,38 (0,77-2,48)	0,275	2,32 (0,75-7,20)	0,146

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su statistički značajni prediktori sniženog HDL kolesterola u kontrolnoj skupini spol, genotip *AT1R*, ukupni kolesterol te trigliceridi. Pri tome su, uz kontrolu drugih varijabli, ženske ispitanice imale statistički značajno veće izglede za snižen HDL kolesterol (OR=16,49; 95% CI: 1,08-252,89). Nosioci genotipa *AT1R* 1166AC ili CC imali su statistički značajno manje izglede za snižen HDL kolesterol u odnosu na nosioce AA genotipa (OR=0,14; 95% CI: 0,03-0,68). Također, jedinični pomak u razini ukupnog

kolesterola smanjivao je izglede za snižen HDL (OR=0,33; 95% CI: 0,14-0,76), dok ih je jedinični pomak u razini triglicerida povećavao (OR=5,94; 95% CI: 1,90-18,57) (tablica 30).

Tablica 31. HDL kolesterol s obzirom na prehranu u kontrolnoj skupini

	Snižen	Normalan	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	11 (10,3)	96 (89,7)	107 (100,0)	1	
Kontinentalna	4 (4,7)	82 (95,3)	86 (100,0)	0,43 (0,13-1,39)	0,157

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Na univarijatnoj razini prehrana nije bila statistički značajno povezana s razinom HDL kolestrola u kontrolnoj skupini (tablica 31).

U analizi koja je uključivala prehranu, ova varijabla nije bila statistički značajno povezana s razinom HDL kolesterola (OR=0,27; 95% CI: 0,04-1.72; p=0,164). Kad je riječ o ostalim varijablama, ovom analizom utvrđeno je da su statistički značajni prediktori HDL kolesterola u skupini zdravih ispitanika genotip *AT1R* i trigliceridi. Pri tome su nositelji genotipa *AT1R* 1166AC ili CC imali statistički značajno manje izglede za snižen HDL kolesterol u odnosu na nositelje genotipa *AT1R* AA (OR=0,07; 95% CI: 0,01-0,51; p=0,009). Kad je riječ o trigliceridima, sa svakim jediničnim pomakom u njihovoj razini, izgledi za snižen HDL kolesterol povećavali su se preko 7,5 puta (OR=7,70; 95% CI: 167-35,61; p=0,009). U ovoj analizi spol nije bio statistički značajan prediktor HDL kolesterola, no smjer povezanosti bio je jednak kao i u analizi koja nije uključivala prehranu (OR=463,1; 95% CI: 0,16-1315516; p=0,130). Isti slučaj bio je i kad je riječ o ukupnom kolesterolu (OR=0,39; 95% CI: 0,14-1,08; p=0,069).

5.9. Čimbenici rizika za visoki krvni tlak

5.9.1. Ispitanici s metaboličkim sindromom

Iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,01; df=1; p=0,927). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,21; df=1; p=0,650) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U

sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,33; df=1; p=0,565), zatim *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,42; df=1; p=0,518) te *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=0,80; df=1; p=0,372).

Tablica 32. Univarijatno i multivarijatno predviđanje visokog krvnog tlaka u ispitanika s MetS

	Visok	Normalan	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	54,0 (47,0-60,0)	48,5 (37,8-59,0)	**1,05 (1,01-1,09)**	**0,025**	**1,06 (1,002-1,11)**	**0,040**
Spol						
ženski	146 (61,9)	16 (66,7)	1		1	
muški	90 (38,1)	8 (33,3)	1,23 (0,51-3,00)	0,644	**6,29 (1,62-24,40)**	**0,008**
ukupno	236 (100,0)	24 (100,0)				
ACE I/D						
DD	64 (27,1)	7 (29,2)	1		1	
ID ili II	172 (72,9)	17 (70,8)	1,11 (0,44-2,79)	0,830	1,16 (0,39-3,47)	0,787
ukupno	236 (100,0)	24 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	179 (75,8)	16 (66,7)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	57 (24,2)	8 (33,3)	0,64 (0,26-1,57)	0,326	0,43 (0,15-1,25)	0,123
ukupno	236 (100,0)	24 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	74 (31,4)	10 (41,7)	1		1	
GC ili CC	162 (68,6)	14 (58,3)	1,56 (0,66-3,68)	0,306	1,99 (0,71-5,53)	0,190
ukupno	236 (100,0)	24 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	123 (52,1)	9 (37,5)	1		1	
AC ili CC	113 (47,9)	15 (62,5)	0,55 (0,23-1,31)	0,177	0,35 (0,11-1,07)	0,066
ukupno	236 (100,0)	24 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	58 (24,6)	3 (12,5)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	178 (75,4)	21 (87,5)	0,44 (0,13-1,52)	0,194	0,38 (0,08-1,87)	0,233
ukupno	236 (100,0)	24 (100,0)				
BMI*	32,0 (28,9-35,0)	31,0 (26,8-33,7)	1,05 (0,96-1,16)	0,287	1,15 (0,96-1,38)	0,126
Ukupni kolesterol*	5,9 (5,3-6,7)	5,4 (5,0-6,1)	**1,61 (1,03-2,54)**	**0,039**	1,06 (0,51-2,21)	0,870
LDL kolesterol*	3,7 (3,2-4,3)	3,3 (2,6-3,7)	**1,76 (1,03-3,00)**	**0,038**	1,28 (0,70-2,33)	0,423
Opseg struka*	106,0 (100,0-113,0)	106,0 (98,3-112,0)	1,01 (0,97-1,05)	0,600	0,98 (0,91-1,05)	0,543
Trigliceridi*	2,18 (1,72-3,05)	2,75 (2,06-4,26)	0,92 (0,79-1,06)	0,225	0,90 (0,71-1,15)	0,393
HDL kolesterol*	1,11 (1,04-1,26)	1,27 (1,02-1,39)	0,37 (0,07-1,90)	0,234	0,13 (0,00-10,82)	0,361
Glukoza*	5,6 (5,0-6,5)	5,5 (4,7-7,0)	1,06 (0,84-1,34)	0,620	0,97 (0,75-1,26)	0,828

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

Multivarijatnom analizom, nakon prilagodbe za sve druge varijable, utvrđeno je da su statistički značajni prediktori visokog krvnog tlaka u skupini ispitanika s MetS dob i spol. Pri tome su sa svakom godinom porasta u dobi, izgledi za visok krvni tlak povećavali 6% (OR=1,06; 95% CI: 1,002-1,11; p=0,040). Muškarci su, uz kontrolu drugih varijabli, imali statistički značajno veće izglede za visok krvni tlak (OR=6,29; 95% CI: 1,62-24,40) (tablica 32).

Tablica 33. Krvni tlak s obzirom na prehranu u skupini ispitanika s MetS

	Visok	Normalan	Ukupno
	n (%)	n (%)	n (%)
Mediteranska ili mješovita	12 (100,0)	0 (0,0)	12 (100,0)
Kontinentalna	173 (92,5)	14 (7,5)	187 (100,0)

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Budući da prehrana niti jednog bolesnika s normalnim krvnim tlakom nije bila mediteranska ili mješovita, nije bilo moguće izračunati omjer izgleda te ova varijabla nije uključena u multivarijatno predviđanje visokog krvnog tlaka (tablica 33).

5.9.2. Zdrave kontrole

Iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,08; df=1; p=0,776). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između genotipova *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,29; df=1; p=0,592) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,42; df=1; p=0,519), zatim *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,76; df=1; p=0,384) te *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=1,39; df=1; p=0,239).

Tablica 34. Univarijatno i multivarijatno predviđanje visokog krvnog tlaka u kontrolnoj skupini

	Visok	Normalan	Univarijatno		Multivarijatno	
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Dob*	58,0 (52,0-63,0)	51,0 (44,0-57,0)	**1,07 (1,04-1,10)**	**<0,001**	**1,04 (1,01-1,08)**	**0,028**
Spol						
ženski	39 (54,9)	133 (72,3)	1		1	
muški	32 (45,1)	51 (27,7)	**2,14 (1,21-3,78)**	**0,009**	**2,89 (1,20-6,95)**	**0,018**
ukupno	71 (100,0)	184 (100,0)				
ACE I/D						
DD	18 (25,4)	62 (33,7)	1		1	
ID ili II	53 (74,6)	122 (66,3)	1,50 (0,81-2,77)	0,200	1,30 (0,62-2,73)	0,491
ukupno	71 (100,0)	184 (100,0)				
PPARγ Pro12Ala						
Pro12Pro	53 (74,6)	140 (76,1)	1		1	
Pro12Ala ili Ala12Ala	18 (25,4)	44 (23,9)	1,08 (0,57-2,04)	0,810	0,78 (0,36-1,71)	0,535
ukupno	71 (100,0)	184 (100,0)				
IL6 -174G>C						
GG	26 (36,6)	62 (33,7)	1		1	
GC ili CC	45 (63,4)	122 (66,3)	0,88 (0,50-1,56)	0,660	0,86 (0,43-1,75)	0,682
ukupno	71 (100,0)	184 (100,0)				
AT1R 1166A>C						
AA	38 (53,5)	92 (50,0)	1		1	
AC ili CC	33 (46,5)	92 (50,0)	0,87 (0,50-1,50)	0,614	0,90 (0,45-1,78)	0,752
ukupno	71 (100,0)	184 (100,0)				
LPL PvuII						
(-/-)	23 (32,4)	45 (24,5)	1		1	
(-/+) ili (+/+)	48 (67,6)	139 (75,5)	0,68 (0,37-1,23)	0,200	0,54 (0,26-1,14)	0,108
ukupno	71 (100,0)	184 (100,0)				
BMI*	24,6 (23,0-27,9)	23,8 (22,0-26,0)	**1,11 (1,02-1,20)**	**0,013**	1,15 (1,00-1,32)	0,050
Ukupni kolesterol*	5,6 (5,0-6,3)	5,3 (4,7-6,1)	1,20 (0,92-1,58)	0,180	2,48 (0,28-21,58)	0,411
LDL kolesterol*	3,4 (2,9-3,9)	3,1 (2,6-3,7)	1,34 (0,97-1,84)	0,072	0,53 (0,06-4,48)	0,560
Opseg struka*	88,0 (80,0-96,0)	83,0 (75,0-90,0)	**1,04 (1,01-1,06)**	**0,005**	1,01 (0,96-1,07)	0,628
Trigliceridi*	1,04 (0,83-1,39)	1,05 (0,77-1,47)	0,75 (0,47-1,20)	0,235	0,30 (0,09-1,02)	0,084
HDL kolesterol*	1,60 (1,40-1,91)	1,68 (1,41-1,99)	0,96 (0,48-1,89)	0,898	0,30 (0,03-3,27)	0,322
Glukoza*	5,1 (4,7-5,6)	4,9 (4,5-5,3)	1,43 (0,97-2,10)	0,070	1,16 (0,71-1,90)	0,566

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; *Medijan (interkvartilni raspon)

Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su statistički značajni prediktori visokog krvnog tlaka u kontrolnoj skupini dob i spol. Pri tome su se sa svakom godinom porasta u dobi izgledi za visok krvni tlak povećavali za 4% (OR=1,04; 95% CI: 1,01-1,08), a muški ispitanici su za njega imali gotovo tri puta veće izglede (OR=2,89; 95 % CI: 1,20-6,95) (tablica 34).

Tablica 35. Krvni tlak s obzirom na prehranu u kontrolnoj skupini

	Visok	Normalan	Ukupno	Univarijatno	
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	P
Mediteranska ili mješovita	28 (25,7)	81 (74,3)	109 (100,0)	1	
Kontinentalna	40 (46,5)	46 (53,5)	86 (100,0)	**2,52 (1,38-4,60)**	**0,003**

KRATICE: OR – omjer izgleda; 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Univarijatnom analizom utvrđeno je da su ispitanici čija je prehrana bila kontinentalna imali oko 2,5 puta veće izglede za visok krvni tlak u odnosu na one čija je prehrana bila mediteranska ili mješovita (OR=2,52; 95% CI: 1,38-4,60; p=0,003) (tablica 35).

Kad je riječ o multivarijatnoj analizi koja je uključivala prehranu, iz punog modela koji je sadržavao sve ispitivane interakcije, najprije je isključena interakcija između *PPARγ* i *LPL* (Wald χ^2=0,03; df=1; p=0,853). Nakon izbacivanja navedene interakcije, najvišu razinu statističke značajnosti imala je interakcija između prehrane i *AT1R* (Wald χ^2=0,24; df=1; p=0,623) te je ona isključena iz prediktivnog modela. U sljedećim koracima redom su izbacivane interakcije između *PPARγ* i *AT1R* (Wald χ^2=0,40; df=1; p=0,526), zatim *PPARγ* i *IL6* (Wald χ^2=0,48; df=1; p=0,488), prehrana i *ACE* (Wald χ^2=0,45; df=1; p=0,501), *ACE* i *AT1R* (Wald χ^2=0,44; df=1; p=0,506), *PPARγ* i *ACE* (Wald χ^2=1,02; p=0,313), prehrana i *LPL* (Wald χ^2=1,44; df=1; p=0,231), prehrana i *PPARγ* (Wald χ^2=1,24; df=1; p=0,265) te prehrana i *IL6* (Wald χ^2=1,21; df=1; p=0,272). U ovoj analizi prehrana nije bila statistički značajan prediktor visokog krvnog tlaka (OR=1,56; 95% CI: 0,74-3,31; p=0,243). Multivarijatnom analizom utvrđeno je da su u skupini zdravih ispitanika statistički značajni prediktori visokog krvnog tlaka spol i dob ispitanika. Pri tome su muški ispitanici u odnosu na ženske imali oko tri puta veće izglede za visok krvni tlak (OR=2,98; 95% CI: 1,16-7,67; p=0,024). Kad je riječ o dobi, sa svakom godinom porasta u dobi, izgledi za visok krvni tlak povećavali su se 4% (OR=1,04; 95% CI: 1,004-1,09; p=0,030).

6. Rasprava

Istraživanja koja su se bavila genetičkom osnovom metaboličkoga sindroma ukazuju da je metabolički sindrom poligenski i multifaktorijelni poremećaj koji nastaje složenim međudjelovanjem brojnih gena i čimbenika okoliša. Stoga istraživanje njegove genetičke podloge još uvijek predstavlja velik izazov. Postoje nesuglasja oko specifičnih definicija MetS te postoje prijepori treba li istraživati sindrom kao specifičan entitet mimo istraživanja pojedinačnih njegovih sastavnica. Neki znanstvenici drže upitnom vrijednost dijagnoze MetS, nasuprot nespornoj vrijednosti dijagnosticiranja i liječenja pojedinih poremećaja, poput dislipidemije, hipertenzije i inzulinske rezistencije. Često se ističe da MetS ne treba shvaćati u patofiziološkom smislu, već više kao pragmatični pristup, za postizanje boljeg kliničkog ishoda. Ipak, nije upitno kako je koncept MetS upozorio i liječnike i javnost na važne interakcije kao što je veza između pretilosti i bolesti te povoljnih učinaka tjelovježbe na sve sastavnice MetS. Koncept MetS također je snažno potaknuo istraživanje ovih odnosa. Razumijevanje genetičkih čimbenika koji povezuju pojedine sastavnice MetS i njihove međuodnose u MetS klinički je vrlo važno jer su sva obilježja MetS pod snažnom genetičkom kontrolom. Ipak procjene nasljednosti su aproksimativne i često ne uzimaju u obzir interakcije gena i okoliša, prvenstveno prehrambenih navika, gena i spola te gena i gena, jer ih je u humanoj populaciji teško razlučiti. Nadalje, procjene se odnose na određene ispitivane populacije i stoga odražavaju populacijsku specifičnost i različitost te veliku raznolikost okolišnih čimbenika.

S obzirom na skromnu ulogu koju pojedinačni polimorfizmi gena imaju kao biljezi složenih poremećaja i bolesti, ispitivanje interakcija gena može rezultirati komplementarnim informacijama koje mogu biti klinički značajne.

Nuklearni receptori PPAR reguliraju mnoge važne stanične i fiziološke funkcije i važni su transkripcijski regulatori metabolizma masti i ugljikohidrata. Na molekularnoj razini nakon aktivacije specifičnim ligandima djeluju na ciljne gene. Sve je više dokaza i o dodatnim načinima djelovanja poput transrepresije i konstitutivne aktivacije receptora što također ima važnu ulogu u signalizaciji posredovanoj putem PPAR. Mehanističke studije ističu promotor-specifične regulacije koje se dešavaju kroz usklađeno djelovanje koregulatora i kroz integraciju vanjskih i unutarstaničnih signalnih puteva preko posttranslacijskih modifikacija. Jedan od glavnih rezultata stanične aktivacije PPAR-a je uspostava ravnoteže između stanične proliferacije, preživljenja i diferencijacije. U ulozi lipidnih senzora PPAR-i na lokalnoj razini

moduliraju gensku ekspresiju prema metaboličkom statusu i tako usklađuju komunikaciju među organima u razvojnim metaboličkim i imunološkim procesima.

Rezultati predočeni u ovoj disertaciji potvrđuju važnost interaktivnih učinaka polimorfizama gena *PPARγ* s nekim od njegovih ciljnih gena na povećanu podložnost prema razvoju poremećaja koji se ubrajaju u čimbenike MetS.

Nuklearni receptor PPARγ ima važnu ulogu u regulaciji ekspresije više gena koji su uključeni u diferencijaciju adipocita i skladištenje lipida (Rangwala i Lazar, 2000; Kletzien i sur., 1992). Štoviše PPARγ je važan u regulaciju lipidne homeostaze i osjetljivosti na inzulin (Olefsky, 2000). Glavni prirodni ligandi PPARγ su PUFA i prostanoidi. Uz to, PPARγ je pod utjecajem više masnih kiselina što ukazuje na njegovu ulogu u prijenosu nutricijskih u metaboličke signale.

U prikazanom radu ispitana je uloga polimorfizma *PPARγ* Pro12Ala pojedinačno i u interakciji s ciljnim genima *LPL*, *IL6*, *ACE* i *AT1R*. Vođeni spoznajom da zamjena aminokiselina Pro12Ala u PPARγ može utjecati na strukturu i posljedično funkciju proteina, pri čemu varijanta 12Ala ima smanjen afinitet prema elementu odgovora u ciljnim genima, što u konačnici rezultira manje učinkovitom stimulacijom ciljnih gena (He, 2009), postavljena je hipoteza o mogućem značajnom učinku interakcija navedenih gena.

I premda varijante gena *PPARγ* promatrane zasebno u ovom istraživanju nisu bile povezane s MetS ili nekom od njegovih sastavnica, interakcija s varijantama gena *LPL* PvuII (-/+), *IL6* -174 G>C, *ACE* I/D i *AT1R* 1166A>C pokazala se statistički značajnom za razvoj MetS ili za poremećaj nekog od njegovih parametara.

Nositelji alela niske aktivnosti, *PPARγ* 12Ala i *LPL* PvuII (+), odnosno kombinacije genotipova *LPL* PvuII (-/+) i (+/+) i *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su značajno veće izglede za razvoj MetS u odnosu na ispitanike koji nisu bili nositelji tih alela. Uloga PPARγ u regulaciji diferencijacije adipocita te metabolizmu lipida i masnih kiselina je dobro razjašnjena i dokumentirana. PPARγ ima važno mjesto u regulaciji ekspresije i aktivnosti LPL. Kako je i aktivnost LPL u korelaciji sa centralnim tipom debljine i sa serumskim lipidima, razložno je pretpostaviti kako interakcije gena koji ih kodiraju mogu doprinositi razvoju MetS. Promotorska regija *LPL* i njezina uloga u regulaciji transkripcije su bili predmetom opsežnih istraživanja. Regulatorna regija 5' sadrži veći broj specifičnih elemenata, između ostalih i element odgovora za PPAR (engl. *PPAR response element*, PPRE) (Schoonjans i sur., 1996). U studiji *in vitro* uočena je za oko ~ 30% niža transaktivacija promotora *LPL* u prisutnosti alela *PPARγ* Ala12. Nakon tih nalaza istraživanja su pokazala kako supstitucija Pro12Ala može rezultirati sniženom aktivnosti LPL *in vivo* (Schneider i sur.,

2002). Snižena aktivnost LPL dovodi do niza poremećaja u metabolizmu lipida. Stoga možemo zaključiti da je nalaz o signifikantnosti interaktivnih učinaka alela niske aktivnosti *PPARγ* i *LPL* za razvoj MetS u skladu s ranije dokumentiranim spoznajama o molekularnim osobinama transkripcijskog faktora PPARγ i jednog od njegovih vrlo važnih ciljnih gena. Polimorfizmi oba gena mogu u značajnoj mjeri utjecati na opseg njihovih interakcija s varijabilnim učincima na homeostazu ponajprije lipida, a posredno i drugih čimbenika koji u konačnice dovode do inzulinske rezistencije i razvoja MetS.

Predočeni rezultati dalje ukazuju na važnost koju može imati interakcija gena *PPARγ* s ciljnim genom *IL6* i rezultirajućim učinkom na razine glukoze u krvi. Ispitanici s MetS koji su bili nositelji kombinacije genotipova *IL6* -174GG i *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su manje izglede za visoke vrijednosti glukoze na tašte u usporedbi s nositeljima genotipa *PPARγ* Pro12Pro. Već je u ranijim istraživanjima dokazana i potvrđena uloga PPARγ u homeostazi glukoze, ali su rezultati i zaključci bili različiti, ponekad i oprječni. U slučajevima kada se promatrala pojedinačna povezanost s rizikom za razvoj T2DM, varijanta *PPARγ* 12Ala se u više studija smatrala protektivnom (Gouda i sur., 2010). Međutim, drugi su znanstvenici istaknuli i važnu ulogu okolišnih čimbenika poput lipida u prehrani (Scacchi i sur., 2007) pa čak i intrauterinih uvjeta razvoja (de Rooij i sur., 2006) kao modulatora povezanosti između PPARγ i T2DM. U našoj studiji varijanta *PPARγ* 12Ala se pokazala zaštitnom u pacijenata s genotipom *IL6* -174GG, dok se u slučaju nositelja alela *IL6* -174C, protektivna uloga *PPARγ* 12Ala gubi, štoviše, nositelji varijante 12Ala su imali veći rizik postizanja visokih vrijednosti glukoze u krvi u usporedbi s ispitanicima s varijantom Pro12. Ovaj nalaz se podudara s nekim publiciranim radovima. Tako je u indijskoj populaciji genotip *PPARγ* Ala/Ala bio u korelaciji s debljinom i inzulinskom rezistencijom (Bhatt i sur., 2012), što ukazuje kako etnička pripadnost s različitim genetičkim naslijeđem i okolišnim čimbenicima može imati dominantnu ulogu. U našoj studiji rezultati multivarijatnog predviđanja za hrvatsku populaciju ukazuju da su kolesterol i TG također povezani s visokim razinama glukoze na tašte, pri čemu svaka jedinica porasta TG povećava za 1,3 puta rizik za pojavu povišenih koncentracija glukoze. Odnos između metaboličkih rizičnih čimbenika i inzulinske rezistencije je složen, a abdominalna pretilost s disfunkcionalnim masnim tkivom predstavlja važan rizični čimbenik.

IL6 u kroničnoj upali ima uglavnom proupalna svojstva. Povišene koncentracije IL6 u serumu su često u korelaciji s debljinom i nakupljanjem visceralnog masnog tkiva, povećanim rizikom poremećaja podnošenja glukoze, T2DM i visokim krvnim tlakom. Visceralno masno tkivo luči značajno više IL6 u odnosu na potkožno tkivo, a također smanjuje aktivnost LPL u

masnom tkivu, što dovodi do smanjenog unosa TG. U ranijim istraživanjima varijante gena *IL6* -174G>C se opisuju kao mogući modulatori razine citokina i metabolizma što može dovesti do poremećene homeostaze glukoze i lipida te povišenog rizika za razvoj metaboličkih poremećaja. U više studija potvrđena je povezanost alela -174C s pokazateljima debljine (Berthier i sur., 2003; Riikola i sur., 2009; Yu i sur., 2011). Također se ističe najveće smanjenje tjelesne mase u skupini ispitanika s genotipom *IL6* -174CC (Razquin 2010).

Zbog manje potrošnje energije i inzulinske osjetljivosti, nositelji genotipa -174CC mogu biti podložniji razvoju debljine i inzulinske rezistencije (Fernandez-Real i sur., 2000; Kubaszek i sur., 2003). U skladu s tim je i nalaz veće učestalosti genotipa -174GG u skupini mršavih ispitanika i onih s nižim koncentracijama inzulina i glukoze u plazmi nakon primjene testa opterećenja glukozom (Berthier, 2005). Naši rezultati su u skladu s ovim publiciranim podacima. Važno je istaknuti da je u naših ispitanika alel *IL6* -174C imao dominantniju ulogu u razvoju viših koncentracija glukoze u odnosu na protektivnu ulogu alela *PPARγ* 12Ala. U literaturi se mogu naći i oprječni rezultati s obzirom na ulogu polimorfizma *IL6* -174G>C u moduliranju koncentracije glukoze. Tako su opisane niže vrijednosti glukoze natašte u nositelja alela *IL6* -174C (Hutch i sur., 2009). I neke druge studije, kao što je jedna provedena u španjolskoj-bjelačkoj populaciji izvještavaju o sličnim povezanostima, ukazujući na vezu genotipa -174GG s T2DM, gdje je alel G bio češće zastupljen u ispitanika s hiperglikemijom i smanjenom osjetljivosti na inzulin, uz pridružene poremećaje u lipidnom profilu.

Niz oprječnih rezultata potvrđuje važnost ispitivanja interakcija gena. To potvrđuje i nalaz u ovoj studiji koja je pokazala da varijanta *IL6* -174C može predstavljati različitu podložnost prema inzulinskoj rezistenciji ovisno o interakciji s varijantama gena transkripcijskog faktora *PPARγ* Pro12Ala. Stoga držimo da ispitivanje interakcija gena može pružiti dodatno razumijevanje patofizioloških procesa koji mogu dovesti do razvoja poremećaja koji u konačnici mogu rezultirati s MetS. Dobar primjer iz literature je i ispitivanje odnosa između polimorfizama gena za limfotoksin-α (LTA), TNF-α i IL 6 i rizika za MetS u kojem je dodatno ispitano može li sadržaj masnih kiselina u plazmi modulirati ovaj odnos. U zaključku autori navode upravo interakcije genotipova LTA, TNF-α i IL 6 kao čimbenike povećanog rizika za MetS, koji se dalje povećava uz niske vrijednosti polinezasićenih i pomakom prema zasićenim masnim kiselinama, ukazujući također na važnu ulogu prehrane u modulaciji genetičkog rizika (Phillips i sur., 2010).

U našoj studiji, u kontrolnoj skupini ispitanika bez MetS, uočena je povezanost između genotipa *IL6* -174CC i većeg opsega struka, što je također u skladu s objavljenim literaturnim

podacima koji ističu povezanost alela C s pokazateljima debljine (Berthier i sur., 2003; Riikola i sur., 2009; Yu i sur., 2011).

Nadalje, uočili smo interakciju između genotipova *PPARγ* i *ACE* značajnu za vrijednosti BMI. U skupini s genotipom *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala, pacijenti s genotipom *ACE* ID ili II imali su manje izglede za razvoj debljine u odnosu na ispitanike s genotipom *ACE* DD što je također u suglasju s nekim ranije objavljenim ispitivanjima (Passaro i sur., 2011) u kojima je genetička kombinacija *ACE* DD/*PPARγ* 12Ala bila povezana s većim BMI i udjelom masti u ispitivanoj talijanskoj ženskoj populaciji. Kako možemo objasniti ovu povezanost? Osobe s genotipom *ACE* DD imaju viši BMI zbog povišene razine ACE koje su uočene u nositelja ovog genotipa (Rigat i sur., 1990; Tiret i sur., 1992). Povišene razine ACE dalje rezultiraju povišenim razinama angiotenzina II koji se smatra trofičnim čimbenikom u diferencijaciji preadipocita u zrele adipocite (Saint-Marc i sur., 2001). Sustav renin-angiotenzin (RAS) ima niz funkcija, a najvažnija je regulacija krvnog tlaka i intravaskularnog volumena. Od nehemodinamskih učinaka RAS-a sve veća pozornost pridaje se učincima RAS-a u patofiziologiji debljine (Engeli i sur., 2000). S obzirom na ulogu angiotenzina II u adipogenoj diferencijaciji, blokada sustava RAS može pospješiti diferencijaciju adipocita i pomoći u sprječavanju procesa koji dovode do razvoja debljine i šećerne bolesti. Poznato je da ACE inhibitori smanjuju rizik razvoja dijabetesa. Transkripcijski faktori PPAR moduliraju RAS preko transkripcijske kontrole renina, angiotenzinogena, ACE i AT1R (Roszer i Ricote, 2010). Odnosi RAS-a i MetS su vrlo složeni. Specifični čimbenici MetS (hiperkolesterolemija, hiperglikemija, debljina) reguliraju ekspresiju komponenata RAS koje aktiviraju stvaranje angiotenzina II i reakcije u određenim vrstama stanica i tkiva. Regulirana sinteza, katabolizam ili izlučivanje sastavnica RAS iz ključnih tipova stanica rezultiraju angiotenzinom posredovanim mehanizmima koji potom pojačavaju ili doprinose razvoju specifičnih osobina MetS (Putnam i sur., 2012). Genska ekspresija molekula RAS je modulirana pomoću PPARγ. Iako je aktivacijom PPARγ olakšana proizvodnja renina, hipertenzivni učinci aktivacije RAS-a su oslabljeni ligandima PPARγ, jer dolazi do značajnog smanjenja razine Ang II te ekspresije gena *ACE* i *AT1R* (Roszer i Ricote, 2010).

U prediktivnom modelu koji je uključivao i prehranu interakcija između *PPARγ* i *ACE* je također bila statistički značajno povezana s BMI. Mediteranski ili mješoviti tip prehrane bio je povezan s nižim BMI u odnosu na ispitanike čija je prehrana bila kontinentalnog tipa. Pod utjecajem prehrane zapaženi su i neki drugačiji učinci interakcija gena. Kao i u analizi koja nije uključivala prehranu, u skupini bolesnika s genotipom *ACE* DD, nositelji genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su statistički značajno veće izglede za razvoj debljine u odnosu

na nositelje genotipa *PPARγ* Pro12Pro. S druge strane, uz uključenje u analizu i prehrane u skupini bolesnika s genotipom *PPARγ* Pro12Pro, nositelji genotipa *ACE* ID ili II su imali preko tri puta veće izglede za pretilost u odnosu na nositelje genotipa *ACE* DD. Sličan je nalaz zabilježen u populaciji korejske djece u kojem se ističe značajna povezanost, ali negativna korelacija između alela *ACE* D i debljine uz visok unos soli u skupini djevojčica, dok za dječake nije dokazana navedena korelacija (Yang i sur, 2013). Navedena korelacija je bila očita samo u osoba s visokim unosom soli, ističući važnu ulogu unosa soli u odnosima između polimorfizma *ACE* I/D i debljine. Autori ističu da je to neočekivana korelacija i nisu ponudili objašnjenje zašto alel D uz visok unos soli ima zaštitnu ulogu u razvoju debljine. Polinezasićene masne kiseline su glavni prirodni ligandi PPARγ, a polimorfizam Pro12Ala, kao što je pokazano na primjeru LPL, može značajno utjecati na aktivaciju ciljnih gena među koje pripadaju i geni RAS. Stoga uloga prehrane može biti značajna u regulaciji odnosa *PPARγ* i njegovih ciljnih gena s kranjim učincima na metabolizam masti i ugljikohidrata. Studije su pokazale da mediteranska prehrana s visokim udjelom maslinovog ulja može poništiti štetne učinke rizičnih alela. U ispitivanjima u bjelačkoj populaciji ustanovljeno je kako visok omjer PUFA:SFA može u nositelja alela *PPARγ* Ala12 rezultirati smanjenjem koncentracija kolesterola i triglicerida (AlSaleh i sur., 2012). Ranija istraživanja istog autora upućuju kako interakcija između *PPARγ* Pro12Ala i *PPARα* Leu162Val utječe na koncentracije LDL kolesterola u plazmi te na udio malih gustih čestica LDL nakon dijete bogate MUFA (AlSaleh i sur., 2011). I druge studije upućuju na složenost interakcija između nutrijenata i bioaktivnih sastojaka hrane i genoma. Tako prehrana bogata mastima može modulirati učinke polimorfizma *PPARγ* Pro12Ala (Helwig i sur., 2007) s najvećim učinkom PUFA i zasićenih masnih kiselina (engl. *saturated fatty acids*, SFA). U kohortnoj studiji u bjelačkoj populaciji koja je uključivala 592 nedijabetička ispitanika, ustanovljene su negativne korelacije koncentracija inzulina natašte s omjerom prehranom uzetih PUFA/SFA, uz snažnu interakciju između tog omjera i polimorfizma Pro12Ala s utjecajem na BMI i koncentaracije inzulina. U slučaju niskog omjera PUFA/SFA, BMI je bio veći u nositelja alela Ala12 u odnosu na homozigote za alel Pro12, dok je u slučaju visokog dijetalnog omjera nalaz bio suprotan (Luan i sur., 2001). Važna uloga polimorfizma *PPARγ* Pro12Ala u modifikaciji interindividualne varijabilnosti triacilglicerola s obzirom na unos n-3 masnih kiselina pokazana je i u studiji Lindi i suradnika (2003). Uz povoljne učinke mediteranskog tipa dijete u smanjivanju opsega struka u populaciji ispitanika s visokim kardiovaskularnim rizikom, također je pokazano da mediteranska prehrana može poništiti negativne učinke alela *IL6* -174C (Razquin i sur., 2010). Ističe se i protektivna uloga alela C polimorfizma *IL6* -

174G>C protiv ponovnog povrata izgubljene tjelesne mase. Štoviše, prisustvo alela *PPARγ* 12Ala zajedno s alelom C pojačava tu zaštitnu ulogu (Goyenechea, 2006).

Iz svega navedenog možemo zaključiti da interakcija gena *PPARγ* i *ACE* može doprinijeti varijabilnim vrijednostima BMI, koje dodatno mogu biti regulirane utjecajem prehrane, što je pokazano i rezultatima iz naše studije. Na temelju naših nalaza možemo barem dijelom pojasniti zašto su do sada publicirani podaci o utjecaju varijante *PPARγ* 12Ala na BMI, a koji ne uključuju i podatke o prehrani ili moguće interakcije s ciljnim genima nekonzistentni. Tako se izvještava o povezanosti alela *PPARγ* 12Ala s nižim BMI (Deeb i sur., 1998; Damcott i sur., 2004) ili višim BMI (Masud i sur., 2003) te povećanim rizikom razvoja debljine (Ochoa i sur., 2004). U našoj studiji, u kontrolnoj skupini ispitanika u multivarijatnom predviđanju, ustanovljeno je da nositelji alela *PPARγ* 12Ala imaju značajno veći opseg struka u odnosu na nositelje alela *PPARγ* Pro12.

Prikazani podaci potvrđuju da genske varijante *PPARγ* Pro12Ala u interakciji s nekima od svojih polimorfnih ciljnih gena, mogu modulirati patofiziološke procese u razvoju MetS u hrvatskoj populaciji. Ovim se istraživanjem također ukazuje na moguće razloge neslaganja podataka između pojedinih studija, koji se mogu barem dijelom obrazložiti interakcijama gena te pripisati različitoj etničkoj pripadnosti ispitanika s značajnim razlikama u prehrambenim navikama.

Postoji još uvijek niz nepoznanica o PPAR koje treba ispitati, od njihove molekularne aktivnosti do posljedičnih fizioloških fenotipskih osobina. Nove tehnologije uz studije cijelog genoma će svakako doprinijeti novim otkrićima o ulozi PPAR-a što će dalje pomoći u dizajniranju novih farmakoloških strategija i ciljeva.

Multivarijatnim predviđanjem u skupini s MetS utvrđena je statistički značajna povezanost između tipa prehrane te koncentracije triglicerida, opsega struka, BMI, vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka, genotipa *AT1R* te izgleda za razvoj MetS. Mediteranski ili mješoviti tip prehrane bio je povezan s nižim vrijednostima triglicerida, opsega struka, BMI i sistoličkog krvnog tlaka te značajno manjim izgledima za razvoj MetS u odnosu na ispitanike čija je prehrana bila kontinentalnog tipa. Povoljan učinak mediteranskog tipa prehrane s većim udjelom takozvanih „zdravih“ namirnica, koje osiguravaju prehranu s više nezasićenih masnih kiselina i vlakana, na različita fenotipska svojstva izražena u MetS, dobro je poznat i dokumentiran u literaturi. Provedena je studija u hrvatskoj populaciji s ciljem usporedbe raspodjele rizičnih kardiovaskularnih čimbenika između kontinentalne i mediteranske regije te urbanih i ruralnih područja (Bergman Marković i sur., 2011). Autori ističu veće opterećenje rizičnim

čimbenicima u kontinentalnoj regiji i ruralnim područjima što povezuju s razlikama u načinu života uključujući prehranu i tjelesnu aktivnost.

Navode se važni kardioprotektivni učinci mediteranske prehrane (MedDiet) te pozitivni učinci na pretilost i T2DM. Koncept MedDiet potječe iz 1950-ih godina iz studije koju je potaknuo Keys (engl. *Seven Countries Study*). Studija je pokazala da je, unatoč visokom unosu masti, stanovništvo otoka Krete u Grčkoj imalo vrlo nisku stopu koronarne bolesti srca i nekih vrsta raka te duži životni vijek (Nestle, 1995). U kliničkim ispitivanjima bolesnika s infarktom miokarda koji su uzimali mediteransku dijetu navodi se da je rizik od novih akutnih srčanih događanja bio niži za 70 % u skupini ispitanika na MedDiet (de Lorgeril i sur., 1999). Naši rezultati su u skladu s ranijim istraživanjima koja su navedena u uvodnom dijelu (Esposito i sur., 2004; Liese i sur., 2004; Wirfalt i sur., 2001). I drugi su ustanovili nižu prevalenciju MetS u ispitanika na mediteranskoj prehrani, bez obzira na dob, spol, tjelesnu aktivnost, lipidni status i krvni tlak (Panagiotakos i sur., 2004). Prospektivna studija Tortosa i suradnika također ističe nižu pojavnost MetS među ispitanicima na MedDiet (Tortosa i sur., 2007).

Najnovija istraživanja (Salas-Salvadó i sur., 2014) učinaka mediteranske dijete obogaćene ekstra djevičanskim maslinovim uljem (engl. *extra virgin olive oil*, EVOO) ističu za 30% smanjenje rizika nastanka T2DM u odrasloj populaciji s visokim kardiovaskularnim rizikom u usporedbi s dijetom s niskim udjelom masti. Podaci su dobiveni u okviru istraživanja španjolske kardiovaskularne preventivne studije *Prevencion con Dieta Mediterránea* (*PREDIMED*) na ispitanicima koji pri uključivanju u ispitivanje nisu imali T2DM. Iznešeni su snažni dokazi kako dugotrajna primjena mediteranske dijete obogaćene s EVOO bez energetske restrikcije, može doprinijeti značajnom smanjenju rizika za T2DM u odrasloj populaciji s visokim kardiovaskularnim rizikom.

U našoj studiji uz kontrolu drugih varijabli, mediteranska ili mješovita prehrana bila je učestalija kod nositelja genotipa *AT1R* 1166AC ili CC u odnosu na genotip *AT1R* 1166AA.

Povezanost genotipa *AT1R* s određenom vrstom namirnica/prehrane koje pojedinac može preferirati treba analizirati nutrigenetičkim pristupom koji ispituje na koji način genske varijante mogu predodrediti nutritivne potrebe i sklonosti pojedinca u fiziološkim, ali i određenim patofiziološkim uvjetima (Simopoulos, 2010; Ferguson, 2009). U slučaju gena *AT1R* treba imati na umu pleiotropnu ulogu koju RAS ima u ljudskom organizmu.

RAS preko AT1R regulira različite hemodinamske procese (homeostazu tekućine, stvaranje aldosterona, bubrežnu funkciju, kontrakciju glatkih mišića krvnih žila) i nehemodinamske fiziološke odgovore (indukciju citokina, stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, stimulaciju sinteze kolagena, apoptozu i hipertrofiju). Nehemodinamsko djelovanje angiotenzina II ima

središnju ulogu ne samo u etiologiji povišenog krvnog tlaka već i u patofiziologiji hipertrofije i zatajenja srca, zadebljanja krvnih žila i ateroskleroze. U slučaju našeg nalaza ne smije se zanemariti niti uloga koju RAS ima u patofiziologiji debljine (Engeli i sur., 2000). Angiotenzin II inhibira adipogenu diferencijaciju i stoga se pretpostavlja da blokada sustava RAS pospješujući diferencijaciju adipocita može pomoći u preveniranju procesa koji dovode do razvoja debljine i šećerne bolesti. Kako možemo objasniti nalaz u našem istraživanju gdje je ustanovljena statistički značajana povezanost između mediteranske ili mješovite prehrane u ispitanika s MetS s genotipom *AT1R* 1166CC ili AC? Zašto nositelji genotipa *AT1R* 1166CC ili AC češće biraju mediteranski ili mješoviti, dakle „zdraviji" tip prehrane?

U literaturi postoje kontradiktorna izvješća o ulozi polimorfizma *AT1R* 1166A<C koji se povezuje se s različitim fenotipskim osobinama. Analizirajući sve do sada objavljene studije alel 1166C se u više studija drži rizičnim čimbenikom za esencijalnu hipertenziju (Bonnardeaux i sur., 1994; Wang i sur., 1997), sistolički krvni tlak, infarkt miokarda (Tiret i sur., 1994), hipertrofiju lijevog ventrikula (Osterop i sur., 1998), bolesti koronarnih arterija (CAD), preeklampsiju i moždani udar i povećanu razinu oksidativnog stresa u zatajenju srca (Cameron i sur., 2006). I u predočenoj studiji u multivarijatnom predviđanju, nakon prilagodbe za sve druge varijable, kontrolni ispitanici s genotipom *AT1R* 1166AC ili CC imali su veći rizik za povišene trigliceride u odnosu na nosioce genotipa AA. Prema navedenim nalazima možemo komentirati da su nosioci rizičnog alela i time genetičke predispozicije za razvoj niza poremećaja koje uključuje i MetS i sve njegove posljedice, razvili prilagodbu odabirom zdravijih namirnica i time stvorili preduvjete za smanjenje rizika od štetnih učinaka zbog genetičkog ustrojstva.

Objavljeni su i drugačiji nalazi u kojima alel 1166C nije rizični, već zaštitni alel. Tako prema drugima (Abdollah i sur., 2005) koji su u ispitanika s MetS testirali povezanosti s *AT1R*, genotip 1166CC je predstavljao genetičku predispoziciju za povoljne učinke na antropometrijska i metabolička svojstva, a koja su dalje važna u procjeni kardiovaskularnog rizika. U švedskoj studiji (Moellsten i sur., 2008) genotip 1166AA se navodi kao rizični čimbenik za razvoj moždanog udara.

I drugi autori također opisuju kako varijante gena mogu utjecati/odrediti prehrambene navike odnosno odabir vrste namirnica. Ispitivanjem polimorfizma *PPARγ* Pro12Ala i varijante Glu27Glu u beta 2-adrenergičkom receptoru, ustanovljeno je da su nositelji oba varijantna alela češće uzimali veće količine PUFA te su više gubili na težini (Rosado i sur., 2006). U studiji McCaffery i suradnika (2012) rizični alel gena *FTO* (rs1421085) se povezuju s učestalijom konzumacijom hrane tijekom dana ($p = 0{,}001$) a učinak je perzistirao i nakon

prilagodbe za tjelesnu masu ($p = 0,004$). Nadalje, rizične varijante gena *BDNF* su bile povezane s češćim konzumiranjem mliječnih proizvoda, mesa, jaja, orašastih plodova i grahorica ($p \leq 0,004$). Za rizični alel gena *SH2B1* (rs4788099) ustanovljena je povezanost s više obroka mliječnih proizvoda ($p = 0,001$), dok je rizični alel gena *TNNI3K* (rs1514176) bio povezan s značajno manjim udjelom energije dobivene iz bjelančevina ($p = 0,002$). Autori na kraju zaključuju da različite genske varijante koje se povezuju s debljinom mogu utjecati na odabir i količinu namirnica pojedinaca s prekomjernom tjelesnom masom ili debelih osoba s T2DM. U već spomenutom istraživanju provedenom među djecom koja su imala neograničen pristup hrani, djeca nositelji varijante *FTO* koja se povezuje s debljinom, konzumirala su više kalorija, pri čemu je veći unos energije bio postignut ne zbog povećane količine konzumirane hrane, već zbog odabira kaloričnijih namirnica (Cecil i sur., 2008). Osim u *FTO*, nekoliko je drugih polimorfizama locirano u ili blizu gena povezanih s regulacijom apetita (Willer i sur., 2009), a pet gena identificiranih u istraživanjima debljine (*SH2B1*, *KCTD15*, *MTCH2*, *NEGR1* i *BDNF*) povezuju se s razinom makronutrijenata preuzetih iz hrane (Bauer i sur., 2009).

I dok smo u ovoj studiji na primjeru gena *AT1R* pokazali postojanje genetičke predispozicije pojedinca prema određenom tipu prehrane (mediteranska, mješovita ili kontinentalna), nismo uspjeli dokazati interaktivne učinke prehrane i gena na pojavnost MetS ili neke od njegovih sastavnica osim u slučaju interakcije *PPARγ* i *ACE* s utjecajem na BMI. Pretpostavljamo da je za ispitivanje uloge interakcija gena i nutrijenata potrebno istraživanje provesti na većem broju ispitanika s bolje definiranim/rasčlanjenim skupinama namirnica-nutrijenata.

U literaturi također nalazimo više primjera s oprječnim, negativnim i pozitivnim korelacijama gena i prehrane.

U populacijskoj studiji *Malmo Diet and Cancer Study* s oko 30 000 ispitanika željelo se ustanoviti je li genetička podložnost za razvoj debljine povezana s prehrambenim navikama i može li vrsta namirnica modificirati genetičku podložnost (Rukh i sur., 2013). Najprije je ispitana povezanost između 16 SNP povezanih s BMI i pridruženim svojstvima, identificiranim u studijama GWA. Nakon toga je među nedijabetičkim ispitanicima provedena analiza povezanosti između GRS koji je uključivao 13 potvrđenih SNP i svakog pojedinačnog SNP i relativnog unosa masti, šećera, bjelančevina, vlakana te ukupnog unosa energije, te analiza interakcija s BMI i pridruženim svojstvima. GRS je snažno bio povezan s povećanim BMI, količinom masti i tjelesnom masom. Viši GRS je bio povezan s nižim ukupnim unosom energije te višim unosom vlakana. Nije uočena značajna interakcija između GRS i vrste hrane s utjecajem na BMI ili sa osobinama povezanima s debljinom. Od pojedinačnih SNP, nakon

korekcije za višestruko testiranje, *NEGR1* rs2815752 je bio povezan s vrstom namirnica, dok je *BDNF* rs4923461 u interakciji s unosom bjelančevina utjecao na BMI. U zaključku autori navode da njihova studija nije pružila dokaze o glavnoj ulozi makronutrijenata, vlakana ili ukupnog energetskog unosa u modifikaciji genetičke podložnosti za razvoj debljine. Autori ipak ističu da broj rizičnih alela kao i pojedinačni genski lokusi povezani s debljinom mogu utjecati na regulaciju unosa hrane i energije te da neki pojedinačni lokusi ipak mogu ući u interakciju s prehranom. Slične zaključke nalazimo i u publiciranim rezultatima studije MONICA/KORA, s 12,462 ispitanika (Holzapfel i sur., 2010). Cilj te studije je bio ispitati povezanosti genetičkih faktora s BMI te dalje istražiti i mogući utjecaj prehrambenih navika i potrošnje energije te zaključiti može li određeni način života modulirati ustanovljene povezanosti između genskih polimorfizama i BMI. Ispitana je povezanost sedam polimorfizama, ranije identificiranih putem GWAS, u ili blizu gena *NEGR1, TMEM18, MTCH2, FTO, MC4R, SH2B1* i *KCTD15*. Potvrđena je povezanost varijantnog alela rs6548238 C>T (*TMEM18*) s nižim vrijednostima BMI te povezanost polimorfizma rs9935401 G>A (*FTO*) i rs7498665 A>G (*SH2B1*) s višim vrijednostima BMI. Genetičke varijante povezane s BMI nisu bile u značajnoj korelaciji s životnim navikama (tip prehrane i potrošnja energije), također nije bilo dokaza o utjecaju životnih navika na povezanosti SNP-BMI.

U drugim publiciranim istraživanjima nalazimo dokaze o interakcijama gena i nutrijenata s učinkom na varijabilnost metaboličkih procesa. Te se interakcije najčešće povezuju s modulacijom homeostaze lipida. Neki su primjeri već navedeni ranije u ovoj raspravi: 1. Visok omjer PUFA:SFA može u nositelja alela *PPARγ* Ala12 rezultirati smanjenjem koncentracija kolesterola i triglicerida (AlSaleh i sur., 2012). 2. Dijeta bogata MUFA može mijenjati učinke interakcija između *PPARγ* Pro12Ala i *PPARα* Leu162Val i utjecati na koncentracije LDL kolesterola u plazmi te na udio malih gustih čestica LDL (AlSaleh i sur., 2011). 3. Visok omjer PUFA:SFA može doprinijeti smanjenju kolesterola i TG u nositelja *PPARγ* Ala12, dok u homozigota za *ADIPOQ* -10066 GG, dijeta bogata MUFA pridonosi povećanju adiponektina u starijoj dobi (AlSaleh i sur., 2012). 4. Niski omjer PUFA/SFA u nositelja alela Ala12 pridonosi višem BMI u odnosu na homozigotne nositelje alela Pro12, dok je u slučaju visokog dijetalnog omjera nalaz suprotan (Luan i sur., 2001). 5. Prehrana bogata mastima može mijenjati učinke polimorfizma *PPARγ* Pro12Ala na inzulinsku osjetljivost i BMI (Helwig i sur., 2007; Lindi i sur.,2003) 6. Mediteranska prehrana može poništiti negativne učinke alela *IL6* -174C na razvoj debljine (Razquin i sur., 2010).

Pregledom studija koje su se bavile interakcijom polimorfizama *IL6* i masnih kiselina iz hrane te njihovih odnosa s debljinom i serumskim lipidima može se zaključiti: 1. Dijetetske masne kiseline, naročito zasićene masne kiseline te omega-3 i omega-6 polinezasićene masne kiseline, utječu na ekspresiju gena *IL6* te mijenjaju stvaranje IL 6. Osim toga polimorfne varijante gena također mogu promijeniti gensku ekspresiju te koncentracije citokina u plazmi, a povezuju se i s debljinom te serumskim koncentracijama lipida. Također su ustanovljene interakcije između dijetetskih masnih kiselina i polimorfizama *IL6* s utjecajem na debljinu i serumske lipide, pri čemu i količina i kvaliteta dijetetskih masnih kiselina može modulirati utjecaj polimorfizama *IL6* na debljinu i profil serumskih lipida i tako modulirati odnose genotipa i fenotipa (Joffe i sur., 2013; Curti i sur., 2011; Phillips i sur., 2010; Razquin i sur., 2010).

U literaturi nalazimo i primjere interakcija nutrijenata i gena RAS s učinkom na ljudsko zdravlje. Primjer interakcije je i već spomenuta studija u populaciji korejske djece u kojoj je pokazana negativna korelacija između alela *ACE* D i debljine uz visok unos soli u skupini djevojčica (Yang i sur, 2013). Studija provedena u kineskoj populaciji ukazuje na značajnu interakciju između učestalosti pijenja zelenog čaja i aktivnosti ACE ovisnu o polimorfizmu gena *ACE* s konačnim utjecajem na rizik razvoja karcinoma dojke (Yuan i sur., 2005). Studija je poduzeta na temelju nalaza *in vitro* koji su pokazali da polifenoli iz čaja mogu inhibirati stvaranje angiotenzinom II inducirane ROS te na osnovi epidemioloških dokaza koji su ukazivali na direktnu ulogu angiotenzina II u razvoju karcinoma dojke. Rezultati studije navode da su žene s genotipom *ACE* niske aktivnosti (II) imale manji rizik za karcinom dojke u odnosu na žene s genotipom *ACE* visoke aktivnosti (DD). Međutim, u žena s genotipom *ACE* DD učestalost pijenja zelenog čaja je značajno smanjivala rizik od karcinoma ($p = 0,039$); OR (95% CI) = 0,33 (0,13-0,82) za žene koje su pile čaj barem mjesečno i 0,29 (0,10-0,79) za one koje su pile zeleni čaj u tjednim razmacima) u usporedbi sa ženama koje nisu konzumirale zeleni čaj.

U mnogim primjerima nailazimo na oprječne rezultate. Više je čimbenika koji mogu utjecati na divergentnost rezultata u studijama provedenim u različitim populacijama koje ispituju interakcije gena i nutrijenata. Prvo, postoji velika različitost u genetičkom nasljeđu između etničkih skupina i pojedinaca koja se očituje u velikoj varijabilnosti učestalosti polimorfizama gena s utjecajem na metabolizam, a time i bioraspoloživost nutrijenata. Osim toga, postoje značajne razlike u mogućnosti izbora i dostupnosti hrane/nutrijenata, a koje su ovisne o kulturološkim, ekonomskim i geografskim odrednicama te razlikama u percepciji okusa hrane. Treće, poremećena prehrana, bilo da se radi o nedostatku ili prekomjernom uzimanju

hrane sama po sebi može utjecati na ekspresiju gena i nestabilnost genoma, što može rezultirati mutacijama u genu ili promjenama na razini kromosoma koje u konačnici dovode, u različitim razdobljima ljudskog života, do razvoja nepovoljnih štetnih fenotipova. Četvrto, kao što je već pokazano u ovoj studiji interakcije s drugim genima mogu značajno mijenjati utjecaj prehrane.

Do sada opisani primjeri nutrigenetičkih studija u literaturi uključujući i ovu studiju rezultat su uglavnom opservacijskih studija i nisu uvijek potvrđeni u intervencijskim studijama. Zbog toga su nužna još mnoga istraživanja kako bi se identificirali poželjni ciljevi dijetetičkih intervencija te na osnovi genetičkih čimbenika donijele personalizirane preporuke i smjernice. U tijeku je niz istraživanja na međunarodnoj razini s velikim brojem sudionika koja će zasigurno doprinijeti novim spoznajam o ovoj problematici.

Personalizirana prehrana nameće potrebu udruživanja detaljnih informacija o određenoj populaciji i individualnom genomu, što nije uvijek izgledno. Razvitak personaliziranih dijetetičkih preporuka oslanja se na nove 'omik' tehnologije koje su se pojavile u novije vrijeme. Metabolomika, lipidomika i proteomika nam omogućuju procijeniti zdravlje prema molekularnim i staničnim procesima koji su dio procesa razvoja bolesti i koji nam trebaju olakšati pronalazak biomarkera za identifikaciju i liječenje bolesti. S daljnjim napretkom istraživanja nutrigenetika i nutrigenomika će zauzeti važnu ulogu u biomedicini s ciljem promoviranja zdravlja, bolje skrbi, prevencije bolesti i produljenja života.

Opsežna istraživanja interakcija gena i gena te gena i prehrane, uz razumijevanje uloge etničke različitosti kao značajnog dodatnog čimbenika u ovim odnosima, može doprinijeti boljem razumijevanju interindividualne varijabilnosti različitih fenotipova koji doprinose razvoju metaboličkoga sindroma.

Limitirajući čimbenici

Veličina ispitivanog uzorka može biti limitirajući čimbenik. Drugi limitirajući čimbenik može biti to što nisu uzeti u obzir svi okolišni čimbenici poput tjelesne aktivnosti, koja može biti važan modulirajući čimbenik u interakcijama gena te gena i prehrane.

Premda je potrebno potvrditi predočene rezultate u replikacijskim studijama kako u našoj tako i u drugim populacijama, interakcije opisanih gena čini se mogu biti od kliničkog značaja.

7. Zaključci

1. Univarijatnom analizom utvrđeno je da su ispitanici čija je prehrana bila kontinentalna imali statistički značajno veće izglede za razvoj MetS u odnosu na ispitanike na mediteranskoj ili mješovitoj prehrani.
2. Univarijatnom analizom utvrđeno je da su ispitanici s MetS čija je prehrana bila kontinentalna imali gotovo četiri puta veće izglede za pretilost u odnosu na one čija je prehrana bila mediteranska ili mješovita.
3. U multivarijatnom predviđanju mediteranski ili mješoviti tip prehrane bio je povezan s nižim vrijednostima triglicerida, opsega struka i sistoličkog krvnog tlaka.
4. Uz kontrolu drugih varijabli, mediteranska ili mješovita prehrana bila je učestalija kod nositelja genotipa *AT1R* 1166AC ili CC u odnosu na genotip *AT1R* 1166AA.
5. Nositelji alela niske aktivnosti, *PPARγ* 12Ala i *LPL* PvuII (+), odnosno kombinacije genotipova *LPL* PvuII (-/-) i *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su značajno veće izglede za razvoj MetS u odnosu na ispitanike koji nisu bili nositelji tih alela.
6. Ispitanici s MetS koji su bili nositelji kombinacije genotipova *IL6* -174GG i *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su manje izglede za visoke razine glukoze natašte u usporedbi s nositeljima genotipa *PPARγ* Pro12Pro.
7. Ispitanici s MetS, nositelji kombinacije genotipova *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala i *ACE* ID ili II imali su manje izglede za razvoj debljine u odnosu na ispitanike s genotipom *ACE* DD.
8. U multivarijatnom predviđanju, kontrolni ispitanici bez MetS s genotipom *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su veće izglede za povećan opseg struka u odnosu na nositelje genotipa *PPARγ* Pro12Pro.
9. Multivarijatnim predviđanjem utvrđeno je da su kontrolni ispitanici s genotipom *AT1R* 1166AC ili CC imali veće izglede za povišene trigliceride u odnosu na nositelje genotipa *AT1R* 1166AA.
10. Univarijatnom analizom utvrđeno je da su zdravi ispitanici čija je prehrana bila kontinentalna imali veće izglede za povišen krvni tlak u odnosu na one čija je prehrana bila mediteranska ili mješovita.

8. Sažetak

U patogenezi metaboličkoga sindroma (MetS) nije još sasvim razjašnjena uloga interakcija gena i okoliša. PPARγ regulira ekspresiju ključnih gena u adipogenezi, metabolizmu masti i šećera, upali i imunosti. Među različite ciljne gene *PPARγ* pripadaju i *LPL*, *IL6*, *ACE* i *AT1R*. Cilj ove studije bio je ispitati interakcije između varijanti *PPARγ* i njegovih ciljnih gena, te prehrane i njihovu povezanost s MetS i pojedinim njegovim sastavnicama.

Istraživanje je provedeno na 527 ispitanika (263 s MetS i 264 kontrole). Genotipizacija *PPARγ* Pro12Ala, *LPL* PvuII (-/+), *IL6* -174G>C, *ACE* I/D i *AT1R* 1166A>C provedena je metodama temeljenim na lančanoj reakciji polimerazom.

U skupini s genotipom LPL PvuII (-/-), nositelji genotipa PPARγ Pro12Ala ili Ala12Ala su imali manji rizik za razvoj MetS u odnosu na ispitanike s genotipom Pro12Pro. Varijanta gena *PPARγ* Ala12 ima zaštitnu ulogu u ispitanika s genotipom *IL6* -174GG, dok je u nositelja alela *IL6* -174C i alela *PPARγ* Ala12 zabilježen veći rizik razvoja povišenih koncentracija glukoze na tašte u usporedbi s nositeljima varijante *PPARγ* Pro12. Interakcija između *PPARγ* i *ACE* je bila značajna za vrijednosti BMI. U skupini ispitanika s genotipom *ACE* DD, nositelji genotipa *PPARγ* Pro12Ala ili Ala12Ala imali su veći rizik za razvoj debljine. Mediteranska ili mješovita prehrana bila je učestalija kod nositelja genotipa *AT1R* 1166AC ili CC u odnosu na genotip *AT1R* 1166AA.

9. Summary

The role of the gene environment interactions in the pathogenesis of metabolic syndrome (MetS) has not been fully clarified yet. PPARγ regulates the expression of key genes involved in adipogenesis, lipid and glucose metabolism, inflammation and immunity. *LPL*, *IL6*, *ACE* and *AT1R* belong to different *PPARγ* target genes. The aim of the study was to estimate the influence of interactions between *PPARγ* gene variants, its target genes and diet on MetS and its traits. The study included 527 participants (263 with MetSy and 264 controls). Genotyping of *PPARγ* Pro12Ala, *LPL* PvuII (-/+), *IL6* -174G>C, *ACE* I/D and *AT1R* 1166A>C was performed using polymerase chain reaction based methods.

In the group of participants with *LPL* PvuII (-/-), those with PPARγ Pro12Ala or Ala12Ala genotype had lower odds for MetSy. PPARγ Ala12 variant was found protective in patients with *IL6* -174GG genotype, while in the case of *IL6* -174C allele carriers, for *PPARγ* Ala12

carriers larger odds for high glucose levels compared to Pro12 variant were observed. Interactions of *PPARγ* and *ACE* were significant for BMI. In the group with *ACE* DD genotype, those with *PPARγ* Pro12Ala or Ala12Ala genotype had greater odds for obesity. Mediterranean or mixed diet was more prevalent in the group of 1166AC or CC genotype carriers.

10. Literatura

Abdollahi MR, Gaunt TR, Syddall HE, i sur. Angiotensin II type I receptor gene polymorphism: anthropometric and metabolic syndrome traits. J Med Genet 2005;42(5):396-401.

Ahluwalia TS, Ahuja M, Rai TS, i sur. ACE Variants Interact with the RAS Pathway to Confer Risk and Protection against Type 2 Diabetic Nephropathy. DNA Cell Biol 2009;28(3):141-150.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, i sur. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation 2009;120:1640-1645.

AlSaleh A, Frost GS, Griffin BA, i sur. PPARγ2 gene Pro12Ala and PPARα gene Leu162Val single nucleotide polymorphisms interact with dietary intake of fat in determination of plasma lipid concentrations. J Nutrigenet Nutrigenomics 2011;4(6):354-66.

AlSaleh A, Sanders TA, O'Dell SD. Effect of interaction between PPARG, PPARA and ADIPOQ gene variants and dietary fatty acids on plasma lipid profile and adiponectin concentration in a large intervention study. Proc Nutr Soc 2012;71(1):141-153.

Alvarez Leon EE, Ribas Barba L, Serra Majem L. Prevalence of the metabolic syndrome in the population of Canary Islands, Spain. Med Clin (Barc) 2003;120:172-174.

Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, i sur. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. Diabetes 2008;57(1):95-101.

Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. Circ Res 2004;94(9):1211-1218.

Angelakopoulou A, Shah T, Sofat R, i sur. Comparative analysis of genome-wide association studies signals for lipids, diabetes, and coronary heart disease: Cardiovascular Biomarker Genetics Collaboration. Eur Heart J 2012;33(3):393-407.

Antonellis A, Rogus JJ, Canani LH, i sur. A method for developing highdensity SNP maps and its application at the type 1 angiotensin II receptor (AGTR1) locus. Genomics 2002;79(3):326-332.

Avery CL, He Q, North KE, i sur. A phenomics-based strategy identifies loci on APOC1, BRAP, and PLCG1 associated with metabolic syndrome phenotype domains. PLoS Genet 2011;7(10):e1002322.

Barbato A, Cappuccio FP, Folkerd EJ, i sur. Metabolic syndrome and renal sodium handling in three ethnic groups living in England. Diabetologia 2004;47:40-46.

Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Diabetologia 1993;36:62-67.

Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. Annu Rev Genet. 1997;31:493-525.

Bauer F, Elbers CC, Adan RA, i sur. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference. Am J Clin Nutr 2009;90(4):951-959.

Bays HE, Gonzáles-Campoy JM, Bray GA, i sur. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. Expert Rev Cardiovasc Ther 2008;6:343-368.

Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxydelta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. J Clin Invest 2003;112(6):945-955.

Benyamin B, Sorensen TI, Schousboe K, Fenger M, Visscher PM, Kyvik KO. Are there common genetic and environmental factors behind the endophenotypes associated with the metabolic syndrome? Diabetologia 2007;50:1880-1888.

Bergman Marković B, Vrdoljak D, Kranjcević K, i sur. Continental-Mediterranean and rural-urban differences in cardiovascular risk factors in Croatian population. Croat Med J 2011;52(4):566-75.

Berthier MT, Houde A, Cote M, i sur. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men. J Lipid Res 2005;46(2):237-244.

Berthier MT, Paradis AM, Tchernof A, i sur. The interleukin 6-174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men. J Hum Genet 2003;48:14-19.

Bhatt SP, Misra A, Sharma M, i sur. Ala/Ala genotype of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferatoractivated receptor-g2 gene is associated with obesity and insulin resistance in Asian Indians. Diabetes Technol Ther 2012;14:828-834.

Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, i sur. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. Hypertension 1994;24(1):63-69.

Bouchard C. The biological predisposition to obesity: beyond the thrifty genotype scenario. Int J Obes (Lond) 2007;31:1337-1139.

Bouhaha R, Baroudi T, Ennafaa H, i sur. Study of TNFα-308G/A and IL6 -174G/C polymorphisms in type 2 diabetes and obesity risk in the Tunisian population. Clin Biochem 2010;43(6):549-552.

Bouhaha R, Meyre D, Kamoun HA, i sur. Effect of ENPP1/PC-1-K121Qand PPARgamma-Pro12Ala polymorphisms on the genetic susceptibility to T2D in the Tunisian population. Diabetes Res Clin Pract 2008;81(3):278-283.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology 1996;137(1): 354-366.

Cameron VA, Mocatta TJ, Pilbrow AP, i sur. Angiotensin type-1 receptor A1166C gene polymorphism correlates with oxidative stress levels in human heart failure. Hypertension 2006;47(6):1155-1161.

Carmelli D, Cardon LR, Fabsitz R. Clustering of hypertension, diabetes, and obesity in adult male twins: same genes or same environments? Am J Hum Genet 1994;55:566-573.

Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CN. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. N Engl J Med 2008;359:2558-2566.

Cecil JE, Watt P, Palmer CN, Hetherington M. Energy balance and food intake: the role of PPARγ gene polymorphisms. Physiol Behav 2006;88(3):227-233.

Corella D, Qi L, Tai ES, i sur. Perilipin gene variation determines higher susceptibility to insulin resistance in Asian women when consuming a high-saturated fat, low-carbohydrate diet. Diabetes Care 2006;29:1313-1319.

Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, i sur. The metabolic syndrome. Endocr Rev 2008;29(7):777-822.

Corpeleijn E, Petersen L, Holst C, i sur. Obesity-related polymorphisms and their associations with the ability to regulate fat oxidation in obese Europeans: the NUGENOB study. Obesity 2010;18(7):1369-1377.

Costa V, Gallo MA, Letizia F, Aprile M, Casamassimi A, Ciccodicola A. PPARG: Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues. PPAR Res. 2010;2010.

Curti ML, Jacob P, Borges MC, Rogero MM, Ferreira SR. Studies of gene variants related to inflammation, oxidative stress, dyslipidemia, and obesity: Implications for a nutrigenetic approach. J Obes 2011;2011:497401.

Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, i sur. Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. Metabolism 2004;53(3):303-309.

de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The Renin Angiotensin System and the Metabolic Syndrome. Physiol Behav 2010;100(5):525-534.

de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction. Final report of the Lyon Diet Heart Study. Circulation 1999;99:779-785.

de Rooij SR, Painter RC, Phillips DI, i sur. The effects of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene on glucose/insulin metabolism interact with prenatal exposure to famine. Diabetes Care 2006;29(5):1052-1057.

Dedoussis GV, Vidra N, Butler J, i sur. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) Pro12Ala polymorphism and risk for pediatric obesity. Clin Chem Lab Med 2009;47(9):1047-1050.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, i sur. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. Nat Genet 1998;20(3):284-287.

Dina C, Meyre D, Gallina S, i sur. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. Nat Genet 2007;39:724-726.

Due A, Larsen TM, Hermansen K, i sur. Comparison of the effects on insulin resistance and glucose tolerance of 6-mo high-monounsaturated-fat, low-fat, and control diets. Am J Clin Nutr 2008;87(4):855-862.

Due A, Larsen TM, Mu H, Hermansen K, Stender S, Astrup A. Comparison of 3 ad libitum diets for weight-loss maintenance, risk of cardiovascular disease, and diabetes: A 6-mo randomized, controlled trial. Am J Clin Nutr 2008;88(5):1232-1241.

Duncan JA, Scholey JW, Miller JA. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in humans: physiology and pathophysiology of the genotypes. Curr Opin Nephrol Hypertens 2001;10(1):111-116.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet 2005;365(9468):1415-1428.

Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. Inflamm Res 2009;58:727-736.

Edwards KL, Newman B, Mayer E, Selby JV, Krauss RM, Austin MA. Heritability of factors of the insulin resistance syndrome in women twins. Genet Epidemiol 1997;14:241-253.

Eklund C, Nenonen A, Kukkonen-Harjula K, i sur. Association of the IL6-174(G/C) polymorphism with C-reactive protein concentration after weight loss in obese men. Eur Cytokine Netw 2006;17(2):131-135.

Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue reninangiotensin system. Hypertension 2000;35(6):1270-1277.

Enzi G, Gasparo M, Biondetti PR, Fiore D, Semisa M, Zurlo F. Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age and overweight, evaluated by computed tomography. Am J Clin Nutr 1986;44:739-746.

Ervin RB. Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. Natl Health Stat Report 2009;5;(13):1-7.

Esposito K, Marfella R, Ciotola M, i sur. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. JAMA 2004;292:1440-1446.

Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour 2010;10(3):564-567.

Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285(19):2486-2497.

Facchini FS, Hollenbeck CB, Jeppesen J, Chen YD, Reaven GM. Insulin resistance and cigarette smoking. Lancet 1992;339:1128-1130.

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, i sur. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. J Biol Chem 1997;272(30):18779-18789.

Fall T, Ingelsson E. Genome-wide association studies of obesity and metabolic syndrome. Mol Cell Endocrinol. 2014;382(1):740-57.

Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. Cell Metab 2006;4(4):263-273.

Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L i sur. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. J Nutrigenet Nutrigenomics 2011;4(2):69-89.

Ferguson LR. Nutrigenomics approaches to functional foods. J Am Diet Assoc 2009;109:452-458.

Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab 2000;85(3):1334-1339.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, i sur. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest 1998;102(7):1369-1376.

Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. J Clin Invest 1997;100(9):2158-2169.

Fornage M, Jacobs DR, Steffes MW, Gross MD, Bray MS, Schreiner PJ. Inverse effects of the PPAR(gamma)2 Pro12Ala polymorphism on measures of adiposity over 15 years in African Americans and whites. The CARDIA study. Metabolism 2005;54(7):910-917.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, i sur. A common variant in the FTO gene is associated with body mass indeks and predisposes to childhood and adult obesity. Science 2007;316:889-894.

Garg A. Regional adiposity and insulin resistance. J Clin Endocrinol Metab 2004;89(9):4206-4210.

Gemmill RM, Drabkin HA. Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 3 Mapping. Cytogenet Cell Genet 1991;57(4):162-166.

Ghoussaini M, Meyre D, Lobbens S, i sur. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. BMC Med Genet 2005;6:11.

Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet and cardiovascular health. Ann N Y Acad Sci 2005;1056:253-260.

Goldberg IJ, Merkel M. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. Front Biosci 2001;6:D388-405.

Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala

gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. Am J Epidemiol 2010;171(6):645-655.

Goyenechea E, Parra MD, Martinez Hernandez JA. Role of IL-6 and its -174G>C polymorphism in weight management and in the metabolic comorbidities associated with obesity. An Sist Sanit Navar 2005;28(3):357-366.

Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:629-636.

Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. Biochem Biophys Res Commun 1994;200(1):313-319.

Guo SW, Thompson E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics 1992;48(2):361-372.

Gurka MJ, Lilly CL, Oliver MN, Deboer MD. An examination of sex and racial/ethnic differences in the metabolic syndrome among adults: A confirmatory factor analysis and a resulting continuous severity score. Metabolism 2013 Oct 24. pii: S0026-0495(13)00338-7. doi: 10.1016/j.metabol.2013.10.006.

Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 1992;35:595-601.

He W. PPARgamma2 Polymorphism and Human Health. PPAR Res 2009;2009:849538.

Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, i sur. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia: role of oxidized LDL. Circulation 1996;9:1346-1353.

Helwig U, Rubin D, Kiosz J, i sur. The minor allele of the PPARγ2 Pro12Ala polymorphism is associated with lower postprandial TAG and insulin levels in non-obese healthy men. Br J Nutr 2007;97(5):847-854.

Hilgers KF, Langenfeld MR, Schlaich M, Veelken R, Schmieder RE. 1166 A/C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and the response to short-term infusion of angiotensin II. Circulation 1999;100(13):1394-1399.

Holzapfel C, Grallert H, Huth C, i sur. Genes and lifestyle factors in obesity: results from 12,462 subjects from MONICA/KORA. Int J Obes (Lond) 2010;34(10):1538-1545.

Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. Int J Obes Relat Metab Disord 2003;27Suppl 3:53-55.

Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, i sur. Increased frequency of angiotensinconverting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. Nephrol Dial Transplant 2000;15(7):1008-1013.

Hu FB, van Dam RM, Liu S. Diet and risk of Type II diabetes: The role of types of fat and carbohydrate. Diabetologia 2001;44(7):805-817.

Huang HY, Thuita L, Strickland P, i sur. Frequencies of single nucleotide polymorphisms in genes regulating inflammatory responses in a community-based population. BMC Genet 2007;8:7.

Huguenin GV, Rosa G. The Ala allele in the PPAR-gamma2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes mellitus in Caucasians and improved insulin sensitivity in overweight subjects. Br J Nutr 2010;104(4):488-497.

Hutch C, Illig T, Herder C, i sur. Joint analysis of individual participants' data from17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and boy mass index. Ann Med 2009;41:128-138.

Ide T, Egan K, Bell-Parikh LC, FitzGerald GA. Activation of nuclear receptors by prostaglandins. Thromb Res 2003;110(5-6):311-315.

Jaccard J. Interaction effects in logistic regression. Newbury Park, CA: SAGE. 2001.

Jacobsson JA, Schiöth HB, Fredriksson R. The impact of intronic single nucleotide polymorphisms and ethnic diversity for studies on the obesity gene FTO. Obes Rev 2012;13(12):1096-1109.

Jensen MD. Is visceral fat involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome? Human model. Obesity (Silver Spring) 2006;14Suppl 1:20-24.

Joffe YT, Collins M, Goedecke JH. The relationship between dietary fatty acids and inflammatory genes on the obese phenotype and serum lipids. Nutrients 2013;5(5):1672-705.

Kang JX. The coming of age of nutrigenetics and nutrigenomics. J Nutrigenet Nutrigenomics 2012;5(1):I-II.

Karmelić I, Lovrić J, Božina T, i sur. Adiponectin level and gene variability are obesity and metabolic syndrome markers in a young population. Arch Med Res 2012;43(2):145-153.

Kleinbaum DG, Klein M. Logistic regression: A self learning text, 2. izd. New York: Springer; 2002.

Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. Mol Pharmacol 1992;41(2):393-398.

Kolčić I, Vorko-Jović A, Salzer B, Smoljanović M, Kern J, Vuletić S. Metabolic syndrome in a metapopulation of Croatian island isolates. Croat Med J 2006;47(4):585-592.

Kong C, Nimmo L, Elatrozy T, i sur. Smoking is associated with increased hepatic lipase activity, insulin resistance, dyslipidaemia and early atherosclerosis in type 2 diabetes. Atherosclerosis 2001;156:373-378.

Koršić M, Gotovac K, Nikolac M, i sur. Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue in overweight women. Front Biosci (Elite Ed) 2012;4:2834-2844.

Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. Hypertens Res. 2010;33(5):386-393.

Kraja AT, Borecki IB, North K, i sur. Longitudinal and age trends of metabolic syndrome and its risk factors: the Family Heart Study. Nutr Metab (Lond) 2006;3:41.

Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, i sur. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. Diabetes. 2011;60(4):1329-1339.

Kristiansson K, Perola M, Tikkanen E, i sur. Genome-wide screen for metabolic syndrome susceptibility Loci reveals strong lipid gene contribution but no evidence for common genetic basis for clustering of metabolic syndrome traits. Circ Cardiovasc Genet. 2012;5(2):242-249.

Kubaszek A, Pihlajamaki J, Punnonen K, Karhapää P, Vauhkonen I, Laakso M. The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. Diabetes 2003;52:558-561.

Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. Science 2005;307:373-375.

Lee AW, Hengstler H, Schwald K, i sur. Functional inactivation of the genomewide association study obesity gene neuronal growth regulator 1in mice causes a body mass phenotype. PLoS One 2012;7(7):e41537.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem 1995;270(22):12953-12956.

Liese AD, Schulz M, Moore CG, Mayer-Davis EJ. Dietary patterns, insulin sensitivity and adiposity in the Multi-ethnic Insulin Resistance Atherosclerosis Study population. Br J Nutr 2004;92:973-984.

Lindi V, Schwab U, Louheranta A, i sur. Impact of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene on serum triacylglycerol response to n-3 fatty acid supplementation. Mol Genet Metab 2003;79(1):52-60.

Long S, Tian Y, Zhang R, i sur. Relationship between plasma HDL subclasses distribution and lipoprotein lipase gene HindIII polymorphism in hyperlipidemia. Clin Chim Acta 2006;366(1-2):316-321.

Lottenberg AM, Afonso Mda S, Lavrador MS, Machado RM, Nakandakare ER. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. J Nutr Biochem 2012;23(9):1027-1040.

Luan J, Browne PO, Harding AH, i sur. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARγ locus. Diabetes 2001;50(3):686-689.

Lusis AJ, Attie AD, Reue K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. Nat Rev Genet 2008;9(11):819-830.

MacDougald OA, Burant CF. The rapidly expanding family of adipokines. Cell Metab 2007;6:159-161.

Marković BB, Kern J, Milaković SB, i sur. Metabolic syndrome in family medicine. Acta Med Croatica 2007;61(3):245-251.

Masud S, Ye S, SAS Group. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. J Med Genet 2003;40(10):773-780.

Mattevi VS, Zembrzuski VM, Hutz MH. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. Braz J Med Biol Res 2007;40(7):927-932.

McCaffery JM, Papandonatos GD, Peter I, i sur. Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look Ahead Trial. Am J Clin Nutr 2012;95(6):1477-1486.

Melanson EL, Astrup A, Donahoo WT. The relationship between dietary fat and fatty acid intake and body weight, diabetes, and the metabolic syndrome. Ann Nutr Metab 2009;55(1-3):229-243.

Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR Jr, Folsom AR. Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older iowa women. Diabetes Care 2001;24(9):1528-1535.

Milewicz A, Tworowska-Bardzinska U, Dunajska K, Jedrzejuk D, Lwow F. Relationship of PPARgamma2 polymorphism with obesity and metabolic syndrome in postmenopausal Polish women. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2009;117(10):628-632.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16(3):1215.

Mirzaei H, Akrami SM, Golmohammadi T, i sur. Polymorphism of Pro12Ala in the peroxisome proliferator activated receptor 2 gene in Iranian diabetic and obese subjects. Metab Syndr Relat Disord 2009;7(5):453-458.

Moczulski DK, Rogus JJ, Antonellis A, Warram JH, Krolewski AS. Major susceptibility locus for nephropathy in type 1 diabetes on chromosome 3q: results of novel discordant sib-pair analysis. Diabetes 1998;47(7):1164-1169.

Moleres A, Rendo-Urteaga T, Azcona C i sur. IL6 gene promoter polymorphism (-174G/C) influences the association between fat mass and cardiovascular risk factors. J Physiol Biochem 2009;65(4):405-413.

Möllsten A, Stegmayr B, Wiklund PG. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system confer increased risk of stroke independently of blood pressure: a nested case-control study. J Hypertens 2008;26(7):1367-72.

Monda KL, North KE, Hunt SC, Rao DC, Province MA, Kraja AT. The genetics of obesity and the metabolic syndrome. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2010;10:86-108.

Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, i sur. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. Circulation 1997;96(3):741-747.

Moon MK, Cho YM, Jung HS, i sur. Genetic polymorphisms in peroxisome proliferator-activated receptor γ are associated with type 2 diabetes mellitus and obesity in the Korean population. Diabet Med 2005;22(9):1161-1166.

Morini E, Tassi V, Capponi D, i sur. Interaction between PPARγ2 variants and gender on the modulation of body weight. Obesity 2008;16(6):1467-1470.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. Nature 1991;351(6323):233-236.

Nestle, M. Mediterranean diets: historical and research overview. Am J Clin Nutr 1995;61:1313-1320.

Nevajda B, Havelka-Mestrović A, Bilić M, i sur. Prevalence of the metabolic syndrome in the old institutionalized people in Zagreb, Croatia. Coll Antropol 2013;37(1):203-206.

Newton R. Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. Eur J Pharmacol 2013 Jun 7. pii: S0014-2999(13)00452-4. doi:10.1016/j.ejphar.2013.05.035.

Ochoa MC, Marti A, Azcona C, i sur. Gene-gene interaction between PPAR gamma 2 and ADR beta 3 increases obesity risk in children and adolescents. Int J Obes Relat Metab Disord 2004;28Suppl 3:37-41.

Oh EY, Min KM, Chung JH, i sur. Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in Korean diabetic and obese subjects. J Clin Endocrinol Metab 2000;85(5):1801-1804.

Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. J Clin Invest 2000;106(4):467-472.

Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. Annu Rev Genomics Hum Genet 2004;5:71-118.

Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuiji LA, i sur. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. Hypertension 1998;32(5):825-830.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, i sur. Impact of lifestyle habits on the prevalence of the metabolic syndrome among Greek adults from the ATTICA study. Am Heart J 2004;147:106-112.

Paracchini V. Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. Am J Epidemiol 2005;162(2):101-114.

Passaro A, Dalla Nora E, Marcello C, i sur. PPARg Pro12Ala and ACE ID polymorphisms are associated with BMI and fat distribution, but not metabolic syndrome. Cardiovasc Diabetol 2011;10:112.

Pašalić D, Sertić J, Kunović B, i sur. Lipoprotein lipase gene polymorphism and lipid profile in patients with hypertriglyceridemia. Croat Med J 2001;42(5):517-522.

Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, i sur. A mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. Diabetologia 2001;44(11):2038-2043.

Perez-Martinez P, Phillips CM, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F. Nutrigenetics, metabolic syndrome risk and personalized nutrition. Curr Vasc Pharmacol 2013 Oct 30. [Epub ahead of print].

Peters KE, Beilby J, Cadby G, i sur. A comprehensive investigation of variants in genes encoding adiponectin (ADIPOQ) and its receptors (ADIPOR1/R2), and their association with serum adiponectin,type 2 diabetes, insulin resistance and the metabolic syndrome. BMC Med Genet 2013;25;14:15.

Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. Curr Opin Cardiol 2006;21(3):185-193.

Phillips CM, Goumidi L, Bertrais S, i sur. Additive effect of polymorphisms in the IL-6, LTA, and TNF-{alpha} genes and plasma fatty acid level modulate risk for the metabolic syndrome and its components. J Clin Endocrinol Metab 2010;95(3):1386-1394.

Phillips CM, Tierney AC, Roche HM. Gene-nutrient interactions in the metabolic syndrome. J Nutrigenet Nutrigenomics 2008;1(3):136-151.

Phillips CM. Nutrigenetics and Metabolic Disease: Current Status and Implications for Personalised Nutrition. Nutrients 2013;5(1):32-57.

Poljičanin T, Sekerija M, Boras J, i sur. Metabolic syndrome--community nursing evaluation and intervention: the CroHort study. Coll Antropol 2012;36Suppl 1:35-40.

Povel CM, Boer JM, Onland-Moret NC, Dollé ME, Feskens EJ, van der Schouw YT. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) involved in insulin resistance, weight regulation, lipid metabolism and inflammation in relation to metabolic syndrome:an epidemiological study. Cardiovasc Diabetol 2012;11:133.

Pujia A, Gnasso A, Irace C, i sur. Association between ACE-D/D polymorphism and hypertension in type II diabetic subjects. J Hum Hypertens 1994;8(9):687-691.

Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012;302(6):H1219-1230.

Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. Annu Rev Nutr 2000;20:535-559.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, i sur. The human obesity gene map: the 2005 update. Obesity (Silver Spring) 2006;14(4):529-644.

Razquin C, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Crehuet J, Santos JM, Marti A. A mediterranean diet rich in virgin olive oil may reverse the effects of the -174G/C IL6 gene variant on 3-year body weight change. Mol Nutr Food Res 2010;54supplement 1:75-82.

Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988;37:1595-1607.

Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. Clin Res Cardiol.2006;95(3):136-147.

Reiner Ž, Muačević-Katanec D, Katanec D, Tedeschi-Reiner E. Je li hipertrigliceridemija čimbenik rizika od koronarne bolesti srca? Liječ Vjesn 2012;134(3-4):105-111.

Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest 1990;86(4):1343-1346.

Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res 1992;20(6):1433.

Riikola A, Sipila K, Kahonen M, i sur. Interleukin-6 promoter polymorphism and cardiovascular risk factors: The Health 2000 Survey. Atherosclerosis 2009;207:466-470.

Roche HM, Phillips C, Gibney MJ. The metabolic syndrome: The crossroads of diet and genetics. Proc Nutr Soc 2005;64(3):371-377.

Ronnemaa T, Ronnemaa EM, Puukka P, Pyorala K, Laakso M. Smoking is independently associated with high plasma insulin levels in nondiabetic men. Diabetes Care 1996;19:1229-1232.

Rosado EL, Bressan J, Hernandez JA, Martins MF, Cecon PR. Effect of diet and PPARγ2 and β2-adrenergic receptor genes on energy metabolism and body composition in obese women. Nutr Hosp 2006;21(3):317-331.

Rosado EL, Bressan J, Martins MF, Cecon PR, Martinez JA. Polymorphism in the PPARgamma2 and beta2-adrenergic genes and diet lipid effects on body composition, energy expenditure and eating behavior of obese women. Appetite 2007;49(3):635-643.

Roszer T, Ricote M. PPARs in the Renal Regulation of Systemic Blood Pressure. PPAR Res 2010;2010:698730.

Rukh G, Sonestedt E, Melander O, i sur. Genetic susceptibility to obesity and diet intakes: association and interaction analyses in the Malmo Diet and Cancer Study. Genes Nutr 2013;8(6):535-547.

Saint-Marc P, Kozak LP, Ailhaud G, Darimont C, Negrel R. Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. Endocrinology 2001;142:487-492.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, i sur. Prevention of Diabetes With Mediterranean Diets: A Subgroup Analysis of a Randomized Trial. Ann Intern Med 2014;160(1):1-11.

Sällman Almén M, Rask-Andersen M, Jacobsson JA, i sur. Determination of the obesity-associated gene variants within the entire FTO gene by ultra-deep targeted sequencing in obese and lean children. Int J Obes (Lond) 2013;37(3):424-431.

Scacchi R, Pinto A, Rickards O, i sur. An analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma 2) Pro12Ala polymorphism distribution and prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in world populations in relation to dietary habits. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2007;17(9):632-641.

Scaglioni S, Verduci E, Salvioni M, i sur. PPAR-γ2 Pro12Ala variant, insulin resistance and plasma long-chain polyunsaturated fatty acids in childhood obesity. Pediatr Res 2006;60(4):485-489.

Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. Diabetes 2006;55:1537-1545.

Schneider J, Kreuzer J, Hamann A, Nawroth PP, Dugi KA. The proline12alanine substitution in the peroxisome proliferator–activated receptor-g2 gene is associated with lower lipoprotein lipase activity in vivo. Diabetes 2002;51:867-870.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, i sur. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. EMBO J 1996;15:5336-5348.

Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. Circulation 2004;109(17):2054-2057.

Semenkovich CF, Wims M, Noe L, Etienne J, Chan L. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at posttranscriptional and posttranslational levels. J Biol Chem 1989;264(15):9030-9038.

Seo T, Al-Haideri M, Treskova E, i sur. Lipoprotein lipase-mediated selective uptake from low density lipoprotein requires cell surface proteoglycans and is independent of scavenger receptor class B type 1. J Biol Chem 2000;275(39):30355-30362.

Simopoulos AP. Nutrigenetics/nutrigenomics. Annu Rev Public Health 2010;31:53-68.

Sjogren M, Lyssenko V, Jonsson A, Berglund G, Nilsson P, Groop L, et al. The search for putative unifying genetic factors for components of the metabolic syndrome. Diabetologia 2008;51:2242-2251.

Slagter SN, van Vliet-Ostaptchouk JV, Vonk JM, i sur. Associations between smoking, components of metabolic syndrome and lipoprotein particle size. BMC Medicine 2013;11:195.

Sonestedt E, Gullberg B, Ericson U, Wirfalt E, Hedblad B, Orho-Melander M. Association between fat intake, physical activity and mortality depending on genetic variation in FTO. Int J Obes (Lond) 2011;35(8):1041-1049.

Sonestedt E, Roos C, Gullberg B, Ericson U, Wirfalt E, Orho-Melander M. Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the FTO genotype and obesity. Am J Clin Nutr 2009;90(5):1418-1425.

Soriguer F, Morcillo S, Cardona F, i sur. Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. J Nutr 2006;136(9):2325-2330.

Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, i sur. Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. Genomics 1987;1(2):138-144.

Stefanski A, Majkowska L, Ciechanowicz A, i sur. Lack of association between the Pro12Ala polymorphism in PPAR-γ2 gene and body weight changes, insulin resistance and chronic diabetic complications in obese patients with type 2 diabetes. Arch Med Res 2006;37(6):736-743.

Sugawara A, Uruno A, Matsuda K, i sur. Effects of PPARγ agonists against vascular and renal dysfunction. Curr Mol Pharmacol 2012;5(2):248-254.

Sun K, Liu J, Ning G. Active Smoking and Risk of Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis of Prospective Studies. PLoS ONE 2012;7(10):e47791.

Szabo de Edelenyi F, Goumidi L, Bertrais S, i sur. Prediction of the metabolic syndrome status based on dietary and genetic parameters, using random forest. Genes Nutr 2008;3(3-4):173-176.

Tai ES, Corella D, Deurenberg-Yap M, i sur. Differential effects of the C1431T and Pro12Ala PPARgamma gene variants on plasma lipids and diabetes risk in an Asian population. J Lipid Res 2004;45(4):674-685.

Tai ES, Ordovas JM. The role of perilipin in human obesity and insulin resistance. Curr Opin Lipidol 2007;18:152-156.

Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, i sur. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. Biochem Biophys Res Commun 1992;183(2):910-916.

Tarry-Adkins JL, Ozanne SE. Mechanisms of early life programming: current knowledge and future directions. Am J Clin Nutr 2011;94(6Suppl):1765S-1771S.

Tierney AC, McMonagle J, Shaw DI, i sur. Effects of dietary fat modification on insulin sensitivity and on other risk factors of the metabolic syndrome—LIPGENE: A european randomized dietary intervention study. Int J Obes (Lond) 2011;35(6):800-809.

Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, i sur. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. J Hypertens 1998;16(1):37-44.

Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, i sur. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. Lancet 1994;344(8927):910-913.

Tiret L, Rigat B, Visvikis S, i sur. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. Am J Hum Genet 1992;51(1):197-205.

Tortosa A, Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, Basterra-Gortari FJ, Nunez-Cordoba JM, Martinez-Gonzalez MA. Mediterranean diet inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: the SUN prospective cohort. Diabetes Care 2007;30:2957-2959.

Tucak-Zorić S, Curcić IB, Mihalj H, i sur. Prevalence of metabolic syndrome in the interior of Croatia: the Baranja region. Coll Antropol 2008;32(3):659-665.

van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, i sur. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. Hypertension 2000;35(3):717-721.

Vattikuti S, Guo J, Chow CC. Heritability and genetic correlations explained by common SNPs for metabolic syndrome traits. PLoS Genet 2012;8(3):e1002637.

Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, i sur. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. Diabetologia 2001;44(3):312-319.

Vessby B. Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. Curr Opin Lipidol 2003;14(1):15-19.

Viguerie N, Montastier E, Maoret JJ, i sur. Determinants of Human Adipose Tissue Gene Expression: Impact of Diet, Sex, Metabolic Status, and Cis Genetic Regulation. PLoS Genet 2012;8(9):e1002959.

Vuguin PM, Hartil K, Kruse M, i sur. Shared effects of genetic and intrauterine and perinatal environment on the development of metabolic syndrome. PLoS One 2013;8(5):e63021.

Vuković Lela I, Jelaković B. Hipertenzija i metabolički sindrom. Medix 2011;17(97):96-100.

Wang WY, Zee RY, Morris BJ. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. Clin Genet 1997;51(1):31-34.

Warensjo E, Sundstrom J, Lind L, Vessby B. Factor analysis of fatty acids in serum lipids as a measure of dietary fat quality in relation to the metabolic syndrome in men. Am J Clin Nutr 2006;84(2):442-448.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest 2003;112(12):1785-1788.

Wells JC. Ethnic variability in adiposity, thrifty phenotypes and cardiometabolic risk: addressing the full range of ethnicity, including those of mixed ethnicity. Obes Rev 2012;13 Suppl 2:14-29.

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(1):25-34.

Willett W. Nutritional Epidemiology. 2. izd. New York: Oxford University Press; 1998.

Wirfalt E, Hedblad B, Gullberg B, i sur. Food patterns and components of the metabolic syndrome in men and women: a cross-sectional study within the Malmo Diet and Cancer cohort. Am J Epidemiol 2001;154:1150-1159.

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization; 1999.

Wu J, Province MA, Coon H, i sur. An investigation of the effects of lipid-lowering medications: genome-wide linkage analysis of lipids in the HyperGEN study. BMC Genet 2007;8:60.

Xu E, Li W, Zhan L, i sur. Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene are associated with atherosclerotic cerebral infarction in the Chinese. Neuroscience 2008;155(2):403-408.

Yang SJ, Kim S, Park H, i sur. Sex-dependent association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and obesity in relation to sodium intake in children. Nutrition 2013;29(3):525-530.

Yang X, Smith U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? Diabetologia 2007;50:1127-1139.

Ye S, Dhillon S, Seear R, i sur. Epistatic interaction between variations in the angiotensin I converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genes in relation to extent of coronary atherosclerosis. Heart 2003;89(10):1195-1199.

Yen CJ, Beamer BA, Negri C, i sur. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians:

identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. Biochem Biophys Res Commun 1997;241(2):270-274.

Yu Y, Zhang ZH, Wei SG, Weiss RM, Felder RB. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ regulates inflammation and renin-angiotensin system activity in the hypothalamic paraventricular nucleus and ameliorates peripheral manifestations of heart failure. Hypertension 2012;59(2):477-484.

Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: A systematic review and meta-analysis. Obesity 2011;20;396-406.

Yuan J-M, Koh W-P, Sun C-L, Lee H-P, Yu MC. Green tea intake, ACE gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. Carcinogenesis 2005;26:1389-1394.

Zabaneh D, Balding DJ. A genome-wide association study of the metabolic syndrome in indian asian men. PLoS One 2010;5:e11961

Žmire J. Debljina i metabolička inzulinska rezistencija. Medicus 2004;13(2):27-35.

11. Životopis

Rođena sam 1980. godine u Rijeci. U Delnicama sam završila opću gimnaziju. 2009. godine diplomirala sam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, smjer Biokemijsko inženjerstvo. Za vrijeme studiranja u više razdoblja od 2006. – 2009. godine boravila sam u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U Zavodu za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju izradila sam diplomski rad pod naslovom ″Validacija HPLC metode za kvantitativno određivanje vitamina A u plazmi″.

Od 2009. godine zaposlena sam kao znanstveni novak-asistent na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na projektu MZOS ″Funkcijska genomika i proteomika rizičnih čimbenika ateroskleroze″ kojeg je voditelj prof.dr.sc. Jadranka Sertić. Znanstvena istraživanja provodim u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb. Također sam uključena i u dodiplomsku nastavu na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2010. godine na Medicinskom fakultetu sam upisala poslijediplomski stručni studij Javno zdravstvo, a 2011. doktorski studij Biomedicina i zdravstvo.

Objavila sam osam znanstvenih radova, od kojih sam prvi autor na dva rada. Pet radova je objavljeno u časopisima koje citira Current Contents i tri u časopisu koji citira Science Citation Index. Sudjelovala sam na nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Na 9. Hrvatskom kongresu o aterosklerozi dobila sam prvu nagradu za najbolji poster pod naslovom „Varijabilnost PPAR gama je važan čimbenik u razvoju metaboličkoga sindroma“ i također na 3. Hrvatskom kongresu o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem za poster „Angiotensin II Type-1 Receptor A1166C Polymorphism and Increased Risk of Early Onset of Ischemic Stroke“.

12. Bibliografija

Znanstveni radovi u časopisima

1. Božina T, Sertić J, Lovrić J, Jelaković B, Šimić I, Reiner Ž. Interaction of Genetic Risk Factors Confers Increased Risk for Metabolic Syndrome: The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ. Genet Test Mol Biomarkers 2014;18(1):32-40.

2. Božina T, Šimić I, Lovrić J, Pećin I, Jelaković B, Sertić J, Reiner Ž. Effects of Lipoprotein Lipase and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Gene Variants on Metabolic Syndrome Traits. Coll Antropol 2013;37(3):801-808.

3. Lovrić M, Božina N, Hajnšek S, Kuzman MR, Sporiš D, Lalić Z, Božina T, Granić P. Association between lamotrigine concentrations and *ABCB1* polymorphisms in patients with epilepsy. Ther Drug Monit 2012;34(5):518-525.

4. Božina N, Jovanović N, Podlesek A, Rojnić Kuzman M, Kudumija Slijepčević M, Roguljić A, Dimitrović A, Božina T, Lovrić J, Ljubić H, Medved V. Suicide ideators and attempters with schizophrenia--the role of 5-HTTLPR, rs25531, and 5-HTT VNTR Intron 2 variants. J Psychiatr Res 2012;46(6):767-773.

5. Karmelić I, Lovrić J, Božina T, Ljubić H, Vogrinc Ž, Božina N, Sertić J. Adiponectin level and gene variability are obesity and metabolic syndrome markers in a young population. Arch Med Res 2012;43(2):145-153.

6. Sertić J, Božina T, Skorić B, Lovrić J, Slaviček J, Šimičević L, Jelaković B, Božina N, Miličić D, Reiner Ž. New trends in laboratory diagnostics: biomarkers of atherosclerosis; preventive and personalized medicine. Neurol Croat 2012;61(Suppl 2):137-149.

7. Sertić J, Skorić B, Lovrić J, Božina T, Reiner Ž. Može li određivanje Lp-PLA_2 pomoći u predskazivanju ateroskleroze i kardiocerebrovaskularnih bolesti? Acta Med Croatica 2010;64(4):237-245.

8. Sertić J, Juričić Lj, Ljubić H, Božina T, Lovrić J, Markeljević J, Jelaković B, Merkler M, Reiner Ž. Variants of *ESR1*, *APOE*, *LPL* and *IL-6* loci in Young Healthy Subjects: Association With Lipid Status and Obesity. BMC Res Notes 2009;2:203.

Sažeci sa znanstvenih skupova

1. Božina T, Sertić J, Šimić I, Jelaković B, Lovrić J, Reiner Ž. Varijabilnost PPARgama je važan čimbenik u razvoju metaboličkog sindroma. Liječnički vjesnik 135 (Suplement 2). Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, 2013.

2. Bazina A, Sertić J, Šimičević L, Božina T, Lovrić T, Poljaković Z. Uloga polimorfizma intereleukina-6 kod cerebrovaskularnog inzulta. Liječnički vjesnik 135 (Suplement 2). Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, 2013. 56-56.

3. Božina T, Sertić J, Lovrić J, Jelaković B, Jovanović N, Božina N. Contribution of 5-HTTLPR and BDNF gene variants to obesity risk. Abstracts of the 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS and 7th Congress of the Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory medicine. U:Biochemia medica. Zagreb: Medicinska naklada, 2012. A54-A204.

4. Božina T, Sertić J, Ljubić H, Jelaković B, Božina N, Lovrić J, Karanović S, Reiner Ž. Effects of *PPARγ*, *APOE*, *ACE* and *AT1R* Gene Variants on Development of Metabolic Syndrome. Abstracts of the 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. U:Clin Chem Lab Med 2011;49Special Suppl:S1-S874

5. Bazina A, Božina T, Lovrić J, Poljaković Z, Božina N, Sertić J. Genetic interactions in the renin-angiotensin system confer increased risk of stroke. Abstracts of the 78th European Atherosclerosis Society Congress. U:Atherosclerosis 2010;Suppl 11(2):S1-S246.

6. Božina T, Ljubić H, Rojnić Kuzman M, Božina N, Sertić J. Association study of *ABCB1* and *5HT2c* genetic polymorphisms and metabolic syndrome in female patients with schizophrenia. Abstracts of the 78th European Atherosclerosis Society Congress. U:Atherosclerosis 2010;Suppl 11 (2):S1-S246.

Tekstovi u udžbenicima i priručnicima

1. Lovrić J, Božina T. Statistička analiza povezanosti pretilosti s biokemijskim i genskim biljezima u mladih zdravih ispitanika. Katalog dijagnostičkih laboratorijskih pretraga. Sertić, Jadranka (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2011. Str. 812-817.

2. Šupe S, Božina T. Farmakogenomika u neurologiji. U: N. Božina, V. Macolić-Šarinić., ur. Farmakogenomika i farmakovigilancija-sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije – upute i smjernice. Zagreb: Medicinska naklada, 2013. Str 59-75.