

# Povezanost polimorfizma 1019 gena LEPR s tjelesnim karakteristikama romske populacije u Hrvatskoj

---

Jakopec, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:321978>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Martin Jakopec

POVEZANOST POLIMORFIZMA 1019 *LEPR* GENA S TJELESNIM KARAKTERISTIKAMA ROMSKE  
POPULACIJE U HRVATSKOJ

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad, izrađen na Institutu za antropologiju u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Tatjane Škarić-Jurić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## ZAHVALE

Veliko hvala mentoricama prof. dr. sc. Tatjani Škarić-Jurić, te dr. sc. Matei Zajc Petranović, kao i ostalim zaposlenicima Instituta za antropologiju, posebice dr. sc. Marijani Peričić Salihović, dr. sc. Ani Barešić i dr. sc. Željki Tomas.

Veliko hvala suvoditelju prof. dr. sc. Goranu Kovačeviću, te doc. dr. sc. Petri Korać na ukazanom povjerenju i podršci.

Hvala obitelji i prijateljima na podršci.

Hvala zakladi „Nutricia Research Foundation“ koja je financijski omogućila ovo istraživanje.

Ovaj rad posvećen je dragoj prijateljici Vanji Tadić, čije prijateljstvo i rad su mi uvijek bili poticaj.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## POVEZANOST POLIMORFIZMA 1019 *LEPR* GENA S TJELESNIM KARAKTERISTIKAMA KOD ROMSKE POPULACIJE U HRVATSKOJ

Martin Jakopec

Rooseveltovo trg 6  
HR-10000 Zagreb, Hrvatska

Brojna epidemiološka istraživanja su pokazala da je debljina značajan čimbenik rizika za većinu kroničnih bolesti današnjice. Leptin i leptinski receptor važni su regulatori uhranjenosti, korištenja energije i raspodjele tjelesnih masnoća. Stoga je cilj ovog rada bio testirati povezanost polimorfizma 1019 gena za leptinski receptor (gen *LEPR*) s morfološkim pokazateljima uhranjenosti kod romske populacije koja živi u Republici Hrvatskoj. Romi su izabrani za istraživanje zbog visoke prevalencije pretilosti i dijabetesa tipa 2 u ovoj populaciji kao i stoga što je riječ o endogamnoj osnivačkoj zajednici kod koje je moguće detektirati specifične veze između genotipa i fenotipa. Uzorak obuhvaća 401 odraslu osobu kod koje je provedena antropometrija te je uzeta krv za analizu DNA. Za određivanje genotipa korištena je metoda lančane reakcije polimerazom, a nakon toga su uzorci pocijepani restrikcijom enzimom. Povezanost kategorijskih varijabli uhranjenosti s genotipom ispitana je Pearsonovim  $\chi^2$ -testom. Povezanost mjerenih kvantitativnih varijabli s genotipom provjerena je analizom varijance (ANOVA) s PostHoc testom. Kako bi se uklonile razlike između spolova, provedeno je poravnavanje korištenjem „z-varijabli“ kreiranim unutar svakog spola zasebno. Utvrđeno je da je genotip TT *LEPR* polimorfizma 1019 značajan prediktor debljine u ovoj populaciji, pri čemu je posebno istaknut njegov utjecaj na centralno nakupljanje masnog tkiva kod muškaraca.

48 stranica, 8 slika, 23 tablice, 27 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

**Ključne riječi:** gen za leptinski receptor, antropometrija, pretilost, studija povezanosti, Romi

**Voditelj:** Dr. sc. Tatjana Škarić-Jurić, zn. savjetnik

**Suvoditelj:** Dr. sc. Goran Kovačević, izv. prof.

**Ocjenitelji:** dr. sc. Jasna Hrenović, izv. prof., dr. sc. Petra Korać, doc., dr. sc. Goran Kovačević, izv. prof.

**Rad prihvaćen:**

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

## ASSOCIATION BETWEEN *LEPR* GENE 1019 POLYMORPHISM AND THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS IN ROMA POPULATION OF CROATIA

Martin Jakopec

Rooseveltova trg 6  
HR-10000 Zagreb, Croatia

Many epidemiological researches have shown that obesity is an important risk factor for most of the chronic diseases of modern age. Leptin and leptin receptors are important regulators of nutritional status, energy usage and body fat distribution. Therefore, the objective of this research was to test the association of *LEPR* gene polymorphism 1019 with morphological indicators of nutritional status of Roma population living in Croatia. The Roma have been chosen for research because of high prevalence of obesity, type 2 diabetes and because they are an endogamous founder community where it is possible to determine specific associations between genotype and phenotype. Research was done on 401 adult persons, whom have undergone anthropometry and whose blood samples were taken for DNA analysis. Polymerase chain reaction followed by a restriction enzyme cleavage was used to determine the genotype. The association of categorical variables of nutritional status with genotype was tested by Pearson's  $\chi^2$ -test. The association of measured quantitative variables with genotype has been checked by variance analysis (ANOVA) with PostHoc test. To remove differences between sexes, an alignment has been made by creating „z-variables“ within each sex specifically. It has been shown that TT genotype of *LEPR* 1019 polymorphism is an important predictor of obesity in this population, and that it also has a major impact on central fat tissue accumulation in the male population.

48 pages, 8 figures, 23 tables, 27 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library.

**Key words:** leptin receptor gene, anthropometry, obesity, association study, Roma

**Supervisor:** Dr. Tatjana Škarić-Jurić, Sc. Advisor

**Cosupervisor:** Dr. Goran Kovačević, Assoc. Prof.

**Reviewers:** Dr. Jasna Hrenović, Assoc. Prof., Dr. Petra Korać, Asst. Prof., Dr. Goran Kovačević, Assoc. Prof.

**Thesis accepted:**

## POPIS KRATICA

SŽS – središnji živčani sustav

ObRa – oblik kratkog leptinskog receptora

ObRb – oblik dugačkog leptinskog receptora

JAK-STAT3 - kinaza Janus i aktivator transkripcije-3, od eng. *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription-3*

PI3K - fosfatidilinozitol 3-kinaza, od eng. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

MAPK - proteinska kinaza aktivirana mitogenima, od eng. *Mitogen-activated Protein Kinase*

mTOR – protein, od eng. *Mammalian Target of Rapamycin*

AMPK - proteinska kinaza aktivirana adenzin monofosfatom, od eng. *5'Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*

BMI – indeks tjelesne mase, od eng. *Body Mass Index*

WHR – omjer opsega struka i opsega bokova, od eng. *Waist - Hip Ratio*

TSR – omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora, od eng. *Triceps – Subscapular skinfold ratio*

Ob/ob – mišji soj mutantnog genotipa za *LEP* gen, koji se ekscesivno hrani i postaje pretio

Db/db – mišji soj mutantnog genotipa za *LEPR* gen, služi kao model za pretilost, dijabetes i dislipidemiju

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1	Hormon leptin i njegovi receptori .....	1
1.2	Otkriće i građa leptina .....	4
1.3	Gen <i>LEP</i> i njegove mutacije .....	7
1.4	Gen <i>LEPR</i> i njegove mutacije .....	9
1.5	Pretilost .....	11
1.6	Polimorfizmi gena <i>LEPR</i> i pretilost.....	13
1.7	Populacija Roma .....	14
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
3.	MATERIJALI I METODE.....	16
3.1	Uzorak.....	16
3.2	Genotipizacija .....	17
3.3	Antropometrijska mjerenja .....	20
3.4	Statistička obrada podataka .....	22
4.	REZULTATI.....	23
5.	RASPRAVA.....	37
5.1	Genotip TT, pretilost i implikacije.....	37
5.2	Leptinski receptor.....	39
5.3	Smjer djelovanja i daljnjih istraživanja .....	40
6.	ZAKLJUČCI .....	42
7.	LITERATURA.....	43
8.	ŽIVOTOPIS.....	46



# 1. UVOD

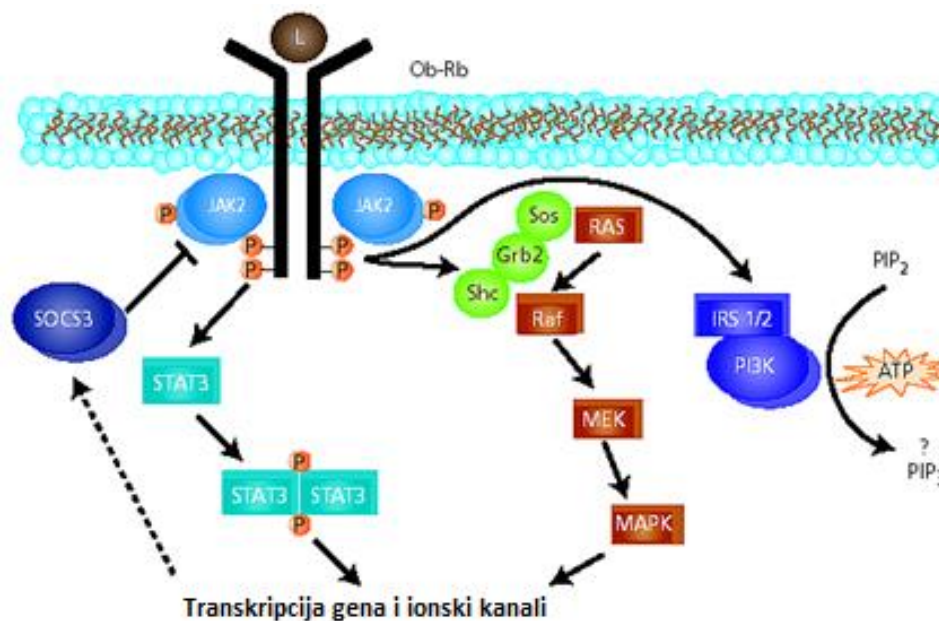
## 1.1 Hormon leptin i njegovi receptori

Leptin (od grč. λεπτός, *leptos*, "mršav"), tzv. hormon sitosti, hormon je kojeg luče masne stanice i on regulira razinu masti pohranjene u organizmu. Adipociti proizvode leptin u odgovoru na povećanje njihove veličine. Kako se nakupljaju masti, stanice ispuštaju više leptina. Svoju funkciju regulacije zaliha masti organizam obavlja prilagođavanjem osjećaja gladi i usklađivanjem trenutne energetske potrošnje. Leptin regulira energetske unos, energetske potrošnje i distribuciju energije u organizmu, tj. protok nutrijenata između organa i zatim preradu, pohranu i upotrebu nutrijenata. Inducira promjene u mozgu koje utječu na energetske homeostazu u različitim tkivima poput adipocita. Kad razina pohranjenih masti dosegne kritičnu točku, postignuto je stanje sitosti, tj. inhibiran je osjećaj gladi u organizmu. Tada je pojačano lučenje leptina, koji djeluje na način da ulazi u cirkulaciju i dolazi do leptinskih receptora u stanicama hipotalamusa (neuroni NPY/AgRP i alpha-MSH/CART), čime ih aktivira. Potrošnja energije pojačava se zbog ovog signala u mozgu, ali i izravno putem leptinskih receptora u perifernim tkivima (Kelesidis i sur. 2010).

Hormon grelin djeluje antagonistički u odnosu na leptin. Grelin je neuropeptid koji djeluje u središnjem živčanom sustavu (SŽS), također preko receptora na neuronima hipotalamusa, a kao i leptin osim same regulacije gladi, ima značajnu ulogu u regulaciji distribucije i stope potrošnje energije. Kad je koncentracija nutrijenata u želucu niska, a njegov volumen smanjen, počinje lučenje grelina. Kada se pak volumen želuca proširi, lučenje grelina prestaje. Osim generiranja osjećaja gladi, grelin potiče lučenje želučane kiseline i povećava pokretljivost probavnog trakta kako bi se organizam pripremio za unos hrane. Leptin i grelin dakle, uz mnoge druge hormone, sudjeluju u kompleksnom procesu održavanja energetske homeostaze organizma (Bouret i sur. 2004).

Leptin se veže na specifične leptinske receptore, ObR, eksprimirane u mozgu (na neuronima hipotalamusa) i u perifernim tkivima. ObR spada u klasu I. superobitelji receptora citokina. Alternativnim prekranjem gena (od eng. *alternative splicing*) proizvodi se šest izoformi ObR-a (ObRa – ObRf). Oblik kratkog leptinskog receptora, ObRa, ključan je za

transport leptina preko krvno-moždane barijere. Oblik dugačkog leptinskog receptora, ObRb, medijator je u provođenju signala i pojačano je eksprimiran u stanicama hipotalamusa, ključnog mjesta regulacije energetske homeostaze i neuroendokrinih funkcija. Vezanjem leptina na ObRb receptor aktiviraju se različiti putevi prijenosa signala, uključujući kinazu Janus i aktivator transkripcije-3, JAK-STAT3 (od eng. *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) koji je važan u regulaciji energetske homeostaze i fosfatidilinozitol 3-kinazu, PI3K (od eng. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) koja je važna u regulaciji unosa hrane i glukoze homeostaze (slika 1.1.). Istražuju se i drugi potencijalni nizvodni prijenosnici signala nakon aktivacije ObRb, poput proteinske kinaze aktivirane mitogenima, MAPK (od eng. *Mitogen-Activated Protein Kinase*), proteina mTOR (od eng. *Mammalian Target of Rapamycin*) i proteinske kinaze aktivirane adenozin monofosfatom, AMPK (od eng. *5'Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*). Aktivacija ObR-ova utječe na transkripcijsku regulaciju melanokortinskog puta u hipotalamusu i smanjuje ekspresiju endokanabinoida.



Slika 1.1. Vezanje leptina na leptinski receptor ObRb i istraživani nizvodni signalni putevi.

Leptin kao protein ima nekoliko endokrinih funkcija, uključen je u regulaciju imunoloških i upalnih odgovora, hematopoezu, angiogenezu i zacjeljivanje rana. Otpornost na leptin predložena je kao patofiziološki mehanizam pretilosti (Myers i sur. 2008). U pretilim

osobama smanjena je ekspresija ObRa (ključnog za aktivni transport leptina preko krvno-moždane barijere) i moguće je da su pretile osobe zato „otporne“ na leptinske signale. Antagonisti ObR-ova trenutno su atraktivne mete za razvoj farmakoloških tretmana pretilosti.

## 1.2 Otkriće i građa leptina

O postojanju hormona koji regulira glad i energetske potrebe organizma nagađalo se od pedesetih godina prošlog stoljeća, kada su se u laboratoriju Jackson (Bar Harbor, Maine, SAD) počeli proučavati mutantni pretili miševi koji su nehotice nastali u mišjoj koloniji. Za otkriće gena za leptin 1994. godine i izolaciju njegovog produkta 1995., leptina, zaslužni su Jeffrey Friedman, molekularni genetičar iz The Rockefeller University Hospital (New York, New York, SAD) i njegov tim (Zhang i sur. 1994.). Leptin, produkt gena *LEP* (mišji *ob* gen) sastavljen od 167 aminokiselina, otkriven je pomoću pozicijskog kloniranja na *ob/ob* miševima, koji su mišji model za pretilost razvijen u laboratoriju Jackson (slika 1.2.). Ti miševi imaju homozigotnu mutaciju leptinskog gena, što rezultira kompletnom deficijencijom leptina koja se manifestira u hiperfagiji, ekstremnoj pretilosti, dijabetesu, neuroendokrinim abnormalnostima i neplodnosti (Zhang i sur. 1994). Mehanizmi koji reguliraju unos hrane i potrošnju energije određuju tjelesnu kompoziciju, tj. pretilost ili mršavost. Mutacije leptinskog gena u populaciji miševa uzrokuju tešku pretilost i dijabetes tipa 2 kao dio sindroma koji odgovara morbidnoj pretilosti kod ljudi.

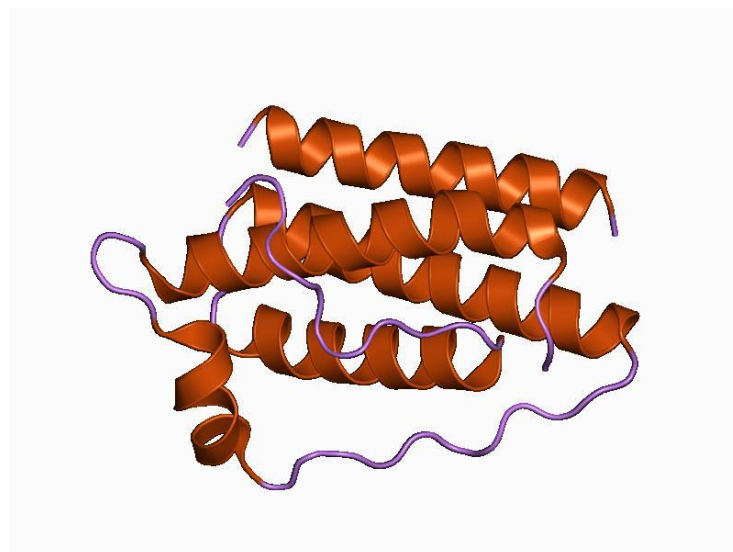


Slika 1.2. Miš soja *ob/ob* (lijevo) i zdravi miš (desno).

Sekundarna mutacija koja uzrokuje pretilost i sličan fenotip otkrivena je 1960-ih, također u laboratoriju Jackson, a soj je nazvan *db/db* (od dijabetes). Rudolph Leibel i Jeffrey Friedman mapirali su gen *ob* 1990. godine. Nekoliko naknadnih studija koje su proveli Leibel i Friedman doista su potvrdile kako je otkriven gen koji sadrži uputu za novootkriveni hormon koji cirkulira krvlju i koji bi mogao suprimirati unos hrane i tjelesnu težinu u *ob/ob* miševima i

miševima divljeg tipa, ali ne i u db/db miševima. Gen *ob* je izoliran 1994. godine u Friedmanovom laboratoriju i proglašeno je njegovo otkriće. Friedman je odlučio nazvati produkt ovog gena „leptin“ po grčkom izrazu za mršavost. Leptin je prvi otkriveni hormon kojeg proizvode adipociti. Istraživanje provedeno 1995. godine pokazalo je kako mutacije prisutne u mišjem *ob* genu nisu prisutne u ljudskom genomu. U ljudskim slučajevima pretilosti ekspresija ovog gena bila je pojačana. Ova saznanja dovela su do pretpostavke o otpornosti na leptin kod pretilih ljudi. Kasnija istraživanja pokazala su da je *db* gen eksprimiran u hipotalamusu i da nosi uputu za leptinski receptor.

Leptin (slika 1.3.) je protein mase 16 kDa. Od njegovog otkrića do danas, razumijevanje funkcije leptina proširilo se od suzbijanja pretilosti do širokih učinaka na reproduktivni sustav, hematopoezu, angiogenezu, krvni tlak, koštanu masu, homeostazu limfnih organa i sustava T limfocita. Leptin ima kompleksne biološke učinke, koje ostvaruje kroz vezanja sa svojim receptorima eksprimiranim u SŽS i periferno.



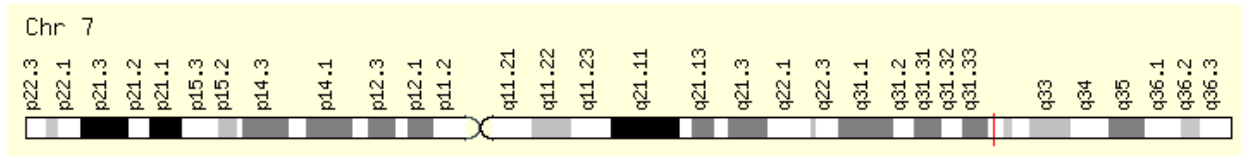
**Slika 1.3. Tercijarna struktura leptina**

Također ga proizvode stanice smeđeg masnog tkiva, placente (sinciotrofoblasti), jajnici, mišići, želudac, koštana srž, hipofiza i jetra. Razine lučenja leptina iz stanica bijelog masnog tkiva u pozitivnoj je korelaciji s količinom tjelesnih masnoća. Poput mnogih drugih hormona, leptin se luči u pulsevima i postoje značajne varijacije u njegovoj količini između jutra i večeri (Licinio i sur. 1997). Cirkulirajući leptin, tj. njegova razina, prvenstveno je odraz količine energije pohranjene u mastima, ali i odraz akutnih promjena u unosu kalorija. Leptin cirkulira

krvlju u slobodnom obliku i vezan na proteine. Razine leptina variraju eksponencijalno s količinom masti u organizmu. Razine leptina više su između ponoći i ranog jutra, što odgovara suprimiranom apetitu noću. Ritam i razine cirkulirajućeg leptina moguće je modificirati pažljivim tempiranjem obroka.

### 1.3 Gen *LEP* i njegove mutacije

Gen *LEP* (od *leptin*) ili *OB* (od eng. *obese*), s kojeg se prepisuje uputa za hormon leptin, nalazi se na dužem kraku ljudskog kromosoma 7 (slika 1.4.).



Slika 1.4. Lokacija gena *LEP* na kromosomu 7 (crvena crta).

Neke homozigotne mutacije gena *LEP* mogu biti povezane s teškom pretilošću, hiperfagijom i otpornošću na inzulin. Leptin je esencijalni signal proizveden u adipoznom tkivu te utječe na neurone hipotalamusa koji integriraju i reguliraju metabolizam u cijelom organizmu: leptin izravno obavještava mozak o stanju energetske zaliha organizma. U odsutnosti leptina, mozak procjenjuje energetske zalihe organizma nedovoljnom i aktivira snažne mehanizme koji su zaduženi za obnavljanje zaliha (signal gladi). Kada izostaje sinteza leptina ili prijenos leptinskog signala do hipotalamusa tijekom hranjenja, pretili fenotip je neizbježna posljedica.

Homozigotne mutacije *LEP* koje su dovele do potpune deficijencije leptina opisane su u iznimno rijetkim slučajevima pretilosti. No, većina pretilih pacijenata ima visoku razinu cirkulirajućeg leptina, jer su otporni ili tolerantni na leptinski učinak na smanjenje tjelesne težine. Predloženo je više mehanizama koji bi mogli uzrokovati otpornost na leptin, poput defektnog receptora *ObRb* ili defektnih nizvodnih komponenti puta, ili indukcije inhibitora leptinske signalizacije poput *SOCS-3* (od eng. *Suppressor of Cytokine Signaling-3*), ili pak defekata u transportu leptina kroz krvno-moždanu barijeru. Detaljnije studije signalnih puteva leptina potrebne su kako bismo mogli u potpunosti razumjeti mehanizme odgovorne za otpornost na leptin ili toleranciju leptina, a što će dovesti do razvoja novih terapijskih tretmana pretilosti i metaboličkog sindroma.

I miševi *ob/ob* i miševi *db/db*, koji imaju mutirani leptinski receptor, kao i ljudi s kongenitalnom deficijencijom leptina imaju razvijenu otpornost na inzulin i različite druge

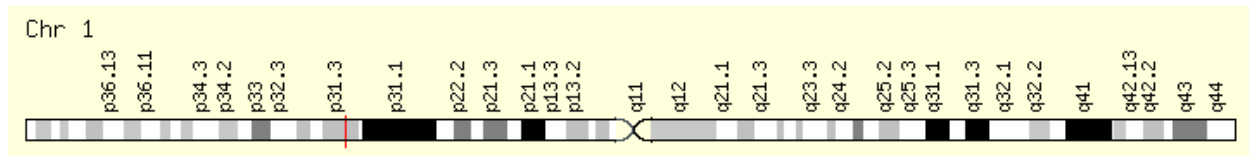
znakove metaboličkog sindroma. Kod mišjeg soja ob/ob, tretman leptinom poboljšava hiperglikemiju i hiperinzulinemiju prije postignuća gubitka težine. Tretman leptinom kod ljudi s kongenitalnom deficijencijom leptina također je pokazao poboljšanje hiperinzulinemije, kao i razine LDL kolesterola (od eng. *low-density lipoprotein*), HDL kolesterola (od eng. *high-density lipoprotein*) i triglicerida. Još uvijek se istražuju mehanizmi koji dovode do takvih rezultata.

Homozigotne mutacije gena *LEP* u pacijentima s kongenitalnom kompletnom deficijencijom leptina uzrokuju tešku pretilost vrlo rano tijekom života. Takvi pacijenti odgovaraju na tretman rekombinantnim ljudskim leptinom, koji smanjuje apetit i unos hrane, što dovodi do većeg gubitka težine. Ovi pacijenti imaju određene neuroendokrine abnormalnosti, poput hipogonadotropnog hipogonadizma s nemogućnošću dostizanja puberteta, koje se popravljaju s unosom rekombinantnog leptina (Strobel i sur. 2008). Ovakve mutacije su rijetke, no treba ih uzeti u obzir kod mladih pacijenata s teškom, ranom pretilošću i hiperfagijom jer se kongenitalna deficijencija leptina danas može liječiti.



## 1.4 Gen *LEPR* i njegove mutacije

Gen *LEPR* (ili *OBR* ili *OB-R*), s kojeg se prepisuje uputa za leptinski receptor, nalazi se na kraćem kraku prvog kromosoma kod ljudi (slika 1.5.). Ranije su spomenuti različiti oblici leptinskog receptora nastali alternativnim prekrajanjem ovog gena.



Slika 1.5. Lokacija gena *LEPR* na kromosomu 1 (crvena crta).

Leptinski receptori eksprimirani su na površini stanica mnogih organa i tkiva u ljudskom organizmu, a najvažnija je njihova ekspresija u neuronima hipotalamusa. Osim već spomenute funkcije kontrole osjećaja gladi i osjećaja sitosti pomoću leptina i grelina, te njihovih receptora, hipotalamus kontrolira i osjećaj žeđi, funkcije poput spavanja, raspoloženja i tjelesne temperature. Nemoguće je definitivno reći koja bi sve bila područja djelovanja hipotalamusa, s obzirom da regulira otpuštanje brojnih hormona koji imaju različite regulatorne uloge u organizmu. Leptinski receptori na neuronima hipotalamusa aktivirani su vezanjem leptina, koji pristaje u svoje vezno mjesto kao ključ u bravu, što okida niz kemijskih signala koji utječu na suprimiranje osjećaja gladi i proizvodi osjećaj sitosti u organizmu.

*LEPR* spada u tzv. superobitelj imunoglobulina, odnosno obitelj gena s domenama sličnim imunoglobulinima (od eng. *immunoglobulin-like domain containing*). Leptinski receptori dokazano stimuliraju transkripciju svojih ciljanih gena putem aktivacije proteina STAT u citosolu. Mutacije u *LEPR* povezane su s pretilošću i disfunkcionalnom hipofizom, a pojavili su se i dokazi kako su leptinski receptori potrebni za određeni hematopoetski put koji osigurava normalnu limfopoezu. *LEPR* je konzerviran kod čimpanze, rhesus majmuna, psa, mačke, miša, štakora, kokoši, ribe zebrice i žabe. Čak 72 organizma imaju ortologe ljudskog *LEPR* gena (Cui i sur. 2014).

Mišji soj db/db model je za pretilost, dijabetes i dislipidemiju, a ti miševi su homozigotni za točkastu mutaciju u genu za leptinski receptor. Identificirano je barem pet mutacija *LEPR*

koje uzrokuju deficijenciju leptinskog receptora. Deficijencija leptinskog receptora povezana je s izraženim osjećajem gladi, velikim dobitkom na težini i smanjenom proizvodnjom hormona koji usmjeravaju spolni razvoj (hipogonadotropni hipogonadizam). Neke mutacije rezultiraju manjim brojem leptinskih receptora koji uspješno dolaze na površinu stanice (gdje se događa vezanje leptina). Receptori koji dođu na površinu stanice mogu vezati leptin, no narušena im je signalizacijska funkcija. Poremećena signalizacija leptinskih receptora onemogućuje normalno osjećanje gladi i sitosti te dovodi do znakova i simptoma poremećaja. Zbog hipogonadotropnog hipogonadizma u pacijentima s deficijencijom leptinskog receptora, pretpostavlja se kako je signalizacija leptinskih receptora uključena i u regulaciju odgovora tijela na hormone koji kontroliraju spolni razvoj, iako je točan patofiziološki mehanizam još uvijek nerazjašnjen (Farooqi i sur. 2007).

## 1.5 Pretilost

Pretilost je višak tjelesnih masnoća koji rezultira ozbiljno narušenim zdravljem. Muškarci s više od 25% masti u tijelu i žene s više od 30% masti u tijelu smatraju se pretilima. Najproširenija procjena pretilosti radi se pomoću indeksa tjelesne mase, BMI (od eng. *Body Mass Index*), koji je definiran kao omjer mase osobe i kvadrata njene visine (tablica 1.1.). Pretilost je rizični faktor za kronične bolesti poput dijabetesa, osteoartritisa, bolesti srca, visokog krvnog tlaka, moždanog udara i nekih vrsta raka. Pretilost ima više uzroka. Genetski, okolišni i psihološki čimbenici igraju ulogu u njenom razvoju.

Tablica 1.1. Indeks tjelesne mase i klasifikacija tjelesne težine.

<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Klasifikacija</b>
< 16.00	mršavost III. stupnja
16.00 – 16.99	mršavost II. stupnja
17.00 – 18.49	mršavost I. stupnja
18.50–24.99	primjerena tjelesna masa
25.00–29.99	prekomjerna tjelesna masa I. stupnja
30.00–39.99	prekomjerna tjelesna masa II. stupnja
≥ 40.00	prekomjerna tjelesna masa III. stupnja

Restriktivni i smanjeni unos kalorija i vježbanje najvažniji su u liječenju pretilosti. Kvaliteta prehrane može se poboljšati smanjenom konzumacijom namirnica bogatih jednostavnim šećerima i unosom više vlaknaste hrane. Uz prilagođenu prehranu moguće je

uzimati i lijekove za redukciju apetita ili lijekove za redukciju apsorpcije masti. Ukoliko dijeta, vježbanje i lijekovi nisu učinkoviti, moguća je i operacija podvezivanja želuca i crijeva, čime se smanjuje njihov volumen pa osjećaj sitosti nastupa ranije, a smanjena je i mogućnost apsorpcije nutrijenata iz hrane. Otkriće leptina potaknulo je brojna istraživanja molekularne osnove kontrole tjelesne težine. S obzirom da većina pretilih ljudi ima visoke razine leptina u krvotoku, razumno je pretpostaviti kako postoje druge molekularne komponente koje utječu na osjećaj sitosti i regulaciju tjelesne težine. Zapravo postoji cijela mreža signala koji doprinose homeostazi tjelesne težine i koje tek treba istražiti. Miševi su se pokazali jako korisnim modelom za ljudsku pretilost i na njima se vrši većina istraživanja. Tržište lijekovima koji bi efikasno tretirali pretilost je izuzetno veliko i aktivno se traže farmakološke mete za nove terapije. Pretilost je vodeći globalni uzrok smrti kojeg je moguće spriječiti, a sve je više pretilih odraslih osoba, ali i djece. Američko medicinsko udruženje (AMA, *American Medical Association*) klasificiralo je pretilost kao bolest 2013. godine.

## 1.6 Polimorfizmi gena *LEPR* i pretilost

Leptin ima ključnu ulogu u regulaciji tjelesne težine, no doprinosi polimorfizama *LEPR* gena u pretilosti nisu u potpunosti razjašnjeni, zbog čega su zanimljiv predmet aktualnih istraživanja koja se provode diljem svijeta. Masuo i suradnici (2008), ispitali su povezanost polimorfizama *LEPR* gena, plazmatskog leptina (PL) i tjelesne razine norepinefrina (NE) kao indeksa aktivnosti simpatičkog živčanog sustava u populaciji bijelih muškaraca s različitim vrijednostima BMI. Vrijednosti BMI u istraživanoj skupini kretale su se između 19.4 kg/m<sup>2</sup> i 39.5 kg/m<sup>2</sup>. Proučavani *LEPR* polimorfizmi bili su Gln223Arg, Lys656Asn, i Lys109Arg. Pretili muškarci imali su viši krvni tlak, više razine PL-a i NE-a u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase. U skupini pretelih muškaraca utvrđena je veća frekvencija alela Arg223 i homozigotnog genotipa Arg223 na lokusu Gln223Arg i genotipa Asn656 na lokusu Lys656Asn u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase. Pojedinci homozigotni za alel Arg223 ili Asn656 imali su više razine PL-a, veći omjer struka i bokova, veći BMI, ali i značajno veću razinu NE-a u organizmu. Nije primijećena razlika u distribuciji alela Arg109 na lokusu Lys109Arg između pretile skupine i skupine s normalnom tjelesnom masom. Rezultati ovog i sličnih istraživanja pokazuju kako su polimorfizmi *LEPR* povezani s distribucijom pretilosti u populaciji. Razumno je pretpostaviti kako su polimorfizmi *LEPR* gena važni u razvoju pretilosti putem otpornosti na leptin i smanjene aktivnosti simpatičkog živčanog sustava zbog smanjenog odgovora na koncentraciju leptina.

Polimorfizam Gln223Arg najčešće je istraživani polimorfizam gena *LEPR* i smatra se povezanim s potrošnjom energije u organizmu. Pretila djeca homozigotnog genotipa Gln pokazala su pojačanu oksidaciju masti prije i poslije unosa hrane, što je korisna informacija za prilagođavanje prehrane (Repasy i sur. 2014).

## 1.7 Populacija Roma

Romi su transnacionalna, etnička, manjinska populacija indijskog porijekla nastanjena diljem svijeta. Žive na Srednjem istoku, objema Amerikama, Australiji, dijelovima Afrike, ali najviše ih ima u Europi (pogotovo istočni dijelovi). *Rom* je službeni etnonim od 1970-ih, a znači „čovjek“. Romi su od najranijih trenutaka pojavljivanja u Europi etiketirani kao „lutajući narod bez korijenja“, a distanca i segregacija okružuju romske skupine i dan danas u svim zemljama u kojima žive. Pretpostavlja se da su Romi napustili sjeverozapadnu Indiju, gdje su naseljavali doline uz rijeku Ganges, prije više od tisuću godina zbog čestih vanjskih napada na to područje, ali i zbog unutrašnjih društvenih nemira. Pretpostavlja se da su od 10. do 13. stoljeća prošli Hindukuš, došli do iranskih područja i južnog Kavkaza, a zatim stigli u Bizantsko Carstvo. Turska osvajanja „nosila“ su ih prema Bliskom istoku i do grčkih otoka. U 15. stoljeću Romi su stigli u Zapadnu Europu. Prema nekim procjenama, između dvanaest i šesnaest milijuna Roma danas živi raseljeno po svijetu.

Dolazak Roma u kršćansku Europu za posljedicu je imao donošenje niza represivnih zakona koji su uglavnom ograničavali njihovo kretanje i nametali im različite zabrane. Romi zaista od svog dolaska nisu dobro prihvaćeni u zapadnom svijetu i tijekom vremena iskusili su užase isključivanja, prisilne asimilacije, pa do porobljavanja, a za vrijeme Drugog svjetskog rata i brutalan genocid. Politika prema Romima počela se mijenjati u pozitivnijem smjeru tek relativno nedavno, poglavito zahvaljujući desetljeću za uključivanje Roma, a u kojoj mjeri, ovisi od države do države. Uglavnom se provodi politika integracije Roma u šire društvo, no potrebno je pojačati napore i educirati većinsko stanovništvo o romskom narodu jer je često prisutna duboko ukorijenjena netrpeljivost i nerazumijevanje zbog koje je teško eliminirati diskriminaciju pri zapošljavanju.

Burna povijest i nomadski način života ostavili su traga u romskim zajednicama. Romi su iznimno prilagodljivi sredinama u kojima žive i uglavnom su dvojezični (višejezični), a prihvaćaju i preuzimaju elemente kulture i religije područja u kojem žive (tzv. etnomimikrija). No, vrlo cijene svoju tradiciju i međusobno uglavnom komuniciraju romskim idiomima, a posebno je specifična njihova usmena književnost i tradicionalna glazba (Zajc i sur. 2006).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- Utvrditi spolne razlike za dob i za svih 10 morfoloških dimenzija (visina tijela, težina tijela, opseg nadlaktice, opseg trbuha, opseg bokova, kožni nabor tricepsa, subskapularni kožni nabor, indeks tjelesne mase, omjer opsega trbuha i opsega bokova, te omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora) od kojih su svi, izuzev visine, pokazatelji stupnja uhranjenosti.
- Iz šest mjerenih morfoloških dimenzija (tjelesna visina, tjelesna težina, dva opsega (trbuha i bokova) i dva kožna nabora) izračunati tri izvedena indeksa od kojih je indeks tjelesne mase (BMI) pokazatelj ukupne uhranjenosti, dok su dva indeksa (omjer opsega trbuha i bokova te omjera tricepsa i subskapularnog kožnog nabora) pokazatelji raspodjele masnog tkiva u tijelu (periferna i centralna raspodjela).
- Iz opsega struka te indeksa tjelesne mase kreirati kvalitativne varijable prema standardnim graničnim vrijednostima te utvrditi prevalenciju pretilosti i prekomjerne težine u populaciji Roma koji žive u Republici Hrvatskoj
- Utvrditi učestalosti alela i genotipova polimorfizma *LEPR* 1019 u populaciji Roma koji žive u Republici Hrvatskoj
- Testirati povezanost kvalitativnih pokazatelja uhranjenosti s genotipovima *LEPR* polimorfizma 1019 (chi2-testom). Analiza će se provesti za ukupni uzorak i u spolno odvojenim pod-uzorcima.
- Testirati povezanost kvantitativnih pokazatelja uhranjenosti s genotipovima *LEPR* 1019 polimorfizma (ANOVA i posthoc analiza). Analiza će se provesti na razini ukupnog uzorka korištenjem z-vrijednosti koje su kreirane unutar svakog spola zasebno.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 Uzorak**

Uzorak romske populacije obuhvatio je 206 muškaraca i 207 žena, srednje dobi od 41 godine, iz populacije romskih zajednica koje žive na teritoriju Republike Hrvatske.

Uzorci krvi su prikupljeni na terenima u Zagrebu (2012.) u okviru projekta dobrotvorne zaklade „Nutricia Research Foundation“ pod naslovom: „Debljina kod hrvatskih Roma: interakcija gena leptinskog sustava i biomarkera prehrambenog statusa u različitom okruženju“ (voditeljica: prof. dr. sc. Tatjana Škarić-Jurić), te u Međimurju i Baranji (2005., 2006.) u sklopu projekata „Kompleksna obilježja i zdravlje stanovništva od djetinjstva do duboke starosti“ (MZOS br. 196-1962766-2747, voditeljica: prof.dr.sc. Nina Smolej Narančić) i „Molekularno-genetička obilježja populacija utemeljitelja – Romi kao model“ (MZOS br. 196-1962766-2763, voditeljica prof.dr.sc. Branka Jančićević). U okviru tri navedena projekta osmišljena su i provedena terenska istraživanja Roma Bajaša u Međimurju i Baranji, te balkanskih Roma u Zagrebu. Podatke su prikupljali djelatnici Instituta za antropologiju u suradnji s Uredom za nacionalne manjine Vlade Republike Hrvatske i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo te uz pomoć udruge „Romi za Rome“. Svi ispitanici dobrovoljno su sudjelovali u studiji dajući pri tome informirani pristanak. Sva istraživanja su etički odobrena.

U sklopu terenskih istraživanja napravljena je antropometrija te su izvađeni uzorci krvi za biokemijske analize i izolaciju DNA.



## 3.2 Genotipizacija

Uzorci DNA dobiveni su iz uzoraka pune krvi, metodom isoljavanja (Bago i Herak Bosnar 2007), te su iz izvornih otopina napravljena 10%-tna razrjeđenja, koja su korištena u daljnjim laboratorijskim analizama.

Pregledom sekvence DNA koja se nalazi u blizini istraživanog polimorfizma, ukupne duljine 253 nukleotida, utvrđeno je da polimorfizam ne sadrži restrikcijsko mjesto za poznate restrikcijske enzime te je ono konstruirano pomoću početnica.

Sekvenca početnica je sljedeća:

*Forward* 5'-CAGATCTTGAAAAGGGTTCT-3' (20 nukleotida)

*Reverse* 5'-TCCCATGAGCTATTAGAGAAAGAATCCTTCCA-3' (32 nukleotida)

Sastav reakcijske smjese ukupnog volumena 15  $\mu\text{L}$  bio je sljedeći:

$\text{Mg}^{2+}$  (25  $\mu\text{M}$ ) = 1,5  $\mu\text{L}$

pufer (0.8 M Tris-HCl, 0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) = 1,5  $\mu\text{L}$

dNTP mix (10  $\mu\text{M}$ ) = 0,15  $\mu\text{L}$

početnice (10 $\mu\text{M}$ ) = 0,3  $\mu\text{L}$  *Forward* + 0,3  $\mu\text{L}$  *Reverse*

betain = 1  $\mu\text{L}$

Fire Taq polimeraza = 0,2  $\mu\text{L}$

$\text{dH}_2\text{O}$  = 8,05  $\mu\text{L}$

DNA = 1  $\mu\text{L}$

Po završetku pripreme reakcijske smjese, spremnici s uzorcima su stavljeni u PCR-uređaj prema programu: denaturacija na 95° C tijekom 30 sekundi, prijanjanje na 56° C tijekom 90 sekundi, te elongacija na 72° C tijekom 5 minuta. Nakon petnaest ciklusa, uzorci bi ostali pohranjeni na 4° C, dok ih se ne bi prenijelo na gel za elektroforezu, kako bi se provjerila uspješnost umnažanja.

Elektroforeza za provjeru uspješnosti umnažanja DNA bila je obavljena na agaroznom gelu (1.5% agarozna, 1xTAE pufer (40 mM Tris-HCl, 1mM EDTA,  $\text{dH}_2\text{O}$ ), SYBR Safe boja za DNA), a prilikom nanošenja na gel, uzorci su pomiješani s 1:5 puferom LB za nanošenje DNA na gel. Elektroforeza je trajala 35 min, pri naponu od 70 V i jakosti struje od 150 mA.

Nakon elektroforeze rezultati su očitani pomoću ultraljubičastog svjetla na transiluminatoru.

Umnoženi uzorci bili bi zatim podvrgnuti tretmanu s restrikcijskim enzimom NcoI, čije je restrikcijsko mjesto 5'...C<sup>~</sup>CATGG...3' // 3'...GGTAC<sup>~</sup>C...5', dok je sastav reakcijske smjese ukupnog volumena 15 µL bio sljedeći:

10x pufer K = 1,5 µL (10 mM Tris-HCl pH 8.9, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% BSA)

restrikcijski enzim NcoI = 0,075 µL (10 U/µL)

umnožena DNA = 7 µL

dH<sub>2</sub>O = 6,425 µL

Epruvete s tako pripremljenom smjesom ostavljene su na 4 sata u termostatu na 37° C, kako bi se provela digestija.

Po završetku reakcije, uzorci bi bili nanoseni na nešto gušći gel (2.5% agarozu, 1xTAE pufer (40 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, dH<sub>2</sub>O), SYBR Safe boja za DNA), radi boljeg razdvajanja i veće razlučivosti restrikcijskih fragmenata.

Popis korištenih kemikalija, materijala i uređaja naveden je u tablicama (Tablica 3.1., tablica 3.2. i tablica 3.3.) na kraju odjeljka.

**Tablica 3.1. Korištene kemikalije u PCR reakciji i agaroznoj gel elektroforezi.**

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač</b>
5 x HOT FIREPol <sup>®</sup>	Solis BioDyne
Početnice Pro1019Pro	Gorea plus
dH <sub>2</sub> O	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
Agarozu	Sigma
SYBR <sup>®</sup> safe	Invitrogen
NcoI	TaKaRa
Pufer K	TaKaRa
1000 bp DNA ljestve	Solis BioDyne
Betain	Solis BioDyne
Mg <sup>2+</sup>	Solis BioDyne
Pufer	Solis BioDyne
dNTP	Solis BioDyne

**Tablica 3.2. Korišteni materijali u PCR reakciji i agaroznoj gel elektroforezi.**

<b>Materijal</b>	<b>Proizvođač</b>
Epruvete i poklopci za epruvete za PCR (0,2ml)	Molecular BioProducts
Automatske pipete raznih volumena	Eppendorf
Nastavci za automatske pipete različitih volumena	Eppendorf
Epruveta s poklopcem (1,5ml)	Eppendorf
Pločica za izradu gela	Elchrom Scientific

Češljici za izradu jažica	Elchrom Scientific
---------------------------	--------------------

**Tablica 3.3. Korišteni uređaji u PCR reakciji i agaroznoj gel elektroforezi.**

<b>Uređaj</b>	<b>Proizvođač</b>
Stroj za PCR (TGradient)	Biometra
Stroj za PCR (GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 9700)	Applied Biosystems
Stroj za PCR (GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 2700)	Applied Biosystems
Aparatura za elektroforezu	Elchrom Scientific
Transiluminator TEX 20-MC	Vilber
Kamera PowerShot G1	Canon
Stroj za sekvenciranje (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems
Centrifuga (Labofuge 400R)	Thermo Scientific

### 3.3 Antropometrijska mjerenja

Antropometrijska mjerenja provedena su prema standardnom IBP protokolu (engl. *International Biological Programme*; Weiner i Lourie, 1981.), a uključivala su mjerenje visine i težine tijela, opsega nadlaktice, struka i bokova, te subskapularnog i kožnog nabora tricepsa.

Visina ispitanika izražena u milimetrima mjerena je pomoću stadiometra s rasponom mjerenja 200 cm. Ispitanik je stajao bosonog i skupljenih stopala na vodoravnoj podlozi. Masa izražena u kilogramima s preciznošću od 0,1 kg mjerena je pomoću digitalne vage postavljene na vodoravnu površinu.

Opseg nadlaktice mjeran je na polovištu duljine između vrha ramena i lakta ruke, pri čemu je ruka bila ispružena i opušteno visila uz tijelo. Opseg struka izmjeran je na polovici udaljenosti između posljednjeg rebra i vrha zdjelične kosti. Opseg bokova mjeran je preko najšireg dijela bokova i stražnjice. Svi opsezi izmjerani su nerastezljivom mjernom trakom s preciznošću od 1 mm. Opseg struka i bokova mjeran je u stojećem položaju ispitanika skupljenih nogu, s time da je mjerna traka bila paralelna s podom.

Veličina kožnog nabora tricepsa izmjerena je na polovici duljine stražnje strane nadlaktice. Veličina subskapularnog kožnog nabora izmjerena je na polovici donjeg dijela lopatične kosti, gdje je nabor bio pri kutu od 45°. Vrijednosti oba kožna nabora određene su kaliperom s preciznošću od 0,2 mm.

Iz izmjerenih antropometrijskih vrijednosti izračunata su tri indeksa (BMI, WHR, TSR) koji se koriste kako bi se procijenio stupanj uhranjenosti, te razina centralne i periferne distribucije masnog tkiva u tijelu. Sva tri indeksa ujedno su i pokazatelji zdravstvenog rizika.

#### Indeks tjelesne mase

Indeks tjelesne mase okvirna je kategorija za procjenu uhranjenosti. To je broj koji se dobije kao rezultat omjera mase u kilogramima i kvadrata visine u metrima, prema formuli:

$$\text{Indeks tjelesne mase (BMI)} = \text{masa (kg)} / \text{visina}^2 (\text{m}^2)$$

To je najčešće korištena vrijednost za procjenu osobne uhranjenosti, a pokazala se kao dobar statistički pokazatelj, posebice kod populacijsko-genetičkih istraživanja, te ga koristi i Svjetska Zdravstvena Organizacija (WHO). Kategorizacija razreda uhranjenosti prema indeksu tjelesne mase opisana je ranije u uvodu, no kao fenotipske kategorije u ovom su radu korištene tri granične vrijednosti (BMI = 18.5-24.99 normalna tjelesna masa; BMI = 25-29.99 prekomjerna tjelesna masa; BMI  $\geq$  30 pretilost), prema preporukama Svjetske Zdravstvene Organizacije (*WHO Tech Rep Ser* 1995).

#### Omjer opsega struka i bokova

Omjer opsega struka i bokova koristi se kao procjena raspodjele masnog tkiva u tijelu. S obzirom da je upravo centralna raspodjela masnog tkiva čimbenik rizika za brojne, prvenstveno kardiovaskularne bolesti, ovaj indikator se koristi i kao jedan od dijagnostičkih kriterija za metabolički sindrom. To je broj koji se dobije kao omjer opsega struka i opsega bokova.

Prema nuputcima Svjetske Zdravstvene Organizacije (WHO, 1999), granične vrijednosti za ovaj omjer su: žene  $>0,85$ ; muškarci  $>0,90$ . To znači da se osobama čiji omjer premašuje graničnu vrijednost može (uz prisutnost drugih kriterija) dijagnosticirati metabolički sindrom.

Kod samog opsega struka, također su definirane granične vrijednosti koje predstavljaju kardiovaskularni rizik. One iznose 80 cm za žene i 94 cm za muškarce, pa osobe koje imaju veće vrijednosti od navedenih zadovoljavaju jedan od kriterija za metabolički sindrom te imaju povećani rizik kardiovaskularnih bolesti (IDF – International Diabetes Federation, 2006.).

#### Omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora

Omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora koristi se kao pokazatelj tjelesne raspodjele masnog tkiva. To je broj koji se dobije dijeljenjem veličine kožnog nabora tricepsa s veličinom subskapularnog kožnog nabora. Za ovaj omjer nema definiranih graničnih vrijednosti, no unatoč tome, veće vrijednosti ukazuju na perifernu raspodjelu masnog tkiva u tijelu, a niže na centralnu.

### 3.4 Statistička obrada podataka

U okviru ovog rada provedeno je nekoliko statističkih postupaka. Karakteristike kvantitativnih varijabli prikazane su deskriptivno-statistički pri čemu je značajnost razlika između srednjih vrijednosti muškaraca i žena testirana Studentovim t-testom. Učestalost alela na lokusu *LEPR* 1019 dobivena je prebrojavanjem iz genotipskih vrijednosti. Provjera podvrgavanja frekvencija raspodjele genotipova prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži provjerena je  $\chi^2$  testom s dva stupnja slobode, usporedbom opaženog (O) i očekivanog (E) broja homozigota i heterozigota. Povezanost genotipa *LEPR*1019 polimorfizma sa spolom te s pet kategorijskih varijabli prehrambenog statusa ispitana je Pearsonovim  $\chi^2$  testom. Kako bi se detektiralo postoji li značajna razlika između kvantitativnih vrijednosti mjerenih antropometrijskih varijabli koje su pokazatelji uhranjenosti u odnosu na genotip *LEPR*1019 polimorfizma, provedena je analiza varijance (ANOVA) uz PostHoc test. Kako bi se mogla iskoristiti informacija ukupnog uzorka bez utjecaja spolnih razlika koje su prisutne za gotovo sve ciljne varijable, napravljeno je poravnavanje po spolu. To je postignuto tako da je unutar svakog spola za svaku varijablu njena vrijednost transformirana u z-vrijednost te su potom rezultati oba spola združeni i formirana je tzv. „z-varijabla“ koja pozicionira mjerenu varijablu u jedinicama standardne devijacije. Na prikazani način omogućeno je testiranje povezanosti svake antropometrijske varijable s genotipom bez utjecaja spolnih razlika koje utječu na apsolutne vrijednosti ispitivanih varijabli. U istraživanju je korišten statistički program SPSS 7.5.1.

## 4. REZULTATI

Da bi se ispitala povezanost polimorfizma 1019 *LEPR* gena s tjelesnim karakteristikama na uzorku od 401 osobe (199 muškaraca i 202 žene), analizirani su i uspoređeni antropometrijski podaci i genotip. Antropometrijska mjerenja obuhvatila su dob, visinu, masu, opseg nadlaktice, opseg trbuha, opseg bokova, kožni nabor tricepsa, subskapularni kožni nabor, indeks tjelesne mase, omjer opsega trbuha i opsega bokova te omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora.

U Tablici 4.1. prikazana je deskriptivna statistika kojom se Studentovim t-testom uspoređuje značajnost razlika u srednjim vrijednostima antropometrijskih varijabli između spolova. Podebljane vrijednosti označavaju statistički značajne podatke. Iz rezultata je vidljivo da muškarci imaju statistički značajno veće srednje vrijednosti za pet varijabli (visina tijela, težina tijela, opseg nadlaktice, opseg trbuha te omjer opsega trbuha i bokova), dok kod žena takva situacija vrijedi za tri mjerene varijable (kožni nabor tricepsa, subskapularni kožni nabor, te omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora). Dvije antropometrijske varijable nisu pokazale statistički značaj pri usporedbi veličina srednjih vrijednosti, a to su opseg bokova, te indeks tjelesne mase (BMI). Dob obiju spolova bila je 41 godina.

**Tablica 4.1** Deskriptivna statistika za dob i mjerene antropometrijske varijable u uzorku Roma koji žive u RH. Prikaz je dan za muškarce i žene odvojeno, a značajnost razlike testirana je Studentovim t-testom.

redosljed	Varijabla	Muškarci (N = 206)		Žene (N= 207)		razina značajnosti p-vrijednosti
		X	SD	X	SD	
1	Dob (god.)	40,65	13,72	40,60	13,61	ns
2	Visina tijela (cm)	<b>168,98</b>	6,37	155,17	6,26	***
3	Težina tijela (kg)	<b>78,75</b>	17,06	64,47	14,88	***
4	Opseg nadlaktice (cm)	<b>31,07</b>	3,91	28,81	4,42	***
5	Opseg trbuha (cm)	<b>96,484</b>	13,90	89,09	15,05	***
6	Opseg bokova (cm)	100,20	8,72	101,59	11,77	ns
7	Kožni nabor tricepsa (mm)	10,94	5,25	<b>19,39</b>	8,55	***
8	Subskapularni kožni nabor (mm)	21,28	11,33	<b>23,83</b>	11,73	*
9	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,50	5,32	26,80	6,19	ns

10	Omjer opseg trbuha / opseg bokova	<b>0,96</b>	0,08	0,87	0,08	***
11	Omjer KN triceps/ KN subskapularni	0,58	0,21	<b>0,88</b>	0,29	***

BMI: indeks tjelesne mase; KN: kožni nabor; p – vrijednost: statistička mjera u postupku provjeravanja hipoteze; \*: p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; ns: nije statistički značajno

Analizirana je prisutnost genotipova i alela za polimorfizam *LEPR1019*, te njihova podudarnost s očekivanjima Hardy-Weinbergove ravnoteže metodom Chi<sup>2</sup> – testa. Rezultati su prikazani u Tablici 4.2., te potvrđuju da se populacija hrvatskih Roma nalazi u Hardy-Weinberg ravnoteži za ovaj polimorfizam.

**Tablica 4.2. Učestalosti genotipova i alela polimorfizma *LEPR1019*.**

	Genotipovi			Aleli		HW	
	CC	CT	TT	C	T	Chi <sup>2</sup>	p
N = 401	207	170	24			2,0165	0,1556
%	51,6	42,4	6,0	73	27		

HW: Hardy-Weinberg ravnoteža; Chi<sup>2</sup>: statistička mjera u postupku provjeravanja hipoteze; p: p-vrijednost

**Tablica 4.3. Raspodjela genotipova *LEPR1019* u odnosu na raspodjelu standardnih kategorija za indeks tjelesne mase (BMI), opseg struka (opseg struka – II) i omjer opsega struka i bokova (WHR), za ukupni uzorak, te zasebno za muškarce i za žene, analizirano Chi<sup>2</sup> testom.**

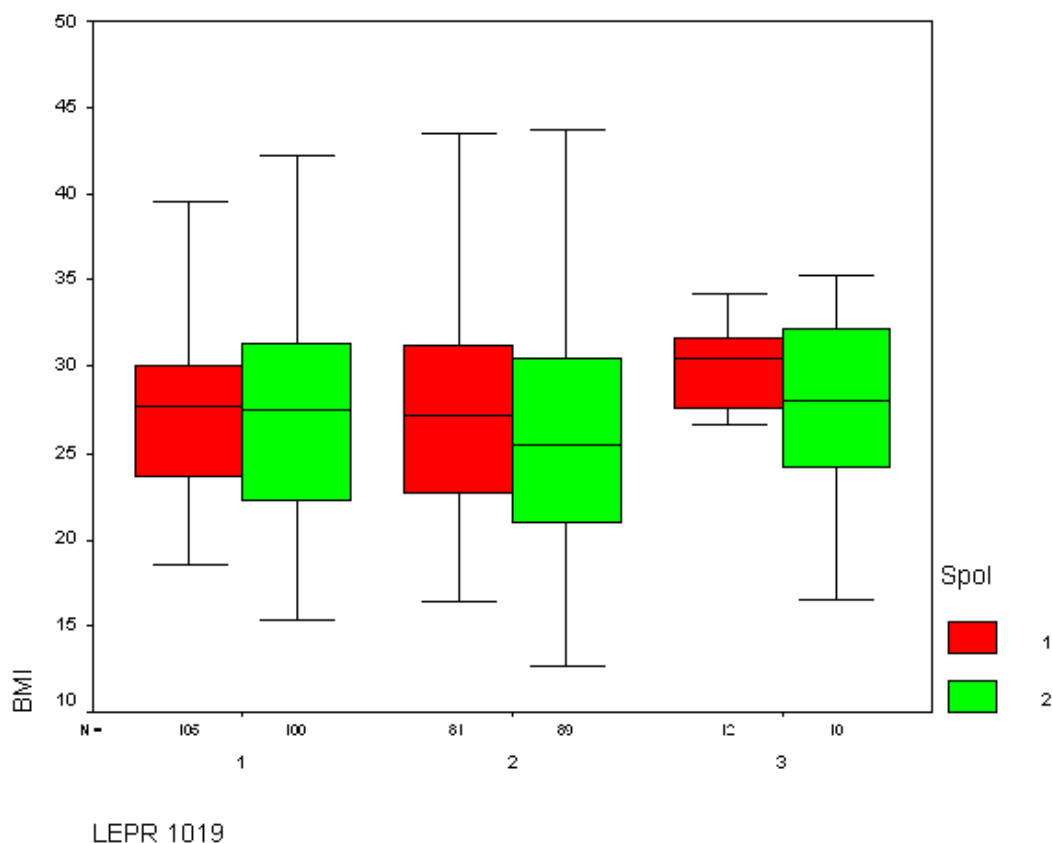
Spol / Rizični fenotip	Usporedba genotipova	Ukupni uzorak (p vrijednosti)	Muškarci (p vrijednosti)	Žene (p vrijednosti)
Muškarci vs. Žene	CC vs. CT vs. TT	0,754	-	-
	CC vs. CT, TT	0,649	-	-
	TT vs. CT, CC	0,646	-	-
BMI_123	CC vs. CT vs. TT	0,058	<b>0,035</b>	0,551
	CC vs. CT, TT	0,563	0,262	0,530
	TT vs. CT, CC	<b>0,037</b>	<b>0,019</b>	0,512
BMI25	CC vs. CT vs. TT	<b>0,023</b>	0,067	0,326
	CC vs. CT, TT	0,356	0,582	0,489
	TT vs. CT, CC	<b>0,024</b>	<b>0,044</b>	0,262
BMI30	CC vs. CT vs. TT	0,071	<b>0,027</b>	0,411
	CC vs. CT, TT	0,990	0,260	0,260
	TT vs. CT, CC	<b>0,027</b>	<b>0,008</b>	0,675
WHR(WHO)	CC vs. CT vs. TT	0,390	0,741	0,426
	CC vs. CT, TT	0,209	0,782	0,193
	TT vs. CT, CC	0,829	0,534	0,686
OP. STRUKA –II	CC vs. CT vs. TT	0,380	0,087	0,680



	CC vs. CT, TT	0,739	0,205	0,389
	TT vs. CT, CC	0,164	<b>0,037</b>	0,973

BMI: indeks tjelesne mase; WHR: omjer opsega struka i bokova; op. struka – II: opseg struka;  
 CC: homozigotni genotip koji ima samo alel C; CT: heterozigotni genotip s C i T alelima; TT: homozigotni genotip koji ima samo alel T; podebljane vrijednosti: statistički značajne vrijednosti.

Rezultati testiranja povezanosti genotipova *LEPR1019* u odnosu na raspodjelu standardnih kategorija za indeks tjelesne mase (BMI), opseg struka (opseg struka – II) i omjer opsega struka i bokova (WHR), za ukupni uzorak, te zasebno za muškarce i za žene prikazani su u Tablici 4.3. Rezultati su pokazali da ne postoji razlika u raspodjeli genotipova polimorfizma *LEPR1019* između muškaraca i žena. Pearsonov  $\chi^2$  test je pokazao kod muškaraca značajnu razliku u raspodjeli genotipova kad je riječ o tri kategorije indeksa tjelesne mase (BMI) ( $p=0,035$ ), te da se genotip TT ističe u odnosu na ostala dva i u ukupnom uzorku ( $p=0,037$ ) i kod muškaraca ( $p=0,019$ ). Iako u populaciji žena nije pokazana značajna povezanost ovog polimorfizma niti s jednim od tri ispitivana indeksa, značajnost povezanosti raspodjele genotipova *LEPR1019* s kategorijama indeksa tjelesne mase (BMI) kod muškaraca bila je dovoljno velika da se reflektira i na razini ukupnog uzorka. Nadovezujući se na ta opažanja, slijede i rezultati za kategoriju prekomjerne tjelesne mase, gdje je značajnost razlike tri genotipa za ukupni uzorak iznosila  $p=0,023$ . U istoj kategoriji TT genotip ponovno odskače i u ukupnom uzorku ( $p=0,024$ ) i u populaciji muškaraca ( $p=0,044$ ). Na isti način su se razlikovale pretile od ne-pretelih osoba, gdje je genotip pokazao statistički značajnu povezanost kod muškaraca ( $p=0,027$ ), dok se genotip TT u usporedbi s ostala dva pokazao statistički značajnim i na ukupnom uzorku ( $p=0,027$ ) i kod muškaraca ( $p=0,008$ ). Kod omjera opsega struka i bokova nije pokazana statistička značajnost raspodjele genotipova niti za jedan uzorak. Kad je riječ o opsegu struka, kod muškaraca je pokazana statistička značajnost genotipa TT u odnosu na ostala dva ( $p=0,037$ ). Kategorizacija je napravljena prema standardnim graničnim vrijednostima koje se u medicini koriste kao mjerilo za rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti.



**Slika 4.1. Srednje vrijednosti indeksa tjelesne mase u odnosu na genotip *LEPR1019* (CC = 1, CT = 2, TT = 3). Prikaz za muškarce (1) i žene (2) odvojeno.**

BMI: indeks tjelesne mase

Iz slike 4.1. je vidljivo da muškarci genotipa TT imaju prosječno viši indeks tjelesne mase (BMI), te da im je raspon relativno uzak u usporedbi s ostalim genotipovima. Takva situacija nije vidljiva kod žena, što implicira i spolnu razliku u povezanosti pretilosti s polimorfizmom *LEPR1019*.

U ukupnom uzorku od 401 ispitanika prikazana je raspodjela genotipova prema indeksu tjelesne mase (BMI) razvrstanom u tri kategorije (tablica 4.4.). Vidljivo je da su tri kategorije BMI gotovo podjednako raspodijeljene, te da je prevalencija prekomjerne težine u ovoj populaciji iznosi 31,7%, pretilosti 29,9%, dok je samo 38,4% osoba normalne tjelesne težine.

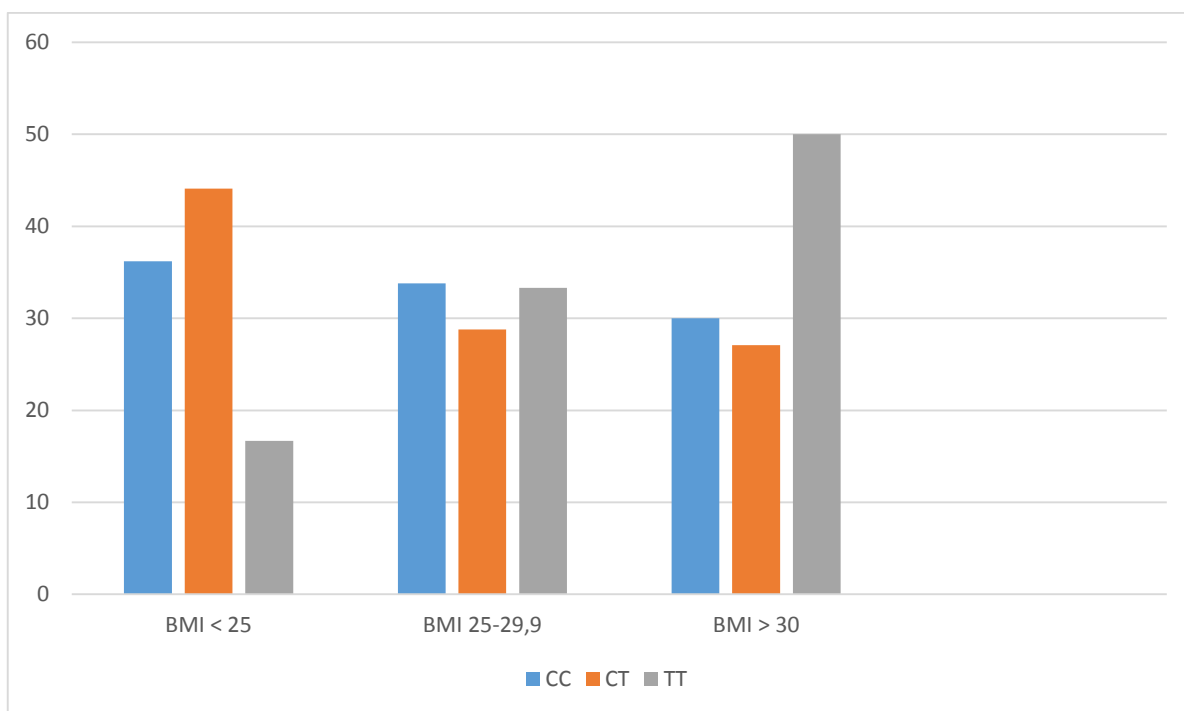
**Tablica 4.4. Povezanost genotipova *LEPR* s tri kategorije indeksa tjelesne mase (BMI) u ukupnom uzorku (Chi<sup>2</sup>-test)**

		CC	CT	TT	Ukupno
BMI <25	Izmjereni broj:	75	75	4	154
	Očekivani broj:	79,5	65,3	9,2	154
	Postotni udio:	36,2%	44,1%	16,7%	<b>38,4%</b>
BMI 25-29.9	Izmjereni broj:	70	49	8	127
	Očekivani broj:	65,6	53,8	7,6	127
	Postotni udio:	33,8%	28,8%	33,3%	<b>31,7%</b>
BMI >30	Izmjereni broj:	62	46	12	120
	Očekivani broj:	61,9	50,9	7,2	120
	Postotni udio:	30,0%	27,1%	50,0%	<b>29,9%</b>
Ukupno	Izmjereni broj:	207	170	24	401
	Očekivani broj:	207	170	24	401
	Postotni udio:	100%	100%	100%	100%

$\chi^2 = 9,108$ ;  $df = 4$ ;  $p = 0,058$

BMI: indeks tjelesne mase

Raspodjela genotipova *LEPR*1019 prema BMI pokazuje da se kod genotipa CC u svakoj od tri kategorije indeksa tjelesne mase (BMI) nalazi podjednaki broj ispitanika, dok je kod genotipa TT jasno prisutna gradacija u zastupljenosti prema varijabli BMI. Naime, samo četiri ispitanika koji imaju genotip TT (16,7%) imaju vrijednost BMI ispod 25, dok ih je trećina (33,3%) u kategoriji između 25 do 29,9, a čak polovica (50%) u razredu s BMI vrijednosti iznad 30. Statistička značajnost je granična ( $p$ -vrijednost = 0,058), te se može naslutiti kako homozigotni genotip TT nosi određeni zdravstveni rizik. Ovaj odnos prikazan je grafički (slika 4.2.), pri čemu se ističe niska učestalost genotipa TT kod osoba normalne tjelesne mase (BMI<25) i njegova visoka učestalost kod pretilih osoba (BMI>30)



**Slika 4.2. Postotna zastupljenost genotipova *LEPR* (homozigoti CC i TT, te heterozigoti CT) unutar tri kategorije indeksa tjelesne mase (BMI) u ukupnom uzorku.**

Isti ovaj odnos prikazan je u tablici 4.5. i slici 4.3., samo za muškarce (199 ispitanika) s obzirom da je utvrđeno (tablica 4.3.) da kod ovog spola relacija između BMI i polimorfizma *LEPR1019* ima statistički značajnu razinu.

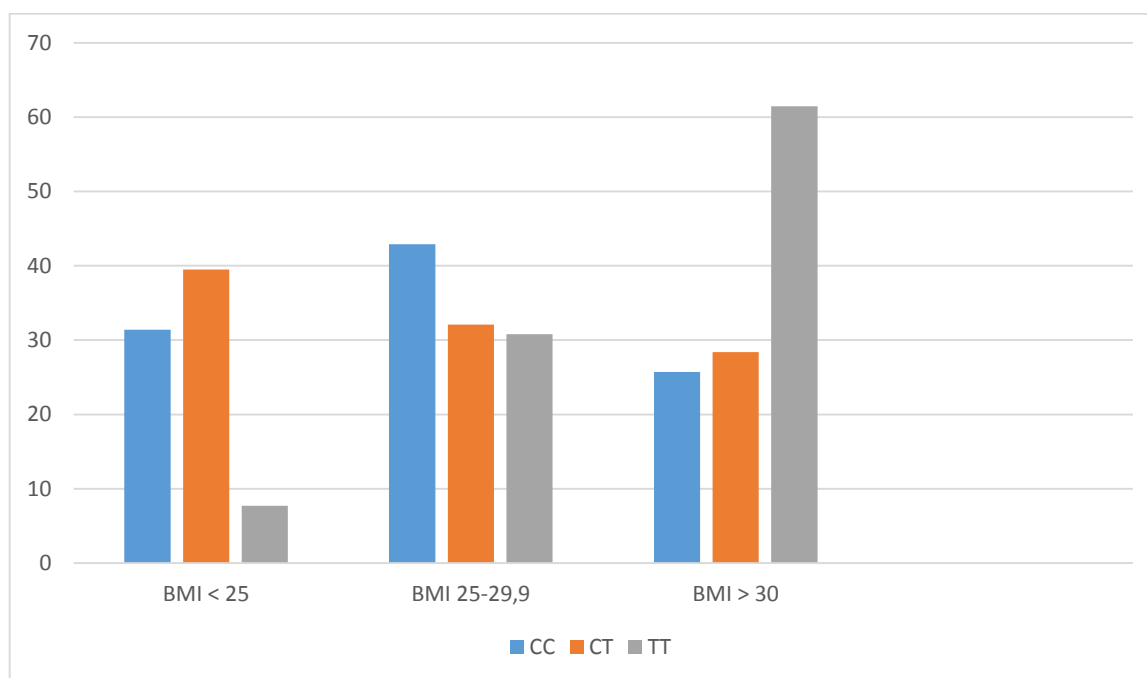
Kada se odvojeno promatra muški spol (tablica 4.5., slika 4.3.), jasno je vidljiva povezanost pretilosti s genotipom. Vidimo da kod genotipova CC i CT postoji približno podjednaka raspodjela tri kategorije BMI vrijednosti, dok je kod genotipa TT razlika izražena. Sa samo 7,7% ispitanika u prvoj, i čak 61,5% u kategoriji pretilih, čini se da ovaj genotip predstavlja izraziti zdravstveni rizik za muškarce. Takva distribucija je statistički značajna ( $p$ -vrijednost = 0,035) i upućuje na zdravstvene rizike koji za muškarce proizlaze iz *LEPR1019* polimorfizma.

**Tablica 4.5. Prikaz povezanosti genotipova *LEPR* s tri kategorije indeksa tjelesne mase (BMI) kod muškaraca (Chi<sup>2</sup>-test)**

		CC	CT	TT	Ukupno
BMI <25	Izmjereni broj:	33	32	1	66
	Očekivani broj:	34,8	26,9	4,3	66
	Postotni udio:	31,4%	39,5%	7,7%	33,2%
BMI 25-29.9	Izmjereni broj:	45	26	4	75
	Očekivani broj:	39,6	30,5	4,9	75
	Postotni udio:	42,9%	32,1%	30,8%	37,7%
BMI >30	Izmjereni broj:	27	23	8	58
	Očekivani broj:	30,6	23,6	3,8	58
	Postotni udio:	25,7%	28,4%	61,5%	29,1%
Ukupno	Izmjereni broj:	105	81	13	199
	Očekivani broj:	105	81	13	199
	Postotni udio:	100%	100%	100%	100%

$$\chi^2 = 10,322; df = 4; p = 0,035$$

BMI: indeks tjelesne mase



**Slika 4.3. Prikaz postotne zastupljenosti genotipova *LEPR* (homozigoti CC i TT, te heterozigoti CT) unutar tri kategorije indeksa tjelesne mase (BMI) u uzorku muškaraca.**

## Rezultati ANOVA i PostHoc testa na ukupnom uzorku

Analiza varijance (ANOVA) mjerenih, kvantitativnih vrijednosti tjelesnih karakteristika povezanih s uhranjenošću i ispitivanog polimorfizma *LEPR* gena pokazala je na razini ukupnog uzorka rezultate koji su prikazani u tablicama 4.6. – 4.12.

Tablica 4.6. pokazuje da postoji povezanost između genotipa i BMI (p-vrijednost = 0,043), te da su osobe genotipa TT sklonije većoj vrijednosti indeksa tjelesne mase u odnosu na osobe koje nose genotip CT (p-vrijednost = 0,018). Nadalje, utvrđena je i veza između subskapularnog kožnog nabora (Tablica 4.7.), gdje ponovno osobe genotipa TT imaju više vrijednosti u odnosu na genotipove CC i CT, što upućuje na rizik genotipa TT za centralno nakupljanje masnog tkiva.

Iako kod ostalih varijabli ANOVA nije dostigla razinu statističke značajnosti, ona je kod tri varijable bila graničnih vrijednosti, pri čemu je Post Hoc analiza pokazala da se genotip TT ističe kao rizičan u odnosu na genotip CT. Riječ je o kožnom naboru tricepsa (Tablica 4.8.), opsegu nadlaktice (Tablica 4.9.) i opsegu trbuha (Tablica 4.10.). S obzirom da prve dvije varijable upućuju na perifernu distribuciju masnog tkiva, a opseg trbuha na centralnu, ovi rezultati ukazuju da genotip TT povećava rizik razvoja i periferne i centralne pretilosti.

Kod omjera opsega trbuha i bokova (Tablica 4.11.) i kod omjera kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora (Tablica 4.12.) nije pronađena povezanost s genotipovima polimorfizma *LEPR1019*, stoga se može zaključiti da je genotip TT, posebice u odnosu na genotip CT, rizični faktor za povećane razine masnog tkiva, a ne utječe na njegovu raspodjelu.

**Tablica 4.6 Usporedba z-vrijednosti indeksa tjelesne mase s genotipom kod ispitanika iz ukupnog uzorka testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti indeksa tjelesne mase pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

<i>LEPR1019</i> genotip	N	z-BMI X	z-BMI SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	205	0,0345	0,9281		-	0,165	0,079
CT (2)	170	-0,1092	1,0655		0,165	-	0,018
TT (3)	22	0,4287	1,0697	0,043	0,079	0,018	-

z-BMI: z-vrijednost indeksa tjelesne mase

**Tablica 4.7 Usporedba z-vrijednosti subskapularnog kožnog nabora s genotipom kod ispitanika iz ukupnog uzorka testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti subskapularnog kožnog nabora pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-KNSUB X	z-KNSUB SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	205	0,0185	0,9841		-	0,126	0,002
CT (2)	167	-0,1398	0,9646		0,126	-	0,000
TT (3)	24	0,6925	1,1920	0,001	0,002	0,000	-

z-KNSUB: z-vrijednost subskapularnog kožnog nabora

**Tablica 4.8 Usporedba z-vrijednosti kožnog nabora tricepsa s genotipom kod ispitanika iz ukupnog uzorka testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti kožnog nabora tricepsa pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-KNTRIC X	z-KNTRIC SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	203	0,0197	0,9655		-	0,278	0,122
CT (2)	158	-0,0940	0,9696		0,278	-	0,044
TT (3)	20	0,3773	1,2615	0,111	0,122	0,044	-

z-KNTRIC: z-vrijednost kožnog nabora tricepsa

**Tablica 4.9 Usporedba z-vrijednosti opsega nadlaktice s genotipom kod ispitanika iz ukupnog uzorka testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti opsega nadlaktice pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-OPNADL X	z-OPNADL SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	206	0,0048	0,9645		-	0,397	0,058
CT (2)	167	-0,0840	1,0285		0,397	-	0,023
TT (3)	23	0,4234	1,1166	0,073	0,058	0,023	-

z-OPNADL: z-vrijednost opsega nadlaktice

**Tablica 4.10 Usporedba z-vrijednosti opsega trbuha s genotipom kod ispitanika iz ukupnog uzorka testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti opsega trbuha pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-OPTRB X	z-OPTRB SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	201	0,0077	0,9892	0,082	-	0,381	0,069
CT (2)	168	-0,0840	1,0072		0,381	-	0,027
TT (3)	23	0,4101	1,0584		0,069	0,027	-

z-OPTRB: z-vrijednost opsega trbuha

**Tablica 4.11 Usporedba z-vrijednosti omjera opsega trbuha i opsega bokova s genotipom kod ispitanika iz ukupnog uzorka testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti omjera opsega trbuha i opsega bokova pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-WHR X	z-WHR SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	200	0,0209	0,9871	0,790	-	0,524	0,909
CT (2)	167	-0,0460	1,0005		0,524	-	0,684
TT (3)	22	0,0467	1,2279		0,909	0,684	-

z-WHR: z-vrijednost omjera opsega trbuha i opsega bokova

**Tablica 4.12 Usporedba z-vrijednosti omjera kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora s genotipom kod ispitanika iz ukupnog uzorka testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti omjera kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-TRCSB X	z-TRCSB SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	200	-0,0200	1,0304	0,158	-	0,300	0,168
CT (2)	156	0,0912	0,9844		0,300	-	0,068
TT (3)	20	-0,3430	0,7463		0,168	0,068	-

z-TRCSB: z-vrijednost omjera kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora



## Rezultati ANOVA i PostHoc testa kod muškaraca

Kad se muškarci promatraju kao zasebno ispitivana skupina, testovi nisu pokazali statističku značajnost povezanosti genotipa TT s BMI (Tablica 4.13.), iako postoji granična vrijednost pri usporedbi genotipa TT i CT (p-vrijednost = 0,059), što s obzirom na veličinu uzorka sugerira da bi ipak mogla postojati veza između spola, genotipa i indeksa tjelesne mase.

Međutim, kod specifičnih antropometrijskih veličina koje upućuju na centralno nakupljanje masnog tkiva, rezultati su jednoznačni. Subskapularni kožni nabor (Tablica 4.14.) se pokazao kao veličina pod utjecajem genotipa, i to na razini ukupnog uzorka (p-vrijednost = 0,001), a i pri usporedbi pojedinih genotipova, gdje genotip TT ima značajno više srednje vrijednosti u odnosu na oba preostala genotipa (p-vrijednost = 0,000).

Slični podaci slijede i za opseg trbuha (Tablica 4.17.), gdje se na razini uzorka muškaraca vidi značaj povezanosti genotipa s ovom veličinom (p-vrijednost = 0,020), a i posebni pri usporedbi različitih genotipova: TT vs. CC (p-vrijednost = 0,006), te TT vs. CT (p-vrijednost = 0,007). Iako u uzorku muškaraca nije pronađena statistička značajnost povezanosti genotipa s omjerom kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora (Tablica 4.18.), genotip TT se ponovo ističe pri usporedbi pojedinih genotipova, što također ide u prilog tezi da osobe s genotipom TT imaju izraženiju predispoziciju za centralno nakupljanje masnog tkiva.

U suprotnosti s centralnim nakupljanjem, nisu pronađeni statistički značajni rezultati analize varijance kad je riječ o perifernom nakupljanju masnog tkiva. Tako da ni kod kožnog nabora tricepsa (Tablica 4.15.), niti kod opsega nadlaktice (Tablica 4.16.) nije utvrđena značajnost povezanosti genotipa s tim varijablama niti na razini usporedbe sva tri genotipa, niti pri usporedbi pojedinih genotipova.

Premda je genotip TT u odnosu na ostala dva genotipa pokazao više vrijednosti omjera opsega trbuha i bokova (Tablica 4.19.), ta relacija nije dostigla granicu statističke značajnosti.

**Tablica 4.13 Usporedba z-vrijednosti indeksa tjelesne mase s genotipom kod ispitanika iz uzorka muškaraca testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti indeksa tjelesne mase pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-BMI X	z-BMI SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	105	-0,0160	0,8886		-	0,788	0,074
CT (2)	81	-0,0550	1,1394		0,788	-	0,059
TT (3)	12	0,5330	0,9711	0,163	0,074	0,059	-

z-BMI: z-vrijednost indeksa tjelesne mase

**Tablica 4.14 Usporedba z-vrijednosti subskapularnog kožnog nabora s genotipom kod ispitanika iz uzorka muškaraca testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti subskapularnog kožnog nabora pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-KNSUB X	z-KNSUB SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	104	-0,0540	0,9248		-	0,805	0,000
CT (2)	81	-0,0890	0,9976		0,805	-	0,000
TT (3)	13	0,9689	1,2791	0,001	0,000	0,000	-

z-KNSUB: z-vrijednost subskapularnog kožnog nabora

**Tablica 4.15 Usporedba z-vrijednosti kožnog nabora tricepsa s genotipom kod ispitanika iz uzorka muškaraca testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti kožnog nabora tricepsa pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-KNTRIC X	z-KNTRIC SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	103	-0,0038	0,9675		-	0,787	0,414
CT (2)	77	-0,0440	0,9621		0,787	-	0,353
TT (3)	11	0,2497	1,1679	0,648	0,414	0,353	-

z-KNTRIC: z-vrijednost kožnog nabora tricepsa

**Tablica 4.16 Usporedba z-vrijednosti opsega nadlaktice s genotipom kod ispitanika iz uzorka muškaraca testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti opsega nadlaktice pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-OPNADL X	z-OPNADL SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	105	0,0190	0,9528		-	0,783	0,100
CT (2)	81	-0,0600	1,0790		0,783	-	0,079
TT (3)	13	0,4704	0,9625	0,208	0,100	0,079	-

z-OPNADL: z-vrijednost opsega nadlaktice

**Tablica 4.17 Usporedba z-vrijednosti opsega trbuha s genotipom kod ispitanika iz uzorka muškaraca testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti opsega trbuha pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-OPTRB X	z-OPTRB SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	104	-0,0570	0,9364		-	0,990	0,006
CT (2)	81	-0,0590	1,0601		0,990	-	0,007
TT (3)	13	0,7520	1,0715	0,020	0,006	0,007	-

z-OPTRB: z-vrijednost opsega trbuha

**Tablica 4.18 Usporedba z-vrijednosti omjera kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora s genotipom kod ispitanika iz uzorka muškaraca testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti omjera kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

LEPR1019 genotip	N	z-TRCSB X	z-TRCSB SD	p-vrijednost (sve skupine)	p-vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p-vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p-vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	102	0,0391	1,0116		-	0,841	0,033
CT (2)	76	0,0694	1,0055		0,841	-	0,029
TT (3)	11	-0,6377	0,7139	0,084	0,033	0,029	-

z-TRCSB: z-vrijednost omjera kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora

**Tablica 4.19 Usporedba z-vrijednosti omjera opsega trbuha i opsega bokova s genotipom kod ispitanika iz uzorka muškaraca testirana ANOVA testom te usporedba z-vrijednosti omjera opsega trbuha i opsega bokova pojedinih genotipova testirana PostHoc testom.**

<i>LEPR1019</i> genotip	N	z-WHR X	z-WHR SD	p- vrijednost (sve skupine)	p- vrijednost (1 vs. 2 i 3)	p- vrijednost (2 vs. 1 i 3)	p- vrijednost (3 vs. 1 i 2)
CC (1)	103	-0,0460	0,9316		-	0,984	0,077
CT (2)	80	-0,0490	1,0486		0,984	-	0,080
TT (3)	12	0,4984	1,3090	0,193	0,077	0,080	-

z-WHR: z-vrijednost omjera opsega trbuha i opsega bokova

## 5. RASPRAVA

### 5.1 Genotip TT, pretilost i implikacije

Osobe oba spola romske populacije u Hrvatskoj koje imaju TT genotip sklonije su biti pretile, a muškarci imaju statistički veće šanse biti pretili od žena. Također, muškarci koji su homozigoti za T alel imaju veće šanse za centralno nakupljanje masnog tkiva od muškaraca koji imaju jedan ili dva C alela. S obzirom da je riječ o tihoj mutaciji, koja ne mijenja aminokiselinu koja se ugrađuje u nastajući protein, nije lako objasniti zašto je tome tako. Jedno od mogućih objašnjenja moglo bi biti da dolazi do poteškoća u tRNA za taj kodon ili da se događa problem u mreži djelovanja s drugim genima zbog odsutnosti C alela. O raznim mogućnostima i utjecajima genotipa za leptinski receptor raspravlja se u nastavku poglavlja.

Pretilost je stanje organizma s prekomjernim udjelom masnog tkiva u tijelu. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije, u 2014. godini otprilike 39% svjetske populacije bilo je prekomjerne tjelesne mase, a 13% pretilo. Imajući ove podatke u vidu, Romska populacija u Hrvatskoj, s udjelom pretilih od 30% (BMI 30+) i osoba koje imaju prekomjernu tjelesnu masu od 32% (BMI 25 – 29,99), daleko premašuje navedene svjetske prosjeke, što sugerira da je riječ o populaciji koja pripada skupini s posebno visokim dugoročnim zdravstvenim rizicima. Naime, pretilost je česti čimbenik rizika za mnoge bolesti, od kojih su najčešće bolesti srca i krvožilnog sustava, dijabetes tipa 2, neki tipovi raka (pr. dojke, debelog crijeva) i osteoartritis. Stoga je posebno zabrinjavajući podatak da je oko 42 milijuna djece u svijetu u dobi do pet godina također prekomjerne tjelesne mase ili pretilo.

Iako su dva glavna uzroka pretilosti očividna i poznata od davnina (prekomjeran unos hrane i nedovoljno bavljenje tjelesnim aktivnostima), u provedenoj studiji (Keith i sur. 2006) identificirano je dodatnih deset mogućih čimbenika koji utječu na opće povećanje zastupljenosti pretilih u ljudskoj populaciji. To su nedostatak sna, stvari koje utječu na endokrini sustav (prvenstveno razni kemijski zagađivači prisutni u okolišu), smanjena varijabilnost u temperaturi boravišnog prostora, smanjena stopa pušenja cigareta (koje blokiraju apetit), povećanje uzimanja lijekova koji pogoduju debljanju (pr. atipični antipsihotici), proporcionalno povećanje etničkih i dobnih skupina koja imaju predispoziciju

imati veću tjelesnu masu, trudnoće u kasnijoj dobi, epigenetski faktori, prirodna selekcija za viši indeks tjelesne mase, te pozitivan fenotipski odabir reproduktivnih partnera.

S genetičke točke gledišta, pretilost je pod utjecajem višestrukih setova gena. U istraživanju tog tipa (Yako i sur. 2015) identificirano je preko 240 polimorfizama u 42 gena koji utječu na fenotipske karakteristike i povezuju se s pretilošću. Geni mogu djelovati na različite grupe procesa poput stimuliranja apetita, potrošnje energije, stimulacije metabolizma i stimulacije adipogeneze.

Osim direktnih utjecaja na „fitness“ jedinke, kao što su zdravstveno stanje, plodnost i mortalitet, tjelesna kompozicija je značajna i kod privlačnosti, a ima utjecaja i na kognitivne sposobnosti djece. Posebno je važna veličina omjera opsega trbuha i bokova (WHR), čija niža vrijednost je kod žena konzistentni marker više razine estrogena (Singh 1993). Premda sklonosti muškaraca prema ženama različitih fenotipskih karakteristika variraju u ovisnosti o kulturološkom miljeu iz kojeg dolaze, WHR se pokazao kao univerzalni unutarnji klasifikator za procjenu privlačnosti žene. Nadalje, istraživači su u studiji na podacima iz američkih bolnica (Lassek i Gaulin 2008) pokazali da djeca čije majke imaju široke bokove i nizak WHR ostvaruju najbolje rezultate na testovima kognitivnih sposobnosti i inteligencije. Kao mogući uzrok toga, navode zalihe masti na bokovima, koje sadrže dugolančane nezasićene masne kiseline, ključne za razvoj fetusovog mozga.

Izuzev bioloških i zdravstvenih utjecaja, u posljednje vrijeme sve je veći utjecaj pretilosti i na ekonomiju i ekonomska zbivanja. S obzirom na iznimno velik broj pretilih ljudi, troškovi njihova liječenja i s time povezani poslovni gubitci su vrtoglavi i broje se u milijardama. U SAD-u su troškovi liječenja povezanih s pretilosti iznosili oko 200 milijardi američkih dolara, tj. 20,4% ukupnih medicinskih troškova (Cawley 2005), a studija na zaposlenicima Sveučilišta Duke (Ostbye i sur. 2007) pokazala je da su ljudi s BMI iznad 40 imali dvostruko više plaćenih bolovanja i izbivanja s radnog mjesta, te dvanaest puta više izgubljenih radnih dana od suradnika u kategoriji 18.5-24.9 BMI. Najčešće ozljede pretilih ljudi događaju se tijekom padova ili podizanja predmeta, prilikom čega se događaju povrede nogu, zapešća ili ruku, te leđa.

## 5.2 Leptinski receptor

Gen za leptinski receptor i njegovi polimorfizmi zanimljivo su područje za istraživanje. Nakon otkrića leptina, koji je bio obećavajuća meta za tretman pretilosti, utvrđeno je da su pretili ljudi neosjetljivi tj. rezistentni na razine leptina u serumu. To je usmjerilo znanstvena istraživanja prema drugom dijelu metaboličkog signalnog puta - leptinskom receptoru. Do danas su obavljena mnoga istraživanja, kao i meta-analize, no rezultati nisu jednoznačni. Tako je meta-analiza (Yang i sur. 2011) polimorfizma *LEPR* 1019 i pretilosti kod kineske Han populacije pokazala značajnu povezanost, što je u skladu i s nalazima ovog rada.

Studija provedena u Brazilu (Mattevi i sur. 2002), na uzorku od 336 ispitanika europskog porijekla pokazuje nešto drukčije rezultate. Proučavani su polimorfizmi *LEP* A19G, *LEPR* Gln223Arg, *LEPR* Pro1019Pro i *NPY* Leu7Pro, no utjecaj na BMI je pronađen samo kod polimorfizma *LEPR* Gln223Arg, dok za ostale nije utvrđen. Kako predlažu, to je moguće zato što se kod polimorfizma Gln223Arg događa promjena aminokiselina na dijelu blizu citokinskih motiva koji su nužni za vezanje leptina. Zbog toga je možda narušen signalizacijski kapacitet, te dolazi do drukčijeg odgovora, pa posljedično i pretilosti.

S druge strane, u opsežnom sistematskom pregledu i meta-analizi (Yu i sur. 2012), nije uočena povezanost polimorfizama adipokinskih gena (*LEP*, *LEPR* i *RETN*) sa sklonosti ka pretilosti. U istom je istraživanju sklonost pretilosti dovedena u vezu s polimorfizmima *ADIPOQ* i *TNF- $\alpha$* , što samo potvrđuje kompleksnost mreže međudjelovanja različitih gena u razvoju tako složenog poremećaja.

S obzirom na to da je pretilost stanje organizma koje može biti podloga za razvoj raznih drugih bolesti, interesantno je provjeriti postoji li ikakva povezanost na genetskoj razini s bolestima. Istraživanje provedeno u Koreji (Woo i sur. 2006) pokušalo je dovesti u vezu razinu leptina u krvi, polimorfizme gena za leptinski receptor i rak dojke. Dosadašnja su istraživanja pokazala da pretilost pomaže razvoju raka dojke, stoga su ispitani leptin i leptinski receptor kao mogući čimbenici rizika za karcinom dojke. No, rezultati su se pokazali negativnima, tj. nije utvrđena direktna veza između leptina, polimorfizama *LEPR* gena i raka dojke.

Ipak, postoje indicije da je polimorfizam 1019 gena *LEPR* genetska podloga za razvoj teške preeklampsije. Rezultati dobiveni na uzorku od 207 pacijentica s teškom preeklampsijom i 252 zdrave žene (kontrolna grupa), pokazali su da je statistički značajno veći broj genotipa G1019A kod žena s teškom preeklampsijom. Unatoč tome, veza s indeksom tjelesne mase nije pronađena, kao ni povezanost s krvnim tlakom (Guan i sur. 2011).

No, osim navedenih, postoje i mnoge druge bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih poteškoća i ostalih metaboličkih stanja kod kojih bi se mogla provjeriti povezanost genetske podloge leptinskog sustava i pretilosti.

### **5.3 Smjer djelovanja i daljnjih istraživanja**

Iako se unazad posljednjih 20 godina pretilost uvelike istražuje (Yako i sur. 2015) još uvijek ne postoji potpuna jednoznačna slika o načinu i razvoju ovog stanja. Kod istraživanja leptina i leptinskog receptora, nisu svi rezultati pozitivni, no to može biti zavaravajući podatak. Kao multifaktorijalno fenotipsko svojstvo, pretilost je pod utjecajem ne samo mnogo gena koji su uključeni u rad različitih tjelesnih sustava, već i kombinacije rizičnih gena koje različito pridonose konačnoj tjelesnoj konstituciji. Prilikom promatranja izoliranog gena, moguće je da neki drugi gen maskira fenotipsko djelovanje promatranog gena, ili da su određene kombinacije haplotipova sklonije nekom stanju od drugih. Osim genetskih, postoje i okolišni čimbenici koji utječu na količinu tjelesne masnoće, a postoje i problemi s premalenom veličinom uzoraka u istraživanju s obzirom na učinak pojedinih gena na fenotip.

S obzirom da je tjelesna konstitucija kvantitativno (kontinuirano) svojstvo, te kao takvo pod utjecajem velikog broja gena (velikog i malog učinka), otkrića lokusa za kvantitativna svojstva (QTL – quantitative trait loci) u posljednja dva desetljeća bacila su novo svjetlo na varijacije u fenotipu. QTL su dijelovi DNA koji sadrže ili su povezani s genima koji imaju učinak na neko kvantitativno svojstvo, pa je pretpostavka da su polimorfizmi pojedinih nukleotida na tim lokusima osnovni molekularni supstrat za evoluciju. Međutim, takvih lokusa je jako puno i postoje prilične poteškoće u mapiranju svih gena i njihovih interakcija. Osnovna je ideja da će uzorak biti vidljiv i gensko međudjelovanje razjašnjeno kad se sakupi dovoljan broj podataka.



Ipak, danas su genetičke analize osjetno jeftinije, pa samim time i dostupnije, te bi bilo dobro napraviti studije cjelogenomske povezanosti i mreža interakcija. Takve podatke moglo bi se iskoristiti s kliničkim podacima dobivenim iz bolnica, što je napravljeno za ranije opisane kognitivne testove za djecu. Naravno, osim genetskih, vjerojatno će biti potrebno napraviti jednake takve mape za epigenetske faktore i modifikatore koji djeluju na gene od interesa.

Prilikom svih istraživanja kvantitativnih svojstava, važno je paziti na ujednačavanje veličina i vrijednosti, kako bi rezultati bili što reprezentativniji i usklađeniji.

Pretilost je ozbiljan problem na populacijskoj razini. Trenutno u svijetu umire više ljudi od bolesti i stanja koje proizlaze iz pretilosti, nego od pothranjenosti. Štoviše, epidemija pretilosti poprima takve razmjere da se procjenjuje da će generacije rođene u 21. stoljeću biti prve u povijesti čovječanstva kod kojih bi se životni vijek djece mogao početi smanjivati u odnosu na roditelje. Pretilost je moguće spriječiti i to nije nepovratno stanje organizma. Neki od jednostavnih savjeta kojih bi se trebalo pridržavati su: smanjiti unos šećera i masnoća u prehrani, povećati udio vlaknaste hrane i voća, te redovito bavljenje tjelesnim aktivnostima.

S obzirom da je riječ o pojavi koja zahvaća društvo u cijelosti, u prevenciji bi trebale sudjelovati i vlasti, na način da omoguće savjetovanje i pomoć, te promoviraju zdrave životne navike. Prehrambena industrija bi trebala proizvoditi procesiranu hranu i pića s manje šećera i masti, te se reklamirati odgovornije, pogotovo kad je riječ o djeci i adolescentima kao ciljanim skupinama.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih analiza povezanosti istraživanih polimorfizma gena za leptinski receptor i njegovog utjecaja na tjelesne karakteristike u populaciji hrvatskih Roma, mogu se donijeti zaključci:

- Analizirana je 401 osoba (199 muškaraca i 202 žene) te su utvrđene razlike među spolovima u srednjim vrijednostima osam (visina, masa, opseg nadlaktice, opseg trbuha, kožni nabor tricepsa, subskapularni kožni nabor, omjer opsega trbuha i opsega bokova, omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora) ispitivanih morfoloških karakteristika u odrasloj populaciji Roma. Muškarci i žene bili su iste prosječne dobi, a također se nisu razlikovali u srednjim vrijednostima indeksa tjelesne mase (BMI) i vrijednostima opsega bokova.
- utvrđena je učestalost alela za polimorfizam *LEPR1019* (C = 73%, T = 27%) gena te učestalost genotipova kod kojih je utvrđeno da se nalaze u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.
- usporedbom indeksa tjelesne mase (BMI) s genotipom utvrđena je prevalencija pretilosti (30%) i prekomjerne tjelesne mase (32%) u populaciji Roma koji žive u RH.
- kvantitativne i kvalitativne analize, i to na temelju više proučavanih varijabli, su pokazale da *LEPR1019* polimorfizam utječe na nakupljanje masnog tkiva u populaciji promatranih romskih zajednica. Homozigotni genotip TT pokazao se kao zdravstveno rizičan za razvoj pretilosti, pri čemu je učinak ovog genotipa posebno izražen kod muškaraca kod kojih utječe na centralno nakupljanje masnog tkiva.

## 7. LITERATURA

Bago R., Herak Bosnar M. (2007) Isoljavanje – izolacija genomske DNK iz uzoraka pune krvi. U: Ambriović Ristov, A. i sur. (ur.), Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, str. 165-167.

Bouret S.G., Draper S.J., Simerly R.B. 2004. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* **304**, 108–110.

Cui M.Y., Hu K.C., Pelletier C., Dziuba A., Slupski R.H., Li C., Denver R.J. 2014. Ancient Origins and Evolutionary Conservation of Intracellular and Neural Signaling Pathways Engaged by the Leptin Receptor. *Endocrinology* **155**, 4202-4214.

Cawley J. 2012. Medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. *Journal of Health Economics* **31**, 219-230.

Farooqi I.S., Wangensteen T., Collins S., Kimber W., Matarese G., Keogh J.M., Lank E., Bottomley B., Lopez-Fernandez J., Ferraz-Amaro I., i sur. 2007. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *The New England Journal of Medicine* **356**, 237-247.

Guan L.X., Gao L., Gao Y., Li H.B., Yu F.F., Du X.Y., Jiang H. 2011. Association of leptin level and leptin receptor gene polymorphisms with susceptibility to severe pre-eclampsia. *Chinese Journal of Medical Genetics* **28**, 562-567.

International Diabetes Federation. 2006. The International Diabetes Federation consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.

Keith S.W., Redden D.T., Katzmarzyk P.T., Boggiano M.M., Hanlon E.C., Benca R.M., Ruden D., Pietrobelli A., Barger J.L., Fontaine K.R., Wang C., Aronne L.J., Wright S.M., Baskin M., Dhurandhar N.V., Lijoi M.C., Grilo C.M., DeLuca M., Westfall A.O., Allison D.B. 2006. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *International Journal of Obesity* **30**, 1585–1594.

Kelesidis T., Kelesidis I., Mantzoros, C.S. 2010. The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Annals of Internal Medicine* **152**, 93-100.

Lassek W.D., Gaulin S.J.C. 2008. Waist-hip ratio and cognitive ability: is gluteofemoral fat a privileged store of neurodevelopmental resources? *Evolution and Human Behavior* **29**, 26-34.

Licinio J., Mantzoros C., Negrao A.B., Cizza G., Wong M.L., Bongiorno P.B., i sur. 1997. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature Medicine* **3**, 575–579.

Masuo K., Straznicky N.E., Lambert G.W., Katsuya T., Sugimoto K., Rakugi H., Socratous F., Hastings J., Lambert E.A., Ogihara T., Esler M.D. 2008. Leptin-receptor polymorphisms relate to obesity through blunted leptin-mediated sympathetic nerve activation in a Caucasian male population. *Hypertens Res.* **31**, 1093-1100.

Mattevi V.S., Zembruski V.M., Hutz M.H. 2002. Association analysis of genes involved in the leptin-signaling pathway with obesity in Brazil. *International Journal of Obesity* **26**, 1179-1185.

Myers M.G., Cowley M.A., Munzberg H. 2008. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annual Review of Physiology* **70**, 537–56.

Ostbye T., Dement J.M., Krause K.M. 2007. Obesity and Workers' Compensation Results From the Duke Health and Safety Surveillance System. *Archives of Internal Medicine* **167**, 766-773.

Repasy J., Béghin L., Dauchet L., De Vriendt T., i sur. 2014. Influence of parental socio-economic status on diet quality of European adolescents: results from the HELENA study. *British Journal of Nutrition* **111**, 1303-1312.

Singh, D. 1993. Body shape and women's attractiveness: The critical role of waist-to-hip ratio. *Human Nature* **4**, 297-321.

Strobel A., Issad T., Camoin L., Ozata M., Strosberg A.D. 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genetics* **18**, 213–215.

Weiner J.S., Lourie J.A. (1981): *Practical human biology*. Academic Press, London.

Woo H.Y., Park H., Ki C.S., Park Y.L., Bae W.L. 2006. Relationships among serum leptin, leptin receptor gene polymorphisms, and breast cancer in Korea. *Cancer Letters* **237**, 137-142.

World Health Organization. 1995. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. WHO Tech Rep Ser **854**, 1–452.

World Health Organization. 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization 1999.

Yako Y.Y., Echouffo-Tcheugui J.B., Balti E.V., Matsha T.E., Sobngwi E., Erasmus R.T., Kengne A.P. 2015. Genetic association studies of obesity in Africa: a systematic review. *Obesity reviews* **16**, 259-272.

Yang G.P., Peng S.H., Zuo S.Y., Wang Y.R., Peng X.N., Zeng X.M. 2011. Meta-analysis on the relationship between leptin receptor Gln223Arg and Pro1019Pro gene polymorphism and obesity in the Chinese population. *PubMed* **32**, 1037-1042.

Yu Z., Han S., Cao X., Zhu C., Wang X., Guo X. 2012. Genetic Polymorphisms in Adipokine Genes and the Risk of Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obesity* **20**, 396-406.

Zajc M., Smolej Narančić N., Skarić-Jurić T., Milčić J., Barbalić M., Meljanac Salopek K., Martinović Klarić I., Jančićjević B. 2006. Body mass index and nutritional status of the Bayash Roma from eastern Croatia. *Coll Antropol.* **30**, 783-787.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Zagrebu, 21.03.1990. godine, gdje sam završio OŠ „Dragutin Domjanić“ i II. gimnaziju. Tijekom srednje škole sudjelovao sam na državnom natjecanju iz filozofije, te na državnim i međunarodnim natjecanjima iz debate, gdje sam ostvario zapažene uspjehe. Integrirani preddiplomski i diplomski studij prava na Pravnom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisao sam akademske godine 2008./2009., te ga nakon prve godine ispisao. Preddiplomski studij molekularne biologije upisao sam u akademskoj godini 2009./2010., a završio ga 2011./2012. godine, te stekao zvanje sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol.). Diplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisao sam u akademskoj godini 2012./2013., a sve ispite položio u 2015. godini. Tijekom studija sam se aktivno bavio debatom, te radom s mladima u području promicanja međunarodnog dijaloga, tolerancije i rješavanja konflikata. Aktivno govorim engleski i njemački jezik, a pasivno talijanski.