Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Ana – Marija Popović Jurić

DISTRIBUCIJA POLIMORFIZAMA GENA *FTO* I NJEZINA POVEZANOST S DULJINOM TELOMERA I KLINIČKIM STATUSOM ŽENA S PRETILOSTI

Doktorski rad

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Doktorski rad**
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

DISTRIBUCIJA POLIMORFIZAMA GENA *FTO* I NJEZINA POVEZANOST S DULJINOM TELOMERA I KLINIČKIM STATUSOM ŽENA S PRETILOSTI

Ana – Marija Popović Jurić

Doktorski rad je izrađen u: Laboratorij za molekularnu i staničnu biologiju, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Mentori: prof. dr. sc. Ivica Rubelj, znanstveni savjetnik; dr. sc. Martina Matovinović, dr. med. viši znanstveni suradnik

Kratki sažetak doktorskog rada:

Gen *FTO* (*fat-mass and obesity associated gene*) se prvi put u cjelogenomskim studijama povezuje s povećanim indeksom tjelesne mase (ITM) i pretilošću te sa ekspresijom i funkcijom susjednih gena što upućuje na narušeni odgovor na sitost, prejedanje i hranjenje bez osjećaja gladi. U ovom istraživanju ispitali smo genetsku osnovu nastanka pretilosti te kako se ista reflektira na metabolizam telomera. Dobiveni rezultati potvrđuju povezanost gena *FTO* s povećanim ITM i nastankom pretilosti. Distribucija polimorfizama pokazuje bimodalni efekt između nula rizičnih varijanti i tri koliko je analizirano u ovom istraživanju, odnosno ukupno šest rizičnih varijanti koliko je uzeto za usporedbu. Polimorfizami gena *FTO* utječu na dinamiku skraćivanja telomera gdje analiza pokazuje da prisutnost rizičnih varijanti dovodi do većeg skraćivanja telomera u odnosu na pretilost bez rizičnih varijanti čiji je utjecaj na skraćivanja telomera jednak kao i kod pojedinaca normalne tjelesne mase. Pojedinci s kraćim telomerama i rizičnim varijantama gena *FTO* u budućnosti bi mogli imati koristi u vidu bržeg i učinkovitoijeg pristupa u liječenju gubitka tjelesne mase ako bi individualni pristup uključivao mjerenje duljine telomera i određivanje *FTO* genotipa.

Broj stranica: 105
Broj slika: 26
Broj tablica: 8
Broj literaturnih navoda: 195
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: pretilost, gen *FTO*, polimorfizmi, telomere

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za javnu obranu:
1.
2.
3.
4.

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **PhD thesis**
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: biology, basic medical sciences

DISTRIBUTION OF *FTO* POLYMORPHISMS AND ITS ASSOCIATION WITH TELOMER LENGTH AND CLINICAL STATUS OF WOMEN WITH OBESITY

Ana – Marija Popović Jurić

Thesis performed at: Laboratory for molecular and cellular biology, Division of molecular biology, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Supervisor/s: prof. dr. sc. Ivica Rubelj, senior scientist; dr. sc. Martina Matovinović, dr. med. senior research associate

Short abstract:

For the first time in whole-genome wide studies, the *FTO* (fat-mass and obesity associated) gene is associated with an increased body mass index (BMI), with the expression and function of neighboring genes and points to an impaired response to satiety, overeating and feeding without feeling hungry. In this research, we have examined the genetic basis of obesity and how it is reflected on telomere metabolism. Obtained results confirmed association between *FTO* gene with increased BMI and obesity. Distribution of polymorphisms displays a bimodal effect between zero risk variants and three, the number analysed in this research or total of six risk variants analysed for comparison. *FTO* gene polymorphisms have effect on the dynamics of telomere shortening where analysis shows that the presence of risk variants leads to greater telomere shortening compared to obesity without risk variants whose effect on telomere shortening is the same as in individuals of normal body weight. Individulas with shorter telomeres and risk variants could benefit in the future from effcient and effective approach to weight loss treatment if the individual approoach would include measuring telomere length and determining the *FTO* genotipe.

Number of pages: 105
Number of figures: 26
Number of tables: 8
Number of references: 195
Original in: croatian
Key words: obesity, *FTO* gene, polymorphisms, telomeres

Date of the thesis defense:

Reviewers:
1.
2.
3.
4.

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

Doktorsku disertaciju izradila sam u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivice Rubelja, znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju i dr. sc. Martine Matovinović, više znanstvene suradnice.

Non quia difficilia sunt non audemus, sed quia non audemus difficilia sunt. Nulla dies sine linea, nulla regula sine exceptione.

Sapere aude! Qui audet adipiscitur!

Nije da se ne usuđujemo jer je teško, već je teško jer se ne usuđujemo. Nijedan dan bez poteza, nijedno pravilo bez izuzetka.

Usudi se znati! Tko se usudi, pobjeđuje!

Zahvaljujem se, prije svega, svojim roditeljima koji su tijekom svih ovih godina mog školovanja bili strpljivi, pružali mi maksimalnu podršku, ljubav i razumijevanje tijekom mog životnog i intelektualnog usavršavanja. Zahvaljujem se svom suprugu na neizmjernoj podršci i razumijevanju tijekom pisanja i izrade doktorske disertacije, riječima podrške i motivacije za krajnji uspjeh.

Nadalje, zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Ivici Rubelju koji me je poticao i vodio svojim stručnih znanjem i savjetima tijekom izrade ovog doktorskog rada. Također, zahvaljujem se svojoj komentorici, dr. sc. Martini Matovinović, dr. med. spec interne med, dijabetolog i endokrinolog na pomoći i usmjeravanju prema kvalitetnoj izradi doktorske disertacije, ali i na toplim riječima podrške. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Miljenku Huzaku na stručnoj pomoći prilikom statističke obrade podataka, savjetima te slobodnom vremenu prilikom izrade ove disertacije. Zahvaljujem se dr. sc. Luciji Nanić na savjetima i pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ove disertacije. Na kraju, zahvaljujem se prof. dr. sc. Veri Cesar na strpljenju i pomoći bez koje ovaj rad ne bi postojao.

Na kraju, zahvaljujem se svima koji su se našli sa mnom na ovom izazovnom ali lijepom putovanju i učinili ga mogućim.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji bez čije pomoći, podrške, ljubavi i razumijevanja ne bih postigla sve što jesam.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. PRETILOST 1
1.1.1. Dijagnosticiranje debljine 2
1.2. EPIDEMIOLOGIJA PRETILOSTI 4
1.2.1. U svijetu 4
1.2.2. U Hrvatskoj 4
1.3. RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ PRETILOSTI 6
1.3.2. Prehrambene navike 6
1.3.1. Tjelesna aktivnost 6
1.3.2. Socioekonomske odrednice 7
1.4. PRETILOST I KOMORBIDITETI 8
1.4.1. Pretilost i hipertenzija 8
1.4.2. Pretilost i kardiovaskularne bolesti 9
1.4.4. Inzulinska rezistencija i dijabetes tip 2 (DT2) 10
1.5. LIJEČENJE PRETILOSTI 11
1.5.1. Farmakoterapija 11
1.6. GEN *FTO* 13
1.6.1. Biologija gena *FTO* 13
1.6.2. Gen *FTO* i pretilost 15
1.6.3. Funkcija proteina FTO 16
1.6.4. Demetilacija RNA 18
1.6.5. Adipogeneza 19
1.6.6. Gubitak funkcije gena *FTO* 20
1.6.7. Uloga *RPGRIP1L* u adipogenezi 21
1.6.8. Polimorfizmi gena *FTO* 23
1.6.9. Signalni putevi gena *FTO* 25
1.6.10. Telomere 27
2. CILJ RADA 28
2.1. Hipoteze istraživanja 28
2.2. Ciljevi istraživanja 28
3. MATERIJALI I METODE 29
3.1. Materijali 29
3.1.1. Osnovne kemikalije 29
3.1.2. Komercijalni kitovi 29
3.1.3. Enzimi, proteini, nukleotidi 29

3.2. Analiza uzoraka 30
3.2.1. Izolacija DNA iz krvi 30
3.2.2. Provjera koncentracije i kvalitete izolirane DNA 30
3.2.3. Genotipizacija i analiza polimorfizma metodom qPCR 31
3.2.4. Analiza relativne duljine telomera metodom qPCR 35
3.2.5. Statistička obrada podataka 37
3.2.6. Ispitanice 38
4. REZULTATI 39
4.1. Distribucija ispitivanih polimorfizama 39
4.2. Rezultati duljine telomera s obzirom na distribuciju ispitivanih polimorfizama 43
4.3. Rezultati kliničkih parametara u skupini s pretilošću 45
4.4. Laboratorijski parametri skupine s pretilošću 48
5. RASPRAVA 56
6. ZAKLJUČCI 63
7. LITERATURA 64
8. SAŽETAK 89
9. SUMMARY 90
10. PRILOZI 91
11. ŽIVOTOPIS 96

1. UVOD

1.1. PRETILOST

Pretilost ili debljina je kronična metabolička bolest, a nastaje kao posljedica prekomjernog nakupljanja masti u organizmu, neuravnotežene prehrane, smanjene fizičke aktivnosti te neravnoteže između unosa i potrošnje energije (1). Predstavlja vodeći globalni problem epidemijskih razmjera te Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) procjenjuje da je 2016. godine preko 1.9 milijardi osoba imalo prekomjernu tjelesnu masu od kojih je 650 milijuna pretilo, a 340 milijuna ima dijagnozu pretilosti među djecom i mladim osobama (2).

Pretilost se smatra jednom od vodećih bolesti modernog doba i sjedilačkog načina života, te doprinosi sve većoj zdravstvenoj krizi koja ima utjecaj i na sljedeće generacije. Sa sve bržim načinom života i informatizacijom dolazi do pojave pretilosti i kod male djece. Debljina je kronična bolest te je uvrštena u Međunarodnu klasifikaciju bolesti (3) pod medicinskim dijagnozama E65 i E66. Pretilost koja nastaje kombinacijom poligenske podloge, prehrambenih navika, fizičke neaktivnosti, metaboličkih i epigenetičkih čimbenika doprinosi razvoju mnogih drugih zdravstvenih problema poput hipertenzije, inzulinske rezistencije (IR) i dijabetesa. (4).

Bays i sur. su (5) opisali patogenezu adipoznog tkiva novim terminom "bolesna mast", adipozopatija te pretilost nazvali "bolest masnog tkiva" (6). Adipozopatija se javlja kod osoba koje imaju visoki kalorijski unos i sjedilački način života s genetičkim i okolišnim predispozicijama za razvoj pretilosti (7).

Čimbenici koji utječu na stupanj pretilosti su dob, spol, početak pretilosti te broj i težina povezanih komorbiditeta. Mogući patološki putevi pretilosti povezani su s disfunkcijom leptina. Leptin je peptidni hormon koji se izlučuje iz adipocita, a njegova uloga je dugoročno održavanje energije u organizmu. Djeluje na mozak, posebno na hipotalamus kako bi inhibirao unos hrane u organizam. Osobe s pretilošću imaju veće razine leptina u plazmi od osoba s normalnom tjelesnom masom (4,8).

1.1.1. Dijagnosticiranje debljine

Pretilost se dijagnosticira mjerenjem tjelesne mase, obujma struka te izračunavanjem indeksa tjelesne mase (ITM). ITM se računa po formuli gdje se tjelesna masa podijeli s kvadratom visine, ITM = m(kg) /h^2(cm). Indeks tjelesne mase nije precizna i savršena mjera jer će osobe koje su više i/ili imaju veću mišićnu masu imati veći indeks tjelesne mase. Normalni udio masnog tkiva u žena iznosi 20-25%, a kod muškaraca 15-20% ukupne tjelesne mase.

Prema SZO indeks tjelesne mase između 25-29.99 kg/m^2 je u kategoriji prekomjerna tjelesna masa, dok se ITM ≥ 30 kg/m^2 klasificira u 3 stupnja. Indeks tjelesne mase od 30 do 34.9 kg/m^2 predstavlja pretilost prvog stupnja, indeks tjelesne mase od 35 do 39.9 kg/m^2 pretilost drugog stupnja, dok indeks tjelesne mase iznad 40 pretilost trećeg stupnja (9,10) (Tablica 1).

Tablica 1. Kategorizacija ITM (10).

KATEGORIJE TJELESNE MASE	ITM (kg/m^2)	RAZINA ZDRAVSTVENOG RIZIKA
Pothranjenost	<18,5	niska (ali je povećan rizik za druge zdravstvene probleme)
Poželjna tjelesna masa	18,5-24,9	prosječna
Povećana tjelesna masa	25,0-29,9	blago povećana
Debljina ili pretilost	>30,0	**POVEĆANA**
Stupanj I	30,0-34,9	srednje povećana
Stupanj II	35,0-39,9	jako povećana
Stupanj III	>40,0	izrazito jako povećana

Metoda određivanja ITM ima ograničenu upotrebu u svrhu procijene uhranjenosti pa se koriste i druge metode poput antropometrije koja mjeri debljinu potkožnih masnih naslaga na raznim dijelovima tijela poput kuka, bicepsa i tricepsa (10). Antropometrijom se određuje je li povećanje mase nastalo zbog povećanja udjela mišićnog ili masnog tkiva.

Abdominalno nakupljena mast predstavlja značajno veći rizik za razvoj stanja nepovoljnog za organizam u usporedbi s ravnomjerno raspoređenom masti u tijelu. Abdominalna pretilost se obično izražava kao omjer struka i bokova (eng. *waist to hip ratio* - WHR), te je uz ITM dodatna mjera za procjenu rizika. Granične vrijednosti koje ukazuju na veće kardiometaboličke rizike su opseg struka ≥ 94 cm kod muškaraca i ≥ 80 cm kod žena, te na pretilost ukoliko je opseg struka u muškarca ≥ 102 cm, a u žena ≥ 98 cm (11,12).

Omjer struka/bokova se pokazao kao dobra mjera za procjenu rizika jer za razliku od ITM-e možemo vidjeti je li osoba u riziku od nastanka bolesti, iako po kriterijima ITM ne spada u pretilost ili prekomjernu tjelesnu masu. WHR > 1.0 za muškarce i > 0.85 za žene korelira s povećanim rizikom za metaboličke komplikacije (13).

Masne nakupine na visceralnim organima u području trbušne šupljine predstavljaju veću opasnost nego masne nakupine u potkožnom tkivu jer se masne naslage nakupljaju oko organa koji su metabolički jako aktivni i neophodni za život. Masne naslage oko organa potiču lučenje raznih upalnih faktora, među kojima se nalaze i citokini, tzv. adipokini koji imaju ulogu u nastanku inzulinske rezistencije i metaboličkih sindroma (14). Konstantno narušena proliferacija i diferencijacija adipocita, rast adipoznog tkiva te lučenje pro-inflamatornih molekula karakterizira pretilost kao stanje stalne upale niske razine. Najčešće povišeni markeri upale su interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1), tumor-nekrotizirajući faktor-alfa (TNF-α) i C-reaktivni protein (CRP). Kontinuirano stanje upale može djelovati na unos glukoze u stanice te isto tako uzrokovati blagu hiperglikemiju. Prolongirana hiperglikemija uzrokuje glukotoksičnost gdje stanice gušterače više nisu u mogućnosti povećati unos glukoze u stanice. U hiperglikemiji stanice su izložene glukotoksičnosti i lipotoksičnosti (povećava se razina slobodnih masnih kiselina te se nakupljaju toksični metaboliti) te posljedično uzrokuju nastanak inzulinske rezistencije.

ITM je orijentacijska metoda koja ima najširu upotrebu i osobito je korisna u epidemiološkim istraživanjima, ali ju ipak treba uzeti s rezervom zbog nepreciznih rezultata koje može dati. Za dijagnozu prekomjerne tjelesne mase ili pretilosti potrebno je više nego odrediti indeks tjelesne mase. Za konačnu dijagnozu pretilosti potrebno je pogledati i sveukupno stanje organizma (10).

1.2. EPIDEMIOLOGIJA PRETILOSTI

1.2.1. U svijetu

Pretilost polako poprima pandemijske razmjere te isto tako postaje sve veće opterećenje na ekonomskoj i zdravstvenoj razini. Pretilosti se najčešće povezuje s bogatim zemljama, međutim pojavljuje se i u siromašnijim zemljama svijeta i u malim zemljama u razvoju. Problem je poznat pod nazivom "dvostruki teret pothranjenosti" (engl. *The Double Burden of Malnutrition* - DBM) te podrazumijeva probleme malnutricije i pretilosti. Infektivne bolesti nastaju zbog slabo i/ili nikako razvijenog zdravstvenog sustava, a pothranjenost zbog nerazvijenog gospodarstva.

Male zemlje u razvoju nailaze na problem velike dostupnosti hrane koja je jeftinija ali slabe nutritivne vrijednosti. Pri vrhu liste država s najvećim udjelom pretilog stanovništva nalaze se Sjedinjene Američke Države (SAD), gdje se više od trećine populacije klasificira kao pretilo (15). U 2016. godini 38% svjetske populacije (povećanje s 3.2% 1975. godine na 10.8% za muškarce i s 6.4% na 15% za žene) je imalo prekomjernu tjelesnu masu, a 13% je bilo pretilih (16). Prekomjerna tjelesna masa i pretilost zahvaćaju i djecu do 5 godina starosti i adolescente. Tako je prevalencija prekomjerne mase u djece i adolescenata između 5 i 15 godina porasla od 1975. godine sa 4% na 18% u 2016. godini (2).

1.2.2. U Hrvatskoj

Pretpostavlja se da je 2/3 odraslih u Hrvatskoj pretilo ili imaju prekomjernu tjelesnu masu. Podaci za 2019. godinu pokazuju da 65% Hrvata ima povišenu tjelesnu masu od toga 41.7% prekomjernu tjelesnu masu i 23% koji su pretili (17). Zanimljivo je da imamo najdeblje muškarce u Europi prema EUROSTAT-u iz 2019. godine, čak 73% muškarca ima prekomjernu tjelelsnu masu i/ili pretilost, u odnosu na 59% žena.

Broj osoba koje su imale prekomjernu tjelesnu masu i/ili su bili pretili u CroHort studiji (2003. god.) je 757 muškaraca i 1586 žena. Ponovnim mjerenjem nakon pet godina Hrvatska je na 757 muškaraca sa prekomjernom tjelesnom masom/pretilošću imala 66 novodijagnosticiranih pretilih muškaraca. Od 1586 žena s ITM < 30 kg/m^2 nakon pet godina bilo je 325 novodijagnosticiranih žena u skupini pretilih (18) što bi upućivalo na veći porast

pretilosti kod žena u odnosu na muškarce (19). Godišnja stopa pretilosti se povećava za 10.6% u muškaraca i 11.08% u žena što je u skladu sa sličnim istraživanjima kumulativne incidencije za druge zemlje (20,21). Broj muškaraca i žena s pretilosti se smanjuje s dobi. Dok je za žene najveća vjerojatnost za pretilost između 35 i 65 godina života, muškarci su u konstantnom dobitku kilograma tijekom godina (19).

Rezultati prijašnjih istraživanja od 1991. do 2007. godine pokazuju najveću prevalenciju pretilosti/prekomjerne tjelesne mase u Mađarskoj s 65.4%, nakon toga slijedi Hrvatska s 58.2% i Engleska s 56%, dok se najmanja prevalencija nalazi u Italiji s 38.5% i Francuskoj s 41.7% (22) gdje prevladava mediteranski stil života i način prehrane (23–26). Prema podacima EUROSTAT-a za 2019. godinu Hrvatska se nalazi na vrhu ljestvice s 65% populacije s ITM ≥ 25 kg/m^2, slijede Češka i Mađarska s 60%, dok najmanji postotak ima Italija s 46% i Francuska s 47% (17).

Istraživanje po regijama u Hrvatskoj, Fišter i sur. (27) 2009. godine otkrilo je najveću prevalenciju prekomjerne tjelesne mase za muškarce u sjevernom dijelu Hrvatske (71.57%), a najmanju u istočnom dijelu (55.91%). Prekomjernu tjelesnu masu ima 50.81% žena, najčešće u Zagrebu, što je neznatno više nego za žene koje žive u priobalnom dijelu (50.03%). Najveća prevalencija pretilosti za muškarce također se odnosi na sjeverne dijelove Hrvatske 28.62%, dok najnižu prevalenciju imaju muškarci u predjelima planina, 13.75%. Najveća prevalencija pretilosti u žena nalazi se u središnjim dijelovima Hrvatske i iznosi 26.24 %, a najmanja je u Dalmaciji svega 13.62 %. Raspodjela po spolu u Hrvatskoj za prekomjernu tjelesnu masu i pretilost za muškarce iznosi 43.2% i 20.1%, a za žene 33.6% i 20.06%, što se podudara s istraživanjima u susjednim zemljama (28,29).

1.3. RIZIČNI ČIMBENICI ZA RAZVOJ PRETILOSTI

1.3.2. Prehrambene navike

Razvoj prehrambene industrije i modernog načina života znači i "život u pokretu" što dovodi do gubitka tradicionalnog načina pripremanja hrane i njene konzumacije kod kuće te se sve više prihvaća konzumacija hrane u restoranu ili automobilima. Porast je restorana s brzom hranom (*fast food*) dok s druge strane preskakanje obroka dovodi do prejedanja i povećanog energetskog unosa hrane koja je siromašna vlaknima poput većine gotovih ili polugotovih proizvoda. Hrana koja osigurava nutritivnu vrijednost zamjenjuje se s hranom koja je siromašna vlaknima poput gotovih ili polugotovih proizvoda koji su dostupni na policama supermarketa. Jedna od rafiniranih namirnica koju se preporučuje izbjegavati su transmasne kiseline koje povisuju lipoproteine male gustoće (eng. *Low Density Lipoprotein* - LDL), a smanjuju lipoproteine visoke gustoće (eng. *High Density Lipoprotein* - HDL).

Konzumacija brze hrane najveći utjecaj ima u djetinjstvu. Veliko istraživanje provedeno u četiri velika kineska grada zabilježilo je povećanu tjelesnu težinu kod 26.2%, pretilost kod 11.1% te je 19.7% učenika imalo centralnu debljinu (prekomjerno nakupljena mast u predijelu trbuha), a 9% hipertenziju. Prevalencija je bila veća u dječaka te je polovica djece konzumirala brzu hranu u protekla tri mjeseca (30). Slično istraživanje provedeno u Brazilu povezalo je konzumaciju procesuirane hrane i nastanak pretilosti u predškolskoj i školskoj dobi gdje je udio djece s pretilošću iznosio 20.6% u dobi od četiri godine te se povećao za 6.9% u osmoj godini života (31). Konzumacija slatkiša, slatkih pića ili brze hrane je veća u djece koja dobivaju veći džeparac, čak 69% djece. Veći džeparac korelira s navikama roditelja za konzumacijom hrane izvan kuće. Pretilost u djece i mladih se može spriječiti povećanjem znanja o hrani, školskom politikom hranjenja djece u školi sa zdravom hranom i cjelovitim obrocima. Povezanost džeparca s nezdravim navikama je manja u školama koje imaju restrikcije za nezdravu hranu (32).

1.3.1. Tjelesna aktivnost

Niska razina tjelesne aktivnosti je rizični čimbenik za nastanak masnog tkiva te ispitanici s nižom tjelesnom aktivnošću imaju veću žudnju za hranom (33). Fizička aktivnost ima ulogu u održavanju tjelesne mase s potrošnjom energije i regulacijom apetita. Kalorijski unos se

povećava s fizičkom aktivnošću dok kod fizičke inaktivnosti dolazi do povećanja u kalorijskom unosu (34,35).

Značajan gubitak tjelesne mase i njeno održavanje na normalnim razinama dovodi do poboljšanja inzulinske osjetljivosti te su prisutna i poboljšanja zdravlja kardiovaskularnog sustava (36). Tjelesna aktivnost je važan čimbenik u gubitku kilograma zajedno s ograničenjem kalorijskog unosa. Većina pretilih ne uspijeva održati izgubljene kilograme kroz duži period. Za održavanje izgubljene tjelesne mase potrebno je 200-300 min/tjedan umjerene fizičke aktivnosti (36,37).

1.3.2. Socioekonomske odrednice

Uz već prije navedene rizične čimbenike za nastanak pretilosti nije zanemariv utjecaj socijalnog i ekonomskog statusa. Niži socioekonomski status (SES) ima ulogu u nastanku pretilosti, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti te uključuje rizično ponašanje poput pušenja, alkohola te manjak tjelesne aktivnosti. Osobe višeg socioekonomskog statusa su u prosjeku više fizički aktivne i manje sklone konzumaciji duhana, te je stoga manje vjerojatno da će kod njih doći do nastanka prekomjerne tjelesne mase i pretilosti. Također, žene u nižem SES češće imaju abdominalnu pretilosti i dijabetes, dok žene u višem SES imaju bolje prehrambene navike (38). Osobe u nižem SES imaju neadekvatnu prehranu te su razine dnevnog unosa mikronutrijenata (kalcija, vitamina A, C, D, E) ispod preporučenih vrijednosti. Neadekvatna prehrana i visokokalorijska dijeta doprinose razvoju dijabetesa tipa 2 (DT2) u višim socijalnim skupinama dok pojedinci u nižem SES imaju češće abdominalnu pretilost. Unos ugljikohidrata, manjak voća i povrća te vlaknaste hrane je povezan s inzulinskom rezistencijom i metaboličkim komplikacijama (39,40).

Nameće se potreba za što ranijim uspostavljanjem učinkovitijih mjera i zdravstvenih programa koji bi smanjili visoku stopu pretilosti u mladih, a posebno za osobe nižeg SES. Niži SES donosi više rizičnog ponašanja, neadekvatne prehrambene navike, a slabija zdravstvena skrb dovodi do smanjene mogućnosti pravovremenog dijagnosticiranja kroničnih bolesti što dovodi do razvoja težih komplikacija bolesti (41,42).

1.4. PRETILOST I KOMORBIDITETI

1.4.1. Pretilost i hipertenzija

Hipertenzija predstavlja ozbiljni zdravstveni problem koji značajno povećava oboljenja srca, mozga i bubrega. Hipertenzija se često naziva "tihim ubojicom", zbog nesvjesnosti problema, ali i izostanka simptoma (43,44). Rizični čimbenici za razvoj hipertenzije su mnogobrojni, a uključuju genetske čimbenike, dob, spol, unos alkohola, sjedilački način života te inzulinsku rezistenciju (45). Inzulin djeluje na bubrege i ima ulogu u reapsorpciji natrija fiziološkoj kontroli krvnog tlaka te reapsorpciji nutritivno važnih analita (46,47).

Povezanost debljine i hipertenzije dokazana je u brojnim studijama. U istraživanju Foucan i sur. (48) u skupini ispitanika s hipertenzijom, 30% je bilo pretilo, 23.2% su imali dislipidemiju, 11.5% je bilo pušača i 8.2% je imalo povišenu razinu glukoze. Udio ispitanika koji je imao više rizičnih čimbenika je veći u grupi s hipertenzijom u odnosu na kontrolu (55.5% vs. 6.5%). Slično istraživanje proveli su Jenei i sur. (49) koji su pokazali prevalenciju rizičnog faktora pretilosti u 68.49% kod ispitanika s hipertenzijom u odnosu na 45.06% pretilosti kod normotenzivnih ispitanika. Više rizičnih čimbenika ima visoku prevalenciju u hipertenzivnih ispitanika gdje su pušači zastupljeni s 28.38%, fizički neaktivni s 64.78%, a velike količine alkohola je konzumiralo 1.91% ispitanika. Također upućuju na važnost prevencije svih rizičnih faktora i potrebu za globalnim pristupom te učinkovitim preventivnim programom u kontroli i sprječavanju hipertenzije (50).

Uz mnoge rizične čimbenike na koje se može utjecati spada i fizička aktivnost. Ako se fizička aktivnost prilagodi dnevnoj potrošnji energije može značajno doprinijeti smanjenju hipertenzije (51). Zasigurno važnu ulogu imaju i masne stanice, adipociti, koji izlučuju razne adipocitokine, a najvažniji među njima su adiponektin i leptin. Postoji povezanost između leptina u plazmi i visceralnih masti te mogućnost predviđanja početka hipertenzije pomoću leptina (52–57). Leptin djeluje i na krvni tlak putem renalne simpatičke aktivnosti i termogeneze smeđeg adipoznog tkiva (eng. *Brown Adipose Tissue* - BAT) posredovanjem centralnog renin-angiotenziskog sustava (RAS). Na taj način mozak je u mogućnosti modulirati učinke leptina (58,59).

1.4.2. Pretilost i kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti (KVB) su bolesti koje zahvaćaju srce i krvožilni sustav, vodeći su uzrok smrtnosti i invaliditeta u svijetu (60,61). Kardiovaskularne bolesti su većinom uzrokovane aterosklerozom ili promjenama na stjenkama krvnih žila. Uključuju bolesti srca, a najčešće među njima su srčani udar, koronarna bolest srca, bolest perifernih arterija, ateroskleroza aorte (62), ali i cerebrovaskularne bolesti poput moždanog udara. Hipertenzija, dislipidemija, inzulinska rezistencija, pretilost te fizička inaktivnost su vodeći faktori rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti (62–64). U odnosu na Europu, Hrvatska spada u zemlje koje imaju srednje visoke stope smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti iako postoji pozitivan trend smanjenja smrtnosti od KVB u Hrvatskoj. Unutar države postoje geografske razlike, pa tako kontinentalni dio ima veće stope smrtnosti od priobalja (65). Mnoga istraživanja pokazuju odnos rizičnih faktora u njihovom značajnom doprinosu razvoja bolesti.

1.4.3. Dislipidemija i metabolički sindrom

Metabolički sindrom predstavlja skup rizičnih čimbenika koji se javlja zajedno s hipertenzijom i dijabetesom (66,67). Metabolički sindrom je obilježen nastankom rizičnih faktora, ali i dislipidemijom - povećanim trigliceridima, smanjenim HDL-om te povećanim LDL-om (68–70). Promjena načina života može imati povoljan utjecaj na smanjenje lipida u krvi, ali i na krvni tlak. Redovito vježbanje može doprinijeti smanjenju kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti (dijabetesa, debljine) (71). Postoji povezanost jednostrukih nukleotidnih polimorfizama (eng. *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) nekih gena i srčanih oboljenja ili komplikacija. Primjerice, gen UCP (eng. *uncoupling protein* - UCP) kodira protein termogenin koji ima glavnu funkciju u proizvodnji topline iz smeđeg adipoznog tkiva (BAT) (72). Pronađena su dva SNP-a u ovom genu koja su povezana s rizikom za nastanak KVB i šećerne bolesti tip 2 te pretilosti (73,74).

1.4.4. Inzulinska rezistencija i dijabetes tip 2 (DT2)

Inzulinska rezistencija definira se kao smanjeni fiziološki odgovor masnog tkiva, jetre i skeletnih mišića na inzulin u održavanju normalne razine glukoze u tijelu (75). Smatra se da je rezistencija na inzulin glavni patološki faktor u nastanku DT2 s metaboličkim komplikacijama (76,77).

Dijabetes tipa 2 je progresivna, kronična bolest poremećaja metabolizma glukoze uzrokovana neosjetljivošću stanica na inzulin (78,79). Upalne molekule mogu utjecati na signalne puteve te posljedično utjecati na funkciju β stanica (80). Pretilost potiče stvaranje kronične upale te ima značajnu povezanost s IR. U visceralnoj masti nalaze se adipociti kao skladište viška masti, ali oni isto tako izlučuju veće količine masnih kiselina te imaju veću sekreciju proupalnih citokina (76,80–83).

Adipozno tkivo luči mnoge kemijske supstance koje imaju različite funkcije. U IR i DT2 važnu ulogu imaju adipocitokini s velikim doprinosom u nastanku pretilosti (8). Adiponektin je jedan od glavnih adipocitokina uključenih u metabolizam lipida, reguliranje energije i poboljšanja inzulinske rezistencije (84). Uloga leptina je u kontroli energije, metabolizma i krvnog tlaka (85). Istraživanje Brand i sur. (86) pokazalo je da je leptin te omjer leptina/adiponektina (L/A) povezan s IR, štoviše, njihovo međudjelovanje modulira pretilost i IR. Rezultati studije su otkrili kako debljina objašnjava 57% povezanosti između IR i L/A omjera. Istraživanja drugih studija također su pokazala da je L/A omjer potencijalni faktor za nastanak IR (87,88).

1.5. LIJEČENJE PRETILOSTI

Pretilost je kompleksna i dugotrajna bolest, prema tome takvo je i liječenje te bolesti. Osnovno načelo gubitka kilograma podrazumijeva kalorijski deficit te povećanje ili uvođenje fizičke aktivnosti kako bi organizam umjesto ugljikohidrata počeo koristiti i mast kao izvor energije. Postoje razne vrste dijeta koje garantiraju brzi gubitak kilograma ali nedostatak tih dijeta je restriktivna prehrana koja osim što je nezdrava za organizam, ima i tzv. "jo - jo" učinak. Liječenje pretilosti podrazumijeva pravilnu prehranu s uravnoteženim unosom bjelančevina, masti i ugljikohidrata te vitamina i ostalih mikronutrijenata uz primjenu fizičke aktivnosti.

1.5.1. Farmakoterapija

Temeljno liječenje debljine je promjena stila života što uključuje promjenu prehrambenih navika i povećanje tjelesne aktivnosti, a ukoliko se ne uspijeva smanjiti tjelesna masa uključuje se i farmakoterapija. Farmakoterapija može biti od velike pomoći ali uz uvjet pridržavanja reducirane prehrane i tjelesne aktivnosti. Trenutno je preporuka za primjenu lijekova uz reduciranu prehranu i aktivnost samo za bolesnike s ITM > 27 kg/m^2 s komorbiditetima te za bolesnike s ITM > 30 kg /m^2 (89).

Orlistat je među prvim odobrenim lijekovima za liječenje pretilosti. Orlistat blokira apsorpciju masti te potiče gubitak tjelesne mase, dovodi do poboljšanja osjetljivosti na inzulin, dovodi do poboljšanja u razinama glukoze, kolesterola, triglicerida i LDL-a.

Liraglutid je glukagonu sličan peptid-1 (GLP-1) receptor agonist koji se koristi za liječenje dijabetesa tipa 2 i za liječenje debljine. GLP-1 je hormon koji se oslobađa iz gastrointestinalnog trakta kao odgovor na unos hrane i djeluje kao fiziološki regulator apetita. Učinak liraglutida je vidljiv u poboljšanju razine glukoze, HbA1c, razine kolesterola i krvnog tlaka (90). U siječnju 2022. godine EMA (Europska medicinska agencija) je odobrila primjenu još jednog GLP-1 receptor agonista za liječenje debljine, semaglutida. Podudaranost sekvence semaglutida s ljudskim GLP-1 je 94% te omogućuje selektivno vezanje za GLP-1 receptor. Učinak semaglutida se vidi u smanjenom unosu energije, povećavanom osjećaju sitosti, punoće te manjoj žudnji za hranom s visokim udjelom masnoće.

Ako se uz primjenu fizičke aktivnosti, pravilne prehrane doda i farmakološka terapija liječenja debljine, a ne uspijeva se postići značajan napredak u gubitku na tjelesnoj masi može se pristupiti i kirurškom liječenju debljine - barijatrijskoj kirurgiji. Kirurško liječenje podrazumijeva operaciju želudca te djelomično odstranjivanje želudca i tankog crijeva. Operacija želudca se primjenjuje kada sve prethodne intervencije nisu dale rezultate.

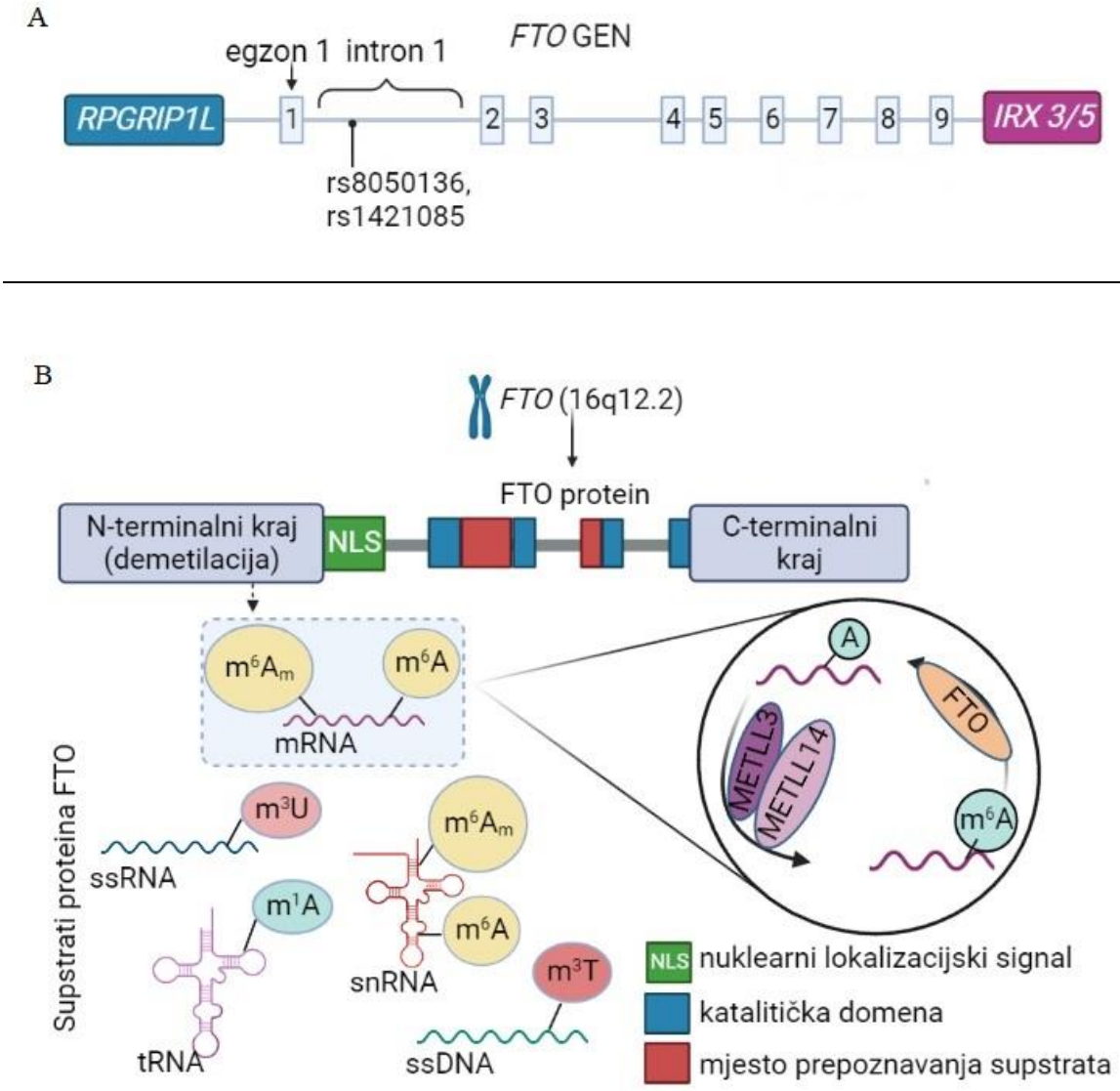
Rezultati studije koja je ispitivala povezanost rizičnih polimorfizama i povratka izgubljenih kilograma nakon liječenja barijatrijskom kirurgijom je pokazala da je za uspješno dugoročno održavanje izgubljene tjelesne mase potrebno uzeti u obzir i utjecaj genetike. Prisutnost rizičnih varijanti gena *FTO* dovodi do ponovnog povećanja tjelesne mase (91).

1.6. GEN *FTO*

1.6.1. Biologija gena *FTO*

Gen *FTO* ili alfa-ketoglutarat-ovisna deoksigenaza, prvi put se spominje kao gen odgovoran za pretilost u analizama cjelogenomskih studija (92–94) i od tada dobiva najveću pozornost u istraživanjima povezanim s liječenjem pretilosti na genetskoj razini, ali i u definiranju molekularnog mehanizma s utjecajem na metabolizam. Jednostruki nukleotidni polimorfizmi (SNP) predstavljaju varijacije u jednom nukleotidu koje se često pojavljuju u populaciji, tipično u više od 1% populacije (95). SNP-ovi su najčešći oblik varijacija u genomu. Primjerice, ljudski genom u prosjeku sadrži jedan SNP na svakih 1.000 nukleotida pa ih često nalazimo i u genima. Nije jasno utječu li varijacije gena *FTO* koje su povezane s pretilošću na funkciju samog gena i/ili djeluju na ekspresiju i funkciju susjednih gena *FTO*.

Gen *FTO* sadrži 9 egzona, nalazi na više od 400 kb dugoj regiji na 16 kromosomu (16q12.2) te kodira za Alkb protein neovisan o željezu i 2-oksoglutarat deoksigenazu (Slika 1A). Najčešće varijante koje se povezuju s pretilošću su otkrivene u intronu 1 i 2 te egzonu 2. Protein FTO se sastoji od 505 aminokiselina, ima molekularnu masu 58 282 Da te mu je kofaktor Fe^{2+}. Nalazi se u jezgri (96) gdje ima mogućnost demetilacije nuklearne RNA (eng. *small nuclear RNA* - snRNA) dok u citoplazmi posreduje u demetilaciji najčešće epigenetičke modifikacije glasničke RNA (eng. *messenger RNA* - mRNA), 6 metiladenozina, te N^1-metiladenozina (m^1A) u transportnoj RNA (eng. *transfer RNA* – tRNA) (Slika 1B). Gen *FTO* sudjeluje u popravku dvostrukih lomova DNA te *FTO* varijante u mehanizmu nastanka pretilosti (97). Analiza strukture proteina pokazuje da FTO ima dvije domene, N terminalnu domenu koja sadrži katalitičku jezgru i C terminalnu domenu koja ima ulogu u stabilizaciji konformacije N terminalne domene (96).



Slika 1. Shematski prikaz gena *FTO* (slika 1A) i molekularni put proteina FTO (slika 1B). Preuzeto i prilagođeno iz Popović i sur., 2022 (98).

m^6A_m: N^6, 2-O-dimetiladenozin; m^6A: 6 – metiladenozin; m^3U: 3-metiluracil; m^1A: 1-metiladenozin; m^3T: 3-metiltimin; ssRNA: jednolančana RNA; tRNA: transportna RNA; snRNA: mala jezgrina RNA; ssDNA: jednolančana DNA; METLL3: metiltransferaza 3; METLL14: metiltransferaza 14.

Protein FTO ima ulogu u ranom razvoju i prisutan je u svim tkivima s visokom ekspresijom u mozgu (99), posebno u hipotalamusu i hipofizi te nadbubrežnoj žlijezdi što upućuje da *FTO* sudjeluje u ekspresiji homeostaze i kontrolira potrošnju energije. Narušena funkcija proteina FTO može uzrokovati zastoj u rastu, malformacije mozga i mikrocefaliju, teški psihomotorni zastoj, malformacije lica te ranu smrt (100). Studije (101,102) provedene na miševima ukazuju na ulogu u živčanom sustavu te na asocijaciju s ITM, rizikom za pretilost i uvjetovani dijabetes tipa 2. Varijante za nastanak pretilosti nalaze se na lokusu 14 (103), a najčešće proučavani SNP-ovi su rs9909609 AA, rs1421085 CC i rs17817449 GG. Patogena varijanta rs1421085 narušava evolucijski očuvan motiv za vezanje AT-bogatog interaktivnog proteina 5B s domenom (ARID5B), čiji gubitak rezultira u pretjeranoj ekspresiji dva susjedna gena, gena za Iroquois homeobox protein 3 (*IRX3*) i gena za Iroquois homeobox protein 5 (*IRX5*). Pretjerana ekspresija tih gena djeluje na diferencijaciju adipocita iz smeđih u bijele što dovodi do nakupljanja masti i gubitka termogeneze (104).

Također postoji korelacija između nastanka pretilosti koja može biti posredovana genima koji se nalaze usko uz lokus gena *FTO*. U tom smjeru najviše se spominje gen za *RPGRIP1L* (*retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1*) koji se nalazi uzvodno od gena *FTO* te geni *IRX3* i *IRX5* koji se nalaze nizvodno od gena *FTO*. Polimorfizmi koji se javljaju u genu *FTO* mogu imati utjecaj na susjedne gene tako da mijenjaju njihovu ekspresiju, transkripcijsku regulaciju ili funkciju samog gena.

1.6.2. Gen *FTO* i pretilost

Otkriće gena *FTO* kao glavnog i odgovornog za nastanak pretilosti dolazi 2007. godine u cjelogenomskim studijama povezanosti (eng. *Genome Wide Association Study* - GWAS) dijabetesa tipa 2. Skupina polimorfizama u intronu 1 pokazala je povezanost s dijabetesom tipa 2 (92,93). Međutim, prilagodba za ITM dovodi do zaključka da *FTO* i DT2 imaju poveznicu preko ITM. Studija Dina i sur. (105) potvrđuje gen *FTO* kao prvi identificirani gen koji utječe na pretilost u populaciji. Najznačajnije varijante u 1. intronu rs9909609, rs9930506, rs1421085 i rs17817449, povezane su s fenotipom pretilosti. Fenotipske osobine uključuju povišenu razinu leptina, smanjenu razinu HDL-a i povišen LDL, nastanak potkožnog masnog tkiva i masnih naslaga, abdominalne masti te povećan omjer struka u odnosu na bokove. Studije koje su uslijedile u različitim populacijama identificirale su polimorfizme gena *FTO*, te se tako u

zemljama Istočne Azije (Koreja, Kina, Japan) najčešće pojavljuju SNP-ovi rs9909609, rs17817449 i rs12149832. Studija PAGE (eng. *Population Architecture using Genomics and Epidemiology* - PAGE) (106) identificirala je SNP rs56137030 kao najznačajniji u europskoj populaciji koji je povezan s ITM (107). SNP-ovi rs8050136 i rs1421085 imaju specifične vezne afinitete za različite transkripcijske faktore uključujući faktor Cut Like Homeobox 1 (CUTL1/CUX1) (108,109). Homozigoti za rs9939609 AA imaju 1.67 puta veći rizik za pretilost što je ekvivalentno 3 kg dodatne tjelesne mase u usporedbi s TT homozigotima.

1.6.3. Funkcija proteina FTO

Protein FTO katalizira Fe^{2+} i 2-oksoglutarat (2-OG) ovisnu demetilaciju 3-metiltimina (3-meT) na jednostrukoj DNA te 3-metiluracila (3-meU) i N-6 metiladenozina (m^6A) u mRNA, Stoga protein FTO ima veliku sličnost s bakterijskom DNA demetilazom alkilatin B (AlkB), pripada u obitelj alkilatin B enzima za popravak DNA, demetilaze koja sudjeluje u popravku metilnih lezija (110). Funkcija drugih enzima iz AlkB obitelji proteina je poništavanje alkiliranog oštećenja DNA i RNA nastalog uslijed oksidativne demetilacije. Gen *FTO* sadrži motive koji sliče onima iz Alkb obitelji dioksigenih enzima i koji djeluju na DNA i RNA nukleotide koji su oštećeni (111). N-6 metiladenozin je najučestalija post-transkripcijska modifikacija i glavni supstrat proteina FTO, koja potencijalno može doprinijeti pretilosti, međutim točna fiziološka uloga gena još uvijek nije poznata (112,113).

FTO kao supstrat pre^{fe}rira 3-meT u jednolančanim DNA (eng. *Single Stranded DNA* - ssDNA) i 3-meU u jednolančanim RNA (eng. *Single Stranded RNA* - ssRNA) te njegovi homolozi alkilatin B homolog 1 (ALKBH1) i alkilatin B homolog 3 (ALKBH3) imaju mogućnost demetilacije 1-metiladenina i 3-metilcitozina. Katalitička domena proteina FTO sadrži pet visoko konzerviranih aminokiselinskih ostataka, histidin i asparaginsku kiselinu koje su potrebne za vezanje Fe^{2+} te, histidin i dva arginina za vezanje 2OG. Protein FTO posjeduje dugu petlju L1 čiji su aminokiselinski ostatci insercije u usporedbi s ostalim članovima AlkB obitelji, ali su visoko konzervirani u proteinima FTO drugih vrsta (96). L1 petlja dolazi u kontakt s nemetiliranom stranom DNA dupleksa dok metilirana strana služi kao supstrat za FTO. Uloga L1 petlje je u blokiranju nemetilirane strane dsDNA/RNA da dobije pristup veznom mjestu supstrata. Za L1 petlju se misli da daje specifičnost za jednostruke nukleinske

kiseline tijekom vezanja supstrata (96). Mogućnost razlikovanja 3-meT i 3-meU omogućuje se interakcijom vezanja vodika s dva atoma karbonilnog kisika u 3-meT i 3-meU.

Katalitička aktivnost proteina FTO koja je ovisna o 2-OG može regulirati transkripciju (114), a daljnje studije su potvrdile da utječe na postranskripcijske modifikacije m^6A u ssRNA, ali i da služi kao senzor korištenja aminokiselina. U iskorištenju svih aminokiselina protein FTO utječe na smanjenu aktivaciju mTORC1 (eng. *mammalian target of rapamycin complex 1* - mTORC1) signalnog puta i uključuje gene za autofagiju (114) što može regulirati ekspresiju gena *FTO*. m^6A je mRNA modifikacija koja se nalazi u određenim mRNA obično locirana oko 3' UTR regije oko stop i start kodona. Razina ove modifikacije varira ovisno o razvoju i odgovoru na stres (115). Protein FTO se preferencijalno veže za pre-mRNA u intronskim regijama i tako posreduje u uklanjanju m^6A iz introna, u blizini alternativno spojenih egzona i poly-A mjesta (116).

Iako se prethodno smatralo da protein FTO demetilira m^6A, nova istraživanja ne govore u prilog toj činjenici:

1. Razine m^6A su konstantne sve dok se mRNA ne razgradi (117)
2. Iako protein FTO ima 50 puta veću katalitičku aktivnost prema m^6A u odnosu na m^3U, pokazuje nizak reakcijski odgovor na supstrat što čini demetilacijsku aktivnost neučinkovitom zbog brzog mRNA eksporta iz jezgre
3. Protein FTO ne pokazuje demetilaciju m^6A specifičnu za sekvencu (118)
4. Vezna mjesta proteina FTO su siromašna m^6A konsenzusima

Objavljeni rezultati ukazuju da protein FTO prefencijalno demetilira m^6Am (2-O-dimetiladenozin) za kojeg pokazuje 100 puta veću demetilacijsku aktivnost u odnosu na m^6A (119). Wei i sur. (120) su otkrili da se distribucija demetilacije razlikuje između jezgre i citoplazme gdje bi m^6A bio supstrat u primarno poliadeniliranoj RNA u nukleusu, dok u citoplazmi ima veći afinitet prema m^6Am što ukazuje na postojanje demetilacijske aktivnosti i u jezgri i u citoplazmi.

N^6, 2-O-dimetiladenozin (m^6Am) je strukturno sličan m^6A jer oba imaju metilnu skupinu na šestom atomu adeninskog prstena. m^6Am, jedna od najučestalijih modifikacija, visoko je selektivna i lokalizirana na 1. kodirajućem nukleotidu, pridružena m^7G nalazi se na 5' kraju mRNA (119,121). Istraživanje Mauer i sur. (119) pokazalo je veću otpornost m^6Am na mRNA

dekapirajući enzim 2 (eng. *mRNA decapping enzyme 2* - DCP2), međutim kako se protein FTO veže na m^6Am tako smanjuje stabilnost mRNA. Transkripti koji počinju s m^6Am preveniraju DCP2 posredovano uklanjanje kape i mikro RNA posredovanu degradaciju.

Zanimljivo otkriće u radu Wei i sur. su (120) nepromijenjene razine mRNA transkripcijskih produkata koji sadrže m^6Am nakon utišavanja gena *FTO* u odnosu na grupu produkata koja sadrži samo m^6A. Obzirom da je prije opisano kako povećanje m^6A znači povećanje mRNA transkripata, pretpostavka je da će i m^6Am razine biti veće. Rezultati ukazuju da samo nuklearna demetilacija m^6A korelira s povećanim razinama mRNA transkripata. Utišavanje će također dovesti do povećanja m^1A razina u određenih tRNA koje su supstrati za protein FTO te tako negativno utjecati na translaciju.

1.6.4. Demetilacija RNA

Metilacija uobičajeno ne mijenja sekvencu već utječe na funkciju RNA tako što utječe na translaciju, stabilnost i lokalizaciju.

m^6A je post-transkripcijska modifikacija mRNA, tRNA, snRNA. Metilaciju adenozina vrši veliki m^6A metiltransferaza kompleks koji sadrži enzim sličan metiltransferazi 3 (eng. *Metiltransferasa like 3* - METTL3) sa S-adenozil-metionin podjedinicom (SAM) kao donora metilne skupine dok proteini ALKBH5 i FTO rade demetilaciju. Većinom se metiliraju oligonukleotidi koji sadrže GGACU motiv (122).

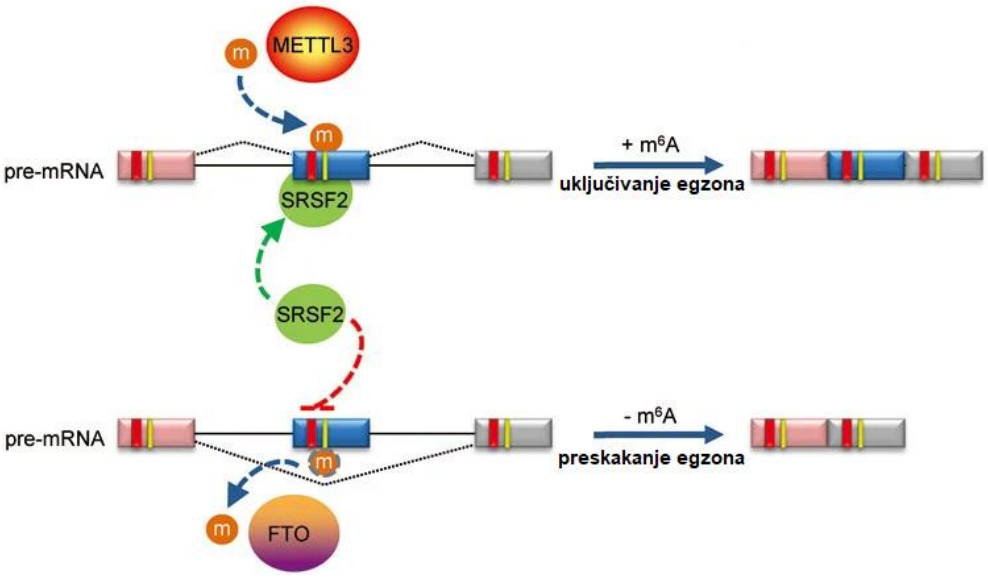
Demetilacija RNA zasigurno ima veliku ulogu u genskoj ekspresiji, ali i metilacija DNA također daje svoj doprinos u funkcioniranju gena. Metilacija CpG otoka inhibira promotorsku aktivnost. Tako je povećana metilacija introna 1 gena *FTO* u raznim studijama povezana s mnogim bolestima poput pretilosti i dijabetesa. Bell i sur. (123) su identificirali povećanu stopu metilacije na haplotipu koji sadrži rizični polimorfizam rs8050136 povezan s pretilošću. Daljnja analiza je otkrila 7.7 kb dugu regiju kao raspon sa najviše značajnih razlika u metilaciji koja inkapsulira visoko konzervirani ne kodirajući element identificiran kao "pojačivač dugog dometa" (eng. *long-range enhancer*).

Istraživanje provedeno na kineskoj populaciji dokazalo je da hipometilacija specifičnih CpG otoka u genu *FTO* potiče njegovu ekspresiju. Porođajna težina je povezana s ekspresijom gena *FTO* i metilacijom promotora. Djeca s velikom i srednjom porođajnom masom imaju

značajno povećanu placentarnu mRNA ekspresiju gena *FTO*, a kod novorođenčadi s velikom porođajnom masom značajno je smanjena stopa metilacije na CpG otoku 1 (124)

1.6.5. Adipogeneza

Adipogeneza je proces prekomjernog stvaranja i akumulacije masnih stanica u tijelu, kao subkutano ili visceralno masno tkivo (125). Uloga proteina FTO u alternativnom prekrajanju mRNA upućuje na njegovu važnost u adipogenezi. Prema istraživanju Zhao i sur. (126) pokazalo se da modifikacija m^6A regrutira regulatore prekrajanja, faktor spajanja bogat serinom/argininom 1 (eng. *Serine/arginine-rich splicing factor 1* - SRSF1) i faktor spajanja bogat serinom/argininom 2 (eng. *Serine/arginine-rich splicing factor 2* - SRSF2) koji su važni za procesiranje introna. Ako je gen *FTO* utišan, SRSF2 će se vezati na transkript koji sadrži m^6A te će onda taj transkript biti uključen u protein. Primjer je gen *Runt* (eng. *Related Transcription Factor 1*-RUNX1t1) gdje vezanje proteina SRSF2 dovodi do uključivanja egzona 6 te nastanka duge forme RUNX1t1 koja blokira adipogenezu. Uz ekspresiju gena *FTO* dolazi do demetilacije m^6A, onemogućeno je vezanje proteina SRSF2 i egzon 6 se ne uključuje u transkript pa tako nastaje kratka forma RUNX1t1 koja promovira adipogenezu (Slika 2). Utišavanje gena *FTO* smanjuje ekspresiju kratke izoforme RUNX1t1.



Slika 2. Prekrajanje RUNX1t1 posredovano SRSF2 vezanjem na egzon. Prilagođeno prema Zhao X. i sur., 2014 (126).

1.6.6. Gubitak funkcije gena *FTO*

Ekspresija gena *FTO* u hipotalamusu je izražena u regijama zaduženima za regulaciju unosa i potrošnje energije što upućuje da ekspresija gena *FTO* može biti regulirana osjetom gladi ili sitosti. Ekspresija gena *FTO* u hipotalamusu miša je smanjena u gladovanju u pretilih i mršavih miševa. Nalazi upućuju da gen *FTO* nije reguliran samo s pretilošću. Istraživanje provedeno na šest različitih sojeva miša s pretilim fenotipom pokazalo je da nema značajne razlike u ekspresiji u hipotalamusu u usporedbi s divljim tipom (108).

FTO knockout (KO) miševi imaju promjene u dopaminergičnim neurotransmiterima, mišićnoj masi, metabolizmu te imaju visoku stopu postnatalne smrtnosti. Kod ljudi s točkastom mutacijom u genu *FTO* koja inaktivira protein FTO, fenotipski izgled uključuje mikrocefaliju, teži psihomotorni razvoj, postnatalnu retardaciju te funkcionalne deficite u mozgu (115). *FTO* KO rezultira promjenama u pre-mRNA prekrajanju s prevalencijom preskakanja egzona (116).

Do parcijalnog gubitka funkcije proteina FTO u miševa dolazi mutacijom u kodonu za 367. aminokiselinu koja za posljedicu ima zamjenu izoleucina fenilalaninom (Fto^{I367F}). Mutirani protein ima smanjenu katalitičku aktivnost i reducirane razine proteina FTO što vjerojatno narušava funkciju proteina. Za razliku od *FTO* KO, mutacija proteina FTO^{I367F} nema isti učinak zbog djelomične ekspresije u nukleusu. Redukcija tjelesne mase ima svoj početak u kasnijoj životnoj dobi, dok potpuni gubitak funkcije ima početak u ranoj dobi (127) te miševi s potpunim gubitkom funkcije imaju do 40% manju tjelesnu masu u usporedbi s divljim tipom. Sojevi miša s potpunim gubitkom funkcije gena *FTO* fenotipski su imali zastoj u rastu, smanjen postotak masti u tijelu te visoki postotak postnatalne smrtnosti (128).

Zamjena glutamina argininom u kodonu za 316. aminokiselinu uzrokuje u ljudi mutaciju gubitka funkcije (eng. *loss of function*) proteina FTO koja dovodi do nemogućnosti vezanja 2-oksoglutarata kojem je potreban arginin. Takva mutacija dovodi do fenotipa koji uključuje postnatalnu smrtnost, retardaciju, mikrocefaliju, psihomotorne smetnje te malformacije mozga i lica (100). Mutacija koja inaktivira funkciju proteina FTO uzrokuje autosomno recesivan letalni sindrom, te mutacije u AlkB obitelji proteina rezultiraju teškim malformacijskim sindromima. Fenotipski mutacija se očituje u cjelokupnom zastoju u rastu, bilateralnom gubitku sluha, smanjenim vidom te hipertrofijom srca (129).

Gen *FTO* je eksprimiran najvećim dijelom u hipotalamusu, ali i u štitnoj i nadbubrežnoj žlijezdi te ima značajnu ulogu u pravilnom funkcioniranju organizma poput odgovora na stres

i anksioznost i za razvitak kognitivnih funkcija. S tom činjenicom nameće se pitanje utjecaja polimorfizma i njihovih negativnih posljedica na mozak. Gubitak funkcije gena *FTO* dovodi do narušenog omjera izoformi moždanog neutrofnog faktora (eng. *Brain Derived Neutrophic Factor* - BDNF) koji dolazi u dva oblika, prekursorni BDNF (proBDNF) i zreli BDNF (mBDNF). Narušeni omjer izoformi BDNF-a nastaje kao posljedica smanjene količine matriks metaloproteinaze 9 (eng. *Matrix Metaloproteinase 9*, MMP - 9) uslijed gubitka funkcije gena *FTO*. Razina mBDNF-a je znatno snižena kod gubitka gena *FTO*. mBDNF sudjeluje u preživljenju, razvoju i diferencijaciji stanica te njegova niska razina dovodi do smanjene aktivnosti mitogen aktivirane protein kinaze (eng. *Mitogen Activated Protein Kinase* - MAPK) koji je također uključen u ove procese (130). Ova saznanja mogu doprinjeti razvoju novih terapijskih pristupa u liječenju bolesti neurološkog sustava koje nastaju uslijed propadanja neurona poput Alzheimerove bolesti.

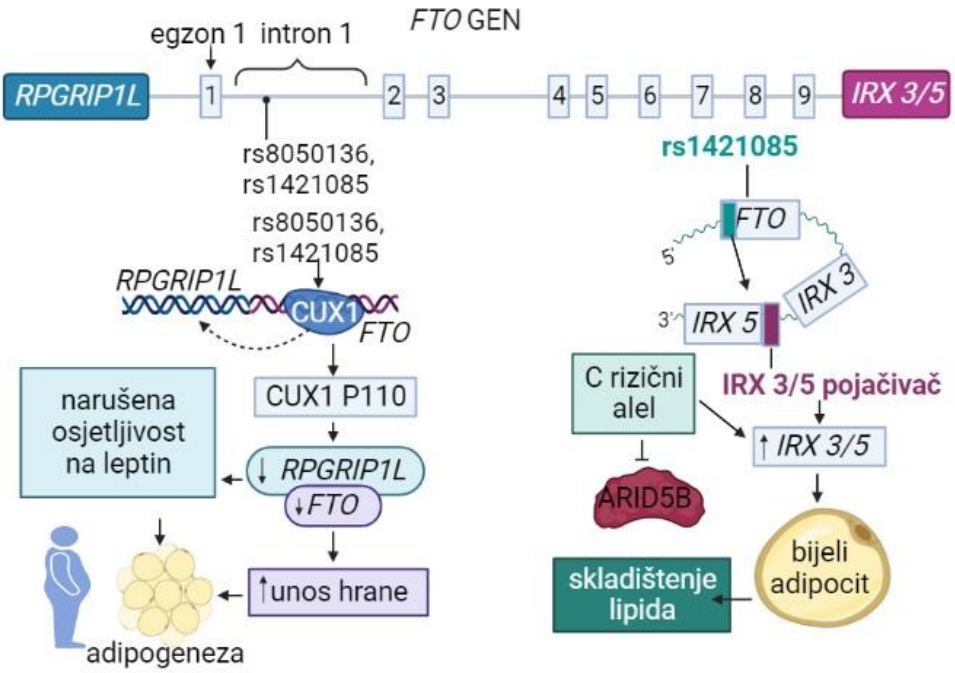
1.6.7. Uloga *RPGRIP1L* u adipogenezi

Varijacije u genu *FTO* mogu utjecati na funkciju susjednih gena na način da mijenjaju aminokiselinski slijed ili utječu na njihovu ekspresiju. Jedan od najistraživanijih gena u neposrednoj blizini gena *FTO* je retinitis pigmentosa GTPase regulator-interakcija protein 1 gen (eng. *Retinitis Pigmentosa GTPasa Regulator-interacting Protein-1-like* - RPGRIP1L). Gen *RPGRIP1L* se nalazi u blizini transkripcijskog startnog mjesta gena *FTO*, ali se transkribira u suprotnom smjeru što upućuje na to da su ova dva gena koregulirani. Gen *RPGRIP1L* može sudjelovati u putevima energije homeostaze u kojima sudjeluje i gen *FTO*. Preklapajuća regulatorna regija u intronu 1 sadrži minimalno dva vezna mjesta za transkripcijske faktore koji se preklapaju (108).

Polimorfizmi u genu *FTO* koji imaju najveću povezanost s pretilošću i prekomjernom tjelesnom masom nalaze se u blizini transkripcijskog mjesta gena *RPGRIP1L* (Slika 3). *RPGRIP1L* je lokaliziran u cilijama i centrosomima stanica cilija. Cilije su strukture bez motiliteta koje su jednako prisutne u mozgu, posebno u hipokampusu i hipotalamusu (131,132). Mutacija gubitka funkcije u genu *RPGRIP1L* uzrokuje Joubert sindrom tip 7 ili Meckel sindrom tip 5 (133), cilijopatije (133,134), ali niti jedan od poznatih SNP-a gena *RPGRIP1L* nema poveznicu s pretilošću (135). Joubert sindrom očituje se u malformacijama cerebeluma i

moždanog debla, često je i zatajivanje bubrega međutim, ne postoje fenotipski izražene osobine koje bi se mogle povezati s debljinom.

SNP rs8050136 se nalazi u intronu 1 gena *FTO*, veže se za transkripcijski faktor CUTL1, i povezan je s nastankom DT2 i ITM (136). CUTL1 dolazi u dvije izoforme, P200 koja se veže na gen *FTO* i inhibira njegovu ekspresiju, te izoforma P110 koja potiče transkripciju gena *FTO* i *RPGRIP1L*. Polimorfizam rs8050136 utječe na izoformu P200 i P110 te na njihove vezne afinitete. Istraživanje Stratigopoulos i sur. (109) otkrilo je da vezanje P200 izoforme smanjuje transkripcijsku aktivnost *FTO* dok P110 izoforma potiče transkripcijsku aktivnost gena *FTO* i *RPGRIP1L*. Naime, ekspresija P110 izoforme je povećala aktivnost pojačivača promotora gena u prisutnosti alela A (rizik od pretilosti) s još većom aktivnosti promotora u prisutnosti alela C rs8050136 polimorfizma. Izoforma P110 također je povećala aktivnost pojačivača promotora gena *RPGRIP1L* u prisutnosti alela C rs8050136 više nego li uz prisutnost alela A. Alel za povećan rizik od pretilosti (alel A) rs8050136 ima smanjen afinitet za gen *FTO* koji onda može dovesti do smanjenog odgovora na leptin. Ekspresija P200 nije uspjela inhibirati aktivnost gena *RPGRIP1L* ali suprimira gen *FTO* što upućuje na to da P200 inhibira transkripcijsku aktivnost samo gena *FTO* dok P110 aktivira i jedan i drugi gen (Slika 3).



Slika 3. Pozicija *RPGRIP1L* u odnosu na gen *FTO* te najznačajniji polimorfizmi u intronu 1. Preuzeto i prilagođeno iz Popović i sur., 2022 (98).

1.6.8. Polimorfizmi gena *FTO*

Polimorfizam gena *FTO* gena se odnosi na jednostruke nukleotidne varijante koje se mogu nalaziti na različitim mjestima unutar samog gena te time mogu dovesti do različitih posljedica. Ako se nalaze u promotorskoj regiji utječu na promjenu regulacije i ekspresije proteina. Mogu promijeniti samu strukturu proteina, ako se nalaze na mjestima koja su ključna za alternativno izrezivanje RNA transkripata (engl. *alternative splicing*) i time odgovorna za sadržaj egzona u procesiranom transkriptu. Polimorfizmi unutar kodirajućih regija mogu biti sinonimi i nesinonimi. Nesinonimi uzrokuju promjenu aminokiseline, što može rezultirati promjenom funkcije proteina.

Gen *FTO* ima polimorfizme u intronu koji mogu pogoditi RNA procesiranje, utjecati na transkripciju, translaciju, promijeniti stabilnost i utjecati na pojačivače (eng. *enhancers*) te se mogu promijeniti afiniteti transkripcijskih faktora za ciljane sekvence. Polimorfizmi gena *FTO* imaju mogućnost promijeniti vezno mjesto za transkripcijske faktore te tako uzrokovati alelno-specifičnu ekspresiju.

U intronu 1 te egzonu 2 gena *FTO* se nalaze SNP-i povezani s pretilošću. Neki od najčešće istraživanih SNP-ova povezanih s pretilošću su rs9926289, rs9939609, rs17817449, rs1421085, rs9930506, rs8050136 i rs1121980. Veza gena *FTO* i pretilosti se očituje u povećanom ITM, opsegu struka (eng. *Waist Circumference* - WC), opsegu bokova (eng. *Hip Circumference* - HC), potrošnji odnosno skladištenju energije, ali i raznim poremećajima u transkripciji i ekspresiji kako gena *FTO*, tako i susjednih gena. Rezultati istraživanja su pokazali veću razinu transkripcije s rizičnog alela u odnosu na nerizični alel (rs9939609 SNP) i sugeriraju da se većina varijacije u ekspresiji gena *FTO* može objasniti varijacijom cis-regulatorne regije u intronu 1 (136).

- <u>rs9930506</u>

Nositelji rizične varijante GG SNP-a rs9930506 u prosjeku imaju veći ITM za 2,18 kg/m^2 u odnosu na zdrave homozigote (137). Saber-Ayad i sur. (138) su u svom istraživanju pokazali veće razine glukoze i HOMA-IR te niže razine inzulina u ispitanika DT2 u usporedbi s divljim tipom. Povezanost ovog polimorfizma i povećanog ITM dokazana je i u istraživanju Chuenta i sur. (139) gdje homozigoti rizičnog alela GG imaju veću srednju vrijednost ITM-a od 38.03

kg/m^2 u odnosu na zdravi alel AA koji ima srednje vrijednosti od 28.0 kg/m^2. Istraživanje povezanosti ITM-a i polimorfizma gena *FTO* dokazalo je značajnu povezanost s pretilošću kategorije II/III. Polimorfizam rs9930506 pokazuje pozitivnu povezanost s dobi i ITM-om ovisno o spolu, te je pokazan značajniji utjecaj na ITM u žena nego u muškaraca, $P = 0.028$ vs $P = 0.184$ (Pearson's hi-kvadrat test) (138). Znanstvenici su otkrili da je rs9930506 povezan s nižim unosom masti u ispitanika s polimorfizmom rs9939609 (138).

- rs9939690

Rizični alel A polimorfizma rs9939609 je povezan s nižim razinama potrošnje energije u mirovanju (eng. *Resting Energy Expenditure* - REE), većim razinama leptina i TSH. Hormoni štitnjače u osoba s pretilosti su obično normalnih vrijednosti. Iako je odnos ITM-a i TSH obično u pozitivnoj korelaciji, ovo je prva studija koja je pokazala da postoje veće razine TSH u odraslih s A alelom, neovisno o ITM (140). Sljedeće istraživanje je potvrdilo povezanost većeg ITM-a s alelom A rs9939609 za u prosjeku 0.4 kg/m^2, s većom koncentracijom inzulina, glukoze i triglicerida te nižim HDL-om (141). Slične rezultate dobili su i znanstvenici u Rumunjskoj gdje je rizični alel rs9939609 povezan sa svim biokemijskim parametrima pretilosti osim HDL, TSH, AST i ALT (142).

- <u>rs1121980</u>

Polimorfizam rs1121980 je pokazao statistički značajnu povezanost s pretilošću (137) gdje homozigoti za rizični alel AA imaju veći ITM u prosjeku za 1.54 kg/m^2. Istraživanje provedeno u Japanu pokazalo je značajnu povezanost polimorfizma rs1121980 s HOMA-IR, te inzulinom (143). Slično istraživanje provedeno u Hrvatskoj, dokazalo je statistički značajnu povezanost između rs1121980 i pretilosti te DT2: težina $P = 0.001$, BMI $P = 0.0013$, WC $P = 0.006$, HC $P = 0.0022$ i inzulin $P = 0.0457$, te od biokemijskih pokazatelja HDL $P = 0.0425$ (144).

- <u>rs8050136</u>

Homozigoti za rizični alel A SNP-a rs8050136 imaju 1.4 puta veći rizik za nastanak DT2, dok hetereozigoti imaju 1.2 puta povećan rizik za DT2. Polimorfizmi gena *FTO* imaju značajnu povezanost s razvojem hipertenzije u pretilih u Europskoj i Azijskoj populaciji, $P = 0.028$, P

< 0.001 (Z test), ali nakon podešavanja po ITM povezanost ostaje značajna samo za Azijsku populaciju, $P = 0.035$ (Z test) (145).

Pronađena je povezanost između polimorfizma rs8050136 i aterosklerotske kardiovaskularne bolesti u žena koje su manje fizički aktivne. Kada su rezultati prilagođeni po ITM, manje aktivne žene s rizičnim alelom su imale 54% veći rizik od razvoja kardiovaskularnog incidenta u usporedbi s fizički aktivnijim ženama koje imaju zdravi alel. Rizični alel je povezan s nižim HDL-om, većim CRP-om te većom prevalencijom hipertenzije, DT2 i metaboličkog sindroma (146).

Meta analiza 62 studije iz različitih regija je dokazala povezanost rs8050136 s DT2 ovisno o regiji, gdje povezanost s DT2 u Istočnoj Aziji ostaje i kada se rezultati prilagode za ITM, dok u Europi ostaju značajni bez usklađivanja prema ITM (147).

Istraživanje Karns i sur. (144) provedeno u Hrvatskoj na 22 polimorfizma koja su u cijelogenomskim studijama povezani s DT2 potvrdilo je povezanost svih odabranih polimorfizama na genu *FTO* s antropometričkim obilježjima pretilosti. Polimorfizam rs8050136 ima statistički značajnu povezanost s DT2 i pretilošću: težina $P = 0.051$, BMI $P = 0.0179$, WC $P = 0.0026$, HC $P = 0.0078$, te za biokemijske pokazatelje HDL $P = 0.0379$ (HelixTree softver (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, SAD)). Biokemijski pokazatelji su važni jer mogu biti sekundarno uključeni u pretilost, dijabetes ali i metabolički sindrom. Primijećena je povezanost alela A i ukupnog unosa energije gdje AA ili AT genotip značajno doprinose povećanom unosu energije u odnosu na nerizičan genotip. Također je povezan s nižom glomerularnom filtracijom bubrega u Američkih Indijanaca (148). Kao i kod prethodnih polimorfizama srednje vrijednosti ITM kod homozigota s nerizičnim alelom su manje (27.5 kg/m^2) u odnosu na homozigote s rizičnim alelom (38.0 kg/m^2) (139).

1.6.9. Signalni putevi gena *FTO*

Polimorfizam rs8050136 korelira s ekspresijom gena *RBL2* (eng. *retinoblastoma like 2 protein*). Protein RBL2 inhibira DNA metiltransferaze 3a/3b (DNMT-3a/3b) što onda dovodi do hipometilacije uključujući i područje subtelomerne regije (149). Polimorfizam rs8050136 pogađa ekspresiju AKT interakcijskog proteina (eng. *AKT interaction protein* - AKTIP) te tako mijenja vezno mjesto za CUX1 transkripcijski faktor (150).

Istraživanje Wu i sur. (151) omogućilo je nova saznanja u mehanizmu aktivirane protein kinaze (eng. *AMP-activated protein kinase* - AMPK), ključnog regulatora lipidnog metabolizma u mišićima. Inhibicijom AMPK se povećava lipidna akumulacija, dok se aktivacijom smanjuje. AMPK negativno regulira ekspresiju gena *FTO* i mRNA m^6A metilaciju. Ako su razine AMPK smanjene, povećana je ekspresija gena *FTO*. Međutim, ako je AMPK aktivirana, dolazi do smanjene ekspresije gena *FTO*, što uzrokuje povećanje metilacije i aktivacije gena za lipolizu s rezultatom smanjenja lipidne akumulacije.

Neki od staničnih karakteristika pretilosti su povećani adipociti, reduciran mitohondrijski sadržaj, gubitak termogeneze, pretjerana akumulacija triglicerida, smanjeni udio smeđih adipocita zbog smanjenog tamnjenja adipocita.

Od molekularnih karakteristika izdvaja se gubitak UCP1 odgovora (eng. *Uncoupling protein 1* - UCP1) na stimulaciju, npr. vježbanje ili na gene regulatore termogeneze. Gen *UCP1* uzrokuje u normalnim uvjetima depolarizaciju membrane mitohondrija i nastanak topline, termogenezu. Geni *IRX3* i *IRX5* imaju ulogu u represiji termogeneze te utječu na diferencijaciju adipocita. Geni *IRX3* i *IRX5* se eksprimiraju u bijelom adipocitnom tkivu, te njihovom inhibicijom dolazi do redukcije tjelesne mase i povećanja potrošnje energije, dok utišavanje dovodi po ponovnog uspostavljanja termogeneze u primarnim adipocitima. Zamjena baze T za C kod polimorfizama rs1421085 narušava konzervirani motiv za ARID5B represor koji korelira s genima *IRX3* i *IRX5* kod zdravih homozigota (TT). U rizičnih homozigota (CC) pretjerana ekspresija ARID5B nema značajan utjecaj na funkciju gena *IRX3* i *IRX5* što upućuje na gubitak represorske funkcije, uvjetovano polimorfizmom. Popravak narušenog ARID5B motiva s CRISP-Cas9 u ispitanika s rs1421085 C/T ponovno uspostavlja represorsku aktivnost nad genima *IRX3* i *IRX5* te stimulira tamnjenje adipocita i uspostavlja termogenezu (152).

De novo metilacija se odrađuje uz pomoć DNMT-3a/3b dok DNMT-1 ima za ulogu održavanje metilacije (153). Metilacija je jedan od mehanizama kojim se može utjecati na ekspresiju gena. Primjerice, epigenetički pristup u regulaciji gena *FTO* je moguć uz regulaciju prehrane. U tom kontekstu se spominje kravlje mlijeko. Mlijeko je bogato esencijalnim aminokiselinama koje povećavanju ekspresiju gena *FTO,* ali i mikro RNA (miRNA) koje inhibicijom DNMT1 promoviraju hipometilaciju introna 1. Iskorištenje aminokiselina dovodi do inhibicije gena *FTO*. Suprimiranjem nove metilacije i/ili održavanjem već postojeće metilacije, te u isto vrijeme demetiliranje introna 1 gena *FTO* uzrokuje njegovu pretjeranu ekspresiju (153).

1.6.10. Telomere

Telomere su specijalizirane repetetivne sekvence nukleotida TTAGGG na krajevima kromosoma sa zaštitnom ulogom protiv fuzije i degradacije kromosoma. Telomere se skraćuju svakom diobom te tijekom života dosegnu kritičnu razinu u kojoj gube svoju funkciju (154,155). Duljina telomera je prihvaćena kao genetički marker starenja i stresa. Najčešće se koristi duljina telomera leukocita (eng. *leukocyte telomere length* – LTL) u analizama povezanosti bolesti i telomera. Kraće telomere su povezane s oksidativnim stresom, upalom, povišenim ITM, pretilošću, dijabetesom, kardiovaskularnim bolestima i akumulacijom masti (156).

Pretilost dovodi organizam u stanje povećanog oksidativnog stresa s proupalnim citokinima gdje su gvaninom bogate sekvence podložnije oksidativnom oštećenju i imaju smanjeni kapacitet za popravak DNA (156). Pretilost dovodi do ubrzanog starenja organizma. Istraživanje Lee i sur. (157) povezalo je ukupnu i abdominalnu mast s kraćim telomerama, a dužina telomera obrnuto je proporcionalna ITM. Zhou i sur. (158) opisali su pozitivnu korelaciju između metilacijskih razina gena *FTO* i duljine telomera dok je istraživanje Shin i sur. (159) opisalo obrnutu korelaciju između polimorfizma rs9939609 i duljine telomera te između duljine telomera leukocita i opsega struka. Prisutnost rizičnog polimorfizma gena *FTO* je neovisan faktor koji utječe na LTL (158). Rezultati studije (160) provedene na intronu 1 gena *FTO* pokazuje kraću duljinu telomera leukocita u nositelja rizičnog polimorfizma rs17817449. Također, opisana je kraća duljina telomera u osoba s hipertenzijom, aterosklerozom (161) i bolestima srca (162). Studija praćenja nakon 10 godina opisala je 0.130 kbp kraće telomere u osoba s pretilošću u odnosu na kontrolnu skupinu što odgovara približno 9 godina starenja. Također, prelazak s normalne tjelesne mase na pretilost ima utjecaj na duljinu telomera i dovodi do skraćivanja telomera za 0.094 kb tijekom 10 godina dok prelazak na prekomjernu tjelesnu masu ima blaži efekt i skraćuje telomere za 0.074 kb (163). Ovi rezultati potvrđuju utjecaj pretilosti na ubrzano starenje organizma.

2. CILJ RADA

2.1. Hipoteze istraživanja

- Rizični polimorfizmi rs8050136, rs9930506 i rs1121980 utječu na nastanak pretilosti kod ispitivane populacije.
- Rizični polimorfizmi rs8050136, rs9930506 i rs1121980 utječu na dinamiku skraćivanja telomera.
- Rizični polimorfizmi rs8050136, rs9930506 i rs1121980 utječu na klinički status i biokemijske pokazatelje metaboličkog stanja pretilih.

2.2. Ciljevi istraživanja

Cilj ovog istraživanja je testiranje navedenih hipoteza polimorfizama gena *FTO* i duljine telomera kako slijedi:

i) Proučiti distribuciju polimorfizama gena *FTO* rs8050136, rs9930506, rs1121980 na ispitivanoj populaciji pretilih u odnosu na kontrolnu skupinu te komparativna analiza istih u odnosu na neke već analizirane polimorfizme.

ii) Odrediti duljinu telomera s obzirom na distribuciju polimorfizama gena *FTO* rs8050136, rs9930506, rs1121980 na ispitivanoj populaciji pretilih u odnosu na kontrolnu skupinu.

iii) Odrediti postoje li razlike u kliničkom statusu, biokemijskim pokazateljima metaboličkog stanja u odnosu na rs8050136, rs9930506, rs1121980 polimorfizme.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

Agaroza (Sigma), agaroza za gel-elektroforezu u pulsirajućem polju (Bio-Rad), etanol (Kemika), etidijev bromid (Roth), Tris-(hidroksimetil)-aminometan (Tris) (Sigma), destilirana voda (deH_2O), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (Kemika), kloridna kiselina (HCl) (Kemika), natrijev-hidroksid (NaOH) (Kemika), natrijev-dodecilsulfat (SDS) (Sigma), natrijev-hidrogenfosfat (Na_2HPO_4) (Kemika), natrijev-klorid (NaCl) (Kemika), kalijev-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)

3.1.2. Komercijalni kitovi

Komplet za izolaciju ukupne DNA iz animalne krvi, tkiva i stanica: DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

3.1.3. Enzimi, proteini, nukleotidi

AmpliTaq Gold^{TM} DNA polimeraza (Termo Fischer)

proteinaza K (Qiagen)

ribonukleaza A (Qiagen)

TaqMan®SNP genotipizacijski test (Termo Fischer)

HotStarTaq DNA polimeraza (Qiagen)

3.2. Analiza uzoraka

3.2.1. Izolacija DNA iz krvi

Ispitanicama je uzet uzorak pune krvi u epruvete volumena 2 ml s EDTA antikoagulansom (etilendiamintetraoctena kiselina). Uzorci su pohranjeni na temperaturi -20°C. U postupku izolacije korišten je komercijalni komplet DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. U sterilne Eppendorf tubice volumena 1.5 ml stavljeno je 100 µl pune krvi, dodano je 20 µl proteinaze K i 4 µl RNaseA koncentracije 100 mg/ml. Volumen je izjednačen s PBS puferom (pH=7.4) do 200 µl konačnog volumena te inkubiran 2 minute na sobnoj temperaturi. Poslije inkubacije u tubice je dodano 200 µl pufera za lizu stanica bez etanola AL*, vorteksirano te potom inkubirano u termobloku (PHMT) 10 minuta na 56°C. Po završenoj inkubaciji u tubice je dodano 200 µl etanola (96-100%) te snažno vorteksirano.

Sadržaj tubica je prebačen u DNeasy Mini spin kolonice s kolekcijskim tubicama volumena 2 ml i centrifugiran na 8000 rpm 1 minutu. Sadržaj kolekcijskih tubica je odbačen a sadržaj DNeasy Mini spin kolonica je stavljen u novu kolekcijsku tubicu te je potom dodano 500 µl pufera AW1* i centrifugirano na 8000 rpm 1 minutu. Sadržaj kolekcijske tubice je odbačen, a kolonica je stavljena u novu kolekcijsku tubicu te je dodano 500 µl pufera AW2, centrifugirano na 14 000 rpm 3 minute kako bi se isušila DNeasy membrana. Nakon centrifugiranja sadržaj je bačen, a kolonica je stavljena u novu Eppendorf tubicu i eluirana s 200 µl pufera AE*, inkubirana 1 minutu na sobnoj temperaturi te potom centrifugirana na 8000 rpm 1 minutu.

---

*sastav pufera je zaštićen od strane proizvođača (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Germany)

3.2.2. Provjera koncentracije i kvalitete izolirane DNA

Izolirana DNA je izmjerena spektrofotometrijski na uređaju NanoPhotometer® N60, IMPLEN. Vrijednosti koncentracija DNA izraženi u ng/µl te omjeri A260/A280 i A260/A230 uzeti su kao pokazatelji koncentracije i čistoće izolirane DNA. Kao dodatni korak provjere, uzorci DNA su stavljeni na horizontalnu gel elektroforezu u 1% agaroznom gelu

(Electrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Biosciences). Izolirana DNA je pohranjena na -20°C do daljnje analize.

3.2.3. Genotipizacija i analiza polimorfizma metodom qPCR

Za ovo istraživanje odabrana su 3 jednostruka nukleotidna polimorfizma: rs8050136 AA rizični genotip, AC heterozigot, CC nerizični genotip; rs1121980 AA rizični genotip, AG heterozigot, GG nerizični genotip; rs9930506 GG rizični genotip, AG heterozigot, AA nerizični genotip. Metoda određivanja genotipa je lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *quantitative real-time polymerase chain reaction*; qPCR) metodom alelne diskriminacije polimorfizama.

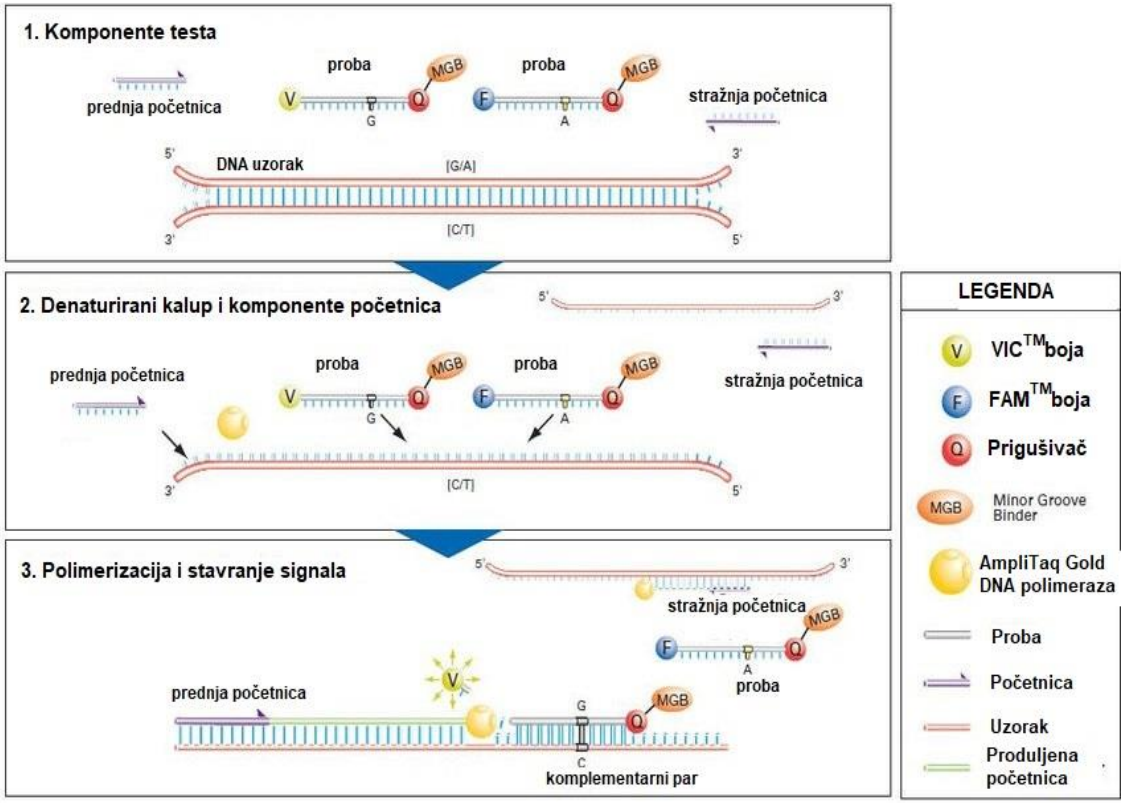
Za genotipizaciju korišteni su komercijalni kompleti TaqMan®SNP Genotyping Assay C_2031259_10 za rs8050136 A/C, C_2031261_10 za rs1121980 A/G, C_29819994_10 za rs9930506 A/G proizvođača Termo Fischer Scientific Applied Biosystems (Tablica 2). TaqMan™ real-time PCR je laboratorijska tehnika čiji se princip temelji na komplementarnom sparivanju probe i željenog fragmenta DNA molekule.

Tablica 2. Sekvence početnica korištene u PCR reakcijama

rs8050136*	CATGCCAGTTGCCCACTGTGGCAAT**[A/C]**AATATCTGAGCCTGTGGTTTTTGCC
rs1121980*	TCCTAGTCACGTGTCTTGGTACTAT**[A/G]**TGAGATTTCAGATCCACCTGCCTAC
rs9930506*	AGGGACACAAAAAGGGACATACTAC**[A/G]**TGAATTACTAATATCTAAGAAAATA
TEL-F	5-CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3
TEL-R	5-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3
IFNB1-F	5-GGTTACCTCCGAAACTGAAGA-3
IFNB1-R	5-CCTTTCATATGCAGTACATTAGCC-3
*sekvenca koja okružuje SNP i na koju je proba specifična	

Genotipizacijski test se sastoji od dvije probe koje su obilježene fluorescentnom bojom na 5' kraju, bojom VIC je obilježen alel 1, a bojom FAM alel 2, te dvije specifične početnice koje se vežu za DNA kako bi se umnožio fragment od interesa. TaqMan® MGB probe na 3' kraju nose neflourescencijski prigušivač (eng. *nonflourescent quencher* - NFQ) koji služi za eliminaciju pozadinske fluorescencije, i grupu MGB (eng. *Minor Groove Binding* - MGB) koji omogućuje bolju stabilnost kompleksa DNA i probe, povećava temperaturu taljenja (eng. *Temperature melting* - Tm) bez da se povećava duljina probe.

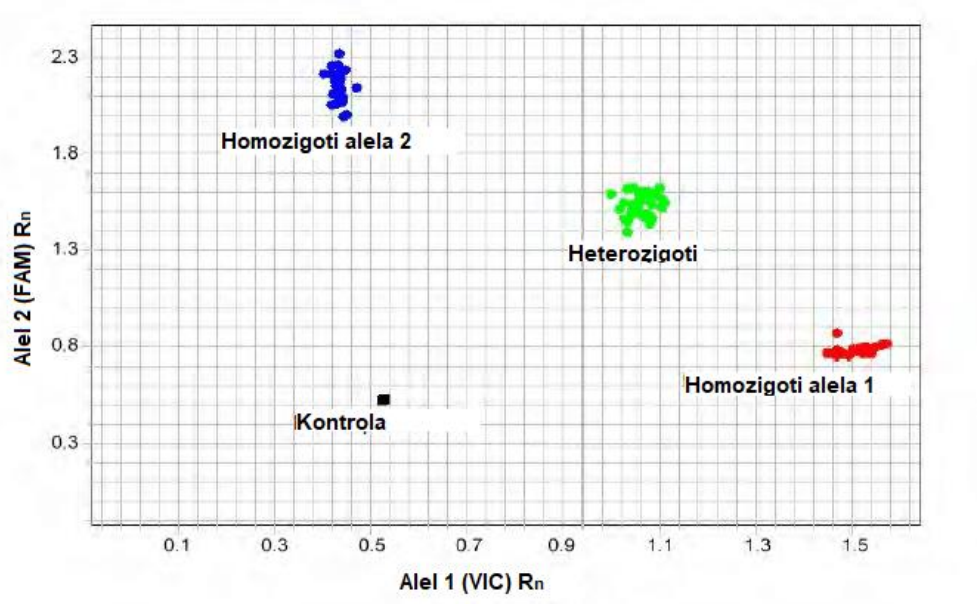
Tijekom hibridizacije AmpliTaq Gold™ DNA polimeraza cijepa samo probe koje su hibridizirane na ciljanu sekvencu. 5' egzonukleazna aktivnost DNA polimeraze omogućava cijepanje reporter boje od probe. Kada proba nije komplementarno sparena, blizina prigušivača na probi s reporter bojom rezultira supresijom fluorescencije (Slika 4). Zbog tako strogih zahtjeva, nespecifične amplifikacije nije moguće detektirati, te fluorescencijski signal prikazuje samo alel na koji se proba vezala.



Slika 4. TaqMan™SNP tehnika detekcije. Prilagođeno prema Schleinitz i sur., 2011 (164).

Metoda alelne diskriminacije svrstava svaki uzorak na njegovo individualno mjesto na dijagramu alelne diskriminacije. Tipični primjer alelnog dijagrama prikazuje nakupine homozigota, heterozigota i kontrole (voda bez DNA). Uzorci u nakupinama su zbijeni, dok su nakupine međusobno udaljene (Slika 5).

Ako postoji detekcija samo jedne boje, npr. VIC^{TM} boje, radi se o homozigotu za alel 1 koji je pozicioniran u donjem desnom kutu dijagrama. Homozigoti za alel 2 obilježeni FAM^{TM} bojom nalaze se u gornjem lijevom kutu, dok se heterozigoti nalaze približno na sredini između alela 1 i alela 2. Kontrola se nalazi u donjem lijevom kutu, neodređeni uzorci (uzorci kojima nedostaje pasivna referenca ili DNA) se nalaze bilo gdje izvan navedenih područja, dok se uzorci kod kojih nije detektirana fluorescencija nalaze kod kontrole.



Slika 5. Primjer dijagrama alelne diskriminacije (165).

R_n – unutarnji fluorescentni signal prema kojem se reporterska boja može normalizirati

3.2.3.1. Priprema uzoraka za qPCR reakciju

Priprema uzoraka za qPCR reakciju sastoji se od pripreme SNP Assay-a i podešavanja koncentracije DNA.

SNP Assay ima volumen od 187 µl, koncentriran 40x. Potrebno je pripraviti 20x radnu koncentraciju SNP Assay-a s 1x TAE puferom. SNP Assay je razrijeđen s 187 µl TAE pufera te je ukupni volumen od 374 µl vorteksiran, centrifugiran, alikvotiran, te potom zbog fotolabilnosti zamotan u aluminijsku foliju i smrznut na -20°C za daljnju analizu.

Kako uzorci izolirane DNA imaju različite koncentracije, potrebno je podesiti masu DNA na 1-20 ng/jažici, finalne koncentracije minimalno 0.2 ng/µl.

U tubicu za PCR reakciju je otpipetirano 1.25 µl SNP Assay-a od interesa, 12.50 µl 2x TaqMan® Master Mix-a (Applied Biosystems), i 11.25 µl pripremljenog uzorka DNA. Sadržaj je pomiješan laganim uvlačenjem u pipetu, te potom centrifugiran kako bi se otklonili eventualni mjehurići zraka. Tako pripremljene PCR tubice su postavljene u uređaj 7300 real-time PCR system (Applied Biosystem) te su namješteni uvjeti PCR reakcije. Ukupni volumen reakcijske smjese je 25 µl. Za obradu rezultata korišten je program 7300 System SDS Software v2.3. Uvjeti PCR amplifikacije su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije

Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
95 °C	10 minuta	1
95 °C	15 sekundi	40
60 °C	1 minuta	

3.2.4. Analiza relativne duljine telomera metodom qPCR

Relativna duljina telomera analizirana je qPCR metodom. Ovom metodom se za svaki uzorak određuje količina produkta telomernih ponavljajućih sekvenci (T) te količina produkta endogene kontrole (S), a njihov omjer (T/S) je u korelaciji s relativnom duljinom telomera. Nastali PCR produkti detektiraju se interkaliranjem spoja SYBR Green (QuantiTect, Qiagen) u dvostruku uzvojnicu DNA. Budući da SYBR Green emitira fluorescenciju tek kad je interkaliran u DNA, taj efekt omogućuje praćenje porasta fluorescencije sa svakim ciklusom PCR-a i služi kao indirektna mjera za količinu nastalog PCR produkta.

Kao endogena kontrola korišten je interferon beta 1 (IFNB1), gen koji pripada skupini interferonskih gena na kromosomu 9, a prisutan je u jednoj kopiji u haploidnom genomu (166). Prema njemu se izračunava relativna količina telomernih ponavljanja. Svaki uzorak analiziran je u triplikatu za telomerne ponavljajuće sekvence i IFNB1. Na svakoj pločici analiziran je i jedan odabrani uzorak koji je korišten kao kalibrator i prema kojem su svi uzorci normalizirani kako bi se osigurala reproducibilnost između različitih pločica.

Preuzeti protokol za kvantifikaciju duljine telomera je prema Vasilishina i sur. (166). Relativna razlika u duljini telomera izračunava se na sljedeći način:

1. Izračunati srednju Ct vrijednost za TEL i IFNB1 svakog uzorka
2. Izračunati $\Delta Ct = CtTEL - CtIFNB1$ svakog uzorka
3. Izračunati T/S omjer ($=2^{-\Delta Ct}$) svakog uzorka
4. Normalizacija prema uzorku kalibratoru:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{uzorak}} - \Delta Ct_{\text{kalibrator}}$

Relativna promjena (eng. *fold change*) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.2.4.1. Priprema uzoraka za kvantifikaciju duljine telomera

Priprema uzoraka za qPCR reakciju sastoji se od pripreme reakcijske smjese s bojom SYBR Green, početnicama i vodom te podešavanja koncentracije DNA.

QuantiTech boja SYBR Green dolazi u 2x početnoj koncentraciji u volumenu od 25µL te je potrebno pripraviti boju u 1x konačnoj koncentraciji. PCR mix 2x QuantiTech SYBR Green sadrži pasivnu referencu ROX koja pruža unutarnju fluorescenciju prema kojoj se reporterska boja može normalizirati te služi za korekciju fluorescencije zbog promjene volumena ili koncentracije DNA. DNA polimeraza HotStarTaq sadržana u mix-u zahtjeva aktivaciju na 95°C/15'.

Za reakcijsku smjesu potrebno je optimizirati koncentraciju početnica koje su u 5µM početnoj koncentraciji. Prednja početnica za telomernu sekvencu (TEL-F) ima finalnu koncentraciju 0.3 µM, a stražnja početnica (TEL-R) finalnu koncentraciju 0.4 µM (Tablica 4). Prednja i stražnja početnica za endogenu kontrolu (IFNB1-F i IFNB1-R) imaju finalnu koncentraciju od 0.4 µM (Tablica 5). Reakcijski mix je pripremljen, zamotan u aluminijsku foliju zbog fotolabilnosti i spremljen na +4°C do upotrebe. Masa DNA koja ide u reakcijsku smjesu je 10 ng/jažici finalne koncentracije 2 ng/µl. Do ukupnog volumena reakcijske smjese od 25 µl je dodana voda.

Pripremljene tubice za PCR su postavljene u uređaj CFX (Bio Rad) te su namješteni uvjeti PCR reakcije (Tablica 6).

Tablica 4. Reakcijska smjesa za telomernu sekvencu

	TEL		
	POČETNA KONCENTRACIJA	FINALNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN U REAKCIJSKOJ SMJESI (µL)
SYBER GREEN	2x	1x	12.5 µL
TEL-F	5 µM	0.3 µM	1.5 µL
TEL-R	5 µM	0.4 µM	2 µL
DNA	9-12 ng/µL	2 ng/µL	4 - 5.5 µL
H_2O	-	-	4 µL
UKUPNI VOLUMEN			25 µL

Tablica 5. Reakcijska smjesa za sekvencu endogene kontrole

	IFNB1		
	POČETNA KONCENTRACIJA	FINALNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN U REAKCIJSKOJ SMJESI (µL)
SYBER GREEN	2x	1x	12.5 µL
IFNB1-F	5 µM	0.4 µM	2 µL
IFNB1-R	5 µM	0.4 µM	2 µL
DNA	9-12 ng/µL	2 ng/µL	4 – 5.5 µL
H_2O	-	-	3.5 µL
UKUPNI VOLUMEN			25 µL

Tablica 6. Uvjeti PCR reakcije za kvantifikaciju duljine telomera

Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
95 °C	15 minuta	1
95 °C	15 sekundi	40
60 °C	1 minuta	

3.2.5. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja su statistički obrađeni u Microsoft Excel 2013 i Graph Prism programu (version 9.1.1.). Učestalost pojedinih genotipova u kontrolnoj skupini i skupini pretilih je određena i uspoređena s odstupanjem od očekivane distribucije u skladu s Hardy-Weinbergovim pravilom. Značajnost odstupanja genotipova od očekivane distribucije određena je X^2 testom pomoću računalnog programa. Rezultat nije u skladu s Hardy-Weinbergovim pravilom ukoliko je *P* vrijednost < 0.05.

Frekvencija pojavljivanja određenog genotipa u grupi pretilih ili kontrola je odrađena deskriptivnom statistikom, a hi-kvadrat test je korišten da bi se odredila statistički značajna povezanost genotipa sa skupinom. Povezanost od $P < 0.05$ se smatra statistički značajnom. Izmjerene vrijednosti analita su podijeljene u dvije grupe, grupa 1 u kojoj se izmjerene vrijednosti nalaze u deficitu, i grupa 2 gdje se izmjerene vrijednosti nalaze u suficitu. Iznimka je HOMA-IR, čije vrijednosti mjerenja su podijeljene u tri grupe (vidjeti Tablicu 8). Analiza

povezanosti biokemijskih pokazatelja i prisutnosti polimorfizma je provedena uz pomoć hi-kvadrat testa i Anova tablice. Statistički značajna vrijednost je postavljena na $P < 0.05$. Biokemijske analize su napravljene na biokemijskom analizatoru eCobas 6000, Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka. Metoda analize biokemijskih parametara je elektrokemiluminiscencija na platformi Roche (ECLIA). Za usporedbu polimorfizama gena *FTO* s odabranim pretragama također su u obzir uzeti i prateći komorbiditeti pretilosti. Komorbiditeti koji su uključeni jesu: hipertenzija, intolerancija na glukozu, predijabetes te inzulinska rezistencija i dislipidemija (podatci prikupljeni na KBC Zagreb, Zavod za Endokrinologiju) (167).

3.2.6. Ispitanice

U ovom istraživanju sudjeluje 64 žene starije od 18 godina podijeljene u dvije skupine: 45 žena s ITM ≥ 30 kg/m^2 kao ispitivana skupina i 19 žena s normalnim ITM (18-25 kg/m^2) kao kontrolna skupina čiji su uzorci prikupljeni u Kliničkom bolničkom centru Zagreb pri Referentnom centru RH za liječenje debljine Zavoda za Endokrinologiju. Raspon godina je od 21 do 66 godine.

Uključni kriteriji u istraživanju su bili ITM ≥ 30 kg/m^2, s ili bez hipertenzije, predijabetesa, dijabetesa. Antropometrijske veličine ispitanica su uključivale tjelesnu visinu (cm), tjelesnu masu (kg). Isključni kriterij su: ne liječena bolest štitnjače, bolest hipofize, nadbubrežne žlijezde, Cushingov sindrom, transplantirani i onkološki bolesnici. Pristanak na istraživanje je isključivo dobrovoljan. Ispitanice su upoznate s podatcima i specifičnostima istraživanja, ciljevima istraživanja, povjerljivosti i zaštiti osobnih podataka te su potpisale informirani pristanak za sudjelovanje. Ispitanice su ispunile anketni upitnik, te im je uzet uzorak krvi.

Istraživanje *"Povezanost odabranih jednostrukih nukleotidnih polimorfizama u ljudskom genu FTO s tjelesnom masom i mikrobiomom usne šupljine u žena Zagrebačke županije*" je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a istraživanje pod naslovom *"Retrospektivne analize podataka pretilih bolesnika koji su liječeni individualnim ili 5-dnevnim grupnim strukturiranim pristupom kroz dnevnu bolnicu*" je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Zagreb.

4. REZULTATI

Ovo istraživanje obuhvaća analizu tri jednostruka nukleotidna polimorfizma na genu *FTO*: rs8050136, rs9930506, rs1121980. Ova tri polimorfizma će se usporediti s polimorfizmima rs9939609, rs17817449 i rs1421085 polimorfizma koji su analizirani ranije na istim uzorcima u istraživanju Huđek i sur. (167). Ispitanicama su napravljene i biokemijske pretrage povezane s pretilošću i dijabetesom.

4.1. Distribucija ispitivanih polimorfizama

Kontrolna skupina ima prosjek godina 31.53 ± 9.56, raspon 23-55, srednja vrijednost ITM-e je 21.74 ± 2.23, raspon 18.5 – 24.8 kg/m^2. Ispitivana skupina ima prosjek godina 43.67 ± 11.12, raspon godina 21-66, srednja vrijednost ITM-e 43.10 ± 8.38, raspon 30-62.2 kg/m^2.

Istraživanje polimorfizma rs8050136 je pokazalo veću učestalost rizičnog genotipa AA (40.00%), i heterozigota AC (37.78%) kod osoba s pretilošću, dok je kod kontrola opažena najveća prisutnost heterozigota AC (63.16%), a rizični genotip AA je bio potpuno odsutan. Prisutnost nerizičnog genotipa u kontrolnoj skupini je veća od one u ispitivanoj skupini (36.84% vs 22.22%). Rezultati su prikazani na slici 6A.

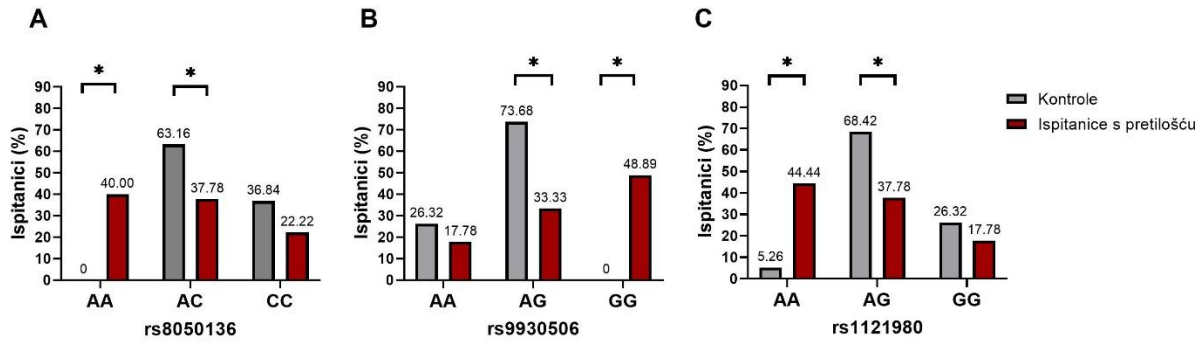
Veća zastupljenost rizičnog genotipa AA između ispitivane skupine i kontrolne je statistički značajna, $P = 0.00115$ te prisutnost AC rs8050136 genotipa u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu, prema hi-kvadrat testu ima statistički značajnu vrijednost, $P = 0.00152$. Učestalost nerizičnog genotipa CC između ispitivane i kontrolne skupine nema statistički značajnu vrijednost, $P = 0.13$.

Analiza polimorfizma rs9930506 pokazala je u skupini s pretilosti veću zastupljenost rizičnog genotipa GG (48.89%), dok u kontrolnoj skupini rizični genotip nije zastupljen. U skupini ispitanica s pretilošću zastupljenost heterozigota je manja u usporedbi s kontrolnom skupinom (33.33% vs 73.68%), dok je nerizični genotip AA više zastupljen u kontrolnoj skupini (26.32% vs 17.78%). Rezultati su prikazani na slici 6B.

Zastupljenost rizičnog alela GG rs9930506 između ispitivane skupine je statistički značajna, $P = 0.00017$. Distribucija heterozigotnog genotipa AG između skupina ima statističku značajnost, $P = 0.00013$, dok zastupljenost nerizičnog genotipa AA između skupina nema statistički značajnu vrijednost, $P = 0.27$.

Rizični genotip AA rs1121980 u skupini s pretilosti ima veću zastupljenost u odnosu sa kontrolnu skupinu (44.44% vs 5.26%), zastupljenost heterozigota AG je veća u kontrolnoj skupini u odnosu na ispitanice s pretilosti (68.42% vs 37.78%), dok je za nerizični genotip GG prisutna nešto veća frekvencija u kontrolnoj skupini (26.32% vs 17.78%). Odnos genotipova je prikazan na slici 6C.

Raspodjela rizičnog genotipa AA rs1121980 ima statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu, $P = 0.00153$. Distribucija heterozigotnog alela AG između skupina ima statistički značajnu razliku, $P = 0.00092$, dok distribucija nerizičnog genotipa nema statistički značajnu razliku između skupina, $P = 0.27$.

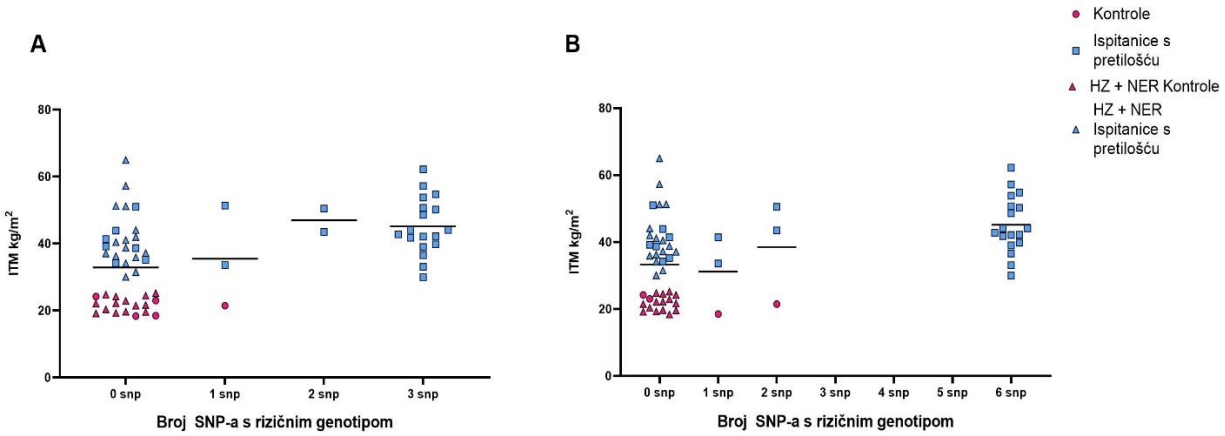


Slika 6. Distribucija genotipova ispitivanih polimorfizama.

*statistički značajna vjerojatnost, $P < 0.01$, Pearsonov hi-kvadrat test

Usporedbom rizičnih genotipova istraživanih polimorfizama i ITM u kontrolnoj skupini i skupini s pretilosti dobivamo bimodalnu distribuciju učestalosti rizičnog genotipa u pretiloj skupini. Ispitanice s pretilošću (n=18) većinom imaju rizični genotip za sva tri analizirana SNP-a ili nemaju rizični genotip za niti jedan od ispitivanih SNP-a (n=23).

Za razliku od skupine s pretilošću, ispitanice normalnog ITM (kontrolna skupina) nemaju rizičnih polimorfizama osim jedne iznimke (Slika 7A). Bimodalna distribucija rizičnih genotipova ostaje slična kad se rezultatima pridruže podaci za dodatna tri SNP-a, analizirani u prethodnoj studiji (167). Kod 40% ispitanica s pretilošću rizični genotip se pojavljuje na svim analiziranim SNP-a, dok se kod samo četiri ispitanice rizični genotip može detektirati na jednom ili dva SNP-a (Slika 7B). Kod ostalih ispitanica s pretilošću (51.11%) nije detektiran rizični genotip. Niti jedna ispitanica iz kontrolne skupine nije imala tri ili šest rizičnih polimorfizama.



Slika 7. Distribucija rizičnih polimorfizama u odnosu na ITM, za tri SNP-a analizirana u ovoj disertaciji (A) te uključujući i podatke za dodatna tri SNP-a analizirana u Huđek i sur. (167) (B). HZ-heterozigot; NER-nerizični genotip.

Distribucija genotipova SNP-a rs8050136 unutar kontrolne skupine i ispitanica se slaže s Hardy-Weinbergovim pravilom (HWE) $P = 0.132$ za kontrolnu skupinu i $P = 0.33$ za ispitivanu skupinu (Tablica 7). Distribucija genotipova SNP-a rs9930506 kod ispitivane skupine ne odstupa od Hardy-Weinbergove distribucije, $P = 0.213$, dok distribucija genotipova u kontrolnoj skupini nije u skladu s HWE $P = 0.039$. U ispitivanoj skupini, $P = 0.456$ i kontrolnoj skupini, $P = 0.17$ distribucija genotipova rs1121980 ne odstupa od Hardy-Weinbergove ravnoteže (Tablica 7).

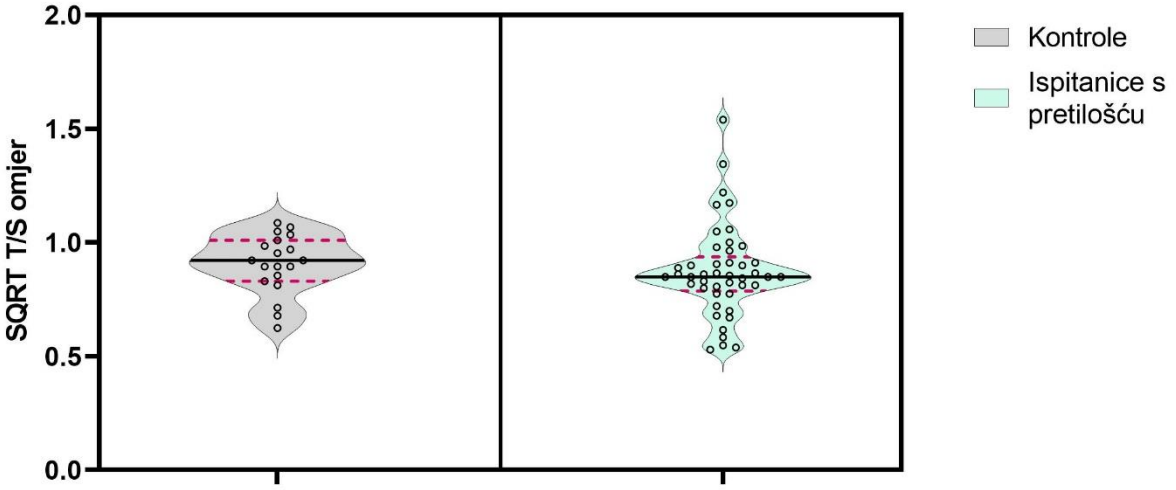
Tablica 7. Hardy-Weinbergova distribucija genotipova

	rs8050136						rs9930506						rs1121980					
	Kontrolna skupina			Pretili			Kontrolna skupina			Skupina s pretilosti			Kontrolna skupina			Skupina s pretilosti		
Genotip	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
Frekvencija genotipa	0.10	0.44	0.46	0.35	0.48	0.16	0.39	0.46	0.13	0.43	0.44	0.11	0.15	0.47	0.37	0.39	0.46	0.13
Frekvencija alela	A= 0.32 C= 0.68			A= 0.59 C= 0.41			A= 0.63 G= 0.37			A= 0.66 G= 0.34			A= 0.39 G= 0.61			A= 0.63 G= 0.37		
Dobiveno	0	12	7	18	17	10	5	14	0	8	15	22	1	13	5	20	17	8
Očekivano	1.9	8.2	8.9	15.6	21.8	7.6	7.6	8.8	2.6	5.3	20.3	19.3	2.9	9.1	6.9	18.1	20.9	6.1
X^2 test	X^2 = 4.047 *P* =0.132			X^2 = 2.174 *P* = 0.337			X^2 = 6.465 *P**= 0.039			X^2 = 3.086 *P* = 0.213			X^2 = 3.544 *P* = 0.17			X^2 = 1.567 *P* = 0.456		

*P** - nije u skladu sa HWE

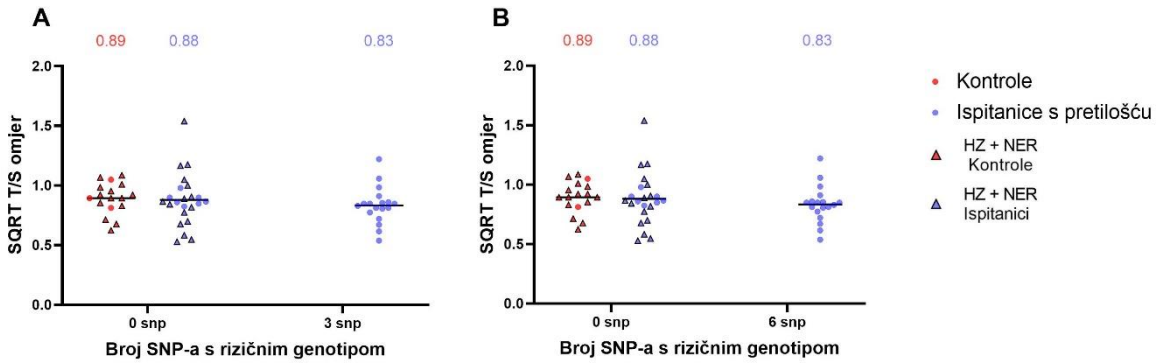
4.2. Rezultati duljine telomera s obzirom na distribuciju ispitivanih polimorfizama

Provedena genotipizacija na tri polimorfizma omogućila je uvid u detaljnije stanje distribucije polimorfizama. S obzirom na rezultate genotipizacije dodatno je provedena analiza duljine telomera (T/S omjer). T/S omjer u kontrolnoj skupini ima srednju vrijednost 0.83 a u ispitivanoj skupini srednja vrijednost je 0.80 (t test; $P = 0.26$) (Slika 8).



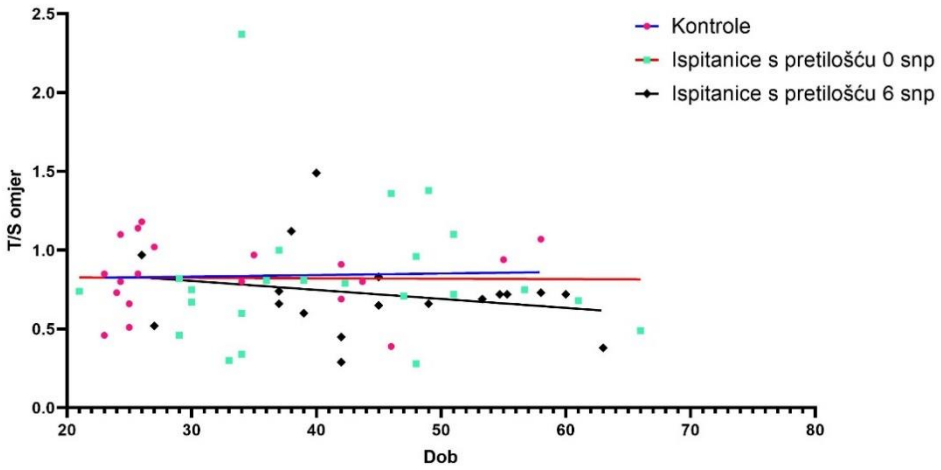
Slika 8. Prikaz distribucije T/S omjera za kontrolnu i ispitivanu skupinu.
SQRT – korijen (eng. *square root*)

S obzirom na razliku u duljini telomera između ispitivane i kontrolne skupine, dalje se analizirala duljina telomera u odnosu na broj SNP-a s rizičnih genotipom. Duljina telomera je jednaka u ispitivanoj i kontrolnoj skupini kod ispitanica koje nemaju niti jedan SNP s rizičnim genotipom (Slika 9A), te ukazuje da se populacijske srednje vrijednosti SQRT T/S omjera ne razlikuju, $P = 0.41$. Također, jednaka je i duljina telomera bilo da imaju rizični genotip za tri ili šest SNP-a (Slika 9B). Iako razlika između nula i tri ($P = 0.23$) i/ili šest SNP-a ($P = 0.23$) nije statistički značajna, razlika u distribuciji duljine telomera ukazuje na utjecaj rizičnih SNP-a na skraćivanje telomera.



Slika 9. Odnos duljine telomera s brojem rizičnih genotipa ispitivanih SNP-a. Na slici 8A nisu prikazana dva ispitanika iz kontrolne skupine, jedan ispitanik s jednim rizičnim SNP-om te jedan ispitanik s dva rizična SNP-a. Na slici 8B nisu prikazana četiri uzorka iz skupine ispitanica s pretilošću, dva ispitanika s jednim rizičnim SNP-om te dva ispitanika s dva rizična SNP-a zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.
HZ-heterozigot; NER-nerizični genotip, SQRT – korijen (eng. *square root*)

Obzirom da se duljina telomera skraćuje svakom diobom stanica, proveli smo analizu duljine telomera ovisno o dobi (Slika 10). Analiza duljine telomera ovisno o dobi je pokazala neovisnost T/S omjera o dobi u kontrolnoj skupini, Y (T/S) = -0.0009 × X (Dob) + 0.8058 te skupini ispitanica s 0 polimorfizama, Y (T/S) = -0.0003 × X (Dob) + 0.8341. Kod ispitanica koje nose rizični genotip svih šest SNP-a postoji koeficijent pada T/S omjera s povećanjem dobi ali bez statističke značajnosti, Y (T/S) = -0.0045 × X (Dob) + 0.9381.

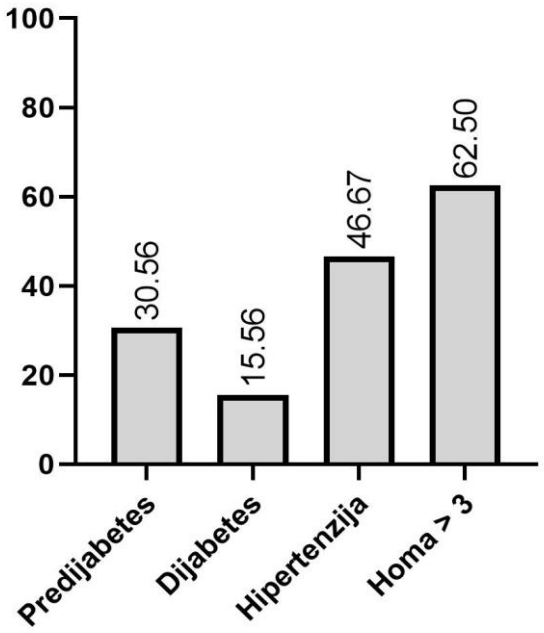


Slika 10. Ovisnost telomera o dobi.

4.3. Rezultati kliničkih parametara u skupini s pretilošću

Skupina s pretilosti dalje se analizirala prema prisutnosti rizičnih polimorfizama, komorbiditetima i laboratorijskim nalazima.

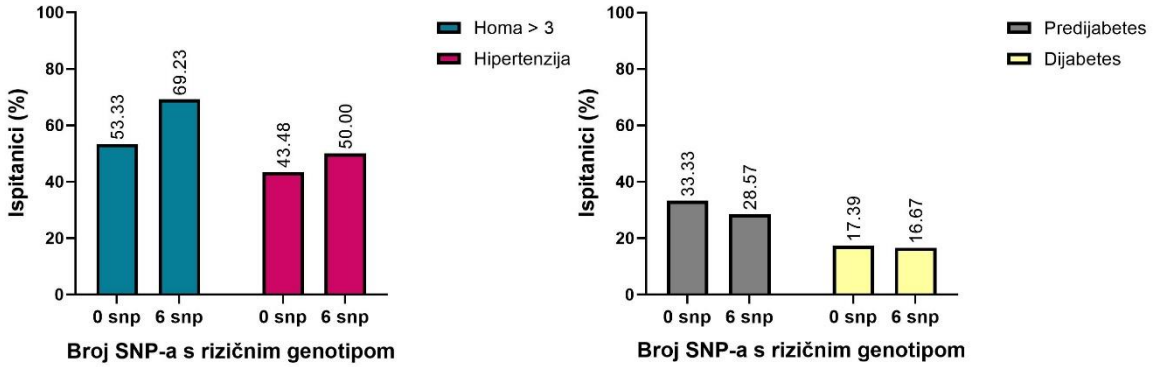
Ispitanice s pretilošću imaju veću zastupljenost predijabetesa koja se dijagnosticirala s intolerancijom glukoze natašte ili postprandijalno u usporedbi s klinički dijagnosticiranim dijabetesom (30.56% vs 15.56%; Slika 11). Također, ispitanice s pretilošću imaju veću zastupljenost inzulinske rezistencije u odnosu na ispitanice s pretilošću bez inzulinske rezistencije (62.50% vs 37.50%), a hipertenzija se pojavljuje u 46.67% ispitanica.



Slika 11. Frekvencija komorbiditeta u ispitivanoj skupini.
HOMA-IR (eng. *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*)

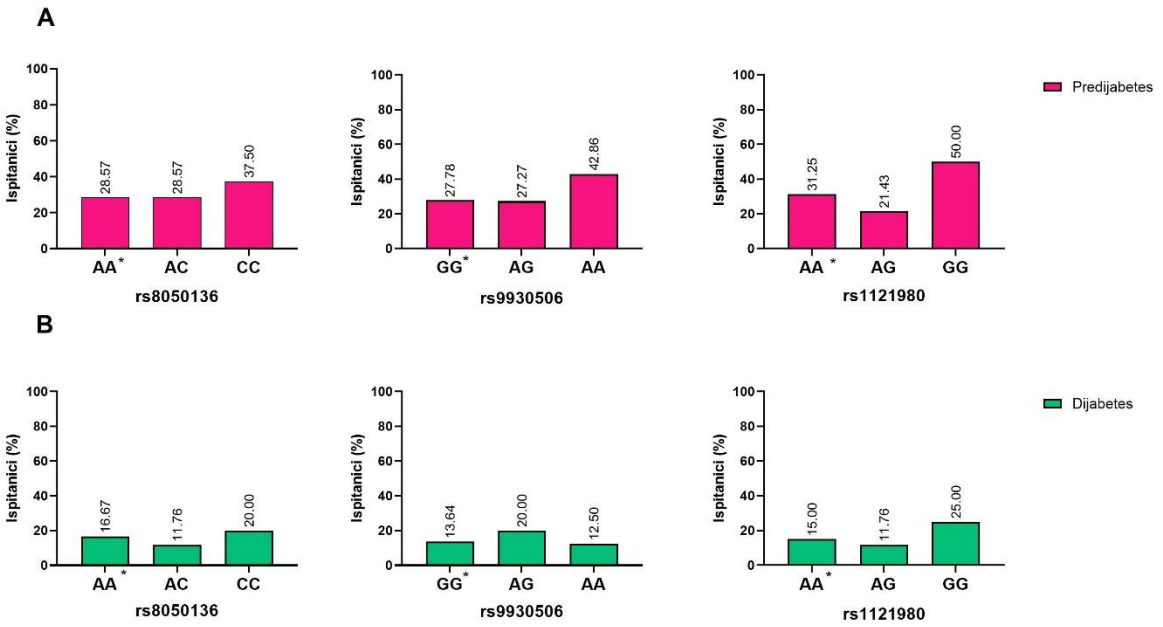
Kada analiziramo frekvenciju pojavljivanja komorbiditeta ovisno o prisutnosti rizičnog genotipa tada se vidi veća pojavnost predijabetesa kod ispitanica bez rizičnog genotipa u odnosu na one ispitanice sa šest rizičnih polimorfizama, dok razlike u pojavljivanju dijabetesa nisu

uočene. Veća pojavnost inzulinske rezistencije i veće zastupljenosti hipertenzije vidljiva je kod ispitanica s pretilošću i šest rizičnih SNP-a (Slika 12).

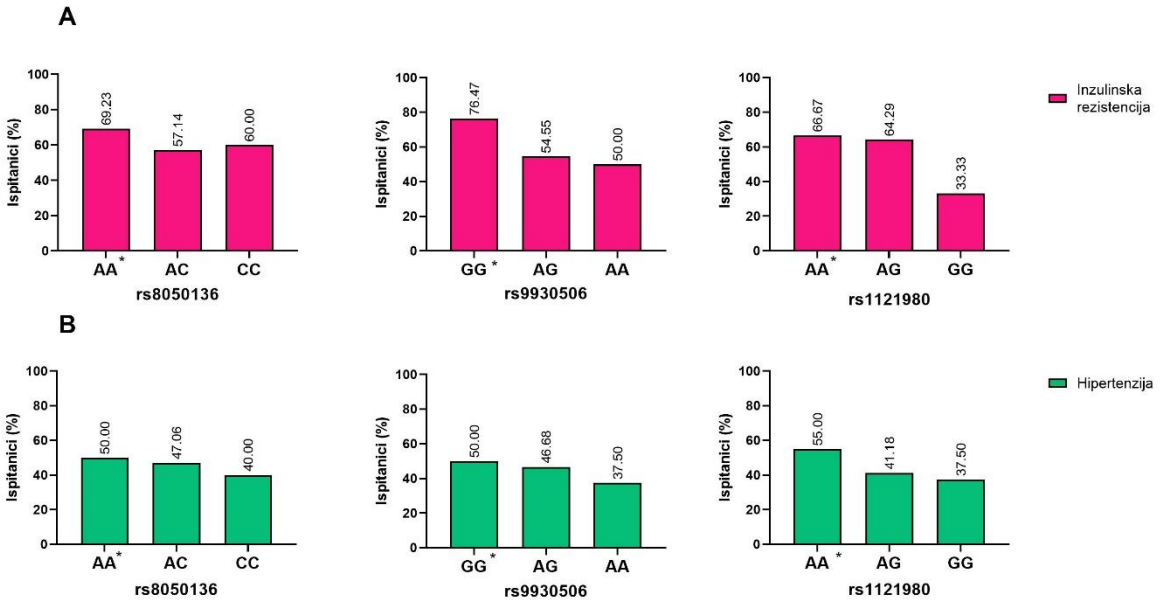


Slika 12. Frekvencija komorbiditeta uz prisutnost rizičnih polimorfizama.

Dalje provedena analiza frekvencije pojavljivanja komorbiditeta ovisno o genotipu pokazala je da prisutnost nerizičnog genotipa CC rs8050136, AA rs9930506 i GG rs1121980 imaju veću pojavnost predijabetesa (Slika 13A). Nerizični genotip CC rs8050136 i GG rs1121980 te heterozigotni genotip rs9930506 imaju veću frekvenciju dijabetesa (Slika 13B). Rizični genotipovi ispitivanih SNP-a imaju veću frekvenciju inzulinske rezistencije (Slika 14A). Nerizični genotip CC rs8050136 ima nešto manju pojavnost inzulinske rezistencije u odnosu na rizični genotip AA rs8050136, ali veću u odnosu na ostale nerizične genotipove. Na slici 14B je vidljiva veća pojavnost hipertenzije kod rizičnog genotipa AA rs1121980 dok rizični genotipovi za ostala dva polimorfizma imaju jednaku pojavnost hipertenzije.



Slika 13. Prikaz frekvencije predijabetesa i dijabetesa ovisno o genotipu polimorfizma.
*rizični genotip



Slika 14. Prikaz frekvencije inzulinske rezistencije i hipertenzije ovisno o genotipu polimorfizma.
*rizični genotip

4.4. Laboratorijski parametri skupine s pretilošću

Daljnje analize ispitanica s pretilošću obuhvaćaju detekciju razlike u laboratorijskim parametrima metaboličkog stanja kod ispitanica bez rizičnog genotipa i ispitanica sa šest rizičnih SNP-a (Tablica 8).

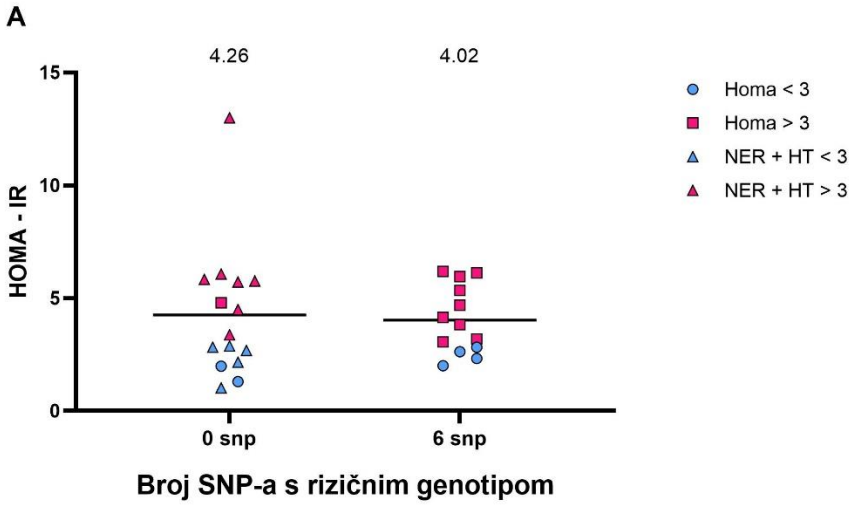
Tablica 8. Laboratorijski parametri ispitivanih analita

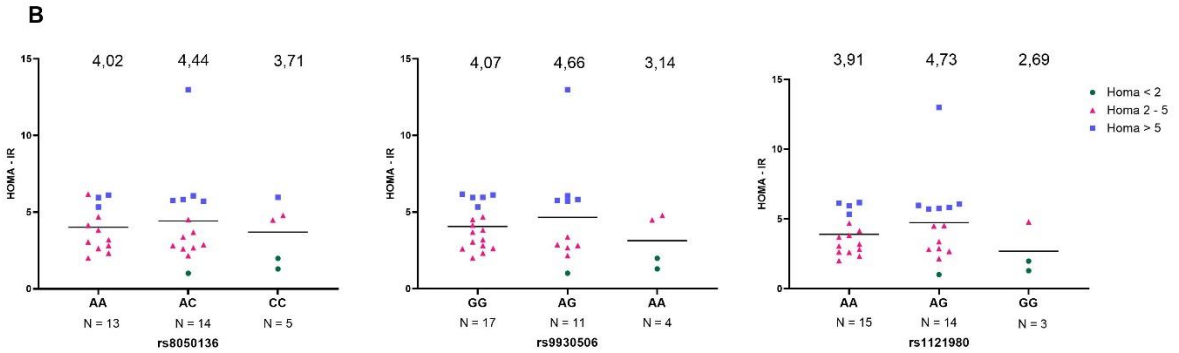
Analit	n	Mean	SD	min	max	*Cut-off* §	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3
HOMA – IR*	32	4.16	2.24	1.02	12.99	3	3 (9.38%)	19 (59.38%)	10 (31.25%)
Vitamin D (50 – 200 nmol/L)	35	38.87	18.79	12	97	50	29 (82.86%)	6 (17.14%)	N/A
Folna (7 – 39.7 mmol/L)	30	15.59	6.44	3	31.5	13.5	12 (40.00%)	18 (60.00%)	N/A
Vitamin B_{12} (145 – 637 pmol/L)	30	291.27	158.58	74	781	250	12 (40.00%)	18 (60.00%)	N/A
LDL (< 3 mmol/L)	29	3.08	0.91	1.11	5.6	3	12 (41.38%)	17 (58.62%)	N/A
HDL (> 1.2 mmol/L)	28	1.31	0.32	0.69	2.2	1.2	10 (35.71%)	18 (64.29%)	N/A
TGL (< 1.7 mmol/L)	29	1.31	0.62	0.56	2.84	1.7	22 (75.86%)	7 (24.14%)	N/A
Ca (2.14 – 2.53 mmol/L)	35	2.31	0.10	2.17	2.55	2.5	33 (94.29%)	2 (5.71%)	N/A
Mg (0.65 – 1.05 mmol/L)	34	0.82	0.10	0.45	0.96	0.85	22 (64.71%)	12 (35.29%)	N/A
Fosfor (0.79 – 1.42 3mmol/L)	34	1.05	0.13	0.84	1.39	0.79	/	34 (100%)	N/A

*HOMA-IR je jedan od jednostavnijih alata dijagnostike inzulinske rezistencije, a računa se po formuli: HOMA-IR= (razina glukoze natašte x razina inzulina natašte)/22.5. Referentni interval 3 – 5 predstavlja inzulinsku osjetljivost, a > 5 inzulinsku rezistenciju.

Vrijednosti vitamina D < 50 nmol/L su deficit vitamina D, vrijednosti 50 – 75 nmol/L su insuficijencija vitamina D, a vrijednosti > 75 nmol/L su suficijencija vitamina D.
[§] vrijednost mjerenja ispod koje se uzorak svrstava u Grupu 1 (analit u deficitu), a iznad koje se svrstava u Grupu 2 (analit u suficitu)

Od 32 ispitanice kojima je određena vrijednost HOMA-IR, 20 (62.50%) ima vrijednost HOMA-IR > 3. Ne postoji statistički značajna razlika u vrijednosti HOMA-IR između ispitanica bez rizičnih SNP-a i sa šest rizičnih SNP-a, $P = 0.99$. Vrijednost HOMA-IR je manja kod ispitanica sa šest rizičnih SNP-a (Slika 15A). Kod ispitivanih polimorfizama veći HOMA-IR je prisutan kod heterozigotnog genotipa, gdje se ističe polimorfizam rs1121980. Međutim najniže vrijednosti HOMA-IR imaju nerizični genotipovi među kojima se ističe genotip GG rs1121980 genotip (Slika 15B). Nije pronađena značajna povezanost između polimorfizma i HOMA-IR (rs8050136 $P = 0.22$; rs9930506 $P = 0.37$; rs1121980 $P = 0.62$).

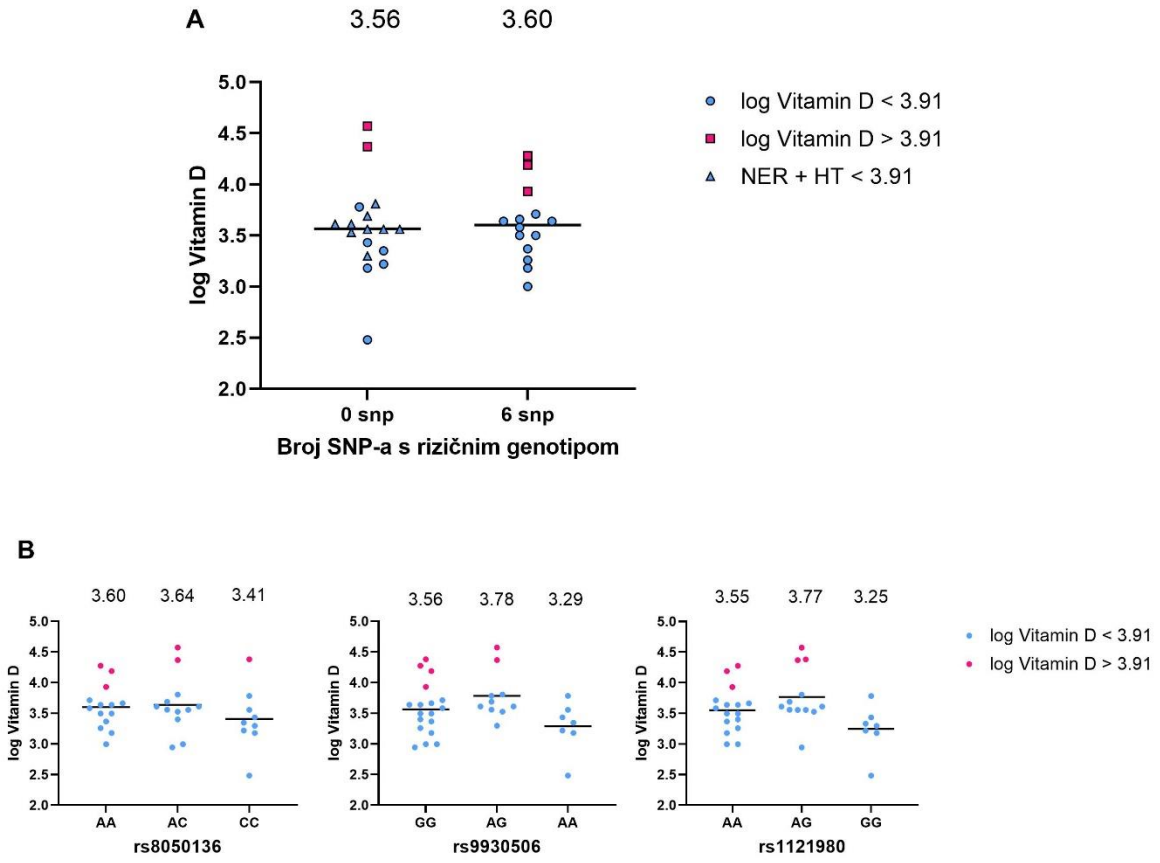




Slika 15. Distribucija HOMA - IR u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma. Na slici 15A su izostavljene četiri ispitanica koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.
*MR- minimalno rizični (ispitanice koje uz nerizične genotipove imaju barem jedan heterozigotni genotip i/ili jedan rizični genotip); HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

Više od 80% ispitanica ima snižene vrijednosti vitamina D. Povećanje broja rizičnih polimorfizama nije povezano s vrijednostima vitamina D, odnosno ne postoji razlika u koncentraciji vitamina D između ispitanika bez rizičnih SNP-a i ispitanika sa šest rizičnih SNP-a (Slika 16A; $P = 0.8$).

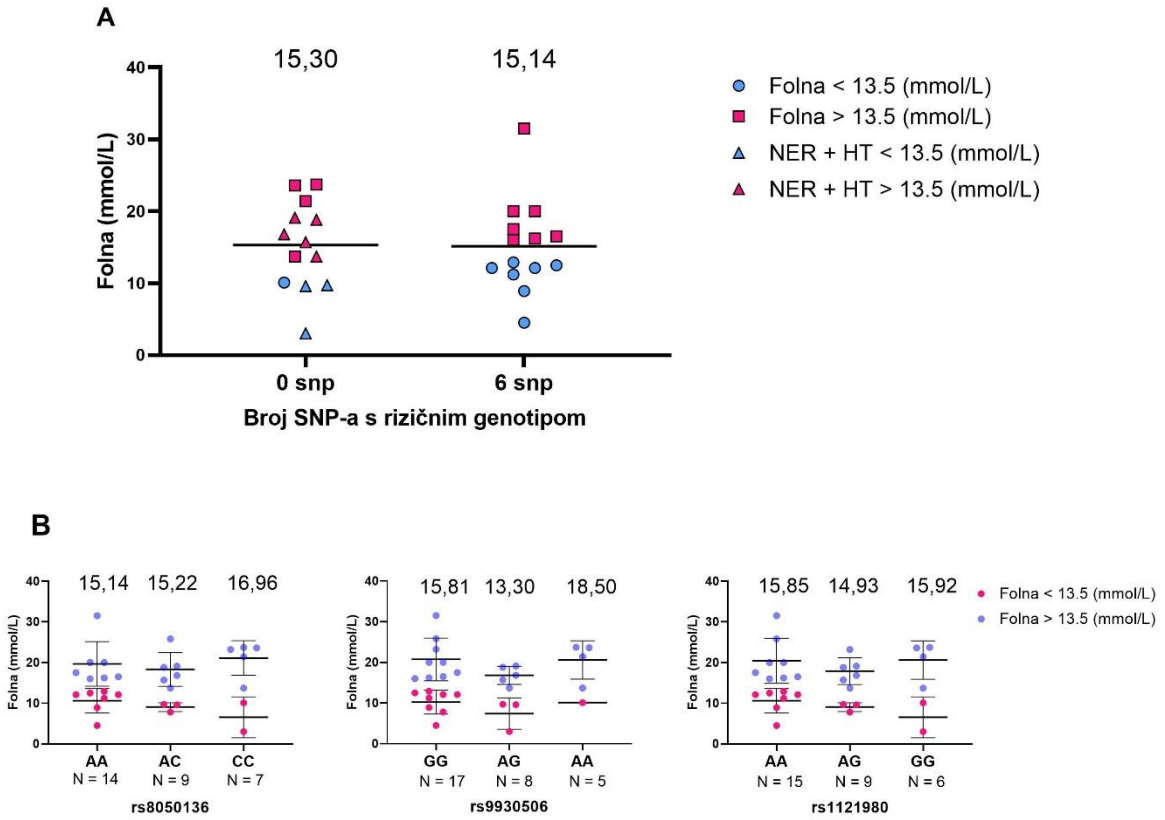
Distribucija vitamina D po genotipu detaljnije je prikazana na slici 16B koja prikazuje više vrijednosti vitamina D kod heterozigota u usporedbi s rizičnim i nerizičnim genotipom koji imaju niže vrijednosti, pri čemu nerizični genotip ima najniže vrijednosti. Distribucija vitamina D kod polimorfizma rs1121980 se statistički granično značajno razlikuje, $P = 0.048$. Ispitanicima kojima je izmjerena vrijednost vitamina D (n = 35), 3 ispitanice (8.57%) imaju suficijenciju vitamina D, 32 ispitanice (91.43%) ima insuficijenciju vitamina D, od toga je 29 ispitanica (82.63%) u rangu deficita vitamina D.



Slika 16. Distribucija vitamina D u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma. Na slici 16A su izostavljene četiri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.

*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

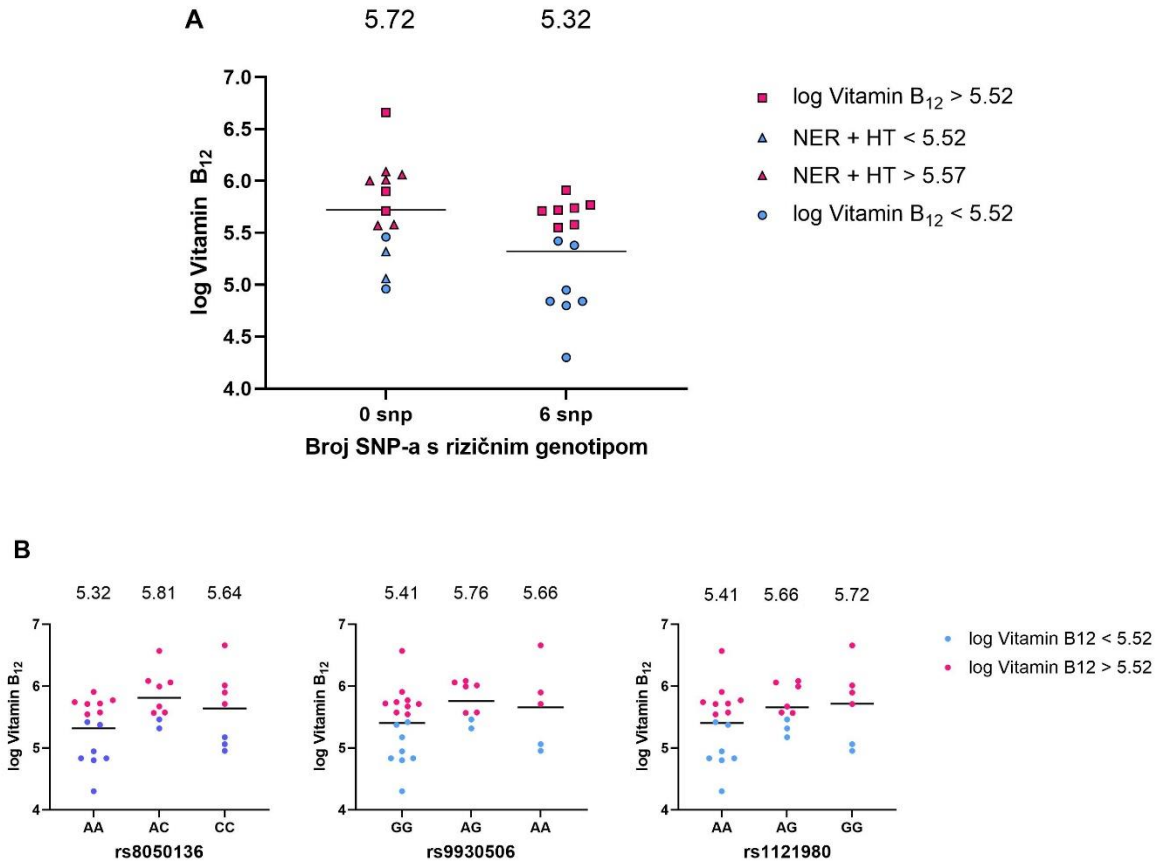
Analiza vrijednosti folne kiseline ne pokazuje razliku između ispitanica bez rizičnih SNP-a i kod ispitanica sa šest rizičnih SNP-a, $P = 0.65$ (Slika 17A). Ispitanice s pretilosti koje imaju heterozigotni genotip polimorfizma rs9930506 imaju najniže koncentracije folne kiseline dok nerizični genotip rs9930506 ima najviše vrijednosti (Slika 17B). Nije pronađena statistički značajna povezanost polimorfizma s koncentracijom folne kiseline (rs8050136 $P = 0.82$; rs9930506 $P = 0.37$; rs1121980 $P = 0.94$).



Slika 17. Distribucija folne kiseline u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma. Na slici 17A su izostavljene tri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.

*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

Analiza koncentracije vitamina B_{12} pokazuje niže vrijednosti kod ispitanica sa šest rizičnih polimorfizama (Slika 18A), te je vidljivo kako su niže vrijednosti zastupljene kod rizičnog, a veće vrijednosti kod nerizičnog genotipa (Slika 18B). Analiza povezanosti koncentracije vitamina B_{12} kod ispitanica bez rizičnih SNP-a ili sa šest rizičnih SNP-a nije pokazala statistički značajnu razliku, $P = 0.09$, kao ni analiza povezanosti koncentracije B_{12} s polimorfizmom također nije pokazala statističku značajnost (rs8050136 $P = 0.07$; rs9930506 $P = 0.026$; rs1121980 $P = 0.36$).



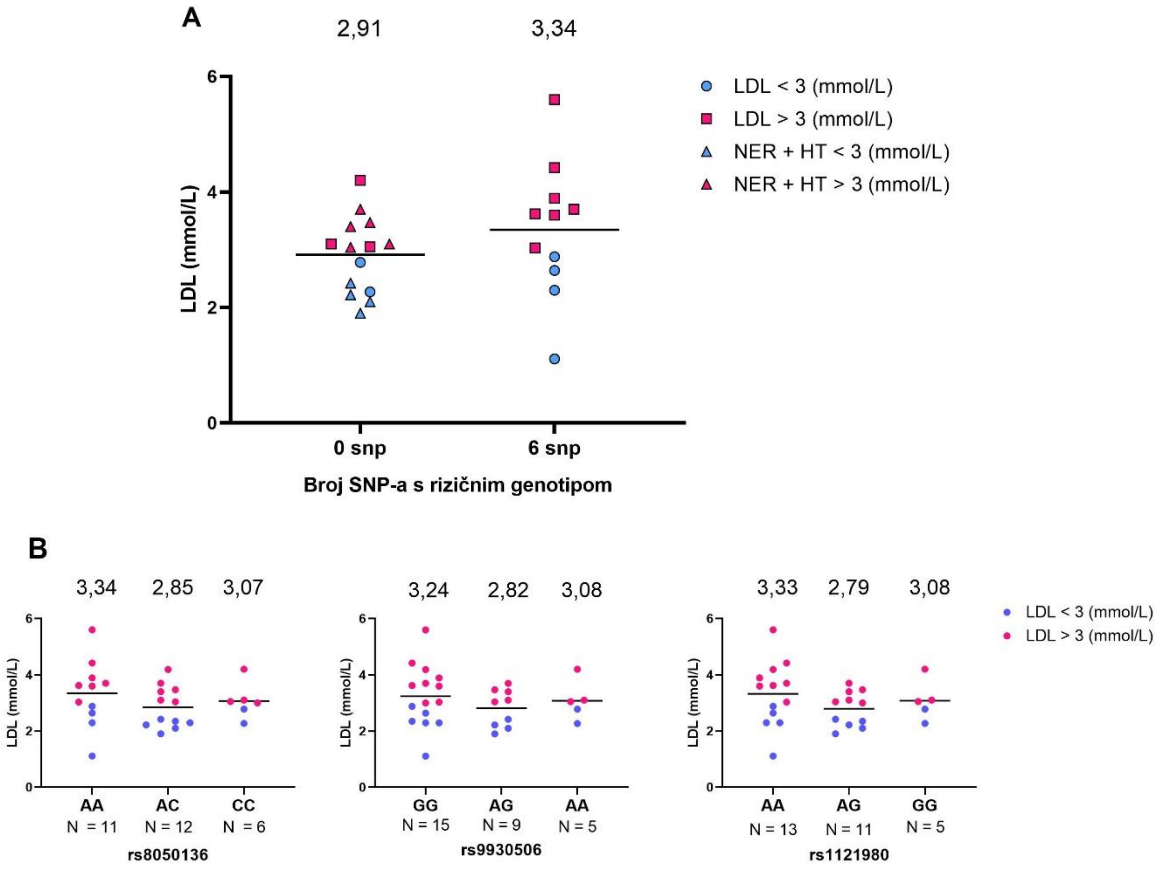
Slika 18. Distribucija Vitamina B_{12} u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma. Na slici 18A su izostavljene tri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.
*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

Slika 19A prikazuje povećane vrijednosti LDL-a na šest rizičnih polimorfizama, iako razlika nije statistički značajna (P = 0.49). Rizični i nerizični genotip pokazuju podjednake vrijednosti izmjerenog LDL-a s nešto višim vrijednostima kod rizičnog genotipa, dok heterozigoti imaju najnižu vrijednosti (Slika 19B). Nije pronađena statistički značajna povezanost LDL-a i polimorfizama (rs8050136 P = 0.44; rs9930506 P = 0.56; rs1121980 P = 0.36).

Slika 20 prikazuje povećane vrijednosti triglicerida na šest rizičnih polimorfizama, ali bez statistički značajne razlike između ispitanica bez rizičnih SNP-a i ispitanca sa šest rizičnih SNP-a, P = 0.46. Rizični genotip ima veće vrijednosti triglicerida, dok najniže vrijednosti triglicerida imaju heterozigotni genotipovi (Slika 1, u Prilogu). Statistički značajna povezanost između

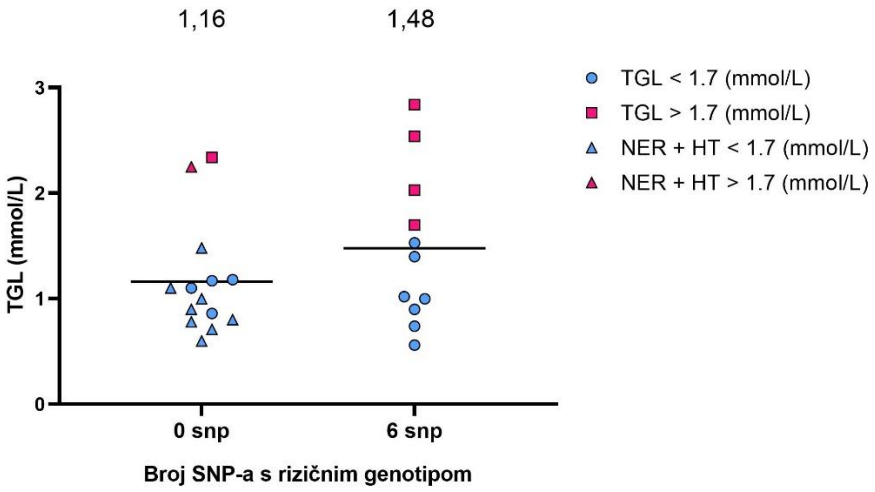
vrijednosti triglicerida i polimorfizama nije pronađena (rs8050136 *P* = 0.22; rs9930506 *P* = 0.37; rs1121980 *P* = 0.67).

Laboratorijska analiza lipidograma nije pokazala statistički značajnu razliku između izmjerene vrijednosti HDL-a s rizičnim polimorfizmima (Slika 2A, u Prilogu), *P* = 0.60. Distribucija izmjerenih vrijednosti HDL-a po genotipu pokazuje bolje vrijednosti kod heterozigota (Slika 2B, u Prilogu), ali bez statistički značajne povezanosti HDL-a i genotipa ispitivanih polimorfizama (rs8050136 *P* = 0.25; rs9930506 *P* = 0.52; rs1121980 *P* = 0.429).



Slika 19. Distribucija LDL-a u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma. Na slici 19A izostavljene su četiri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.

*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.



Slika 20. Distribucija triglicerida u odnosu na rizične polimorfizme. Izostavljena su četiri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.
*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

Vrijednosti kalcija opadaju s porastom broja rizičnih polimorfizama (Slika 3A, u Prilogu), ali bez statističke značajnosti između ispitanica bez rizičnih SNP-a i ispitanica sa šest rizičnih SNP-a, P = 0.34. Nije pronađena statistički značajna povezanost polimorfizma i kalcija (rs8050136 P = 0.30; rs9930506 P = 0.18; rs1121980 P = 0.20) (Slika 3B, u Prilogu).

S porastom broja polimorfizama kod magnezija (Slika 4A, u Prilogu), P= 0.65 i fosfora (Slika 5A, u Prilogu), P = 0.06 uočava se neznatno smanjivanje vrijednosti. Analiza magnezija (slika 4B, u Prilogu) (rs8050136 P = 0.66; rs9930506 P = 0.80; rs1121980 P = 0.79) i fosfora (Slika 5B, u Prilogu) nije pokazala statistički značajnu povezanost (rs8050136 P = 0.66; rs9930506 P = 0.11; rs1121980 P = 0.36). Sve izmjerene koncentracije fosfora su iznad *cut-off* vrijednosti od 0.79 mmol/L.

5. RASPRAVA

Razumijevanje odnosa nastanka pretilosti i genetske podloge zajedno s epigenetičkim utjecajem poput prehrambenih navika i stila života može doprinijeti novim metodama dijagnostike i liječenja, ali i prevenciji. U ovom istraživanju analizirana je distribucija tri polimorfizma gena *FTO:* rs9930506, rs1121980 i rs8050136, prisutnost komorbiditeta pretilosti, duljinu telomera i razlike u biokemijskim pokazateljima s obzirom na distribuciju polimorfizama gena *FTO*.

Ovo istraživanje je potvrdilo povezanost gena *FTO* i pretilosti u ispitivanoj populaciji žena. Rezultati pokazuju akumulaciju rizičnih polimorfizama u osoba s pretilošću. Učestalost rizičnih genotipova na SNP-a rs9930506, rs1121980 i rs8050136 pozitivno korelira s ITM-om i pretilošću. Prethodne studije (93,137–139,144) su ukazale na vezu između pretilosti i ekspresije gena *FTO* i susjednih gena, ekspresije gena *FTO* u tkivima zaduženim za regulaciju obrazaca hranjenja ili utjecaj na razine hormona koji sudjeluju u regulaciji apetita. Rezultati ovog istraživanja pružaju dodatne dokaze povezanosti gena *FTO* i pretilosti. Iako su dosadašnja istraživanja pokazala da su polimorfizmi u genu *FTO* povezani s ponašanjem prilikom hranjenja te s odabirom određene vrste kalorijski bogate hrane, još uvijek nije poznat točan mehanizam nastanka pretilosti.

Polimorfizmi nastaju kao pogreška u prepisivanju DNA te se nasljeđuju od roditelja. Zanimljiv rezultat ove studije je da su 40% ispitanica s pretilošću trostruki nositelji rizičnog genotipa, a 31.11% ispitanica s pretilošću nemaju niti jedan rizični genotipa ispitivanih polimorfizama. 28.89% ispitanica s pretilošću su nositelji kombinacije rizičnog i nerizičnog alela. Rezultati mnogih studija (137,139,141) prijavljuju povezanost polimorfizma i povećanog ITM-a, međutim ne nalazi se studija koja bi prikazala višestruko prisutne rizične genotipove kod osoba s pretilošću. Također, u dostupnim istraživanjima pretilosti i polimorfizama gena *FTO* nije pronađeno odsustvo rizičnih polimorfizama u osoba s pretilošću kao jednog od rezultata studije. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na utjecaj genetike dok istovremeno upućuju na postojanje drugih metaboličkih, epigenetičkih ili genetičkih faktora koji doprinose nastanku pretilosti neovisno o genu *FTO*. S obzirom na navedeno, možemo pretpostaviti da bimodalna distribucija polimorfizama nastaje zbog nasljeđivanja u DNA koje su sklone mutaciji (eng. *hotspot mutations*) u intronu 1 gena *FTO* koja se nalazi na 35 kb dugoj regiji. Učinak gena nasljeđenih od roditelja je vidljiv i u studiji (168) koja je analizirala nekoliko

polimorfizmama u intronu 1 u kojima se nalazi i rs1121980. Rezultati te studije sugeriraju da se nasljeđivanje rizika za pretilost prenosi polimorfizmima gena *FTO*, a fenotip ovisi o porijeklu roditeljskih gena. Efekt nasljeđivanja rizika za pretilost je primjećen za polimorfizme u intronu 2 i 3. Istraživanje (169) koje je analiziralo efekt mutacija gena *FTO* na strukturu i funkciju proteina ukazuje na smanjenu stabilnost i konformaciju proteina te narušeno vezanje substrata. Rezultati ovih studija ukazuju na izmjenjenu ekspresiju i patološki utjecaj rizičnih varijanti gena *FTO* na nastanak pretilosti.

Polimorfizmi gena *FTO* utječu na hipotalamus, odnosno imaju ulogu u obrascima prehrane te utječu na neuralni odgovor prilikom odabira vrste hrane. Imaju utjecaj na hranjenje u odsustvu gladi, prejedanje ili gubitak kontrole prilikom hranjenja te narušen odgovor na sitost (98). Ovi mehanizmi dovode do povećanog unosa energije koja se skladišti u obliku masti u adipocitima. Obrasci ovakvog ponašanja su prijavljeni u osoba s rizičnim genotipom rs9939609 koji je povezan s manjim osjetom sitosti nakon hranjenja te s hranjenjem bez osjećaja gladi (170,171). Nositelji rizičnog genotipa su više konzumirali hranu koja je bogata mastima (172–174), dok je druga studija prijavila veću konzumaciju proteinski bogate hrane (175). Opisan je sličan utjecaj polimorfizma rs8050136 na unos energije i konzumaciju hrane. Rizični alel polimorfizma rs8050136 je u korelaciji s većim unosom energije iz masti i nižm unosom energije iz ugljikohidrata (176). Također, rizični polimorfizam rs9930506 je povezan s povećanim unosom proteina i ugljikohidrata iz hrane (177), povećanom ekspresijom gena *FTO* ali i sa smanjenom ekspresijom gena *IRX3* (178). Količina unesenih kalorija i vrsta makronutrijenata i mikronutrijenata poput folata, kobalmina i epigalokatehtingalata (EGCG) djeluje na ekspresiju gena *FTO*. Najpotentniji epigenetički regulator je epigalokatehtin koji djeluje kao inhibitor ekspresije gena *FTO* zbog velike sličnosti i visokog afiniteta prema veznom mjestu koje ima i orlistat, jedan od lijekova za redukciju tjelesne mase (98,179).

Rezultati većine studija ukazuju na utjecaj polimorfizma u energiji homeostaze i na važnu ulogu ekspresije gena *FTO* u hipotalamusu koja može narušiti ponašanje prilikom hranjenja dovodeći do povećanja tjelesne mase i uzrokujući pretilost. Točan mehanizam djelovanja na regulacijski metabolizam u mozgu nije u potpunosti razjašnjen, ali buduća istraživanja će pomoći rasvjetliti je li put djelovanja gena *FTO* na neuralnu aktivnost direktan ili indirektno utječe na susjedne gene koji sudjeluju u adipogenezi.

Duljina telomera u osoba s pretilošću i kontrolne skupine se razlikuje u srednjoj vrijednosti T/S omjera telomera od 0.03 što je razlika od 3.61%. Ovaj rezultat je u skladu s istraživanjem Zhang i sur. (163) koje ukazuje na utjecaj debljine na duljinu telomera.

Analiza duljine telomera pokazala je da prosječna duljina telomera kod osoba s pretilošću bez rizičnih polimorfizama je jednaka onoj kod kontrolne skupine, dok osobe s pretilošću i rizičnim polimorfizmima imaju kraću prosječnu duljinu telomera koja se ne razlikuje s obzirom na broj rizičnih polimorfizama. Rezultati ovog istraživanja su dijelom u skladu s prethodno objavljenim studijama čiji rezultati pokazuju da pretilost ima utjecaj na skraćivanje telomera (157,159,160,163). Ali novitet je da nije sama pretilost dovoljna odrednica i da pristup liječnju treba biti individualan ovisno o prisutnosti rizičnih polimorfizama. Prisutnost rizičnog polimorfizma povezana je s kraćim telomerama bez obzira na status pretilosti. To upućuje na potrebu agresivnijeg liječenja osoba s pretilošću i rizičnim polimorfizmima kada bi se uz temeljno liječenje pretilosti promjene prehrambenih navika i povećanje tjelesne aktivnosti odmah pristupalo specifičnim farmakološkim metodama u odnosu na osobe s pretilosti koje nemaju rizičnih polimorfizama gena *FTO* i kod kojih možemo duži vremenski period posvetiti samo temeljnom liječenju. Posebno se treba obratiti pozornost na nutrigenomski pristup liječenju debljine koje osim određivanja polimorfizama gena *FTO* uključuje i analizu vitamina B_{12} i B_9 te savjetovati optimizaciju vrijednosti istih iz prehrambenih izvora i/ili prirodnih suplemenata koji bi bili bogati izvor metilne skupine (metilkobalmin, folat, metiltetrahidrofolat) kao i unos supstanci poput katehtina i kurkume, čime se može smanjiti ekspresija rizičnog gena *FTO* epigenetskim pristupom (98), a izbjeći unos lijeka (Slika 21). Ranim uvođenjem lijeka liraglutida za liječenje debljine, pogotovo kod pretilih osoba s rizičnim alelima gena *FTO* koji imaju i kraće telomere može se upravo ostvariti i najveći klinički benefit u tih osoba u vidu smanjenja apetita i gubitka na tjelesnoj masi (180).

U istraživanjima je potrebno obratiti pozornost na skupinu osoba s pretilošću koje se razlikuju po metaboličkom statusu. Za razliku od metabolički bolesnih osoba, metabolički zdrave pretile osobe ne obolijevaju od komplikacija povezanih s pretilošću poput dijabetesa, hipertenzije, dislipidemije te inzulinske osjetljivosti. Studija Molli i sur. (181) je otkrila povezanost kraćih telomera s metaboličkim komplikacijama u odnosu na metabolički zdrave ispitanika s pretilošću ili ispitanike normalne tjelesne mase. Također, nije pronađena razlika u duljini telomera između ispitanika normalne tjelesne mase i metabolički zdravih ispitanika s petilošću. 15-godišnja studija praćenja (182) je prijavila tranziciju 73% metabolički zdravih ispitanika s pretilošću u metabolički bolesne. Polimorfizam rs1121980 je povezan s povećanim

rizikom za nastanak metaboličkog sindroma u osoba s pretilošću, ali je ta povezanost značajna samo u žena. Zajedno ovi rezultati upućuju na različite vrste pretilosti, s pojedincima koji su metabolički zdravi s pretilošću i bez rizičnih polimorfizama koji imaju duže telomere, te s druge strane metabolički bolesne s pretilošću i rizičnim polimorfizmima koji imaju kraće telomere. Ove dvije skupine zahtjevaju različito liječenje jer je dinamika skraćivanja telomera u skupini metabolički bolesnih i s rizičnim alelima znatno izraženija.

Analiza pravaca T/S omjera u odnosu na dob ne razlikuje se statistički, koeficijent smjera je 0 što govori u prilog da T/S omjer nije ovisan o dobi. Ispitanice s pretilošću sa šest rizičnih polimorfizama imaju relativno kraće telomere u odnosu na ispitanice s pretilošću bez rizičnih SNP-a, ali razlika nije statistički podržana zbog premalog broja podataka. Smjer pravca T/S omjera između kontrolne skupine i skupine ispitanica s pretilošću bez rizičnih polimorfizama se ne razlikuje značajno. Možemo zaključiti da pravac T/S omjera ima drugačiji smjer pada ovisno o broju rizičnih polimorfizama. Pretilost dovodi do skraćivanja duljine telomera u odnosu na kontrolnu skupinu, ali se taj efekt skraćivanja povećava s brojem rizičnim polimorfizmima. Najznačajniji rizični elementi za skraćivanje telomera su genetički i epigenetički faktori koji utječu na životni vijek i imaju dugoročne posljedice u vidu različitih bolesti. Poznato je da čimbenici poput stresa, hrane, fizičke aktivnosti i stila života imaju ulogu u dinamici skraćivanja telomera, pa se negativni utjecaj genetičkih čimbenika može ublažiti pozitivnim učincima antioksidansa, vitamina i minerala te promjenom stila života.

Istraživanje je pokazalo da je predijabetes zastupljen u 30.65% ispitanica s pretilošću, a dijabetes s 15.56%. Ispitanice koje su u trenutku prikupljanja podataka imale predijabetes su razvile dijabetes unutar šest godina. Osobe s pretilošću imaju više komorbiditeta pretilosti. Rezultati istraživanja Popović i sur. (183) pokazali su da metabolički status osoba s pretilošću nije pod utjecajem polimorfizama rs9939609, rs1421085 i rs17817449 gena *FTO*. Štoviše, rezultati pokazuju da metabolički bolesni ispitanici s pretilošću imaju manje rizičnog genotipa u odnosu na metabolički zdrave ispitanike s pretilošću. Rezultat drugog istraživanja (184) je pokazao da polimorfizmi gena *FTO* ne utječu na status dijabetesa/predijabetesa.

Hipertenzija je zastupljena u 46.67% ispitanica s pretilošću, međutim nije pronađena statistički značajna povezanost između ispitivanih polimorfizama i hipertenzije. U literaturi je pronađeno da je rizični genotip polimorfizma rs17817449 povezan s većim rizikom za nastanak

hipertenzije gdje od 47.83% ispitanica s pretilošću i s hipertenzijom njih 40.91% imaju genotip GG rs17817449 (185).

Distribucija HOMA-IR u odnosu na broj rizičnih polimorfizama pokazuje niže vrijednosti kod ispitanica s tri kao i sa šest rizičnih polimorfizama, ali povećane vrijednosti kod heterozigotnog genotipa polimorfizma rs1121980. U istraživanju povezanosti polimorfizma gena *FTO* s inzulinskom rezistencijom pronađen je veći rizik za razvoj inzulinske rezistencije ako su ispitanice u genotipu imale rizičan alel, AA/AT za polimorfizam rs1421085 i GG/GT za polimorfizam rs17817449 (186).

Povezanost polimorfizma rs1121980 i povećanih vrijednosti HOMA-IR je opisana u istraživanju Shimaoka i sur. (143). Rezultati drugog istraživanja (138) pokazuju veće vrijednosti glukoze, HOMA-IR, te niže vrijednosti inzulina. Istraživanje Agostinis-Sobrinho i sur. (187) pokazalo je da je uz redovnu tjelovježbu i aktivnost kod djece i adolescenata moguće smanjiti rizik za nastanak IR. Vjerojatnost da će dijete s pretilošću ostati pretilo u odrasloj dobi je u rasponu 20 - 50% prije puberteta i 50 - 70% nakon puberteta (188).

Analiza vitamina D nije pokazala razlike između ispitanica bez rizičnih SNP-a, s tri rizična SNP-a kao ni sa šest rizičnih SNP-a iz čega se može zaključiti da su koncentracije vitamina D neovisne o polimorfizmu već su vezane samo uz pretilost. Iz literature je poznato da osobe s pretilošću imaju niže vrijednosti vitamina D zbog iskorištavanja u metabolizmu masnih stanica. Kako je vitamin D topiv u mastima, nalazi se zarobljen u masnim stanicama. Osobe s povišenim ITM-om trebaju veće količine vitamina D kako bi se spriječio deficit i osiguralo pravilno funkcioniranje organizma (189).

Distribucija vitamina B_{12} je niža kod ispitanica s tri kao i sa šest rizičnih SNP-a (Slika 18A), te isto tako kod rizičnih genotipa ispitivanih polimorfizama (Slika18B), ali bez statističke značajnosti. Varijante polimorfizma rs805136 su povezane s nižim vrijednostima vitamina B_{12} (190). Vitamin B_{12} ako je u obliku metilkobalmina je donor metilne skupine te je deficijencija/insuficijencija vitamina B_{12} povezana s narušenom metilacijom. Također ima važnu ulogu u fetalnom i neuralnom razvoju. Niže koncentracije vitamina B_{12} su povezane s pretilošću i inzulinskom rezistencijom u trudnica (191).

U ovom istraživanju ispitanice s pretilošću s tri rizična SNP-a 3 kao i sa šest rizičnih SNP-a imaju niže vrijednosti HDL-a te više vrijednosti LDL-a i triglicerida. Istraživanje Karns i sur. pokazalo je da su polimorfizmi rs1121980 i rs8050136 povezani s nižim vrijednostima HDL-a (144), dok rezultati drugog istraživanja nisu pokazali povezanost polimorfizama rs9939609,

rs1421085 i rs17817449 i koncentracije lipida u ispitanica s pretilošću (192). U literaturi je opisano istraživanje koje ne pokazuje povezanost polimorfizma rs9939609 i povišenih vrijednosti lipida (193), ali je također pronađeno istraživanje koje je prijavilo utjecaj rizičnog alela polimorfizma rs9939609 na veće vrijednosti triglicerida (194). Meta analiza (195) potvrdila je povezanost kardiometaboličkih bolesti i rizičnog alela polimorfizma rs9939609. Pretilost je povezana s dislipidemijom i povećanim rizikom za razvoj kardiometaboličkih bolesti koja može biti posredovana utjecajem polimorfizama gena *FTO* na lipide. Pregledom literature rezultati istraživanja na polimorfizmima rs9939609, rs1421085 i rs17817449 su sukladni s rezultatima ovog istraživanja za polimorfizme rs8050136, rs9930506 i rs1121980.

Rezultati ove studije sugeriraju da se među osobama s pretilošću mogu prepoznati one osobe čija je pretilost povezana s genom *FTO* za razliku od onih kojima je uvjetovana metaboličkim putem.

Razlikujemo bimodalnu distribuciju pretilih prema *FTO* rizičnom genotipu:

1. pretilost bez rizičnih polimorfizama
2. pretilost s tri, odnosno sa šest rizičnih polimorfizama

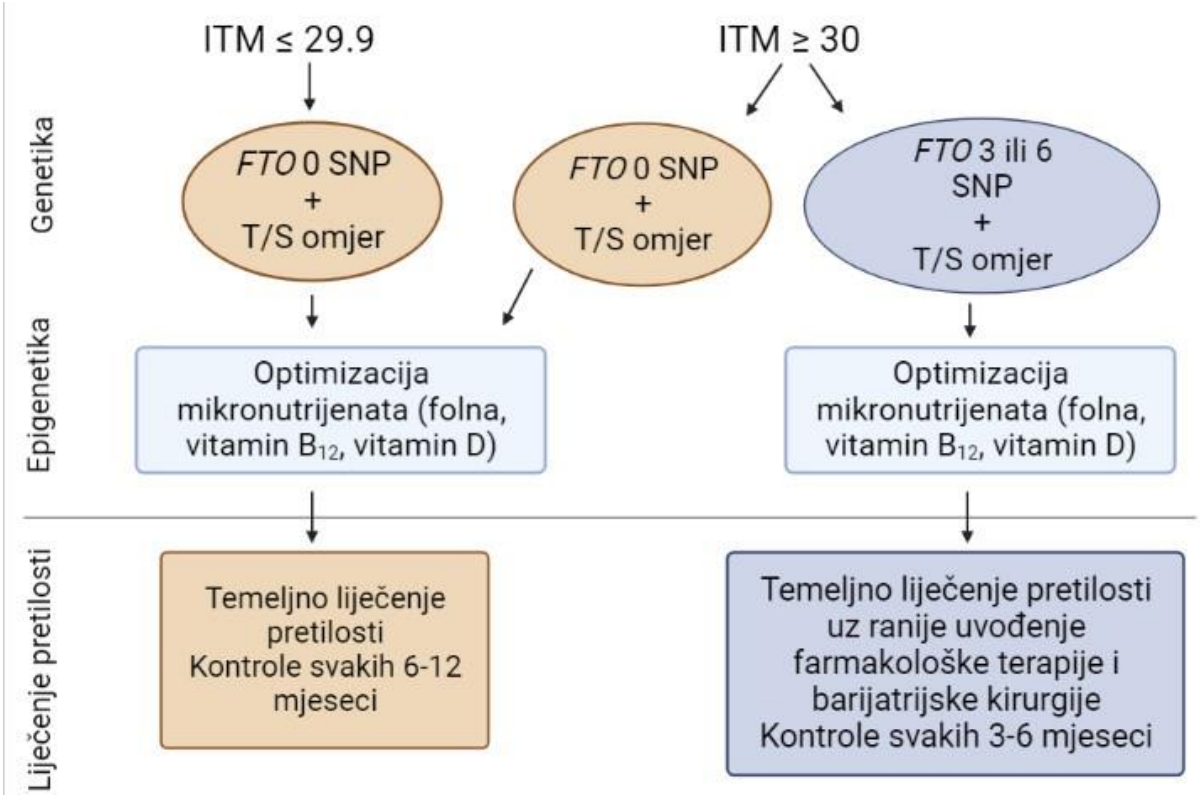
Razlikujemo bimodalnu distribuciju pretilih i prema duljini telomera koje se poklapaju s rizičnim genotipom *FTO* gena.

Sukladno rezultatima predlažem uvođenje novog termina "pretilost s dva karaktera" koji naglašava potrebu za razlikovanjem osoba čija je pretilost uvjetovana genetičkim ili metaboličkim putem te različit utjecaj te pretilosti na duljinu telomera.

Prevencija i mjere za sprječavanje debljine počinju se implementirati u društvo kako se prevalencija pretilosti povećava. Doprinos sjedilačkog načina života u razvoju pretilosti postaje sve izraženiji. Pretjerana mehanizacija i/ili digitalizacija također dovodi do smanjene fizičke aktivnosti s posljedicom razvoja kroničnih bolesti. Javnozdravstvene akcije većinom nemaju dobre rezultate jer se fokusiraju na pojedince potičući većinom samo zdrav način života i fizičku aktivnost, a to ako je u pitanju rizični genotip nije dostatno već je potreban mutidisciplinarni pristup, određivanje mikronutrijenta i uključivanje farmakološke terapije kao (Slika 21) i barijatrijske kirurgije kao zadnji vid terapije. Uspjeh preventivnih akcija ovisi o osobnom shvaćanju i percipiranju pojma debljine i njezinih dugoročnih posljedica.

Zaključno, ovo je istraživanje, potvrdilo hipotezu distribucije polimorfizama i njihovu povezanost s pretilošću. Također, analiza duljine telomera je otkrila kraće telomere u osoba s pretilošću i rizičnim polimorfizmima. Analizom metaboličkih parametara nisu otkrivene statistički značajne razlike između ispitivane skupine s rizičnim polimorfizmima i bez njih, međutim kod vitamina B_{12}, vitamina D i lipida je vidljiva razlika između dvije grupe ispitanica s pretilošću s obzirom na prisutnost rizičnog polimorfizma. Iz rezultata proizlazi različiti klinički pristup osobi s pretilosti, rizičnim aleleima i kraćim telomerama u odnosu na osobe s pretilosti bez rizičnog alela i duljim telomerama. Pojedinci s kraćim telomerama i rizičnim polimorfizmom gena *FTO* u budućnosti bi mogli imati koristi u vidu bržeg i učinkovitijeg pristupa u liječenju gubitka tjelesne mase ako bi individualni pristup uključivao mjerenje duljine telomera i određivanje *FTO* statusa.

Detaljne metode liječenja osoba s pretilošću koje bi se implementirale u zdravstveni sustav s obzirom na rezultate ovog istraživanja potrebno je analizirati na većem broju ispitanika.



Slika 21. Pristup liječenju s obzirom na polimorfizme gena *FTO* i duljinu telomera.
TT, tjelesna težina

6. ZAKLJUČCI

1. Rizični polimorfizmi gena *FTO* rs8050136, rs9930506, rs1121980 povezani su s pretilošću kod ispitivane populacije.

2. Učestalost rizičnih polimorfizama ima izrazito bimodalnu distribuciju te jasno pokazuje da se populacija s pretilošću dijeli na dvije glavne skupine: osobe koje nemaju rizični genotip niti jednog SNP-a, te osobe koje imaju rizični genotip na svih šest analiziranih SNP lokusa.

3. Rezultati sugeriraju da je pretilost povezana sa skraćivanjem telomera te da su rizični polimorfizmi gena *FTO* rs8050136, rs9930506, rs1121980 vezani uz kraće telomere, ali s obzirom da razlika nije statistički značajna, potrebne su daljnje analize na znatno većem broju uzoraka.

4. Ispitanice sa šest rizičnih SNP-a imaju tendenciju nižih vrijednosti vitamina B_{12} i HDL-a te većih vrijednosti LDL-a i TGL. Pretostavku da rizični polimorfizmi gena *FTO* rs8050136, rs9930506 i rs1121980 ne doprinose razlici u kliničkom statusu i biokemijskim pokazateljima metaboličkog stanja osoba s pretilošću potrebno je potvrditi s detaljnim analizama koje će obuhvaćati veći broj uzoraka.

5. Obzirom na dobivene rezultate, predlaže se novi pristup liječenju pretilosti koji bi uključivao analizu polimorfizama gena *FTO* i duljine telomera.

7. LITERATURA

1. O'Rahilly, S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. Nature 462, 307–314 (2009). https://doi.org/10.1038/nature08532.
2. World Health Organization. (2021). Obesity and overweight. [Internet], dostupno na: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight. [25.04.2020.].
3. Svjetska zdravstvena organizacija. Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema, deseta revizija Svezak 1 Drugo izdanje. 2008th ed. MEDICINSKA NAKLADA ZAGREB 2012.; 2012.
4. Xia Q, Grant SF. The genetics of human obesity. Ann N Y Acad Sci. 2013 Apr;1281(1):178-90. https://doi: 10.1111/nyas.12020.
5. Bays H, Abate N, Chandalia M. Adiposopathy: sick fat causes high blood sugar, high blood pressure and dyslipidemia. Future Cardiol. 2005 Jan;1(1):39-59. https://doi: 10.1517/14796678.1.1.39.
6. Bays, H. Adiposopathy, "Sick Fat," Ockham's Razor, and Resolution of the Obesity Paradox. Curr Atheroscler Rep 16, 409 (2014). https://doi.org/10.1007/s11883-014-0409-1.
7. Lorenzo AD, Soldati L, Sarlo F, Calvani M, Lorenzo ND, Renzo LD. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. World J Gastroenterol. 2016 Jan 14;22(2):681–703. https:// http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.681.
8. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. Clin Chim Acta. 2013 Feb 18;417:80–4. https:// https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.007.
9. World Health Organization. The world health report 2002 - Reducing Risks, Promoting Healthy Life (2002). [Internet], dostupno na: https://www.who.int/whr/2002/en/. [25.04.2020.].
10. ZZJZDNZ. Pretilost - kako je pobijediti. [Internet], dostupno na: https://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/kardiovaskularno-zdravlje/134. [25.04.2020.].

11. Purnell JQ. Definitions, Classification, and Epidemiology of Obesity. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279167/.

12. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, Toplak H. Obesity Management Task Force of the European Association for the Study of Obesity. European Guidelines for Obesity Management in Adults. Obes Facts. 2015;8(6):402-24. https://doi: 10.1159/000442721.

13. World Health Organization. (2000). Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330.

14. Hrvatsko društvo za debljinu | Definicija debljine. [Internet], dostupno na: https://drustvozadebljinu.hr/definicija-debljine/. [25.04.2020.].

15. Wang Y, Beydoun MA, Min J, Xue H, Kaminsky LA, Cheskin LJ. Has the prevalence of overweight, obesity and central obesity levelled off in the United States? Trends, patterns, disparities, and future projections for the obesity epidemic. Int J Epidemiol. 2020 Jun 1;49(3):810-823. https://doi: 10.1093/ije/dyz273.

16. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Endocrinol. 2019 May;15(5):288-298. https://doi: 10.1038/s41574-019-0176-8.

17. Obesity rate by body mass index (BMI) - Products Datasets – Eurostat (2022). [Internet], dostupno na: https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/sdg_02_10. [13.02.2023.].

18. Milanović S, Ivanković D, Ivičević Uhernik A, Fister K, Peternel R, Vuletić S. Obesity - new threat to Croatian longevity. Collegium antropologicum. 2012. 36 Suppl 1(1):113-6. https://10.5671/ca.2012361s.113.

19. Milanović S, Ivičević Uhernik A, Fister K, Mihel S, Kovac A, Ivanković D. Five-year Cumulative Incidence of Obesity in Adults in Croatia: The CroHort Study. Collegium antropologicum. 2012. 36 Suppl 1(1):71-6. https://10.5671/ca.2012361s.71.

20. Yannakoulia M, Panagiotakos D, Pitsavos C, Lentzas Y, Chrysohoou C, Skoumas I, Stefanadis C. Five-year incidence of obesity and its determinants: the ATTICA study. Public Health Nutr. 2009 Jan;12(1):36-43. https://doi: 10.1017/S1368980008001900.

21. Barr E, Cameron A, Shaw J, Zimmet P. The Australian Diabetes Obesity and Lifestyle Study (AusDiab) Five year follow-up Results for New South Wales (2005). [Internet], dostupno na: https://www.researchgate.net/publication/237350563_The_Australian_Diabetes_Obesity_and_Lifestyle_Study_AusDiab_Five_year_follow-up_Results_for_New_South_Wales. [25.04.2020.].

22. Gallus S, Lugo A, Murisic B, Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Overweight and obesity in 16 European countries. Eur J Nutr. 2015 Aug;54(5):679-89. https://doi: 10.1007/s00394-014-0746-4.

23. Schröder H, Marrugat J, Vila J, Covas MI, Elosua R. Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. J Nutr. 2004 Dec;134(12):3355-61. https://doi: 10.1093/jn/134.12.3355.

24. Schwarzfuchs D, Golan R, Shai I. Four-year follow-up after two-year dietary interventions. N Engl J Med. 2012 Oct 4;367(14):1373-4. https://doi: 10.1056/NEJMc1204792.

25. Nordmann AJ, Suter-Zimmermann K, Bucher HC, Shai I, Tuttle KR, Estruch R, Briel M. Meta-analysis comparing Mediterranean to low-fat diets for modification of cardiovascular risk factors. Am J Med. 2011 Sep;124(9):841-51.e2. https://doi: 10.1016/j.amjmed.2011.04.024.

26. Rossi M, Negri E, Bosetti C, Dal Maso L, Talamini R, Giacosa A, Montella M, Franceschi S, La Vecchia C. Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio. Public Health Nutr. 2008 Feb;11(2):214-7. https://doi: 10.1017/S1368980007000833.

27. Fister K, Kolcić I, Milanović SM, Kern J. The prevalence of overweight, obesity and central obesity in six regions of Croatia: results from the Croatian Adult Health Survey. Coll Antropol. 2009 Apr;33 Suppl 1:25-9. PMID: 19563142.

28. Berghöfer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. BMC Public Health. 2008 Jun 5;8:200. https://doi: 10.1186/1471-2458-8-200.

29. Overweight and obesity - BMI – Eurostat (2023). [Internet], dostupno na: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics. [26.04.2020.].

30. Zhao Y, Wang L, Xue H, Wang H, Wang Y. Fast food consumption and its associations with obesity and hypertension among children: results from the baseline data of the Childhood Obesity Study in China Mega-cities. BMC Public Health. 2017 Dec 6;17(1):933. https://doi: 10.1186/s12889-017-4952-x.

31. Costa CS, Rauber F, Leffa PS, Sangalli CN, Campagnolo PDB, Vitolo MR. Ultra-processed food consumption and its effects on anthropometric and glucose profile: A longitudinal study during childhood. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2019 Feb;29(2):177-184. https://doi: 10.1016/j.numecd.2018.11.003.

32. Li M, Xue H, Jia P, Zhao Y, Wang Z, Xu F, Wang Y. Pocket money, eating behaviors, and weight status among Chinese children: The Childhood Obesity Study in China mega-cities. Prev Med. 2017 Jul;100:208-215. https://doi: 10.1016/j.ypmed.2017.04.031.

33. Shook RP, Hand GA, Drenowatz C, Hebert JR, Paluch AE, Blundell JE, Hill JO, Katzmarzyk PT, Church TS, Blair SN. Low levels of physical activity are associated with dysregulation of energy intake and fat mass gain over 1 year. Am J Clin Nutr. 2015 Dec;102(6):1332-8. https://doi: 10.3945/ajcn.115.115360.

34. Wiklund P. The role of physical activity and exercise in obesity and weight management: Time for critical appraisal. J Sport Health Sci. 2016 Jun;5(2):151-154. https://doi: 10.1016/j.jshs.2016.04.001.

35. Mayer J, Roy P, Mita KP. Relation between caloric intake, body weight, and physical work: studies in an industrial male population in West Bengal. Am J Clin Nutr. 1956 Mar-Apr;4(2):169-75. https://doi: 10.1093/ajcn/4.2.169.

36. Swift DL, McGee JE, Earnest CP, Carlisle E, Nygard M, Johannsen NM. The Effects of Exercise and Physical Activity on Weight Loss and Maintenance. Prog Cardiovasc Dis. 2018 Jul-Aug;61(2):206-213. https://doi: 10.1016/j.pcad.2018.07.014.

37. Kim BY, Choi DH, Jung CH, Kang SK, Mok JO, Kim CH. Obesity and Physical Activity. J Obes Metab Syndr. 2017 Mar;26(1):15-22. https://doi: 10.7570/jomes.2017.26.1.15.

38. Zujko ME, Waśkiewicz A, Drygas W, Cicha-Mikołajczyk A, Zujko K, Szcześniewska D, Kozakiewicz K, Witkowska AM. Dietary Habits and Dietary Antioxidant Intake Are Related to Socioeconomic Status in Polish Adults: A Nationwide Study. Nutrients. 2020 Feb 18;12(2):518. https://doi: 10.3390/nu12020518.

39. Fisher-Hoch SP, Rentfro AR, Salinas JJ, Pérez A, Brown HS, Reininger BM, Restrepo BI, Wilson JG, Hossain MM, Rahbar MH, Hanis CM, McCormick JB. Socioeconomic status and prevalence of obesity and diabetes in a Mexican American community, Cameron County, Texas, 2004-2007. Prev Chronic Dis. 2010 May;7(3):A53.

40. Volaco A, Cavalcanti AM, Filho RP, Précoma DB. Socioeconomic Status: The Missing Link Between Obesity and Diabetes Mellitus? Curr Diabetes Rev. 2018;14(4):321-326. https://doi: 10.2174/1573399813666170621123227.

41. Kuntz B, Lampert T. Socioeconomic factors and obesity. Dtsch Arztebl Int. 2010 Jul;107(30):517-22. https://doi: 10.3238/arztebl.2010.0517.

42. Burkert NT, Rásky É, Großschädl F, Muckenhuber J, Freidl W. The influence of socioeconomic factors on health parameters in overweight and obese adults. PLoS One. 2013 Jun 5;8(6):e65407. https://doi: 10.1371/journal.pone.0065407.

43. World Health Organization. (2023). Hypertension. [Internet], dostupno na: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension. [26.04.2020.].

44. World Health Organization. (2013). A global brief on hypertension : silent killer, global public health crisis: World Health Day 2013. https://apps.who.int/iris/handle/10665/79059. [26.04.2020.].

45. Kornitzer M, Dramaix M, De Backer G. Epidemiology of risk factors for hypertension: implications for prevention and therapy. Drugs. 1999 May;57(5):695-712. https://doi: 10.2165/00003495-199957050-00003.

46. Horita S, Seki G, Yamada H, Suzuki M, Koike K, Fujita T. Insulin resistance, obesity, hypertension, and renal sodium transport. Int J Hypertens. 2011;2011:391762. https://doi: 10.4061/2011/391762.

47. Tiwari S, Riazi S, Ecelbarger CA. Insulin's impact on renal sodium transport and blood pressure in health, obesity, and diabetes. Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Oct;293(4):F974-84. https://doi: 10.1152/ajprenal.00149.2007.

48. Foucan L, Bangou-Brédent J, Ekouévi DK, Deloumeaux J, Roset JE, Kangambega P. Hypertension and combinations of cardiovascular risk factors. An epidemiologic case-control study in an adult population in Guadeloupe (FWI). Eur J Epidemiol. 2001;17(12):1089-95. https://doi: 10.1023/a:1021213729434.

49. Jenei Z, Páll D, Katona E, Kakuk G, Polgár P. The epidemiology of hypertension and its associated risk factors in the city of Debrecen, Hungary. Public Health. 2002 May;116(3):138-44. https://doi: 10.1038/sj.ph.1900840.

50. Falkner B, Lurbe E. Primordial Prevention of High Blood Pressure in Childhood: An Opportunity Not to be Missed. Hypertension. 2020 May;75(5):1142-1150. https://doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14059.

51. Nakanishi N, Suzuki K. Daily life activity and the risk of developing hypertension in middle-aged Japanese men. Arch Intern Med. 2005 Jan 24;165(2):214-20. https://doi: 10.1001/archinte.165.2.214.

52. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, Sowers J. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. J Clin Hypertens (Greenwich). 2013 Jan;15(1):14-33. https://doi: 10.1111/jch.12049.

53. Seravalle G, Grassi G. Sympathetic Nervous System, Hypertension, Obesity and Metabolic Syndrome. High Blood Press Cardiovasc Prev. 2016 Sep;23(3):175-9. https://doi: 10.1007/s40292-016-0137-4.

54. Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Turri C, Bolla GB, Mancia G. Adrenergic and reflex abnormalities in obesity-related hypertension. Hypertension. 2000 Oct;36(4):538-42. https://doi: 10.1161/01.hyp.36.4.538.

55. Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. Hypertension. 2005 Jan;45(1):9-14. https://doi: 10.1161/01.HYP.0000151325.83008.b4.

56. Galletti F, D'Elia L, Barba G, Siani A, Cappuccio FP, Farinaro E, Iacone R, Russo O, De Palma D, Ippolito R, Strazzullo P. High-circulating leptin levels are associated with greater risk of hypertension in men independently of body mass and insulin resistance: results of an eight-year follow-up study. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Oct;93(10):3922-6. https://doi: 10.1210/jc.2008-1280.

57. Asferg C, Møgelvang R, Flyvbjerg A, Frystyk J, Jensen JS, Marott JL, Appleyard M, Jensen GB, Jeppesen J. Leptin, not adiponectin, predicts hypertension in the Copenhagen City Heart Study. Am J Hypertens. 2010 Mar;23(3):327-33. https://doi: 10.1038/ajh.2009.244.

58. Mark AL. Selective leptin resistance revisited. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013 Sep 15;305(6):R566-81. https://doi: 10.1152/ajpregu.00180.2013.

59. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. Pharmacol Res. 2017 Aug;122:1-7. https://doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.013.

60. HZJZ. (2017). Kardiovaskularne bolesti. [Internet], dostupno na: https://www.hzjz.hr/aktualnosti/kardiovaskularne-bolesti/. [26.04.2020.].

61. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, Alla F, Alvis-Guzman N, Amrock S, Ansari H, Ärnlöv J, Asayesh H, Atey TM, Avila-Burgos L, Awasthi A, Banerjee A, Barac A, Bärnighausen T, Barregard L, Bedi N, Belay Ketema E, Bennett D, Berhe G, Bhutta Z, Bitew S, Carapetis J, Carrero JJ, Malta DC, Castañeda-Orjuela CA, Castillo-Rivas J, Catalá-López F, Choi JY, Christensen H, Cirillo M, Cooper L Jr, Criqui M, Cundiff D, Damasceno A, Dandona L, Dandona R, Davletov K, Dharmaratne S, Dorairaj P, Dubey M, Ehrenkranz R, El Sayed Zaki M, Faraon EJA, Esteghamati A, Farid T, Farvid M, Feigin V, Ding EL, Fowkes G, Gebrehiwot T, Gillum R, Gold A, Gona P, Gupta R, Habtewold TD, Hafezi-Nejad N, Hailu T, Hailu GB, Hankey G, Hassen HY, Abate KH, Havmoeller R, Hay SI, Horino M, Hotez PJ, Jacobsen K, James S, Javanbakht M, Jeemon P, John D, Jonas J, Kalkonde Y, Karimkhani C, Kasaeian A, Khader Y, Khan A, Khang YH, Khera S, Khoja AT, Khubchandani J, Kim D, Kolte D, Kosen S, Krohn KJ, Kumar GA, Kwan GF, Lal DK, Larsson A, Linn S, Lopez A, Lotufo PA, El Razek HMA, Malekzadeh R, Mazidi M, Meier T, Meles KG, Mensah G, Meretoja A, Mezgebe H, Miller T, Mirrakhimov E, Mohammed S, Moran AE, Musa KI, Narula J, Neal B, Ngalesoni F, Nguyen G, Obermeyer CM, Owolabi M, Patton G, Pedro J, Qato D, Qorbani M, Rahimi

K, Rai RK, Rawaf S, Ribeiro A, Safiri S, Salomon JA, Santos I, Santric Milicevic M, Sartorius B, Schutte A, Sepanlou S, Shaikh MA, Shin MJ, Shishehbor M, Shore H, Silva DAS, Sobngwi E, Stranges S, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tadele Atnafu N, Tesfay F, Thakur JS, Thrift A, Topor-Madry R, Truelsen T, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Uthman O, Vasankari T, Vlassov V, Vollset SE, Wakayo T, Watkins D, Weintraub R, Werdecker A, Westerman R, Wiysonge CS, Wolfe C, Workicho A, Xu G, Yano Y, Yip P, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Vos T, Naghavi M, Murray C. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. J Am Coll Cardiol. 2017 Jul 4;70(1):1-25. https://doi: 10.1016/j.jacc.2017.04.052.

62. Olvera Lopez E, Ballard BD, Jan A. Cardiovascular Disease. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. [Internet], dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/.

63. Haley, JE, Urbina, EM. (2020). Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. In: Zeitler, P, Nadeau, K. (eds) Insulin Resistance. Contemporary Endocrinology. Humana, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25057-7_12.

64. World Health Organization. (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/44579.

65. Kralj V, Čukelj P. Kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj u 2019. godini. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2022.

66. Pećin I. Liječenje dislipidemije u bolesnika s arterijskom hipertenzijom. Medix. God. 24 Br. 130/131 [Internet], dostupno na: https://www.medix.hr/lijecenje-dislipidemije-u-bolesnika-s-arterijskom-hipertenzijom. [29.04.2020.].

67. Reiner Ž. Metabolički sindrom i dislipidemija. Medix. God. 17 Br. 97. [Internet], dostupno na https://medix.hr/sing.php?id=227. [29.04.2020.].

68. Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, Keyes MJ, Schaefer EJ, Wilson PW, D'Agostino RB, Vasan RS, Robins SJ. Increased small low-density lipoprotein particle number: a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. Circulation. 2006 Jan 3;113(1):20-9. https://doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.567107.

69. Koba S, Hirano T, Ito Y, Tsunoda F, Yokota Y, Ban Y, Iso Y, Suzuki H, Katagiri T. Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in

relation to the severity of coronary heart diseases. Atherosclerosis. 2006 Nov;189(1):206-14. https://oi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.002.

70. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, Ito Y, Nakajima K, White CC, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. Clin Chem. 2010 Jun;56(6):967-76. https://doi: 10.1373/clinchem.2009.137489.

71. Duncan GE. Exercise, fitness, and cardiovascular disease risk in type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Curr Diab Rep. 2006 Feb;6(1):29-35. https://doi: 10.1007/s11892-006-0048-1.

72. Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Aug;291(2):E350-7. https://doi: 10.1152/ajpendo.00387.2005.

73. Pascual-Gamarra JM, Salazar-Tortosa D, Martinez-Tellez B, Labayen I, Rupérez AI, Censi L, Manios Y, Nova E, Gesteiro E, Moreno LA, Meirhaeghe A, Ruiz JR. Association between UCP1, UCP2, and UCP3 gene polymorphisms with markers of adiposity in European adolescents: The HELENA study. Pediatr Obes. 2019 Jun;14(6):e12504. https://doi: 10.1111/ijpo.12504. Epub 2019 Jan 18.

74. Brondani LA, Assmann TS, de Souza BM, Bouças AP, Canani LH, Crispim D. Meta-analysis reveals the association of common variants in the uncoupling protein (UCP) 1-3 genes with body mass index variability. PLoS One. 2014 May 7;9(5):e96411. https://doi: 10.1371/journal.pone.0096411.

75. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2009 Nov;32 Suppl 2(Suppl 2):S157-63. https://doi: 10.2337/dc09-S302.

76. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract. 2014 Aug;105(2):141-50. https://doi: 10.1016/j.diabres.2014.04.006.

77. Friend A, Craig L, Turner S. The prevalence of metabolic syndrome in children: a systematic review of the literature. Metab Syndr Relat Disord. 2013 Apr;11(2):71-80. https://doi: 10.1089/met.2012.0122.

78. Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. World J Diabetes. 2015 May 15;6(4):598-612. https://doi: 10.4239/wjd.v6.i4.598.

79. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nat Rev Immunol. 2011 Feb;11(2):98-107. https://doi: 10.1038/nri2925.

80. van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. Neth J Med. 2013 May;71(4):174-87.

81. Peplies J, Börnhorst C, Günther K, Fraterman A, Russo P, Veidebaum T, Tornaritis M, De Henauw S, Marild S, Molnar D, Moreno LA, Ahrens W; IDEFICS consortium. Longitudinal associations of lifestyle factors and weight status with insulin resistance (HOMA-IR) in preadolescent children: the large prospective cohort study IDEFICS. Int J Behav Nutr Phys Act. 2016 Sep 2;13(1):97. https://doi: 10.1186/s12966-016-0424-4.

82. Buchan DS, Boddy LM, Young JD, Cooper SM, Noakes TD, Mahoney C, Shields JP, Baker JS. Relationships between Cardiorespiratory and Muscular Fitness with Cardiometabolic Risk in Adolescents. Res Sports Med. 2015;23(3):227-39. https://doi: 10.1080/15438627.2015.1040914.

83. González-Gil EM, Santabárbara J, Ruiz JR, Bel-Serrat S, Huybrechts I, Pedrero-Chamizo R, de la O A, Gottrand F, Kafatos A, Widhalm K, Manios Y, Molnar D, De Henauw S, Plada M, Ferrari M, Palacios Le Blé G, Siani A, González-Gross M, Gómez-Martínez S, Marcos A, Moreno Aznar LA; HELENA study. Ideal cardiovascular health and inflammation in European adolescents: The HELENA study. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2017 May;27(5):447-455. https://doi: 10.1016/j.numecd.2016.12.003.

84. Ghadge AA, Khaire AA, Kuvalekar AA. Adiponectin: A potential therapeutic target for metabolic syndrome. Cytokine Growth Factor Rev. 2018 Feb;39:151-158. https://doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.01.004.

85. Allison MB, Myers MG Jr. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. J Endocrinol. 2014 Oct;223(1):T25-35. https://doi: 10.1530/JOE-14-0404.

86. Brand C, Gaya ACA, Dias AF, Agostinis-Sobrinho C, Farinha JB, Boeno FP, Mota J, Reischak de Oliveira A, Gaya AR. Relationship between insulin resistance and

adipocytokines: the mediator role of adiposity in children. Ann Hum Biol. 2020 May;47(3):244-249. https://doi: 10.1080/03014460.2020.1740320.

87. Agostinis-Sobrinho C, Moreira C, Abreu S, Lopes L, Oliveira-Santos J, Steene-Johannessen J, Mota J, Santos R. Serum Adiponectin Levels and Cardiorespiratory Fitness in Nonoverweight and Overweight Portuguese Adolescents: The LabMed Physical Activity Study. Pediatr Exerc Sci. 2017 May;29(2):237-244. https://doi: 10.1123/pes.2016-0162.

88. López-Jaramillo P, Gómez-Arbeláez D, López-López J, López-López C, Martínez-Ortega J, Gómez-Rodríguez A, Triana-Cubillos S. The role of leptin/adiponectin ratio in metabolic syndrome and diabetes. Horm Mol Biol Clin Investig. 2014 Apr;18(1):37-45. https://doi: 10.1515/hmbci-2013-0053.

89. Tchang BG, Aras M, Kumar RB, Aronne LJ. Pharmacologic Treatment of Overweight and Obesity in Adults. 2021 Aug 2. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trence DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–.

90. Ruban A, Stoenchev K, Ashrafian H, Teare J. Current treatments for obesity. Clin Med (Lond). 2019 May;19(3):205-212. https://doi: 10.7861/clinmedicine.19-3-205.

91. Thonusin C, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. The impact of genetic polymorphisms on weight regain after successful weight loss. Br J Nutr. 2020 Oct 28;124(8):809-823. https://doi: 10.1017/S0007114520001968.

92. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and

adult obesity. Science. 2007 May 11;316(5826):889-94. https://doi: 10.1126/science.1141634.

93. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. PLoS Genet. 2007 Jul;3(7):e115. https://doi: 10.1371/journal.pgen.0030115.

94. Price RA, Li WD, Zhao H. FTO gene SNPs associated with extreme obesity in cases, controls and extremely discordant sister pairs. BMC Med Genet. 2008 Jan 24;9:4. https://doi: 10.1186/1471-2350-9-4.

95. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. Nat Genet. 1999 Jul;22(3):239-47. https://doi: 10.1038/10297.

96. Han Z, Niu T, Chang J, Lei X, Zhao M, Wang Q, Cheng W, Wang J, Feng Y, Chai J. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. Nature. 2010 Apr 22;464(7292):1205-9. https://doi: 10.1038/nature08921.

97. Zhang X, Wei LH, Wang Y, Xiao Y, Liu J, Zhang W, Yan N, Amu G, Tang X, Zhang L, Jia G. Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Feb 19;116(8):2919-2924. https://doi: 10.1073/pnas.1820574116.

98. Popović AM, Huđek Turković A, Žuna K, Bačun-Družina V, Rubelj I, Matovinović M. FTO Gene Polymorphisms at the Crossroads of Metabolic Pathways of Obesity and Epigenetic Influences. Food Technol Biotechnol 2023;61 (1) 14-26. https://doi.org/10.17113/ftb.61.01.23.7594.

99. Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM, Levine AS, Lindblom J, Schiöth HB. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. Endocrinology. 2008 May;149(5):2062-71. https://doi: 10.1210/en.2007-1457.

100. Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B, Yeo GS, Meyre D, Golzio C, Molinari F, Kadhom N, Etchevers HC, Saudek V, Farooqi IS, Froguel P, Lindahl T, O'Rahilly S, Munnich A, Colleaux L. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. Am J Hum Genet. 2009 Jul;85(1):106-11. https://doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.002.

101. Church C, Moir L, McMurray F, Girard C, Banks GT, Teboul L, Wells S, Brüning JC, Nolan PM, Ashcroft FM, Cox RD. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. Nat Genet. 2010 Dec;42(12):1086-92. https://doi: 10.1038/ng.713.

102. Merkestein M, Laber S, McMurray F, Andrew D, Sachse G, Sanderson J, Li M, Usher S, Sellayah D, Ashcroft FM, Cox RD. FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. Nat Commun. 2015 Apr 17;6:6792. https://doi: 10.1038/ncomms7792.

103. Herman MA, Rosen ED. Making Biological Sense of GWAS Data: Lessons from the FTO Locus. Cell Metab. 2015 Oct 6;22(4):538-9. https://doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.018.

104. Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NF, Lee JH, Puviindran V, Tam D, Shen M, Son JE, Vakili NA, Sung HK, Naranjo S, Acemel RD, Manzanares M, Nagy A, Cox NJ, Hui CC, Gomez-Skarmeta JL, Nóbrega MA. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. Nature. 2014 Mar 20;507(7492):371-5. https://doi: 10.1038/nature13138.

105. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Körner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoeur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougnères P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chèvre JC, Froguel P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. Nat Genet. 2007 Jun;39(6):724-6. https://doi: 10.1038/ng2048.

106. Peters U, North KE, Sethupathy P, Buyske S, Haessler J, Jiao S, Fesinmeyer MD, Jackson RD, Kuller LH, Rajkovic A, Lim U, Cheng I, Schumacher F, Wilkens L,

Li R, Monda K, Ehret G, Nguyen KD, Cooper R, Lewis CE, Leppert M, Irvin MR, Gu CC, Houston D, Buzkova P, Ritchie M, Matise TC, Le Marchand L, Hindorff LA, Crawford DC, Haiman CA, Kooperberg C. A systematic mapping approach of 16q12.2/FTO and BMI in more than 20,000 African Americans narrows in on the underlying functional variation: results from the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. PLoS Genet. 2013;9(1):e1003171. https://doi: 10.1371/journal.pgen.1003171.

107. Loos RJ, Yeo GS. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. Nat Rev Endocrinol. 2014 Jan;10(1):51-61. https://doi: 10.1038/nrendo.2013.227.

108. Stratigopoulos G, Padilla SL, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, Zeltser LM, Chung WK, Leibel RL. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008 Apr;294(4):R1185-96. https://doi: 10.1152/ajpregu.00839.2007.

109. Stratigopoulos G, LeDuc CA, Cremona ML, Chung WK, Leibel RL. Cut-like homeobox 1 (CUX1) regulates expression of the fat mass and obesity-associated and retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein-1-like (RPGRIP1L) genes and coordinates leptin receptor signaling. J Biol Chem. 2011 Jan 21;286(3):2155-70. https://doi: 10.1074/jbc.M110.188482.

110. Tung YCL, Yeo GSH, O'Rahilly S, Coll AP. Obesity and FTO: Changing Focus at a Complex Locus. Cell Metab. 2014 Nov 4;20(5):710-718. https://doi:10.1016/j.cmet.2014.09.010.

111. Fedeles BI, Singh V, Delaney JC, Li D, Essigmann JM. The AlkB Family of Fe(II)/α-Ketoglutarate-dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond. J Biol Chem. 2015 Aug 21;290(34):20734-20742. https://doi: 10.1074/jbc.R115.656462.

112. Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O'Rahilly S, Schofield CJ. The obesity-associated FTO gene

encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. Science. 2007 Nov 30;318(5855):1469-72. https://doi: 10.1126/science.1151710.

113. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. Nat Chem Biol. 2011 Oct 16;7(12):885-7. https://doi: 10.1038/nchembio.687.

114. Chen J, Du B. Novel positioning from obesity to cancer: FTO, an m^6A RNA demethylase, regulates tumour progression. J Cancer Res Clin Oncol. 2019 Jan;145(1):19-29. htps://doi: 10.1007/s00432-018-2796-0.

115. Mauer J, Jaffrey SR. FTO, $m^6 A_m$, and the hypothesis of reversible epitranscriptomic mRNA modifications. FEBS Lett. 2018 Jun;592(12):2012-2022. https://doi: 10.1002/1873-3468.13092.

116. Bartosovic M, Molares HC, Gregorova P, Hrossova D, Kudla G, Vanacova S. N6-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 2;45(19):11356-11370. https://doi: 10.1093/nar/gkx778.

117. Sommer S, Lavi U, Darnell JE Jr. The absolute frequency of labeled N-6-methyladenosine in HeLa cell messenger RNA decreases with label time. J Mol Biol. 1978 Sep 25;124(3):487-99. https://doi: 10.1016/0022-2836(78)90183-3.

118. Zou S, Toh JD, Wong KH, Gao YG, Hong W, Woon EC. N(6)-Methyladenosine: a conformational marker that regulates the substrate specificity of human demethylases FTO and ALKBH5. Sci Rep. 2016 May 9;6:25677. https://doi: 10.1038/srep25677.

119. Mauer J, Luo X, Blanjoie A, Jiao X, Grozhik AV, Patil DP, Linder B, Pickering BF, Vasseur JJ, Chen Q, Gross SS, Elemento O, Debart F, Kiledjian M, Jaffrey SR. Reversible methylation of m^6A_m in the 5' cap controls mRNA stability. Nature. 2017 Jan 19;541(7637):371-375. https://doi: 10.1038/nature21022.

120. Wei J, Liu F, Lu Z, Fei Q, Ai Y, He PC, Shi H, Cui X, Su R, Klungland A, Jia G, Chen J, He C. Differential m^6A, m^6A_m, and m^1A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. Mol Cell. 2018 Sep 20;71(6):973-985.e5. https://doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.011.

121. Kruse S, Zhong S, Bodi Z, Button J, Alcocer MJ, Hayes CJ, Fray R. A novel synthesis and detection method for cap-associated adenosine modifications in mouse mRNA. Sci Rep. 2011;1:126. https://doi: 10.1038/srep00126.

122. Ben-Haim MS, Moshitch-Moshkovitz S, Rechavi G. FTO: linking m6A demethylation to adipogenesis. Cell Res. 2015 Jan;25(1):3-4. https://doi: 10.1038/cr.2014.162.

123. Bell CG, Finer S, Lindgren CM, Wilson GA, Rakyan VK, Teschendorff AE, Akan P, Stupka E, Down TA, Prokopenko I, Morison IM, Mill J, Pidsley R; International Type 2 Diabetes 1q Consortium; Deloukas P, Frayling TM, Hattersley AT, McCarthy MI, Beck S, Hitman GA. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. PLoS One. 2010 Nov 18;5(11):e14040. https://doi: 10.1371/journal.pone.0014040.

124. Liu ZW, Zhang JT, Cai QY, Zhang HX, Wang YH, Yan HT, Wu HM, Yang XJ. Birth weight is associated with placental fat mass- and obesity-associated gene expression and promoter methylation in a Chinese population. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016;29(1):106-11. https://doi: 10.3109/14767058.2014.987749.

125. Lane MD. Adipogenesis. In: Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition). Waltham: Academic Press; 2013;52–6. M.D. ISBN 9780123786319. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00089-X.

126. Zhao X, Yang Y, Sun BF, Shi Y, Yang X, Xiao W, Hao YJ, Ping XL, Chen YS, Wang WJ, Jin KX, Wang X, Huang CM, Fu Y, Ge XM, Song SH, Jeong HS, Yanagisawa H, Niu Y, Jia GF, Wu W, Tong WM, Okamoto A, He C, Rendtlew Danielsen JM, Wang XJ, Yang YG. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. Cell Res. 2014 Dec;24(12):1403-19. https://doi: 10.1038/cr.2014.151.

127. Church C, Lee S, Bagg EA, McTaggart JS, Deacon R, Gerken T, Lee A, Moir L, Mecinović J, Quwailid MM, Schofield CJ, Ashcroft FM, Cox RD. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. PLoS Genet. 2009 Aug;5(8):e1000599. https://doi: 10.1371/journal.pgen.1000599.

128. Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. Trends Genet. 2010 Jun;26(6):266-74. https://doi: 10.1016/j.tig.2010.02.006.

129. Daoud H, Zhang D, McMurray F, Yu A, Luco SM, Vanstone J, Jarinova O, Carson N, Wickens J, Shishodia S, Choi H, McDonough MA, Schofield CJ, Harper ME, Dyment DA, Armour CM. Identification of a pathogenic FTO mutation by next-generation sequencing in a newborn with growth retardation and developmental delay. J Med Genet. 2016 Mar;53(3):200-7. https://doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103399.

130. Spychala A, Rüther U. FTO affects hippocampal function by regulation of BDNF processing. PLoS One. 2019 Feb 7;14(2):e0211937. https://doi: 10.1371/journal.pone.0211937.

131. Bishop GA, Berbari NF, Lewis J, Mykytyn K. Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain. J Comp Neurol. 2007 Dec 10;505(5):562-71. https://doi: 10.1002/cne.21510.

132. Berbari NF, Bishop GA, Askwith CC, Lewis JS, Mykytyn K. Hippocampal neurons possess primary cilia in culture. J Neurosci Res. 2007 Apr;85(5):1095-100. https://doi: 10.1002/jnr.21209.

133. Delous M, Baala L, Salomon R, Laclef C, Vierkotten J, Tory K, Golzio C, Lacoste T, Besse L, Ozilou C, Moutkine I, Hellman NE, Anselme I, Silbermann F, Vesque C, Gerhardt C, Rattenberry E, Wolf MT, Gubler MC, Martinovic J, Encha-Razavi F, Boddaert N, Gonzales M, Macher MA, Nivet H, Champion G, Berthélémé JP, Niaudet P, McDonald F, Hildebrandt F, Johnson CA, Vekemans M, Antignac C, Rüther U, Schneider-Maunoury S, Attié-Bitach T, Saunier S. The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. Nat Genet. 2007 Jul;39(7):875-81. https://doi: 10.1038/ng2039.

134. Arts HH, Doherty D, van Beersum SE, Parisi MA, Letteboer SJ, Gorden NT, Peters TA, Märker T, Voesenek K, Kartono A, Ozyurek H, Farin FM, Kroes HY, Wolfrum U, Brunner HG, Cremers FP, Glass IA, Knoers NV, Roepman R. Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. Nat Genet. 2007 Jul;39(7):882-8. https://doi: 10.1038/ng2069.

135. Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V, Klovins J, Gyllensten U, Marcus C, Schiöth HB, Fredriksson R. Major gender difference in association of FTO gene variant

among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Apr 11;368(3):476-82. https://doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.087.

136. Berulava T, Horsthemke B. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. Eur J Hum Genet. 2010 Sep;18(9):1054-6. https://doi: 10.1038/ejhg.2010.71.

137. Saldaña-Alvarez Y, Salas-Martínez MG, García-Ortiz H, Luckie-Duque A, García-Cárdenas G, Vicenteño-Ayala H, Cordova EJ, Esparza-Aguilar M, Contreras-Cubas C, Carnevale A, Chávez-Saldaña M, Orozco L. Gender-Dependent Association of FTO Polymorphisms with Body Mass Index in Mexicans. PLoS One. 2016 Jan 4;11(1):e0145984. https://doi: 10.1371/journal.pone.0145984.

138. Saber-Ayad M, Manzoor S, Radwan H, Hammoudeh S, Wardeh R, Ashraf A, Jabbar H, Hamoudi R. The FTO genetic variants are associated with dietary intake and body mass index amongst Emirati population. PLoS One. 2019 Oct 17;14(10):e0223808. https://doi: 10.1371/journal.pone.0223808.

139. Chuenta W, Phonrat B, Tungtrongchitr A, Limwongse C, Chongviriyaphan N, Santiprabhob J, Tungtrongchitr R. Common variations in the FTO gene and obesity in Thais: a family-based study. Gene. 2015 Mar 1;558(1):75-81. https://doi: 10.1016/j.gene.2014.12.050.

140. Arrizabalaga M, Larrarte E, Margareto J, Maldonado-Martín S, Barrenechea L, Labayen I. Preliminary findings on the influence of FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 polymorphisms on resting energy expenditure, leptin and thyrotropin levels in obese non-morbid premenopausal women. J Physiol Biochem. 2014 Mar;70(1):255-62. https://doi: 10.1007/s13105-013-0300-5.

141. Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA, Pouta A, Ben-Shlomo Y, Ruokonen A, Ebrahim S, Shields B, Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Lango H, Melzer D, Ferrucci L, Paolisso G, Neville MJ, Karpe F, Palmer CN, Morris AD, Elliott P, Jarvelin MR, Smith GD, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. Diabetes. 2008 May;57(5):1419-26. https://doi: 10.2337/db07-1466.

142. Ursu RI, Badiu C, Cucu N, Ursu GF, Craciunescu I, Severin E. The study of the rs9939609 FTO gene polymorphism in association with obesity and the management of obesity in a Romanian cohort. J Med Life. 2015 Apr-Jun;8(2):232-8.

143. Shimaoka I, Kamide K, Ohishi M, Katsuya T, Akasaka H, Saitoh S, Sugimoto K, Oguro R, Congrains A, Fujisawa T, Shimamoto K, Ogihara T, Rakugi H. Association of gene polymorphism of the fat-mass and obesity-associated gene with insulin resistance in Japanese. Hypertens Res. 2010 Mar;33(3):214-8. https://doi: 10.1038/hr.2009.215.

144. Karns R, Zhang G, Jeran N, Havas-Augustin D, Missoni S, Niu W, Indugula SR, Sun G, Durakovic Z, Narancic NS, Rudan P, Chakraborty R, Deka R. Replication of genetic variants from genome-wide association studies with metabolic traits in an island population of the Adriatic coast of Croatia. Eur J Hum Genet. 2011 Mar;19(3):341-6. https://doi: 10.1038/ejhg.2010.178.

145. He D, Fu M, Miao S, Hotta K, Chandak GR, Xi B. FTO gene variant and risk of hypertension: a meta-analysis of 57,464 hypertensive cases and 41,256 controls. Metabolism. 2014 May;63(5):633-9. https://doi: 10.1016/j.metabol.2014.02.008.

146. Ahmad T, Chasman DI, Mora S, Paré G, Cook NR, Buring JE, Ridker PM, Lee IM. The fat-mass and obesity-associated (FTO) gene, physical activity, and risk of incident cardiovascular events in white women. Am Heart J. 2010 Dec;160(6):1163-9. https://doi: 10.1016/j.ahj.2010.08.002.

147. Yang Y, Liu B, Xia W, Yan J, Liu HY, Hu L, Liu SM. FTO Genotype and Type 2 Diabetes Mellitus: Spatial Analysis and Meta-Analysis of 62 Case-Control Studies from Different Regions. Genes (Basel). 2017 Feb 11;8(2):70. https://doi: 10.3390/genes8020070.

148. Yang Q, Xiao T, Guo J, Su Z. Complex Relationship between Obesity and the Fat Mass and Obesity Locus. Int J Biol Sci. 2017 May 15;13(5):615-629. https://doi: 10.7150/ijbs.17051.

149. Zhou Y, Hambly BD, McLachlan CS. FTO associations with obesity and telomere length. J Biomed Sci. 2017 Sep 1;24(1):65. https://doi: 10.1186/s12929-017-0372-6.

150. Stratigopoulos G, Burnett LC, Rausch R, Gill R, Penn DB, Skowronski AA, LeDuc CA, Lanzano AJ, Zhang P, Storm DR, Egli D, Leibel RL. Hypomorphism of Fto and Rpgrip1l causes obesity in mice. J Clin Invest. 2016 May 2;126(5):1897-910. https://doi: 10.1172/JCI85526.

151. Wu W, Feng J, Jiang D, Zhou X, Jiang Q, Cai M, Wang X, Shan T, Wang Y. AMPK regulates lipid accumulation in skeletal muscle cells through FTO-dependent demethylation of N^6-methyladenosine. Sci Rep. 2017 Feb 8;7:41606. https://doi: 10.1038/srep41606.

152. Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, Quon G, Meuleman W, Haugen C, Glunk V, Sousa IS, Beaudry JL, Puviindran V, Abdennur NA, Liu J, Svensson PA, Hsu YH, Drucker DJ, Mellgren G, Hui CC, Hauner H, Kellis M. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. N Engl J Med. 2015 Sep 3;373(10):895-907. https://doi: 10.1056/NEJMoa1502214.

153. Melnik BC. Milk: an epigenetic amplifier of FTO-mediated transcription? Implications for Western diseases. J Transl Med. 2015 Dec 21;13:385. https://doi: 10.1186/s12967-015-0746-z.

154. Artandi SE. Telomeres, telomerase, and human disease. N Engl J Med. 2006 Sep 21;355(12):1195-7. https://doi: 10.1056/NEJMp068187.

155. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. Cell. 2001 Sep 21;106(6):661-73. https://doi: 10.1016/s0092-8674(01)00492-5.

156. Tzanetakou IP, Katsilambros NL, Benetos A, Mikhailidis DP, Perrea DN. "Is obesity linked to aging?": adipose tissue and the role of telomeres. Ageing Res Rev. 2012 Apr;11(2):220-9. https://doi: 10.1016/j.arr.2011.12.003.

157. Lee M, Martin H, Firpo MA, Demerath EW. Inverse association between adiposity and telomere length: The Fels Longitudinal Study. Am J Hum Biol. 2011 Jan-Feb;23(1):100-6. https://doi: 10.1002/ajhb.21109.

158. Zhou Y, Simmons D, Lai D, Hambly BD, McLachlan CS. rs9939609 FTO genotype associations with FTO methylation level influences body mass and telomere length in an Australian rural population. Int J Obes (Lond). 2017 Sep;41(9):1427-1433. https://doi: 10.1038/ijo.2017.127.

159. Shin C, Kim NH, Baik I. Sex-Specific Association between Longitudinal Changes in Adiposity, FTO rs9939609 Polymorphism, and Leukocyte Telomere Length. J Am Coll Nutr. 2016;35(3):245-54. https://doi: 10.1080/07315724.2015.1005197.

160. Dlouha D, Pitha J, Lanska V, Hubacek JA. Association between FTO 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. Clin Chim Acta. 2012 Aug 16;413(15-16):1222-5. https://doi: 10.1016/j.cca.2012.03.025.

161. Edo MD, Andrés V. Aging, telomeres, and atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2005 May 1;66(2):213-21. https://doi: 10.1016/j.cardiores.2004.09.007.

162. Saliques S, Zeller M, Lorin J, Lorgis L, Teyssier JR, Cottin Y, Rochette L, Vergely C. Telomere length and cardiovascular disease. Arch Cardiovasc Dis. 2010 Aug-Sep;103(8-9):454-9. https://doi: 10.1016/j.acvd.2010.08.002.

163. Zhang Y, Xu Z, Yang Y, Cao S, Lyu S, Duan W. Association Between Weight Change and Leukocyte Telomere Length in U.S. Adults. Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Jul 28;12:650988. https://doi: 10.3389/fendo.2021.650988.

164. Schleinitz D, Distefano JK, Kovacs P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan® assay. Methods Mol Biol. 2011;700:77-87. https://doi: 10.1007/978-1-61737-954-3_6.

165. Thermo Fisher [Internet], dostupno na: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf. [24.01.2023.].

166. Vasilishina A, Kropotov A, Spivak I, Bernadotte A. Relative Human Telomere Length Quantification by Real-Time PCR. Methods Mol Biol. 2019;1896:39-44. https://doi: 10.1007/978-1-4939-8931-7_5.

167. Huđek A, Škara L, Smolkovič B, Kazazić S, Ravlić S, Nanić L, Osvatić MM, Jelčić J, Rubelj I, Bačun-Družina V. Higher prevalence of FTO gene risk genotypes AA rs9939609, CC rs1421085, and GG rs17817449 and saliva containing Staphylococcus aureus in obese women in Croatia. Nutr Res. 2017 Dec 18;50:94-103. https://doi: 10.1016/j.nutres.2017.12.005.

168. Liu X, Hinney A, Scholz M, Scherag A, Tönjes A, Stumvoll M, Stadler PF, Hebebrand J, Böttcher Y. Indications for potential parent-of-origin effects within the FTO gene. PLoS One. 2015 Mar 20;10(3):e0119206. https://doi: 10.1371/journal.pone.0119206.

169. Kumar R, Ningombam SS, Kumar R, Goel H, Gogia A, Khurana S, Deo SVS, Mathur S, Tanwar P. Comprehensive mutations analyses of *FTO* (fat mass and obesity-associated gene) and their effects on FTO's substrate binding implicated in obesity. Front Nutr. 2022 Jul 18;9:852944. https://doi: 10.3389/fnut.2022.852944.

170. Dougkas A, Yaqoob P, Givens DI, Reynolds CK, Minihane AM. The impact of obesity-related SNP on appetite and energy intake. Br J Nutr. 2013 Sep 28;110(6):1151-6. https://doi: 10.1017/S0007114513000147.

171. Rutters F, Lemmens SG, Born JM, Bouwman F, Nieuwenhuizen AG, Mariman E, Westerterp-Plantenga MS. Genetic associations with acute stress-related changes in eating in the absence of hunger. Patient Educ Couns. 2010 Jun;79(3):367-71. https://doi: 10.1016/j.pec.2010.03.013.

172. Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, Rogers I, Hattersley AT, McCarthy MI, Davey Smith G. The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. Am J Clin Nutr. 2008 Oct;88(4):971-8. https://doi: 10.1093/ajcn/88.4.971.

173. Steemburgo T, Azevedo MJ, Gross JL, Milagro FI, Campión J, Martínez JA. The rs9939609 polymorphism in the FTO gene is associated with fat and fiber intakes in patients with type 2 diabetes. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2013;6(2):97-106. https://doi: 10.1159/000350741.

174. Haupt A, Thamer C, Staiger H, Tschritter O, Kirchhoff K, Machicao F, Häring HU, Stefan N, Fritsche A. Variation in the FTO gene influences food intake but not energy expenditure. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2009 Apr;117(4):194-7. https://doi: 10.1055/s-0028-1087176.

175. Qi Q, Chu AY, Kang JH, Huang J, Rose LM, Jensen MK, Liang L, Curhan GC, Pasquale LR, Wiggs JL, De Vivo I, Chan AT, Choi HK, Tamimi RM, Ridker PM, Hunter DJ, Willett WC, Rimm EB, Chasman DI, Hu FB, Qi L. Fried food consumption, genetic risk, and body mass index: gene-diet interaction analysis in three US cohort studies. BMJ. 2014 Mar 19;348:g1610. https://doi: 10.1136/bmj.g1610.

176. Park SL, Cheng I, Pendergrass SA, Kucharska-Newton AM, Lim U, Ambite JL, Caberto CP, Monroe KR, Schumacher F, Hindorff LA, Oetjens MT, Wilson S, Goodloe RJ, Love SA, Henderson BE, Kolonel LN, Haiman CA, Crawford DC, North KE, Heiss G, Ritchie MD, Wilkens LR, Le Marchand L. Association of the FTO obesity risk variant rs8050136 with percentage of energy intake from fat in multiple racial/ethnic populations: the PAGE study. Am J Epidemiol. 2013 Sep 1;178(5):780-90. https://doi: 10.1093/aje/kwt028. Epub 2013 Jul 2.

177. Doaei S, Kalantari N, Izadi P, Salonurmi T, Jarrahi AM, Rafieifar S, Azizi Tabesh G, Rahimzadeh G, Gholamalizadeh M, Goodarzi MO. Interactions between macro-nutrients' intake, FTO and IRX3 gene expression, and FTO genotype in obese and overweight male adolescents. Adipocyte. 2019 Dec;8(1):386-391. https://doi: 10.1080/21623945.2019.1693745.

178. Doaei S, Kalantari N, Izadi P, Salonurmi T, Mosavi Jarrahi A, Rafieifar S, Azizi Tabesh G, Rahimzadeh G, Gholamalizadeh M, Goodarzi MO. Changes in FTO and IRX3 gene expression in obese and overweight male adolescents undergoing an intensive lifestyle intervention and the role of FTO genotype in this interaction. J Transl Med. 2019 May 24;17(1):176. https://doi: 10.1186/s12967-019-1921-4.

179. Doaei S, Kalantari N, Mohammadi NK, Tabesh GA, Gholamalizadeh M. Macronutrients and the FTO gene expression in hypothalamus; a systematic review of experimental studies. Indian Heart J. 2017 Mar-Apr;69(2):277-281. https://doi: 10.1016/j.ihj.2017.01.014.

180. García-Cantú EA, Alvarado-Saldaña HH, Támez-Pérez HE, Rubio-Aguilar G. Effects of liraglutide on weight reduction and metabolic parameters in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus. Med Univ. 2014 Apr 1;16(63):66–70.

181. Iglesias Molli AE, Panero J, Dos Santos PC, González CD, Vilariño J, Sereday M, Cerrone GE, Slavutsky I, Frechtel GD. Metabolically healthy obese women have longer telomere length than obese women with metabolic syndrome. PLoS One. 2017 Apr 6;12(4):e0174945. https://doi: 10.1371/journal.pone.0174945.

182. Gharooi Ahangar O, Javanrouh N, Daneshpour MS, Barzin M, Valizadeh M, Azizi F, Hosseinpanah F. Genetic markers and continuity of healthy metabolic status:

Tehran cardio-metabolic genetic study (TCGS). Sci Rep. 2020 Aug 12;10(1):13600. https://doi: 10.1038/s41598-020-70627-5.

183. Popović AM, Huzak M, Matovinović M, Huđek Turković A, Bačun-Družina V, Rubelj I. (2022). Influence of FTO Polymorphisms rs9939609, rs1421085 and rs17817449 on Metabolically (un)Healthy Obesity. U: STEVO JULIUS ZAGREB Conf Book Apstracts. 2022;64. Dostupno na: https://www.bib.irb.hr/1233120.

184. Popović AM, Huzak M, Matovinović M, Huđek Turković A, Bačun-Družina V, Rubelj I. (2022). Association between FTO gene polymorphisms rs9939609, rs1421085 and rs17817449 and prediabetes or diabetes. U: STEVO JULIUS ZAGREB Conf Book Apstracts. Dostupno na: https://www.bib.irb.hr/1233151.

185. Popović A., Matovinović, M., Mustač, F., Huđek Turković, A., Škara, L., Nanić, L., Rubelj, I. & Bačun- Družina, V. (2021) Povezanost genetskih varijanti FTO gena: rs9939609, rs1421085 i rs17817449 u pretilih žena s hipertenzijom. U: 5.hrvatski kongres o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem. Dostupno na: https://www.bib.irb.hr/1173810.

186. Popović AM, Nanić L, Mustač F, Turković Huđek A, Škara L, Bačun-Družina V, Huzak M, Matovinović M, Rubelj I. (2022). Utjecaj polimorfizama FTO gena rs99369609, rs1421085 i rs17817449 na inzulinsku rezistenciju u pretilih žena. U: Štimac, D., Holjević, E., Bukša, I. & Belančić, A. (ur.). Zbornik sažetaka 8. hrvatski kongres o debljini s međunarodnim sudjelovanjem. Dostupno na: https://www.bib.irb.hr/1192233.

187. Agostinis-Sobrinho CA, Ramírez-Vélez R, García-Hermoso A, Moreira C, Lopes L, Oliveira-Santos J, Abreu S, Mota J, Santos R. Low-grade inflammation and muscular fitness on insulin resistance in adolescents: Results from LabMed Physical Activity Study. Pediatr Diabetes. 2018 May;19(3):429-435. https://doi: 10.1111/pedi.12607.

188. Sweeting HN. Gendered dimensions of obesity in childhood and adolescence. Nutr J. 2008 Jan 14;7:1. https://doi: 10.1186/1475-2891-7-1.

189. Vranić L, Mikolašević I, Milić S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? Medicina (Kaunas). 2019 Aug 28;55(9):541. https://doi: 10.3390/medicina55090541.

190. Surendran S, Jayashri R, Drysdale L, Bodhini D, Lakshmipriya N, Shanthi Rani CS, Sudha V, Lovegrove JA, Anjana RM, Mohan V, Radha V, Pradeepa R, Vimaleswaran KS. Evidence for the association between *FTO* gene variants and vitamin B12 concentrations in an Asian Indian population. Genes Nutr. 2019 Sep 5;14:26. https://doi: 10.1186/s12263-019-0649-3.

191. Madhu, S.V. Vitamin B_{12} and diabetes risk—myth or reality. Int J Diabetes Dev Ctries 2020;40, 1–3. https://doi.org/10.1007/s13410-020-00810-x.

192. Popović AM, Huzak M, Matovinović M, Huđek Turković A, Bačun-Družina V, Mustač F, Rubelj I. (2022). FTO gene polymorphisms rs9939609, rs1421085, and rs17817449 causeobesity through impact on serum lipids? U: STEVO JULIUS ZAGREB Conf Book Apstracts. Dostupno na: https://www.bib.irb.hr/1233152.

193. Dorling JL, Thackray AE, King JA, Pucci A, Goltz FR, Batterham RL, Stensel DJ. No Influence of the Fat Mass and Obesity-Associated Gene rs9939609 Single Nucleotide Polymorphism on Blood Lipids in Young Males. Nutrients. 2020 Dec 17;12(12):3857. https://doi: 10.3390/nu12123857.

194. Doney AS, Dannfald J, Kimber CH, Donnelly LA, Pearson E, Morris AD, Palmer CN. The FTO gene is associated with an atherogenic lipid profile and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: a Genetics of Diabetes Audit and Research Study in Tayside Scotland (Go-DARTS) study. Circ Cardiovasc Genet. 2009 Jun;2(3):255-9. https://doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.822320.

195. Liu C, Mou S, Pan C. The FTO gene rs9939609 polymorphism predicts risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2013 Aug 19;8(8):e71901. https://doi: 10.1371/journal.pone.0071901.

8. SAŽETAK

Pretilost je vodeći globalni javnozdravstveni problem koji nastaje kao posljedica prekomjernog nakupljanja masti uz smanjenu potrošnju i povećan unos energije. Ova bolest svjetskih razmjera koja nastaje kao posljedica stila života uz razne rizične čimbenike ima u sebi i genetsku podlogu. Gen *FTO* (eng. *fat-mass and obesity associated gene*) otkriven je u cijelogenomskim studijama gdje se s indeksom tjelesne mase (ITM) dovodi u korelaciju s pretilošću. Istraživanja pretilosti najčešće povezuju varijante gena *FTO* s ITM ili s ekspresijom i funkcijom susjednih gena te upućuju na narušeni odgovor na sitost, prejedanje i hranjenje bez osjećaja gladi.

U ovom istraživanju ispitana je genetska osnova nastanka pretilosti te kako se ista reflektira na metabolizam telomera. Dobiveni rezultati potvrđuju povezanost gena *FTO* s povećanim ITM i nastankom pretilosti. Distribucija polimorfizama pokazuje bimodalni efekt između odsustva rizičnih SNP-a i tri kao odnosno šest rizičnih SNP-a. Analiza utjecaja polimorfizama gena *FTO* na dinamiku skraćivanja telomera pokazuje da prisutnost rizičnih polimorfizama dovodi do većeg skraćivanja telomera u odnosu na pretilost bez rizičnih polimorfizama kod koje je dinamika skraćivanja telomera jednaka kontrolnoj grupi.

Ovi rezultati predstavljaju temelj za različiti klinički pristup i specifičnije liječenje osoba s pretilošću, rizičnim aleleima gena *FTO* i kraćim telomerama u odnosu na osobe s pretilosti, ali bez rizičnog alela i s duljim telomerama. Pojedinci s kraćim telomerama i rizičnim polimorfizmom gena *FTO* u budućnosti bi mogli imati koristi u vidu bržeg i učinkovitoijeg pristupa u liječenju gubitka tjelesne mase ako bi individualni pristup uključivao mjerenje duljine telomera i određivanje *FTO* statusa.

.

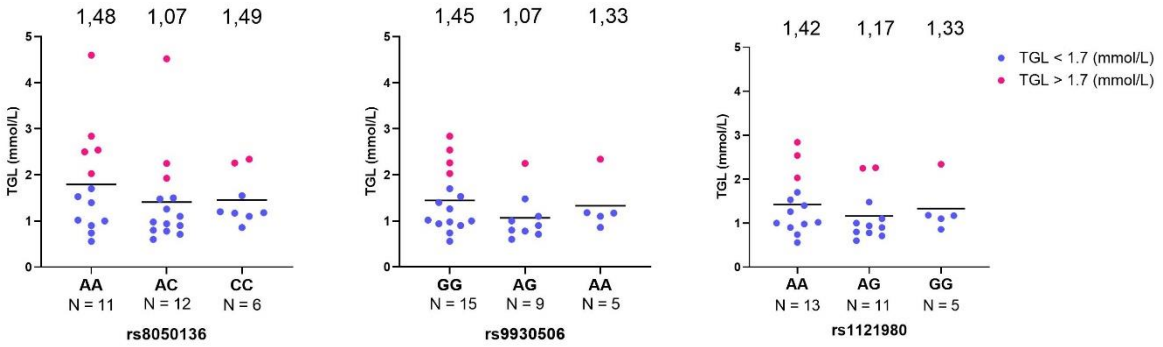
9. SUMMARY

Obesity is a leading global public health problem that occurs as a result of excessive fat accumulation with reduced consumption and increased energy intake. This disease of global proportion, which develop as a result of a lifestyle in addition to various risk factors, also has a genetic basis. The *FTO* (fat-mass and obesity associated) gene was discovered in genomewide studies where it is correlated with obesity regarding body mass index (BMI). Research on obesity most often associates variants of the FTO gene with BMI or with the expression and function of neighboring genes and points to an impaired response to satiety, overeating and feeding without feeling hungry.

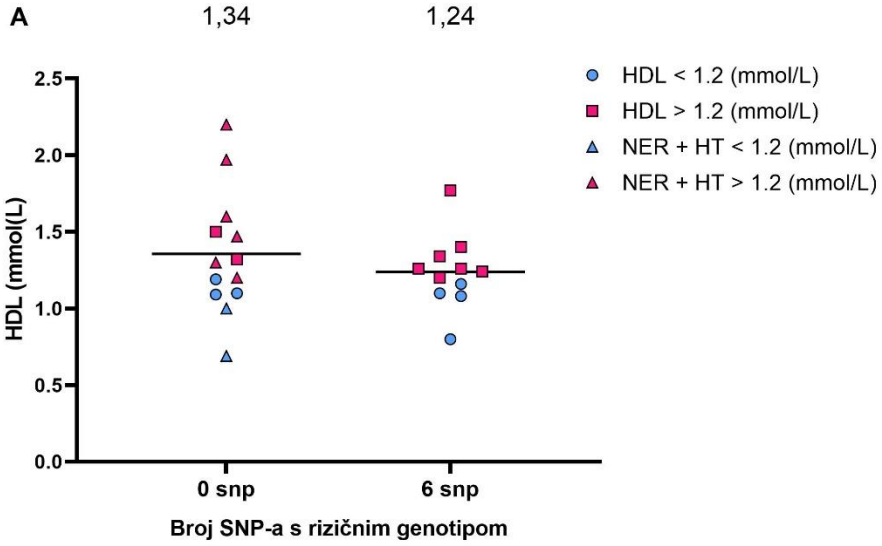
In this research, we have examined the genetic basis of obesity and how it is reflected on telomere metabolism. Obtained results confirmed association between *FTO* gene with increased BMI and obesity. Distribution of polymorphisms displays a bimodal effect between absence of risk polymorphisms and three or six risk polymorphisms. *FTO* gene olymorphisms have effect on the dynamics of telomere shortening where analysis shows that the presence of risk polymorphisms leads to greater telomere shortening compared to obesity without risk polymorphisms where the dynamics of telomere shortening is equal to the control group.

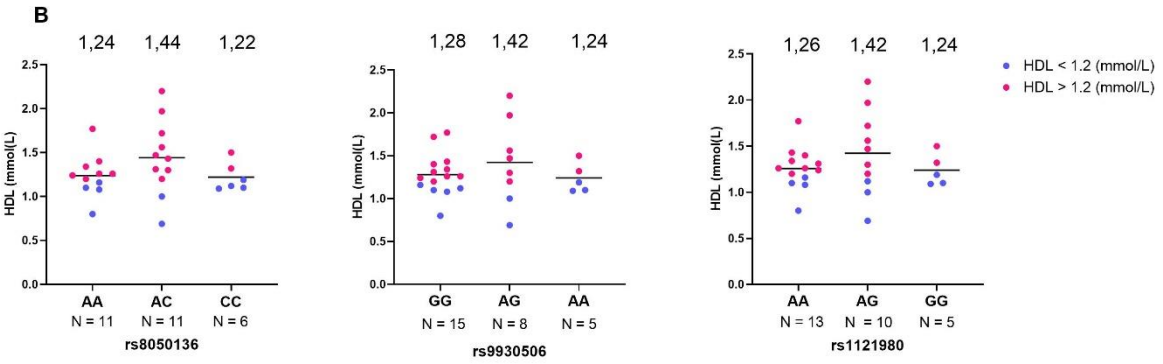
These results represent the basis for a different clinical approach and a more specific treatment of a individuals with obesity, *FTO* risk alleles and shorter telomeres compared to individuals with obesity but without risk alleles and longer telomeres. Individulas with shorter telomeres and risk polymorphisms could benefit in the future from effcient and effective approach to weight loss treatment if the individual approoach would include measuring telomere length and determining the *FTO* status.

10. PRILOZI



Slika 1. Distribucija triglicerida po genotipu za ispitivane polimorfizme

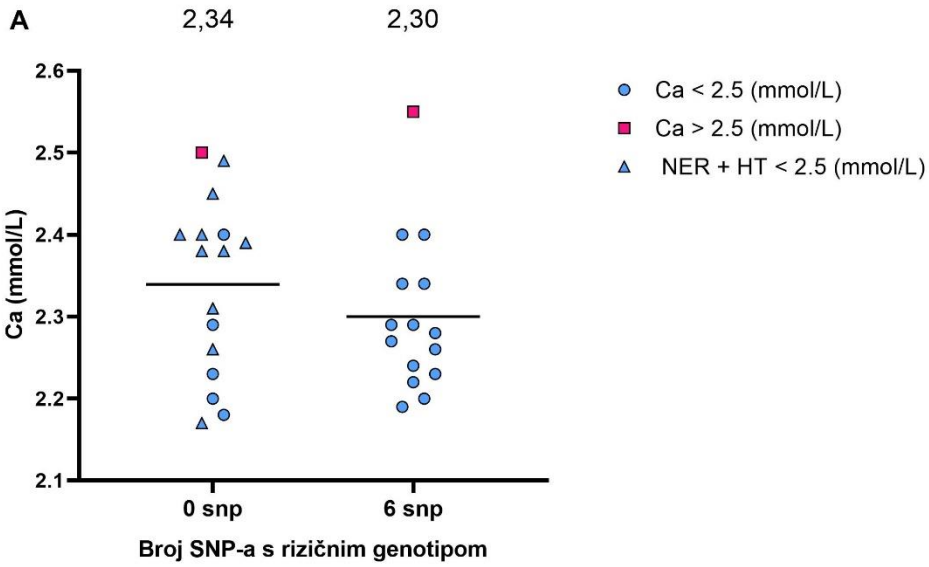


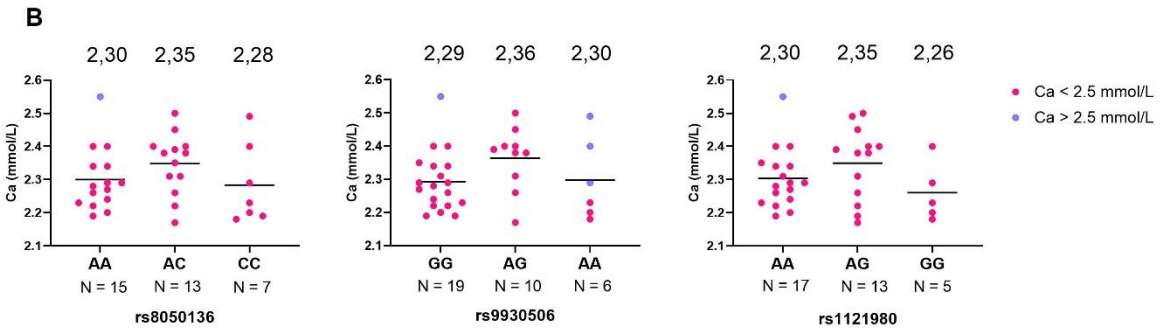


Slika 2. Distribucija HDL-a u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma.

Na slici 2A su izostavljene četiri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.

*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

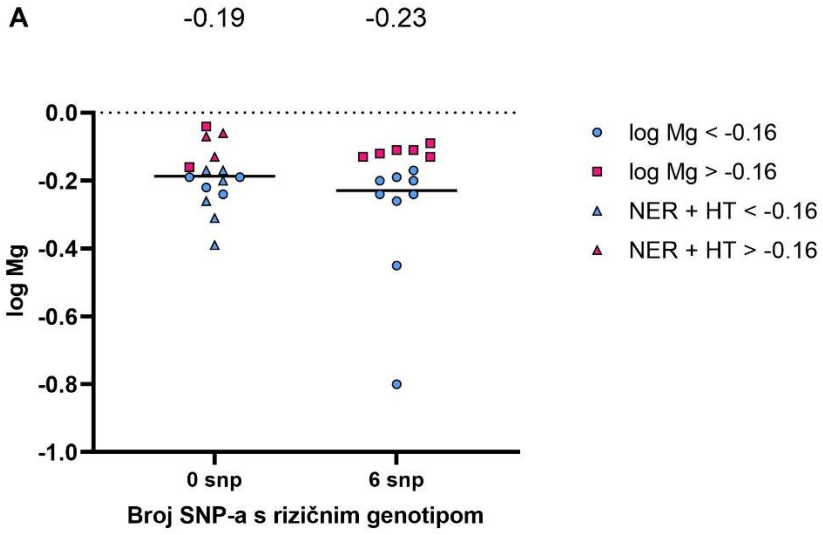


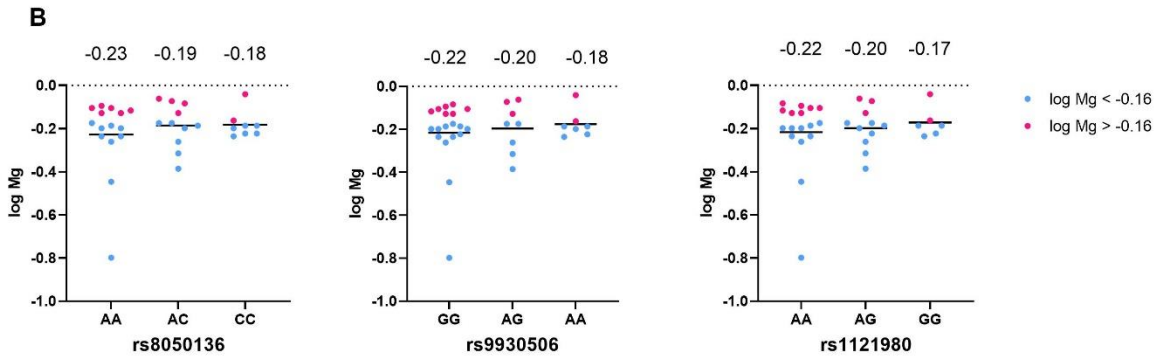


Slika 3. Distribucija kalcija u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma

Na slici 3A su izostavljene četiri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.

*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

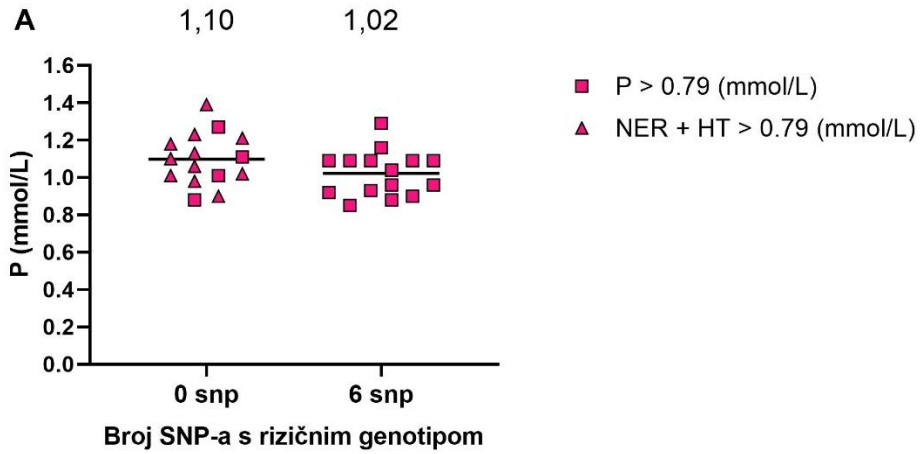


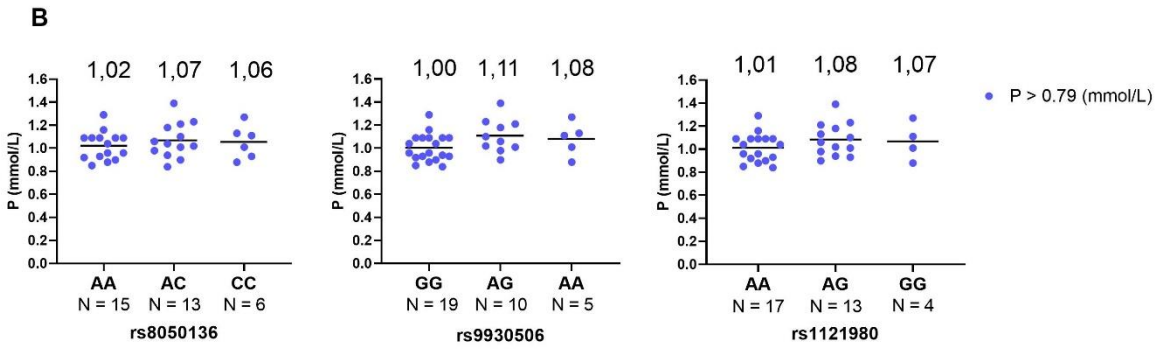


Slika 4. Distribucija magnezija u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma

Na slici 4A su izostavljene četiri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.

*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.





Slika 5. Distribucija fosfora u odnosu na rizične polimorfizme i distribucija po genotipu ispitivanih polimorfizma

Na slici 5A su izostavljene četiri ispitanice koje spadaju u grupu MR* zbog jednostavnijeg grafičkog prikaza.

*MR-minimalno rizični; HT-heterozigot; NER-nerizični genotip.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1994. godine u Gospiću gdje sam pohađala osnovnu školu dr. Jure Turića i Opću gimnaziju Gospić. Godine 2012. upisala sam preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu, gdje sam obranila završni rad 2015. godine i stekla titulu prvostupnice medicinsko laboratorijske dijagnostike. Iste godine upisala sam diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku i stekla titulu magistra medicinsko laboratorijske dijagnostike 2017. godine. Diplomski rad pod nazivom *"Atipične glandularne stanice u PAPA razmazu"* ostvaren je u Kliničkom zavodu za kliničku citologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek, na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod mentorstvom doc. dr. sc. Branke Lončar.

2017. godine zaposlena sam u Zavodu za javno zdravstvo Ličko-senjske županije i Opće bolnice Gospić kao pripravnik u sklopu stručnog osposobljavanja. Iste godine upisujem poslijediplomski interdisciplinarni studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu J.J. Strossmayera u Osijeku. Godine 2019. zaposlena sam kao inženjer na Odsjeku za transfuziju, Odjela za laboratorijsku dijagnostiku, Opće bolnice Gospić.

Doktorsku disertaciju izradila sam u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju, Zavoda za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivice Rubelja, znanstvenog savjetnika te dr. sc. Martina Matovinović, dr. med. više znanstvene suradnice.

Aktivno sam sudjelovala na domaćim i međunarodnim konferencijama na kojima sam izlagala svoje radove usmeno ili putem poster prezentacija. Osvojila sam nagradu za najbolji rad kongresa na 8. Hrvatskom kongresu o debljini s međunarodnim sudjelovanjem u poster sekciji za radove pod nazivom "*Povezanost genetskih varijanti FTO gena: rs9939609, rs1421085 i rs17817449 u pretilih žena s hipertenzijom"* i " *Utjecaj polimorfizama FTO gena rs99369609, rs1421085 i rs17817449 na inzulinsku rezistenciju u pretilih žena"*. Objavila sam jedan izvorni rad na kojem sam prvi autor.

Izvorni rad:

Popović, Ana-Marija; Huđek Turković, Ana; Žuna, Kristina; Bačun-Družina, Višnja; Rubelj, Ivica; Matovinović, Martina. *FTO* Gene Polymorphisms at the Crossroads of Metabolic Pathways of Obesity and Epigenetic Influences. *Food Technology and Biotechnology* (2022) doi:10.17113/ftb.61.01.23.7594

Kongresni sažeci:

Popović, Ana-Marija; Nanić, Lucia; Mustač, Filip; Turković Huđek, Ana; Škara, Lucija; Bačun-Družina, Višnja; Huzak, Miljenko; Matovinović, Martina; Rubelj, Ivica. Utjecaj polimorfizama FTO gena rs99369609, rs1421085 i rs17817449 na inzulinsku rezistenciju u pretilih žena // *Zbornik sažetaka 8. hrvatski kongres o debljini s međunarodnim sudjelovanjem* / Štimac, Davor ; Holjević, Ena ; Bukša, Iva ; Belančić, Andrej (ur.). Rijeka: Hrvatsko društvo za debljinu HLZ, 2022. str. 22-23 (poster, sažetak, znanstveni).

Popović, Ana Marija; Mustač, Filip; Matovinović, Martina; Marčinko, Darko. FTO gene association with depression – Does FTO gen affect obesity in patients with depression // *Abstract Book (International Neuropsychiatric Congress. Online)* / Demarin, Vida ; Budinčević, Hrvoje (ur.). Zagreb: International Institute for Brain Health, 2022. str. 39-40 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Popović, Ana-Marija; Huzak, Miljenko; Matovinović, Martina; Huđek Turković, Ana; Bačun-Družina, Višnja; Rubelj, Ivica. Influence of FTO Polymorphisms rs9939609, rs1421085 and rs17817449 on Metabolically (un)Healthy Obesity *// STEVO JULIUS ZAGREB CONFERENCE Book of Apstracts.* Zagreb, Hrvatska, 2022. str. 64-64 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Popović, Ana-Marija; Huzak, Miljenko; Matovinović, Martina; Huđek Turković, Ana; Bačun-Družina, Višnja; Rubelj, Ivica. Association between FTO gene polymorphisms rs9939609, rs1421085 and rs17817449 and prediabetes or diabetes *// STEVO JULIUS ZAGREB CONFERENCE Book of Apstracts.* Zagreb, Hrvatska, 2022. str. 66-66 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Popović, Ana-Marija; Huzak, Miljenko; Matovinović, Martina; Huđek Turković, Ana; Bačun-Družina, Višnja; Mustač, Filip; Rubelj, Ivica. FTO gene polymorphisms rs9939609, rs1421085, and rs17817449 causeobesity through impact on serum lipids? *// STEVO JULIUS ZAGREB CONFERENCE Book of Apstracts.* Zagreb, Hrvatska, 2022. str. 67-67 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Galijašević, Tin; Mustač, Filip; **Popović, Ana Marija**; Matovinović, Martina; Marčinko, Darko. Imoprtance od Doctor-patient Relationship as a Benefit in Treating People with Prehypertension *// Stevo Julius Conference : Book of Abstracts.* Zagreb, Croatia, 2022. str. 77-77 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

Mustač, Filip; Jakšić, Nenad; Vuksan-Ćusa, Zrinka**; Popović, Ana-Marija**; Matovinović, Martina; Marčinko, Darko. Uloga psiholoških čimbenika i magnezija u hipertenzivnih pretilih bolesnica *// 5. hrvatski kongres o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem* online, 2021. (poster, recenziran, pp prezentacija, znanstveni).

Popović, Ana- Marija; Matovinović, Martina; Mustač, Filip; Huđek Turković, Ana; Škara, Lucija; Nanić, Lucia; Rubelj, Ivica; Bačun- Družina, Višnja. Povezanost genetskih varijanti FTO gena: rs9939609, rs1421085 i rs17817449 u pretilih žena s hipertenzijom *// 5.hrvatski kongres o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem*. Zagreb, Hrvatska, 2021. (poster, recenziran, pp prezentacija, znanstveni).