

UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE MOLEKULSKE MEDICINE



Nataša Jovanović

**POLIMORFIZMI GENA LIPIDNOG
METABOLIZMA KOD PACIJENATA SA
METABOLIČKIM SINDROMOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Karmen Stankov, Prof. dr Mihajla Đan

Novi Sad, 2014. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nataša Jovanović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof.dr Karmen Stankov, vanredni profesor Prof. dr Mihajla Đan, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Polimorfizmi gena lipidnog metabolizma kod pacijenata sa metaboličkim sindromom
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3.

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 9 / stranica 118 / slika 11 /Referenci 134 / tabela 36)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina:	Genetika
Predmetna odrednica,	Metabolički sindrom, Genetska predispozicija za razvoj bolesti, Apolipoprotein E, Lipoproteinski receptori, Genetski polimorfizam
UDK	616-008:575
Čuva se: ČU	Biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Metabolički sindrom predstavlja kompleksno poligeno multifaktorsko oboljenje metabolizma. Poznavanjem genetičke predispozicije mogu se korigovati faktori sredine koji su podložni promenama, čime se pojava bolesti može odložiti ili sprečiti. Utvrđivanje genetičke osnove metaboličkog sindroma je jedan od potrebnih koraka kako u prevenciji nastanka oboljenja, uštedi troškova lečenja, tako i u dizajniranju ciljane terapije. Ciljevi istraživanja su povezanost pojedinih alelnih varijanti apoE i LRP1 gena i pojave metaboličkog sindroma, zatim analiza povezanosti polimorfizma apoE i LRP1 gena i svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra u obe ispitivane grupe, kao i utvrđivanje povezanosti svakog kompozitnog genotipa apoE i LRP1 gena sa pojavom metaboličkog sindroma, kao i povezanost sa svakim pojedinačnim antropometrijskim i biohemijskim parametrom u obe ispitivane grupe. U radu je dokazan značaj apoE gena i LRP1 gena u metabolizmu lipida i svih ostalih ispitivanih antropometrijskih i biohemijskih parametara i značajan uticaj e4 alelne forme apoE gena i T alelne forme LRP1 gena pojedinačno, kao i uticaj kompozitnog genotipa dva pomenuta gena za pojavu i razvoj metaboličkog sindroma. Utvrđeno je da je najčešća alelna forma apoE gena e3, zatim e4 pa e2, dok je najčešća alelna forma LRP1 gena C u obe ispitivane grupe. Zaključeno je da je u eksperimentalnoj grupi značajno češća frekvencija e4 alela apoE gena i T alela LRP1 gena, što potvrđuje negativan uticaj pomenutih alela na ispitivane antropometrijske i biohemijske parametre. Dobijeni rezultati su pokazali da prisustvo e4 alela apoE gena kod ispitanika povećava šansu 11,5 puta za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce e2 i e3 alela, dok T alel LRP1 gena povećava šansu za 4,76 puta u odnosu na nosioce C alela.</p>

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	Sednica Nastavno-naučnog veća održana dana 18.12.2012.godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>Predsjednik: Prof. dr Edita Stokić, redovni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Prof. dr Dragana Obreht, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Prof. dr Branka Kovačev-Zavišić, redovni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Prof. dr Feodora Popić-Paljić, profesor u penziji, Medicinski fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Doc. dr Biljana Božin, docent, Medicinski fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>rezervni član: Doc dr. Jelena Purać, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>.</p>

University of Novi Sad
ACIMSI
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Natasa Jovanovic
Mentor: MN	Associate Professor Mihajla Djan, PhD Associate Professor Karmen Stankov, PhD
Title: TI	Polymorphism of lipid metabolism genes in patients with metabolic syndrome
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication:	Republic of Serbia
Locality of publication:	Vojvodina
Publication year: PY	2014.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	Number of chapters 9, pages 118, tables 36, pictures 11, references 134
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline	Genetics
Subject, Key words SKW	Metabolic Syndrome, Genetic Predisposition to Disease, Apolipoprotein E, Lipoprotein Receptors, Genetic Polymorphism
UC	616-008:575
Holding data: HD	Library of Medical faculty in Novi Sad, 21 000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3.
Note: N	
Abstract: AB	<p>Metabolic syndrome is a complex polygene multifactor metabolic disorder. By knowing genetic predisposition, environment factors which are subject to change can be corrected, which allows the disorder to be postponed or prevented. Determining genetic background of metabolic syndrome is one of the necessary steps in preventing the disorder; it would save the cost of medical treatments as well as help in designing personalised therapy. Experiment goals are determining the connection between individual alleles of apoE and LRP1 genes on one side and the appearance of metabolic syndrome on the other; the analysis of correlation between apoE and LRP1 genes polymorphism and each individual anthropometric and biochemical parameter in both tested groups; as well as establishing the correlation of every composite genotype of apoE and LRP1 genes with presence of metabolic syndrome, and the connection with each anthropometric and biochemical parameter in both tested groups. This paper has demonstrated the importance of apoE gene and LRP1 gene in the metabolism of lipids and in all other anthropometric and biochemical parameters tested and the impact of e4 allele form of apoE gene and T allele form of LRP1 gene individually, as well as the impact of composite genotypes both of the above mentioned genes on the emergence and development of the metabolic syndrome. It has been determined that the most common allele form of apoE gene are e3, e4 and e2 subsequently, while the most common allele forms of LRP1 gene is C in both test groups. It is concluded that in the experimental group more frequent is e4 allele of apoE gene and T allele of LRP1 gene, which confirms negative impact of stated alleles onto tested anthropometric and biochemical parameters. Acquired results show that presence of e4 allele of apoE gene increases the chance 11.5 times for the metabolic syndrome compared to the carriers of e2 and e3 alleles, while T allele of LRP1 gene increases the chance 4.76 times in comparison to C allele carriers.</p>

Accepted on Scientific Board	December 18 th 2012.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Professor Edita Stokić, MD, Full Professor, Medical Faculty of Novi Sad, University in Novi Sad</p> <p>member: Professor Dragana Obreht, Associate Professor, Faculty of Sciences Novi Sad, University in Novi Sad</p> <p>member: Professor Branka Kovačev-Zavišić, MD, Full Professor, Medical Faculty of Novi Sad, University in Novi Sad</p> <p>member: Professor Feodora Popić-Paljić, MD, Associate Professor in retirement, Medical Faculty of Novi Sad, University in Novi Sad</p> <p>member: Professor Biljana Božin, Assistant Professor, Medical Faculty of Novi Sad, University in Novi Sad</p> <p>(substitute member: Professor Jelena Purać, Assistant Professor, Faculty of Sciences Novi Sad, University in Novi Sad)</p>

SKRAĆENICE KORIŠĆENE U RADU

MetS-metabolički sindrom

KVB-kardiovaskularne bolesti

DMT2-dijabetes melitus tip 2

ApoE-apolipoprotein E

apoE-gen koji kodira apolipoprotein E

LRP1 protein-protein srodan receptoru lipoproteina niske gustine

LRP1 gen- gen koji kodira protein srodan receptoru lipoproteina niske gustine

FVIII-faktor koagulacije VIII

KP-arterijski krvni pritisak

SKP-sistolni krvni pritisak

DKP-dijastolni krvni pritisak

OS-obim struka

ITM-indeks telesne mase

IDF-međunarodno udruženje za dijabetes

IR-insulinska rezistencija

HDL-lipoproteini velike gustine

LDL-lipoproteini male gustine

VLDL-lipoproteini vrlo male gustine

TG-trigliceridi

CRP-C reaktivni protein

SMK-slobodne masne kiseline

CETP-holesterol ester transfer protein

HOMA-IR- homeostasis model assessment of insulin resistance

Th-terapija

PCR-lančana reakcija polimeraze

RFLP-polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata

bp-bazni parovi

OR-unakrsni odnosi (engl.*odds ratio*)

Sadržaj

1	UVOD	10
2	PREGLED LITERATURE	13
2.1	Metabolički sindrom.....	13
2.1.1	Epidemiologija metaboličkog sindroma	19
2.1.2	Značaj metaboličkog sindroma	23
2.1.3	Patofiziologija metaboličkog sindroma	25
2.2	Genetičke determinante MetS	27
2.2.1.	Polimorfizam apoE gena.....	30
2.2.1.1.	Populaciono-genetičke studije varijabilnosti apoE gena	31
2.2.1.2.	Značaj polimorfizma apoE u metabolizmu lipida	32
2.2.1.3.	Povezanost apoE alelnih varijanti i metaboličkog sindroma.....	34
2.2.2.	Polimorfizam LRP1 gena.....	35
2.2.2.1.	Populaciono genetičke studije LRP1 gena	38
2.2.2.2.	Značaj LRP1 gena u metabolizmu lipida.....	39
3	CILJ RADA	42
4	HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	43
5	MATERIJAL I METODE RADA	44
5.1	Konstrukcija i način izbora uzorka.....	44
5.2	Metode rada.....	45
5.2.1	Fizički pregled.....	45
5.2.2	Antropometrijska merenja.....	45
5.2.3	Određivanje biohemijskih parametara	45
5.2.4	Određivanje polimorfizma apoE i LRP1 gena.....	46
5.2.5	Statistička obrada i prezentacija rezultata	47
6	REZULTATI	49
6.1	Analiza antropometrijskih i biohemijskih parametara	49
6.2	Polimorfizam apoE gena i metabolički sindrom	52
6.3	Polimorfizam LRP1 gena i metabolički sindrom	63
6.4	Kompozitni genotip apoE i LRP1 gena i metabolički sindrom.....	73
6.5	Zavisnost pojave metaboličkog sindroma u odnosu na pol.....	83
7	DISKUSIJA	92
7.1	Analiza antropometrijskih i biohemijskih parametara	92
7.2	Polimorfizam apoE gena i metabolički sindrom	92
7.3	Polimorfizam LRP1 gena i MetS	97
7.4	Kompozitni genotip i MetS	100
7.5	Zavisnost pojave metaboličkog sindroma u odnosu na pol.....	101
8	ZAKLJUČCI	104
9	LITERATURA:	106

1 UVOD

Savremeni način života doprinosi povećanju učestalosti kompleksnog stanja, medicinskim rečnikom nazvanog metabolički sindrom, koje predstavlja gotovo neizbežnu posledicu nekoliko najučestalijih bolesti savremene civilizacije, pre svega koronarnih oboljenja i dijabetes melitusa tipa II. Kod osoba sa metaboličkim sindromom, tri puta je veći rizik da dožive srčani ili moždani udar i dva puta veći rizik da ih to usmrti. Srbija zauzima neslavno treće mesto u svetu po smrtnosti od bolesti srca, odmah iza Rusije i Ukrajine.

Metabolički sindrom (MetS) predstavlja skup faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih oboljenja (KVB) i dijabetes melitusa tipa II (DMT2), usled postojanja abdominalne gojaznosti i insulinske rezistencije (1). Primarni događaj u nastanku metaboličkog sindroma jeste pozitivni energetski bilans koji dovodi do povećanja mase masnog tkiva, sledi promena metabolizma slobodnih masnih kiselina koje stimulišu endogenu produkciju glukoze izazivajući insulinsku rezistenciju koja je jedan od glavnih patofizioloških mehanizama u nastanku predijabetesa i dijabetesa tip 2 i povećanju kardiovaskularnog rizika (2-4). Rizik od kardiovaskularne bolesti kod osoba sa metaboličkim sindromom je veći 30–400% nego u zdravoj populaciji (5-9). Uprkos rastućem broju dokaza koji podržavaju primenu rane medikamentozne terapije kod bolesnika sa metaboličkim sindromom, mnogi lekari još uvek ne prepoznaju rizik koji je udružen sa ovim stanjem i izbegavaju da uvedu ranu terapijsku intervenciju. Savremeni terapijski pristup lečenju bolesnika sa metaboličkim sindromom podrazumeva takozvani ABCDE pristup (skraćeno od engleskih reči: „A” – *assessment of cardiovascular risk and aspirin therapy* (procena kardiovaskularnog rizika i terapija aspirinom); „B” – *blood pressure control* (kontrola krvnog pritiska); „C” – *cholesterol management* (lečenje hiperholesterolemije); „D” – *diabetes prevention and diet therapy* (prevencija dijabetesa i terapija dijetom) i „E” – *exercise therapy* (terapija fizičkom aktivnošću) (1).

Sve komponente metaboličkog sindroma se ubrajaju u multifaktorijalna svojstva. Multifaktorijalno svojstvo je svojstvo na koje utiče čitav skup faktora, odnosno mnogi genetički faktori, faktori spoljašnje sredine kao i njihovo međusobno delovanje. Upravo zbog toga postoji mali uspeh u identifikaciji gena koji determinišu kompleksna svojstva. Mnoga istraživanja ukazuju da je MetS poligenska i multifaktorijalna bolest koja je

uslovljena složenim međusobnim delovanjem brojnih gena i faktora spoljašnje sredine, zbog čega istraživanje genetičke osnove ovog sindroma predstavlja veliki izazov. Danas se rade intenzivna istraživanja u cilju identifikacije gena koji povećavaju rizik za nastanak metaboličkog sindroma.

ApoE gen se nalazi na humanom hromozomu 19q13.2 i kodira apolipoprotein (Apo) E koji je jedan od pet glavnih tipova lipoproteina u krvi (ApoA-E). Gen se sastoji od tri introna i četiri egzona i dužine je 3597bp. ApoE se uglavnom pojavljuje u tri najčešće izoforme (E2, E3, E4) koje su kodirane od strane tri genska alela apoE gena: e2, e3 i e4. Razlike između ova tri alela nastale su usled supstitucije po jednog nukleotida u kodonima 112 i 158. Alel e3 se smatra „divljim“ tipom alela (izvorišnim alelom) i nalazi se kod oko 79% humane populacije, dok je alel e4 zastupljen sa 14%, a e2 svega 7%. Humani apolipoprotein E je glikoprotein bogat argininom i sastoji se od dva strukturalna dela koji imaju odvojene funkcije. Aminoterminalni deo sadrži region ApoE koji se vezuje za lipoproteinski receptor i karboksiterminalni deo sadrži glavne lipoprotein-vezujuće determinante proteina (10-12). Sintetiše se najviše u jetri i mozgu i njegove dve glavne uloge u metabolizmu su: transport lipida sa mesta njihove sinteze ili apsorpcije do tkiva gde se skladište i transport holesterola i drugih lipida do jetre radi ekskrecije. U metabolizmu lipoproteina ApoE potpomaže uklanjanje VLDL (lipoproteini vrlo male gustine) i hilomikrona, velikih lipoproteina koji su odgovorni za inicijalni transport lipida unetih hranom iz krvotoka do jetre(11,12).

Genotipizacija apoE gena još uvek nije u rutinskoj dijagnostičkoj upotrebi i njena klinička svrha se i dalje evaluira. Prilikom procene kardiovaskularnog rizika kod pacijenata sa konstantno značajno visokim nivoima holesterola i triglicerida nakon korigovane ishrane i promene životnog stila, kao i kod pacijenata koji imaju ksantome i lekar sumnja na tip III hiperlipoproteinemije, ponekad se zahteva genotipizacija apoE. ApoE genotipizacija se takođe primenjuje kod pacijenata sa simptomima progresivne demencije (10-12).

LRP1 gen se nalazi na humanom hromozomu 12q13-14 i kodira protein srodan receptoru lipoproteina niske gustine (engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein*, LRP1) (13). Do danas je poznato nekoliko mutacija sekvence ovog gena; intron 2 (C→T), egzon 3 (C→T), egzon 6 (C→T), intron 6 (G→C), intron 19 (C→T), egzon 22 (C→T), intron 38 (C→T), egzon 61 (G→A) i intron 83 (G→A). Identifikovana je mutacija u okviru egzona 3 LRP1 gena, C→ T na poziciji 677 koja ne menja sekvencu aminokiselina u

proteinu, a povezana je sa Alchajmerovom bolesti, cerebralnom amiloidnom angiopatijom (14), povišenim nivoom FVIII u plazmi i rizikom od venskog tromboembolizma (15). Takođe utiče na ekspresiju markera za diferencijaciju adipocita i održavanje nivoa lipida unutar zrelih adipocita, a ima i ključnu ulogu u metabolizmu lipida (16). LRP1 gen je visoko varijabilan između različitih populacija. Posmatrano u čitavoj humanoj populaciji frekvencija T alela egzona 3 LRP1 gena iznosi 22%, a C alela 78%. LRP1 protein je multifunkcionalni receptor sa dve glavne biološke funkcije u endocitozi mnogih liganada i kontroli i integraciji unutarćelijskih signalnih puteva koji nisu neophodni za opstanak ćelije same po sebi, ali su esencijalni za održavanje bazalne ćelijske funkcije i razvoj i opstanak organizma. Zbog svog značaja LRP1 je ekspresovan skoro u svim ćelijama i nije ustanovljena nijedna poznata bolest usled LRP1 kodirajuće mutacije do danas (17).

MetS predstavlja kompleksno poligeno oboljenje metabolizma koje uključuje centralnu gojaznost, dislipidemiju, hipertenziju i hiperglikemiju. Genetička predispozicija je jedan od faktora rizika koji se ne može kontrolisati, ali poznavanjem genetičke predispozicije mogu se korigovati ostali, modifikujući, faktori sredine čime se razvoj bolesti može odložiti ili sprečiti. Razumevanje značaja genetičkih i faktora sredine, kao i njihovih međusobnih interakcija je od kritičnog značaja za pronalazak specifičnih tretmana i za identifikaciju individua sa visokim rizikom od obolevanja. Utvrđivanje genetičke osnove MetS je jedan od potrebnih koraka kako u prevenciji nastanka oboljenja, tako i u dizajniranju ciljane terapije.

Molekularno-genetički pristup je najpouzdaniji u dijagnostici većine bolesti. Istraživanja pokazuju da primena rutinskog skrininga, posebno kod pacijenata sa familijarnim opterećenjem, doprinosi ranoj dijagnostici i prevenciji, čime se odlaže proces koji dovodi do nastanka i razvoja KVB, dijabetesa, gojaznosti, insulinske rezistencije, a time i MetS, a samim tim i poboljšava kvalitet života i smanjuje broj obolelih. Veoma rana potvrda genetičke predispozicije za nastanak KVB, dijabetesa, gojaznosti, insulinske rezistencije, a time i MetS omogućava promenu životnih navika koje doprinose nastanku i razvoju bolesti, a time i uštedu troškova lečenja (18).

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Metabolički sindrom

Proteklih pedeset godina došlo je do dramatičnih promena u okruženju čoveka, načinu života i ponašanju. Ove promene su dovele do globalnog porasta kako gojaznosti tako i dijabetes melitusa tipa 2 (DMT2). Oba obolenja dobila su razmere epidemije i zahvataju razvijene i zemlje u razvoju i njihova kombinacija predstavlja jednu od najvećih zdravstvenih pretnji XXI veka. Sa globalnog aspekta kod 90% svih slučajeva dijabetesa u pitanju je DMT2. Osim što učestalost obolenja dramatično raste i starost pacijenata u smislu godine pojave obolenja drastično opada, pa je sve veći broj obolelih među decom i adolescentima u mnogim zemljama (19,20).

Metabolički sindrom (MetS) je složen poremećaj. Predstavlja grupaciju faktora rizika za kardiovaskularne bolesti (KVB) i DMT2. Karakterišu ga različite forme metaboličkih abnormalnosti kao što su: dislipidemija, povišen arterijski krvni pritisak (KP), poremećena homeostaza glukoze, dok su abdominalna gojaznost i/ili insulinska rezistencija (IR) privukle najviše pažnje kao srž manifestacija ovog sindroma. Još uvek postoji debata da li ovaj entitet predstavlja specifičan sindrom ili je surogat kombinovanih faktora rizika koji dovode individuu u određeni rizik od obolevanja. Glavni problem koji nosi razvoj MetS je porast prevalence i u detinjstvu i mladom zrelom dobu, kao i buduće posledice na globalni zdravstveni sistem (21,22).

Prošlo je već oko 85 godina od kada se pojavila prva definicija metaboličkog sindroma. Švedski lekar, Kylin, je 1923. godine opisao grupisanje hipertenzije, hiperglikemije i gihta (23). Godine 1947. u Francuskoj je Vague ukazao da na visok rizik za pojavu bolesti krvnih sudova utiče ne samo količina nego i raspodela masti, te je opisao specifičan fenotip gojaznosti: gojaznost gornjeg dela tela, androidni ili muški tip gojaznosti koji je povezan sa metaboličkim poremećajima, najčešće sa dijabetesom tipa 2 i kardiovaskularnim bolestima (24). Oko 40 godina kasnije, Reaven je 1988. godine istakao klinički značaj sindroma, opisao postojanje grupisanja metaboličkih abnormalnosti sa insulinskom rezistencijom kao centralne patofiziološke osobine i označio ga kao 'Sindrom X' (25). Reaven (26) je naglasio da pod dislipidemijom podrazumeva povišenje nivoa triglicerida i sniženje vrednosti HDL holesterola i smatra da insulinska rezistencija nije

poseban metabolički poremećaj (26). Iznenadujuće je da Reaven nije uključio gojaznost, faktor koji je bio u vezi sa MetS u svim sledećim istraživanjima (25).

Metabolički sindrom ima brojne nazive od kojih su neki: „sindrom vesternizacije“, „smrtonosni kvartet“, „sindrom X“, „metabolički sindrom“ kao i „sindrom insulinske rezistencije“. Svi se slažu da su bolesnici sa tim sindromom veoma ugroženi kada su bolesti srca i krvnih sudova u pitanju (26). Istraživači se nadaju da će termin metabolički sindrom ubuduće biti globalno korišćen. U pokušaju da se postigne dogovor oko definicije i da se obezbedi adekvatno dijagnostičko sredstvo za lekare i istraživače, veliki broj organizacija je formulisao definiciju sindroma. Sve su se slagale oko ključnih komponenti sindroma, glukozne intolerancije, gojaznosti, hipertenzije i dislipidemije, ali su se razlikovale u ostalim detaljima (27).

Do sada se verovalo da je dijabetes zasebno oboljenje, ali u suštini tip 2 dijabetesa i druge kategorije glukozne intolerancije su najčešće samo deo mnogo šireg spektra poremećaja koji su zajedno okarakterisani kao metabolički sindrom (MetS). Ovakav savremeniji pogled na tip 2 dijabetesa ima uticaj i na terapiju bolesti. Prethodno je fokus bio na kontroli nivoa glukoze u krvi, a sada se primenjuje mnogo agresivniji pristup za tretiranje ne samo hiperglikemije, već i ostalih faktora rizika za kardiovaskularne bolesti (KVB) kao što su hipertenzija, dislipidemija i gojaznost sa namerom da se značajno smanji kardiovaskularni morbiditet i mortalitet (28).

Kako se pokazalo da je MetS pokazatelj nastanka KVB i DMT2 i kako gojaznost dobija razmere pandemije savremenog doba sasvim je razumljivo zašto u poslednjih dvadeset godina postoji toliko interesovanje za MetS. Ne postoji jedinstvena definicija MetS sindroma, već postoje različite definicije MetS (Tabela 1). Najčešće korišćene definicije su definicija Američkog udruženja za prevenciju (NCEP-ATP III) iz 2001. godine (29) i Međunarodnog udruženja za dijabetes (IDF) iz iste godine (30). Uzevši u obzir rastuću epidemiju KVB i DMT2 širom sveta, potreba za praktičnom definicijom koja bi identifikovala individue sa MetS postaje imperativ.

Prvi pokušaj opšte definicije metaboličkog sindroma je dala Svetska zdravstvena organizacija (WHO) 1999. godine. Ključno u njihovoj definiciji je bio biološki i fiziološki opis insulinske rezistencije meren euglikemijskom insulinskom klamp metodom. Kritike WHO definicije su ukazale na nekoliko ograničenja od kojih je nabitnije bilo u vezi sa

merenjem insulinske osetljivosti putem euglikemijske insulinske klamp metode i čini definiciju neupotrebljivom u kliničkoj praksi ili epidemiološkim studijama (31). Evropsko udruženje za ispitivanje insulinske rezistencije (EGIR) je razvilo modifikovanu verziju WHO definicije koja bi bila jednostavnija za primenu, jer se oslanja na nivo insulina našte umesto na merenje insulinske rezistencije euglikemijskom insulinskom klamp metodom. EGIR definicija je i dalje zadržala insulinsku rezistenciju kao osnovnu komponentu na bazi ubeđenja da je insulinska rezistencija osnovni uzrok metaboličkog sindroma, ali se ograničila na primenu definicije kod onih kod kojih se insulinska rezistencija može lako i jednostavno izmeriti. Stoga su ljudi oboleli od dijabetesa isključeni iz definicije, jer nefunkcionalnost beta ćelija, karakteristika dijabetesa tipa 2, čini procenu insulinske rezistencije nepouzdanom. Definicija EGIR je takođe uvela i obim struka (94cm za muškarce i 80cm za žene) kao meru gojaznosti i uključila modifikovane granične vrednosti za ostale parametre (32). Američki nacionalni program za prevenciju (NCEP-ATPIII) je dve godine kasnije predstavio svoju definiciju dizajniranu za kliničku primenu. ATPIII definicija nije uključila specifična merenja insulinske osetljivosti i prihvatila je manje glukozno-centrični pristup tretirajući ravnopravno sve uključene parametre. Pre svega zadržala je obim struka kao meru gojaznosti, ali sa višim graničnim vrednostima od EGIR definicije (102cm za muškarce i 88cm za žene). ATPIII definicija je bila popularna zbog svoje jednostavnosti koja se ogledala u rutinskom i lakom merenju parametara prilikom kliničkih i istraživačkih protokola. Za razliku od WHO definicije, ATPIII definicija nije uvrstila inflamatorne i hemostatske varijable kao deo proširenja definicije (33). Modifikacija ATPIII definicije je urađena od strane američkog udruženja endokrinologa (AACE) na temelju stava da je insulinska rezistencija srž sindroma. AACE je definicija navodi četiri faktora kao identifikatore abnormalnosti u okviru metaboličkog sindroma: povišeni trigliceridi, snižen HDL holesterol, povišen krvni pritisak i povišeni nivoi glukoze našte i postprandijalno. AACE je isključila gojaznost kao parametar posmatrajući centralnu gojaznost kao faktor koji doprinosi razvoju insulinske rezistencije pre nego kao njegovu posledicu. Izostavljanje abdominalne gojaznosti kao identifikujućeg parametra sindroma u AACE definiciji je izazvalo mnoštvo kritika, posebno u svetlu rastućih dokaza da je centralna gojaznost ključni faktor rizika za dijabetes tipa 2 i kardiovaskularne bolesti (34).

Tabela 1. Različite definicije metaboličkog sindroma

Faktori rizika	WHO (1998)	EGIR (1999)	NCEP ATP III (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)	AHA/NHLB (2005)
Insulinska rezistencija	Neophodna, uz još 2 navedena faktora	Neophodna, uz još 2 navedena faktora	Nije neophodna. Bilo koja 3 od navedenih 5 faktora	Neophodna, uz 1 od navedenih faktora	Nije neophodna	Nije neophodna. Bilo koja 3 od navedenih 5 faktora
Gojaznost	SKO: ♂ ≥ 0.9 ♀ ≥ 0.85 i/ili ITM > 30kg/m ²	OS: ♂ ≥ 94cm ♀ ≥ 80cm	OS: ♂ ≥ 102cm ♀ ≥ 88cm	ITM ≥ 25kg/m ²	↑ OS i još 2 od navedenih faktora *za evropljane ♂ > 94cm ♀ > 80cm	OS: ♂ ≥ 102cm ♀ ≥ 88cm
Dislipidemija	TG ≥ 1.7mmol/l i/ili HDL: ♂ ≤ 0.9mmol/l ♀ ≤ 1.0mmol/l	TG ≥ 1.7mmol/l i/ili HDL: < 1.0mmol/l za ♂ i ♀	TG ≥ 1.7mmol/l	TG ≥ 1.7mmol/l	TG ≥ 1.7mmol/l ili Th TG	TG ≥ 1.7mmol/l ili Th TG
			HDL: ♂ ≤ 1.04mmol/l ♀ ≤ 1.3mmol/l	HDL: ♂ < 1.04mmol/l ♀ < 1.3mmol/l		
Krvni pritisak	≥ 140/90mmHg	≥ 140/90mmHg ili Th HTA	≥ 130/85mmHg	≥ 135/85mmHg	SKP ≥ 130mmHg ili DKP ≥ 85mmHg ili Th HTA	SKP ≥ 130mmHg ili DKP ≥ 85mmHg ili Th HTA
Glikemija	↑ glikemija ili intolerancija na glukozu ili DM tip 2	↑ glikemija ili intolerancija na glukozu, ali ne i DM tip 2	> 6.1mmol/l uključujući i DM	↑ glikemija ili intolerancija na glukozu, ali ne i DM tip 2	≥ 5.6mmol/l (uključujući DM)	≥ 5.6mmol/l ili Th zbog povećanja glikemije
Drugo	Mikroalbuminurija					

WHO-Svetska zdravstvena organizacija; EGIR-Evropsko udruženje za ispitivanje insulinske rezistencije; NCEP-ATP III- Američki nacionalni program za smanjenje holesterola; AACE-Američko udruženje endokrinologa; IDF-Međunarodno udruženje za dijabetes, AHA/NHLBI-Američko udruženje kardiologa i Nacionalni institut za kardiološke, pulmološke i hematološke bolesti; SKO-struk-kuk odnos; OS-obim struka; ITM-indeks telesne mase; TG-trigliceridi; HDL-lipoproteini velike gustine; HTA-arterijska hipertenzija; Th-terapija; SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; DM- dijabetes melitus; ♂-muški pol; ♀-ženski pol; * granične vrednosti obima struka se razlikuju među različitim rasama

Za ove različite definicije metaboličkog sindroma, granične vrednosti za svaki parametar kao i kombinacije parametara se razlikuju. Na osnovu očigledne konfuzije između grupa stručnjaka koji se bave metaboličkim sindromom nije iznenađujuće što su kliničari zbunjeni. Lekarima su potrebna jednostavna sredstva za procenu rizika pacijenata i za poboljšanje tretmana obolelih. U pogledu jednostavnosti ATPIII definicija je superiorna, jer zahteva samo pristup našte, dok WHO definicija traži oralni test opterećenja glukozom i dodatno precizna merenja insulinske rezistencije euglikemijskom insulinskom klamp metodom. Ovakvi problemi su ohrabрили Međunarodno udruženje za dijabetes (IDF) da predstave novu definiciju u pokušaju prevazilaženja navedenih teškoća (35).

Međunarodno udruženje za dijabetes je prepoznalo centralnu gojaznost kao veoma važnu determinantu metaboličkog sindroma i snažnu povezanost između obima struka, KVB i drugih komponenti metaboličkog sindroma. Konkretno je demonstrirano da je akumulacija visceralnog masnog tkiva određena CT skenerom blisko povezana sa razvojem metaboličkih i KVB. Udruženje je takođe istaklo razvoj kriterijuma za centralnu gojaznost koji bi bio odgovarajući za široku raznovrsnost populacija. Indeks telesne mase (ITM), iako široko upotrebljavan, nema dovoljnu osetljivost da bi detektovao centralnu gojaznost kod različitih etničkih grupa, zbog toga je IDF udruženje preporučilo granične vrednosti za centralnu gojaznost na osnovu obima struka koje su bile različite za različite etničke grupe. Takođe su odlučili da definicija bude manje „glukozno-centrična“, pa IDF definicija ima stavke glukozne intolerancije, ali ne na najvažnijoj poziciji. Osim toga insulinska rezistencija je izostavljena kao komponenta, zbog praktičnih poteškoća da se precizno izmeri, a uključene su druge komponente, kao što su obim struka i trigliceridi, koji su u tesnoj vezi sa insulinskom rezistencijom (27).

Pre par godina postavilo se pitanje o opravdanosti postavljanja dijagnoze MetS. Nekoliko naučnika je odbacilo njegovo postojanje. Tako je Gale (36) , stručnjak za dijabetes i bolesti metabolizma istakao da MetS nema dovoljno jasnu definiciju i klinička obeležja, a nije ni jasno da li njegova prisutnost zaista povećava rizik za KVB i DMT2, jer je njegova definicija zasnovana baš na početnim stadijumima upravo tih oboljenja (36). Prema IDF definiciji u dijagnozu sindroma su uključeni čak i razvijeni slučajevi dijabetesa i KVB, iako je dijagnoza MetS istovremeno i njihov faktor rizika, pa predviđa njihov razvoj (37). Gale (36) takođe ističe da je IR, za koju se smatra da je jedna od osnova MetS, teško

merljiva čak i u kliničkim uslovima, a postoji i pitanje oko njene važnosti u samoj etiologiji sindroma, jer nije uključena u novije definicije sindroma. Isti naučnik smatra da MetS nije primenljiv u kliničkoj praksi, jer čak i postavljanje takve dijagnoze ne utiče na pristup u lečenju pacijenata, a sindrom se retko beleži u svakodnevnoj lekarskoj praksi. Kao zaključak on je izneo da je MetS veštački stvorena dijagnoza sa niskom prognostičkom i terapijskom vrednošću koji je stvorila “farmaceutska industrija” kako bi formirala nova tržišta (36,37).

Kahn i sar. (38) iznose da su uslovi za dijagnozu MetS dvojaki i nepotpuni i da ne postoje jasna objašnjenja za izbor graničnih vrednosti pojedinih parametara za njegovu dijagnozu. Takođe se ne slažu sa uključivanjem dijabetesa u definiciju sindroma, nejasnom etiopatogenezom, nejasnim razlozima za uključivanje jednih, a isključivanje drugih faktora rizika za razvoj KVB, naglašavajući da rizik za razvoj KVB nije veći za MetS u odnosu na rizik koji nose njegovi činioci i da se lečenje sindroma ne razlikuje od lečenja njegovih pojedinačnih činilaca. Zaključno iznose da je medicinsko značenje dijagnoze MetS nejasno i da lekari moraju lečiti sve faktore rizika KVB bez obzira da li je dijagnostifikovan MetS ili ne (38).

Nasuprot ovim stavovima, vodeći stručnjaci koji se bave MetS ističu da se ne može zanemariti činjenica da je grupisanje činilaca, odnosno metaboličkih abnormalnosti u okviru sindroma mnogo jače nego što bi se očekivalo pukom slučajnošću, čime se opravdava potreba za korišćenjem izraza “sindrom”. Iako nije do kraja razjašnjena etiologija MetS, što je takođe slučaj i za npr. DMT2, postoje jasni dokazi o uticaju centralnog tipa gojaznosti, IR i blagih upala na pojavu MetS (35). Nadalje, identifikacija ljudi koji imaju visok rizik za razvoj KVB i dijabetesa korišćenjem IDF definicije je veoma jednostavna kako lekarima tako i pacijentima. Identifikacija osoba sa MetS ima za cilj podsticanje na promene životnog stila čime se istovremeno može uticati na sve negativne metaboličke promene u organizmu, a tako je moguće smanjiti rizik za obolevanje od KVB i DMT2 (39). Usled povećane epidemije KVB i DMT2 širom sveta, potreba za identifikacijom i tretiranjem ljudi obolelih od sindroma postaje od velikog značaja (27).

2.1.1 Epidemiologija metaboličkog sindroma

Veliki značaj i doprinos definisanja sindroma je u tome što je uveo nove faktore rizika, koji nisu razmatrani u računanju dotadašnjeg kardiovaskularnog rizika klasičnim skorom iz Framinghamske studije (40). Cilj Framingham studije je bio da identifikuje uobičajene faktore ili karakteristike koje utiču na razvoj KVB kroz dugoročno praćenje velike grupe osoba koje nisu imale simptome KVB niti infarkt miokarda (IM) ili moždani udar. U istraživanje je bilo uključeno 5209 muškaraca i žena od 30 do 62 godine iz grada Framingham u Massachusetts-u. Praćenjem učesnika studije identifikovani su glavni faktori rizika za KVB: hiperholesterolemija, hipertenzija, dijabetes, fizička neaktivnost i pušenje. Iako su u Framingham studiji većinom učesnici bili belci, rezultati ove studije primenljivi su i na druge rase (41). Gojaznost, nivo triglicerida i glikemije nisu ulazili u njegovo izračunavanje. Prava vrednost dijagnostike metaboličkog sindroma leži u tome što on prepoznaje kao osobe u riziku čak i one koji imaju naizgled fiziološke vrednosti parametara, u gornjim granicama njihovog opsega, ukoliko su u odgovarajućoj kombinaciji sa drugim, slično povišenim vrednostima faktora rizika (27).

Obzirom na nepostojanje jedinstvene definicije metaboličkog sindroma teško je utvrditi stvarnu prevalencu ovog poremećaja. Međutim, bez obzira na korišćeni kriterijum prevalenca MetS je veoma visoka i raste u svim zapadnjačkim društvima kao posledica epidemije gojaznosti. Primenom većine definicija oko 30% ljudi zapadnog društva ima dijagnozu MetS (42). Studije pokazuju da je njegova zastupljenost u populaciji odraslih osoba između 15 i 30% u razvijenim zemljama ili urbanim regionima zemalja u razvoju. Prevalenca je uglavnom nešto veća ukoliko se koristi WHO definicija u odnosu na onu koju nudi NCEP-ATPIII. Iako je AHA/NHBLI definicija veoma slična NCEP-ATPIII, sa spuštanjem dozvoljene granice glikemije prevalenca povišenog nivoa glikemije je porasla čak tri puta. Zemlje u razvoju su suočene sa opterećenjem bolestima kako usled siromaštva, tako i usled porasta životnog standarda (43). Nije isključivo porast životnog standarda faktor rizika za obolevanje od hroničnih bolesti, jer u razvijenim zemljama od njih ipak češće obolevaju siromašni delovi populacije (44,45). Najzaslužnije za porast obolevanja od hroničnih bolesti su promene životnog stila, posebno promene u ishrani (zamena tradicionalnog načina ishrane sa ishranom bogatom mastima životinjskog porekla i ugljenim hidratima, tzv. brza hrana), smanjena fizička aktivnost, pušenje, konzumiranje

alkohola. Ovakav životni stil doprinosi povećanju prevalencije gojaznosti, KVB, hipertenzije, moždanog udara i dijabetesa. Uz epidemiju gojaznosti svakako dolazi i epidemija MetS (46).

Amerika

Porast zastupljenosti MetS je posebno izražen u SAD-u, gdje je u periodu od 1999. godine do 2000. godine prevalencija MetS prema ATP III definiciji u opštoj populaciji osoba starijih od 20 godina porasla sa 24,1% na 27,0%. Najveći porast prevalencije zabeležen je među ženama za 23,5%, dok je među muškarcima porasla za 2,2%. U apsolutnim brojevima 1990. godine u SAD-u je oko 41 milion osoba imalo MetS, dok je 2000. godine taj broj porastao na oko 55 miliona. Takvom porastu je najviše doprineo porast prevalencije gojaznosti centralnog tipa i povišenog krvnog pritiska, a u manjoj meri porast prevalencije hipertrigliceridemije i snižene koncentracije HDL holesterola (47). Prema IDF definiciji, prevalencija MetS u SAD-u je bila i viša. Prevalencija je prema ATP III definiciji između 1999. godine i 2002. godine iznosila 34,6%, dok je prema IDF definiciji iznosila čak 39,1%. Visokim vrednostima doprinosi starenje populacije, ali ono što zabrinjava stručnjake je visoka prevalencija MetS među decom i adolescentima. U periodu od 1988. godine do 1994. godine prevalencija MetS među decom od 12-19 godina iznosila je 4,2% (6,1% među dečacima i 2,1% među devojčicama). Među gojaznom decom prevalencija je iznosila čak 28,7%, među decom sa prekomernom telesnom težinom 6,8%, a kod dece sa normalnom telesnom težinom samo 0,1%. Slični rezultati su dobijeni i u periodu 1999-2002. godine, za gojaznu decu prevalencija je varirala između 12% i 14%. (48, 49, 50).

Evropa

U Evropi su istraživanja sprovedena na različitim regionalnim populacijama i iako su korišćene različite definicije, u odraslim populacijama prevalencija MetS su se kretale između 15% i 25%. (39), U Rusiji prevalencija MetS se među ženama kretala oko 23,1% prema IDF definiciji i 11,0% među muškarcima. Centralna gojaznost je bila zastupljenija kod žena dok su povišen nivo triglicerida i glukoze bili češći među muškarcima (51). Prevalencija sindroma kod muškaraca iz Italije bila je 15%, a kod žena 18% prema ATP III definiciji, dok je u Grčkoj prema IDF definiciji ukupno iznosila 43,3%. U Nemačkoj

prevalenca je bila 23,5% za muškarce i 17,6% za žene prema ATP III definiciji i 31,6% za muškarce i 22,6% za žene prema IDF definiciji (52). U DESIR studiji rađenoj u Francuskoj, kojom je obuhvaćeno više od 130 000 ispitanika starosti između 20 i 74 godine, učestalost metaboličkog sindroma procenjena prema NCEP-ATP III kriterijumima je bila 10% za muškarce i 9% za žene. Korištenjem IDF definicije učestalost je bila 21% za muškarce i 17% za žene, dok je AHA/NHBLI definicija identifikovala 18% muškaraca i 14% žena sa metaboličkim sindromom (53). U Finskoj je prevalenca MetS u populaciji između 45 i 64 godine prema definiciji WHO-a iznosila 38,8% kod muškaraca i 22,2% kod žena. U razdoblju od 1992. godine do 2002. godine prevalenca MetS u populaciji Finske (45-64 godina) porasla je sa 48,8% na 52,6% prema ATP III definiciji i sa 51,4% na 55,6% prema IDF definiciji kod muškaraca, a kod žena sa 32,2% na 39,1% prema ATP III definiciji i sa 38,0% na 45,3% prema IDF definiciji (54). U Holandiji prevalenca prema ATP III definiciji iznosila je 46% u opštoj populaciji. U gradskoj populaciji Portugala uzrasta od 18 do 90 godina prema ATP III definiciji iznosila je 19,1% za muškarce i 27,0% za žene. U Španskoj populaciji uzrasta od 35-64 godine prevalenca MetS iznosila je 22,3% među muškarcima i 30,7% među ženama prema ATP III definiciji i 27,7% među muškarcima i 33,6% među ženama prema IDF definiciji (55). Na Kanarskim ostrvima prevalenca populacije uzrasta preko 30 godina je iznosila 26,5% za muškarce i 17,6% za žene prema definiciji WHO.

Farmaceutska kuća Sanofi-Aventis pokrenula je nedavno istraživanje sa ciljem da se proceni učestalost faktora kardiometaboličkog rizika kod pacijenata u Srbiji (56). Ovo je prva sveobuhvatna studija u Srbiji koja bi trebalo da ustanovi prevalencu metaboličkog sindroma i predstavlja priliku da se ovaj sindrom „raščlani“ na komponente i da se definiše značaj svake od komponenti u kardiovaskularnim bolestima. U studiju je bilo uključeno 2.038 pacijenata, ali su analizirani podaci za 1.715, a obuhvaćeno je 37 odsto muškaraca i 63 odsto žena. Prosečna starost muškaraca u studiji je 58, a žena 59 godina. Prema prosečnom indeksu telesne mase (ITM) od 28,7 kod muške populacije u Srbiji, ne razlikuju se značajno od ljudi iz Zapadne Evrope kojima je ITM 29,3. ITM ženske populacije u Srbiji iznosi 28,5, slično kao u zapadnim zemljama. Zanimljivo je da je kod muške populacije, prosečan obim struka 102 centimetra (kod ljudi iz Zapadne Evrope 105cm), a kod ženske 92cm (Evropljanke 94,7cm). Kriterijum za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma imalo je 65,9 % muškaraca i 66,4 % žena u populaciji Srbije. Odsustvo faktora rizika

zabeleženo je kod svega dva % muške populacije u Srbiji, četiri faktora ima četvrtina, a svih pet faktora prisutno je kod 16 % pripadnika muškog pola. „Nula“ faktora rizika ima svaka dvadeseta žena, ali svaka četvrta ima čak četiri (56). U ispitivanju MetS kod dece u Vojvodini, analizirano je 206 ispitanika. U okviru ispitanika bilo je je 51 dete (25%), uzrasta $7,34 \pm 1,98$ godina, i 155 adolescenata (75%), uzrasta $13,62 \pm 2,08$ godina. U istraživanom uzorku bilo je 104 dečaka (50,5%) i 102 devojčice (49,5%). U odnosu na vrednosti ITM, bilo je 153 gojaznih (74%) i 53 prekomerno uhranjenih ispitanika (26%). Kriterijumi IDF primenjavani su na poduzorku prekomerno uhranjenih i gojaznih adolescenata. Svih 34 adolescenta (100%) sa metaboličkim sindromom imali su obim struka ≥ 90 percentila za pol/godine; vrednost krvnog pritiska $\geq 130/85$ mmHg imalo je 30 adolescenata (88,2%); vrednost HDL holesterola $\leq 1,03$ mmol/L (kod adolescenata uzrasta preko 16 godina primenjeni su kriterijumi za odrasle) imalo je 24 adolescenata (70,6%); povišenu vrednost triglicerida $\geq 1,7$ mmol/L imalo je 18 adolescenata (53%); povišenu vrednost glikemije našte $\geq 5,6$ mmol/L imala su 3 adolescenata (8,82%). Primenom definicije sa specifičnim kriterijumima za decu i adolescente kod 29% ispitivane dece postavljena je dijagnoza metaboličkog sindroma. Po definiciji IDF ne predviđa se postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod dece mlađe od 10 godina i ako se nađu patološke vrednosti nekog od ispitivanih kriterijuma, sprovode se dodatna ispitivanja i procene (57). U uzorku 1270 osoba (reprezentativni uzorak grada Novog Sada), bez obzira na pol, 13,62% osoba jeste rizično za sindrom (sa verovatnoćom 50%), te da je 86,38% bez rizika za MetS (sa verovatnoćom 70%). Među osobama muškog pola, bez obzira na starost, rizik za obolevanje od sindroma je 35% (verovatnoća 50%). Kod osoba ženskog pola rizik za obolevanje od sindroma je 60% (sa verovatnoćom 50%). U odnosu na starosnu dob osoba suspektnih za sindrom ima 5% u grupi 25-34 godine, 13,9% u grupi 35-44 godine, 35,3% starih 45-54 godine i 45,7% u grupi 55-64 godine (58).

Azija

Cameron i sar. (22) su objavili detaljan pregled zastupljenosti metaboličkog sindroma koristeći NCEP-ATPIII definiciju i uočili da starost ispitanika utiče na učestalost metaboličkog sindroma. Tako je u Iranu njegova prevalenca kod osoba starosti između 20 i 29 godina 10%, osoba između 60 i 69 godina 38%, a čak 67% kod starijih od 69 godina

(59). U Koreji je prema IDF definiciji prevalenca sindroma 12,7% za muškarce i čak 28,9% za žene (60). Prevalenca MetS u gradskoj populaciji Omana prema ATP III definiciji je iznosila 21,0% sa višom prevalencom među ženama 23,0%, nego muškarcima 19,5%. (61). Prema ATP III definiciji u severnom delu Jordana prevalenca je iznosila ukupno 36,3%, kod žena 40,9%, a kod muškaraca 28,7%.(62). Prevalenca i u gradskoj i u seoskoj populaciji Palestine prema WHO definiciji iznosila je 17% (60). U Indiji kod stanovnika starijih od 20 godina, prevalenca u okviru gradske populacije, prema ATP III definiciji, iznosila je ukupno 31,6%, odnosno 22,9% za muškarce i 39,9% za žene (63). U Kini je utvrđena prevalenca prema ATP III definiciji 9,8% za muškarce i 17,8% za žene, ali je veći postotak utvrđen kod gradske populacije u odnosu na seosku populaciju. U Pekingu je razlika posebno izražena, i u okviru starije populacije, 60-95 godina, iznosi 46,3% prema IDF definiciji, a 30,5% prema ATP III definiciji. Prema WHO definiciji prevalenca u Japanu je iznosila 7,5% za muškarce i 11,3% za žene prema IDF definiciji (60).

2.1.2 Značaj metaboličkog sindroma

Brojne studije su pokazale da prisustvo MetS povećava rizik za nastanak kako KVB, tako i DMT2. U odnosu na normalnu populaciju, osobe sa metaboličkim sindromom imaju 2-4 puta veći kardiovaskularni rizik (6), kao i 5-9 puta veće šanse da razviju DMT2 (64, 65).

Svi parametri različitih definicija MetS su u vezi sa procenom rizika za KVB i DMT2. Posebno tri komponente aterogenog lipoproteinskog trijasa (\uparrow LDL, \downarrow HDL, \uparrow TG) su pojedinačno povezane sa rizikom od KVB, dok IR značajno povećava rizik za razvoj DMT2, iako oko 25% insulin rezistentnih pacijenata imaju normalnu toleranciju glukoze. Centralna gojaznost je takođe u nekoliko studija pokazala da je u vezi sa povećanim rizikom od KVB i DMT2. Svaki pojedinačni faktor povećava ovaj rizik, ali kada postoji njihov sinergizam taj rizik je još veći (22). Nekoliko epidemioloških studija je potvrdilo povećani rizik od KVB kod individua sa MetS, nezavisno od kriterijuma za dijagnostiku MetS. U nekoliko prospektivnih studija, ustanovljen je ukupno 1,5-3 puta veći rizik od KVB i mortaliteta usled KVB. Nedavna meta-analiza je pokazala da je kod osoba sa MetS dva puta veći rizik od smrtnosti usled KVB i 1,5 put u ukupnom mortalitetu (6,9,51). U

INTERHEART studiji, prvoj multietničkoj internacionalnoj studiji na pacijentima sa KVB, pokazano je da prisustvo MetS više od 2,5 puta povećava rizik od akutnog infarkta miokarda, vodeći se u dijagnostici ili IDF ili WHO definicijom (66,67). Mottillo i sar. (68) su pokazali slične rezultate za KVB vodeći se ovim definicijama. Do sada je potpuno prihvaćeno da je MetS u vezi sa pet puta većim rizikom od DMT2 (64). Lakka i sar. (6) su ustanovili u Finskoj populaciji odnos rizika 4,16 (interval poverenja 95%, 1,60-10,8) za mortalitet od koronarnih bolesti kod osoba sa MetS. U NHANES III studiji (the Third National Health and Nutrition Examination Survey) MetS je takođe imao pozitivnu korelaciju sa smrtnošću usled nefatalnog (odnos rizika, 2,01;95% interval poverenja, 1,53-2,64) i fatalnog infarkta miokarda (odnos rizika 2,16; 95% interval poverenja, 1,48-3,16) (6). Osobe sa MetS u Europa studiji, koja je definisana prema AHA/NHBLI kriterijumima, su imale za 82% veći mortalitet od KVB i za 50% veći rizik za nastanak fatalnog i nefatalnog infarkta miokarda u odnosu na osobe koje nisu imale MetS (69). Istraživanje koje je obuhvatilo 10 592 muškarca srednjih godina iz Francuske i severne Irske je poredilo različite definicije MetS u odnosu na nastanak KVB (70). Odnos rizika (hazard ratio) je bio 1,41; 1,40 i 1,46 redom za IDF, WHO i NCEP definiciju što ukazuje na to da su one podjednako efikasne u određivanju kardiovaskularnog rizika što je dalje autore navelo na zaključak da je metabolički sindrom odličan prediktor nastanka KVB. U DECODE studiji koja je uključila osobe sa niskim kardiovaskularnim rizikom, bez dijabetesa, muškarci sa MetS su imali značajno povećan rizik za KVB, dok kod žena to nije bio slučaj (70). Lee i sar. (71) su u populaciji stanovništva Singapura pokazali da je taj rizik jednako povećan kod oba pola. Povezanost periferne vaskularne bolesti i MetS je takođe dokumentovana. MetS je u ovom istraživanju nađen kod 59,8% od ukupno 388 pacijenata sa perifernom vaskularnom bolešću (73). I drugi parametri prisustva periferne vaskularne bolesti kao što je odnos debljine intime i medije karotidne arterije (intima-media carotid index) su povezani sa MetS (73). Wannamethee i sar. (41) su poredili metabolički sindrom i Framinghamski skor kao prediktore koronarne bolesti, cerebralnog insulta i DMT2. Framinghamski skor se pokazao bolji u predviđanju koronarne bolesti i moždanog udara, dok je MetS bio superiorniji u predviđanju nastanka dijabetesa (41).

2.1.3 Patofiziologija metaboličkog sindroma

Kao glavni činioci MetS smatraju se IR i visceralna gojaznost. Oba stanja su u vezi sa intolerancijom glukoze, dijabetesom, dislipidemijom, hipertenzijom, poremećajima koagulacije i fibrinolize i povišenim inflamatornim markerima, C reaktivnim proteinom (CRP). IR i visceralna gojaznost predstavljaju tzv. "začarani krug" u nastanku MetS.

IR uzrokuju genetički ili stečeni faktori, odnosno njihova kombinacija, i remete bilo koju od stepenica složenog fiziološkog procesa, od trenutka vezivanja insulina za ćelijski receptor. Insulin je najjači anabolički hormon koji reguliše metabolizam šećera, masti, proteina, hormone rasta, diferencijaciju ćelija i endotel krvnih sudova. Usled pojačanih napora β -ćelija pankreasa da prevlada IR u masnom i mišićnom tkivu i održi normalan nivo glikemije nastaje kompenzatorna hiperinsulinemija. Međutim, pojačano lučenje insulina izaziva niz poremećaja u tkivima sa osetljivošću na insulin. U slučaju metabolizma ugljenih hidrata u IR izostaje inhibitorno dejstvo insulina na smanjenje glukoneogeneze u jetri i stimulišući učinak na iskorišćavanje glukoze u mišićima. Prvo se javlja postprandijalna hiperglikemija kao posledica nemogućnosti iskorišćavanja glukoze u mišićima i masnom tkivu. Posle se javlja hiperglikemija našte kao posledica povećane glukoneogeneze u jetri (74).

Što se tiče metabolizma masti, poremećaj nastaje kao posledica rezistencije adipocita na dejstvo insulina. Pri prekomernom unosu masnoća trigliceridi (TG) se talože u adipocitima u kojima je smeštena lipaza osetljiva na insulin, koja je odgovorna za razgradnju TG u slobodne masne kiseline (SMK) i insulin je inhibiše. U IR nema inhibitornog efekta insulina na lipazu i TG se razgrađuju, a SMK otpuštaju u krvotok i deluju suprotno od insulina na nivou tkiva, inhibišući unos glukoze u mišiće i stimulišući glukoneogenezu u jetri. Povišen nivo SMK, uz povišen nivo insulina u plazmi, u jetri stimuliše sintezu i sekreciju TG i lipoproteina vrlo male gustine VLDL, kao i lipogenezu, tako što se povećava sinteza SMK iz glukoze. Porastom TG u cirkulaciji snižava se nivo lipoproteina velike gustine (HDL) i javljaju čestice lipoproteina male gustine (LDL). Pri spajanju VLDL sa HDL holesterol ester transfer proteinom (CETP) posreduje se prelaz esterifikovanog holesterola iz srži HDL-a u VLDL i prelaz TG iz VLDL u HDL. Tako se snižava nivo HDL-a koji više ne sadrži esterifikovani holesterol, a VLDL se obogaćuje proaterogenom komponentom holesterola. Pri spajanju VLDL sa LDL, CETP posreduje

prenos TG u LDL koje zatim razgrađuju jetrena ili lipoproteinska lipaza, pa se LDL čestice smanjuju zadržavajući apolipoprotein B (ApoB), i nastaju manje LDL čestice koje su podložne oksidaciji i lako prodiru kroz intimu krvnih sudova na čemu se zasniva njihovo snažno aterogeno dejstvo. Na taj način nastaje aterogeni lipoproteinski trijas: porast TG, snižavanje HDL-a i porast LDL-a. Povišen nivo masti doprinosi IR i na nivou adipocita, gde povećanjem obima masnih ćelija dolazi do smanjenja njihove sposobnosti da skladište lipide te se oni odlažu u mišićima i jetri, β -ćelijama pankreasa i visceralnom masnom tkivu čime doprinose IR u tim organima. Smatra se da SMK ne remete samo delovanje već i sekreciju insulina uzrokujući apoptozu β -ćelija pankreasa (74,75). Povećana koncentracija LDL, iako ne ulazi u kriterijume za metabolički sindrom, predstavlja još jedan bitan činilac dislipidemije u ovom sindromu. De Graaf i sar. (76) su pokazali da osobe sa nivoom TG većim od 2mmol/l najčešće istovremeno imaju i povišen nivo LDL. Ovo povećanje se može objasniti smanjenjem neestriфикovanog i esterifikovanog holesterola i fosfolipida, a povećanom koncentracijom triglicerida. Lipoproteini male gustine su aterogeni iz više razloga: toksični su za endotel, jednostavno prolaze kroz bazalnu membranu endotela, adherišu brzo za glikozaminoglikane, lako se oksiduju i vezuju za makrofage. Neke studije su pokazale da je visok LDL nezavisan rizikofaktor kardiovaskularnih bolesti, ali je ipak mnogo više onih koji smatraju da su KVB posledica sadejstva više faktora (30).

Osnovna uloga masnog tkiva je da deponuje molekule koji sadrže najviše energije u organizmu, masne kiseline i trigliceride. Međutim, ako se premaši kapacitet skladištenja adipocita, trigliceridi se deponuju u jetri, skeletnim mišićima ili u visceralnom masnom tkivu, što za posledicu ima nastanak insulinske rezistencije u ovim organima. Visceralna gojaznost se najčešće meri obimom struka i odnosom struk-kuk i odlično korelira sa insulinskom rezistencijom. Međutim nije svejedno da li do nakupljanja masnih naslaga dolazi u potkožnom masnom tkivu ili oko visceralnih organa. Razlika se može uočiti uz pomoć kompjuterizovane tomografije ili magnetne rezonance. Dokazano je da povećanje visceralnih masnih depoa dovodi do većeg oslobađanja masnih kiselina direktno u portni krvotok, dok potkožne masne naslage oslobađaju masne kiseline isključivo u sistemski krvotok zaobilazeći pritom metabolizam jetre (stvaranje glukoze i lipida, kao i sekreciju protrombogenih proteina kao što su fibrinogen i inhibitora plazminogena) (77). Visceralno masno tkivo je za razliku od potkožnog metabolički aktivan organ. Ono luči različite

adipocitokine, njihova sekrecija je značajno poremećena kod gojaznih osoba zato što dolazi do porasta lučenja leptina, faktora tumorske nekroze- α (TNF- α), interleukina-6 (IL-6), angiotenzina II, neesterifikovanih masnih kiselina (NEMK) i inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI-1). Adiponektin, veoma važan adipocitokin koji štiti od razvoja DM2, hipertenzije, zapaljenja i aterosklerotskih vaskularnih oboljenja je snižen kod individua sa visceralnim nagomilavanjem masti i to može biti uzročno povezano sa MetS. Novootkriveni adipocitokini kao što je visfatin, razni enzimi u masnom tkivu kao neprilisin, faktori rasta npr. fibroblast 21, važni regulatori glukoznog i lipidnog metabolizma se trenutno ispituju u vezi sa njihovom ulogom u patogenezi MetS. Ostale supstance koje otpušta masno tkivo, a za koje se smatra da imaju ulogu u patogenezi MetS, su neesterifikovane slobodne masne kiseline (SMK). U insulinskoj rezistenciji dolazi do ubrzanog oslobađanja SMK iz TG masnog tkiva. U jetri SMK rezultuju povećanom produkcijom glukoze i TG i sekrecijom VLDL, održavajući na taj način „začarani krug“. SMK takođe snižavaju insulinsku rezistenciju u mišićima inhibišući insulin posredovani unos glukoze i povećavajući produkciju PAI-1 i fibrinogena (78).

2.2 Genetičke determinante MetS

Kao što je navedeno MetS predstavlja multikomponentno stanje metabolizma koje uključuje centralnu gojaznost, dislipidemiju, hipertenziju i hiperglikemiju. Centralno pitanje u razumevanju MetS je zašto se ovi činioci grupišu zajedno čineći MetS. Grupisanje se može objasniti kompleksnom fiziološkom kaskadom događaja u kojima pojava jednog činioca izaziva pojavu sledećeg. Alternativno, uzročni faktor zajednički za nekoliko činilaca bi mogao objasniti specifično grupisanje. Ovaj faktor bi mogao biti ili genetičke prirode ili uticaj spoljašnje sredine (79).

Predložene su dve hipoteze koje objašnjavaju interindividualne varijacije podložnosti MetS i varijacijama u okviru fenotipova povezanih sa sindromom. Prema hipotezi štedljivog genotipa (engl. thrifty genotype hypothesis), od strane Neel-a iz 1962. godine, (80) individue koje žive u teškim uslovima sa nestalnim zalihama hrane mogli bi da povećaju svoju šansu za preživljavanje ukoliko bi skladištili višak energije. Tako bi prirodna selekcija favorizovala genotipove koji štede energiju u takvim uslovima. Međutim, izabrane genetičke varijacije favorizovane za vreme pothranjenosti bi postale nepoželjne kada bi se ishrana poboljšala. Podrška ovoj hipotezi je prikazana u studiji na gojaznim

miševima i miševima obolelim od dijabetesa u kojoj heterozigotne životinje iste telesne težine kao i divlji tip preživljavaju duže za vreme potpunog gladovanja nego insulin senzitivni divlji tip miševa (samo kod homozigotnih životinja će se razviti gojaznost ili dijabetes). Hipoteza pretpostavlja da najčešće genetičke varijante „štedljivih gena“ (thrifty genes) predstavljaju sklonost ka MetS (80). Hipoteza štedljivog fenotipa (thrifty phenotype hypothesis) prema Hales i Barker-u iz 1992. godine (81) govori da bebe koje su preživele intrauterinu pothranjenost su adaptirane na slabu ishranu redukujući potrošnju energije i postajući štedljive. Ovakve metaboličke adaptacije su korisne kada su individue pothranjene u detinjstvu i odraslom dobu, međutim sa povećanjem unosa hrane ovakve adaptacije više nisu korisne i vode ka povećanom riziku od MetS u kasnijem životnom dobu. Podrška ovoj hipotezi proizilazi iz utvrđene veze između niske porođajne težine i kasnijeg razvoja IR i DMT2 u nekoliko ispitivanih populacija (81).

Na temelju hipoteze „štedljivog genotipa“, geni uključeni u efikasno skladištenje energije unutar ćelija masnog tkiva, bi mogli povećati sklonost ka MetS. Nekoliko potencijalnih gena kandidata su predloženi na osnovu svog biološkog značaja, kao što su geni uključeni u sistem balansa energije, raspodele hranljivih materija, lipidnog i insulinskog metabolizma, lipolize, termogeneze, preuzimanja glukoze u skeletnim mišićima, inflamacije (82).

Postoje brojna istraživanja koja su se bavila genetikom MetS i zajedno pokazuju da je MetS poligeniska i multifaktorijalna bolest uslovljena međusobnim delovanjem brojnih gena i faktora sredine. Danas se intenzivno traga za genima koji povećavaju rizik za nastanak MetS. Identifikacija gena povezanih sa patogenezom bolesti se zasniva na tri komplementarna pristupa: studije na životinjama, identifikacija humanog kandidat gena i skeniranje humanog genoma praćeno pozicionim kloniranjem. Identifikovane su brojne regije genoma i geni kandidati koji pokazuju povezanost sa pojedinim činiocima MetS i sa samim sindromom. Područja genoma koja su odgovorna ili povezana sa mehanizmom nastanka MetS uključuju sledeće hromosome: 1, 2, 3, 4, 12, 14, 15, 17, 18 i 19. Geni kandidati povezani sa MetS (Tabela 2) su geni uključeni u razvoj gojaznosti, regulaciju metabolizma SMK, geni sa uticajem na insulinsku senzitivnost, geni sa uticajem na metabolizam lipida, geni povezani sa inflamacijom (79).

Tabela 2. Geni povezani sa metaboličkim sindromom

Fenotip	Geni koji kodiraju:
GOJAZNOST	Leptin, leptin receptor, melanokortin receptor, pro-opiomelanokortin
REGULACIJA METABOLIZMA SLOBODNIH MASNIH KISELINA	Adiponektin, β -adrenergički receptori, lipaze, protein za vezivanje masnih kiselina-2
UTICAJ NA INSULINSKU SENZITIVNOST	Peroksizom proliferator-aktivirani receptor γ , glikoprotein PC-I, supstrate insulinskih receptora, glikogen sintetazu skeletnih mišića I, kalpain-10
UTICAJ NA METABOLIZAM LIPIDA	CD36, Apolipoprotein E , 11 β -Hidroksisteroid dehidrogenaza tip I, uzvodni transkripcioni faktor I, lipoproteinske receptore (LRP1)
INFLAMACIJA	Tumor nekroza faktor- α , C reaktivni protein

Prema Song i sar. (83) etničke varijacije u prevalenci MetS snažno ukazuju na genetičku komponentu u patogenezi MetS. Akumulirani dokazi sugerišu da je MetS najverovatnije rezultat uzajamnog dejstva nekoliko gena i spoljašnje sredine. Iako procena heritabilnosti za MetS još nije urađena, jasno je da su sve komponente sindroma nasledne. Brojne blizanačke i porodične studije su pokazale značajan genetički doprinos hipertenziji. Procenjena heritabilnost varira od 22% do 62% za sistolni krvni pritisak (SKP) i od 38-63% za dijastolni krvni pritisak (DKP). Doprinos genetike u razvoju dijabetesa je demonstriran visokom učestalošću dijabetesa među rođacima prvog stepena pacijenata sa DMT2 i visokim podudaranjem kod identičnih blizanaca. Procenjeno je da ukoliko jedan od monozigotnih blizanaca ima dijabetes, verovatnoća za pojavu bolesti kod drugog je 50%; kod dizigotnih blizanaca verovatnoća je procenjena na 37%. Porodične agregacione studije su pokazale da 45% rođaka prvog stepena pacijenata sa DMT2 ima IR u poređenju sa 20% individua bez porodične istorije dijabetesa. Za gojaznost je utvrđena veoma snažna veza među parovima biološki roditelj-dete i među blizancima u pogledu ITM. Procenjuje se da genetički faktori objašnjavaju 40% varijanse u pogledu mase telesne masti i do 70% varijanse centralne gojaznosti. Dodatno, vrednosti konkordanse u stopama glukozne intolerancije, prekomerne gojaznosti i niskog HDL holesterola su značajno više kod monozigotnih u odnosu na dizigotne blizance (83).

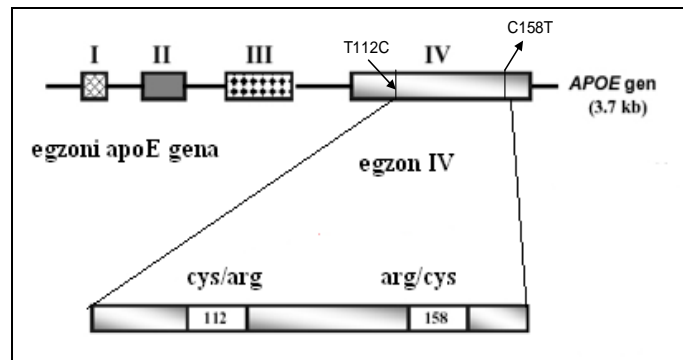
Porodične i blizanačke studije ukazuju da različite karakteristike MetS imaju zajedničke genetičke komponente. Blizanačke studije su pokazale da je povezanost među karakteristikama MetS viša kod monozigotnih nego dizigotnih blizanaca. Porodične studije

takođe pokazuju značajne genetičke korelacije među različitim karakteristikama MetS. Poremećaj metabolizma lipida ili glukoze može dovesti do razvoja jedne ili više karakteristika sindroma, tako da geni uključeni u ove puteve su potencijalno plejotropni za multiple karakteristike sindroma (83,84). Na osnovu iznetog jasno je da treba uložiti velike napore za detekciju, prevenciju i terapiju MetS.

Mnogobrojne studije o uticaju apoE genotipa na bolesti srca ukazuju na značaj definisanja apoE genotipa. Prema dosadašnjim istraživanjima i rezultatima u vezi sa apoE polimorfizmom i MetS jasno je da je e4 alel značajno povezan sa pojavom MetS, kao i da polimorfizam u okviru apoE gena predstavlja centralni faktor rizika za MetS, na osnovu svoje uloge u metabolizmu lipida i lipoproteina. Navedene činjenice ističu da je u toku dijagnostičkih procedura neophodno uvesti genotipizaciju i fenotipizaciju u kliničkoj laboratoriji (85,86).

2.2.1. Polimorfizam apoE gena

Humani apoE gen je dužine 3,7kb, sastoji se od četiri egzona i tri introna i lociran je na hromozomu 19q13.2. Pripada familiji gena koja obuhvata još dva strukturna gena apoC-I i apoC-II i jedan pseudogen apoC-I'. Do danas su detektovana tri alela u okviru ovog gena (e2,e3,e4) koja kodiraju tri izoforme apolipoproteina E u plazmi E2, E3 i E4, kao i nekoliko retkih varijanti sekvence ovog gena, koje se razlikuju prema afinitetu vezivanja za apo-B/E receptor. Ova tri alela definišu šest mogućih genotipova u humanoju populaciji. Postojeća genetička varijabilnost rezultuje cistein-arginin izmenama na dve pozicije 112 i 158 u okviru aminokiselinske sekvence proteina ApoE. Pokazano je da su ove izmene posledica baznih supstitucija u okviru četvrtog egzona apoE gena. Alel e3 predstavlja najčešći alel humane populacije i kodira izoformu koja se karakteriše cisteinom na poziciji 112 (112cys) i argininom na poziciji 158 (158arg) (SI.1). Ova izoforma ApoE praćena je povišenim nivoom ukupnog holesterola i betalipoproteina. Izoforma E2 apolipoproteina E (112cys i 158cys) je u korelaciji sa smanjenim afinitetom vezivanja za ćelijske receptore i sa sniženim nivoom holesterola i betalipoproteina. Alel e4 karakteriše kombinacija 112arg i 158arg i prisustvo ovog alela u genotipu je u korelaciji sa povećanim koncentracijama LDL holesterola u serumu (86,87).



Slika 1. Struktura apoE gena

Pored uloge u transportu holesterola i metabolizmu lipoproteinskih čestica apoE ima i ulogu u imunoregulaciji, regeneraciji nerava i aktivaciji nekih lipolitičkih enzima kao što su heparin lipaza, lipoprotein lipaza i lecitin holesterol aciltransferaza. Naime pored dokazanih asocijacija e4 alela sa koronarnom bolešću srca, metaboličkim sindromom, gojaznošću, nađena je i veza sa vezivanjem tireoidnog hormona (86,88). Pokazana je i inhibicija rasta neurona u prisustvu alela e4. Jedan od najznačajnijih i najpoznatijih rezultata jeste asocijacija e4 alela i nastanka Alchajmerove bolesti (89). Dokazana je i veza polimorfizma apoE sa ishodom lečenja hroničnog hepatitisa B i ubrzane progresije HIV-a (90,91). Takođe je dokazana i značajna progresija smanjenja kognitivne sposobnosti kod ljudi obolelih od Alchajmerove koji su nosioci e4 alela (92).

2.2.1.1. Populaciono-genetičke studije varijabilnosti apoE gena

Postoji različit stepen varijabilnosti apoE gena između različitih etničkih grupa. Alel e3 je najfrekventniji, zastupljen od 50-90%, dok e2 alel ima najnižu zastupljenost 0-15%, a u nekim starosedelačkim populacijama potpuno odsustvuje. E4 alelna varijanta se pojavljuje u frekvencijama od 5-30% (93).

U Evropi e4 alel ima niže frekvencije u južnim nego u severnim zemljama, uz neprekidni porast od juga ka severu. Geografski pad frekvencije e4 alela od ~20% u Finskoj do ~8% u Italiji i Grčkoj najverovatnije doprinosi severno-južnom smanjenju prevalencije kardiovaskularnih bolesti. Dodatno, e4 ima tendenciju opadanja u istočnoj Evropi. Na primer ~11% poljske populacije nosi e4 alel, dok je u Nemačkoj i Holandiji učestalost ~14-15% (93). U zdravoj populaciji Srbije e3 alel ima učestalost od 73,6%, e2 14,9% i e4 11,5% (94). Međutim, razlike u frekvenciji e4 alela postoje i unutar populacija u zavisnosti od

etničke pripadnosti i geografskog položaja. Na primer 8,5% individua u centralnoj Italiji su nosioci e4 alela, dok je u južnoj Italiji zastupljenost malo niža i iznosi 8,3%, dok je na Sardiniji, ostrvu udaljenom oko 250km zapadno od italijanskog kopna, zastupljenost svega 5,3%. Najviše frekvencije e4 alela su utvrđene u domorodačkim populacijama i populacijama sa lovačko-sakupljačkim načinom života u skorijoj prošlosti, dok dugogodišnje poljoprivredne zajednice (kao što su: na Srednjem istoku, južnoj Evropi, jugoistočnoj Aziji, centralnoj Americi) pokazuju najniže frekvencije. Oko 37% starosedalaca Afrikanaca koji žive u južnoj Africi su nosioci e4 alela. Najviše frekvencije e4 alela među populacijama severne Evrope i Severne Amerike su ustanovljene kod starosedelaca sa istočnog dela Grenlanda sa vrednostima ~23%. Proporcija e4 alela ustanovljena kod Aboridžina iznosi 26% i dva puta je veća nego kod Australijanaca evropskog porekla 11% (93). Aceves i sar. (95) su utvrdili heterogenost e4 frekvencije kod Meksikanaca u zavisnosti od stepena urbanizacije i udela „evropskih“ gena, posebno od strane španskih kolonizatora. U Gvadalahari sa relativno visokim brojem stanovnika španskog porekla e4 frekvencija je najniža 8,4% i raste ka susednoj državi Najarit, dosežući svoju najvišu frekvenciju od 28% kod Huihol Indijanaca, starosedelačke meksičke populacije (95).

Na globalnom nivou, više frekvencije e2 alela su uočene u Africi i Okeaniji (0,099 i 0,083 za Afriku i 0,111 i 0,052 za Okeaniju). Slično proseka e4 alela je bio viši u Okeaniji (0,221 i 0,149) i Africi (0,209 i 0,90), dok je u indijskoj i azijskoj populaciji najveću zastupljenost imao e3 alel. Najviši koeficijent genetičke varijacije je utvrđen u Severnoj Americi (9,6%), iako je najviši genetički diverzitet utvrđen u Okeaniji (48,7%) i Africi (46,3%). ApoE e2 poseduje statistički značajan pad frekvencije prema severu Azije što nije u saglasnosti sa statistikom kardiovaskularnih bolesti na ovom kontinentu.

2.2.1.2. Značaj polimorfizma apoE u metabolizmu lipida

Apolipoprotein E u humanoj plazmi ima dužinu 299 aminokiselina i $M_r=34200$ Da i sastoji se od jednog polipeptidnog lanca. U plazmi ApoE čini strukturnu komponentu VLDL, hilomikrona, hilomikronskih ostataka i HDL-a. ApoE predstavlja normalan konstituent lipoproteina bogatih trigliceridima (TRL) i HDL čestica, gde ima funkciju liganda u procesu vezivanja za lipoproteinske receptore. Takođe, ima ključnu ulogu u transportu i redistribuciji lipida između lipoproteina. Zahvaljujući svojoj mogućnosti

vezivanja za LDL, ApoB i ApoE receptor, ima važnu ulogu u određivanju katabolizma ovih lipoproteina. Zbog kompleksnosti strukture i funkcije ApoE, mutacije i polimorfizmi apoE gena imaju izuzetno snažan uticaj na proteinsku funkciju. Različite ApoE izoforme interaguju na različit način sa specifičnim lipoproteinskim receptorima, gde je krajnji ishod promena nivoa TG i holesterola u plazmi (85). Brojne populacione studije dokazale su efekat apoE gena na koncentraciju lipida u plazmi. Prosečan doprinos e4 alela u značajnom povećanju koncentracije ukupnog holesterola je dokazan, te se ovaj alel smatra za predisponirajući alel ateroskleroze. Suprotno njemu, prosečan efekat e2 alela jeste niža koncentracija ukupnog holesterola i to dva do tri puta u odnosu na koncentraciju u prisustvu e4 alela (86). Nosioci e2 alela su manje efikasni u produkciji i transferu VLDL i hilomikrona iz plazme u jetru zbog različitih vezujućih svojstava E2 izoforme proteina. Nasuprot njima nosioci e3 i e4 alela imaju značajno veću efikasnost tokom ovih procesa. ApoE4 i E3 se vezuju skoro jednakim afinitetom za lipoproteinske receptore, dok se E2 vezuje sa manje od 2% svoje snage. Tako u poređenju e3 ili e4 nosilaca, e2 nosioci imaju sporiji proces uklanjanja lipida iz plazme. Razlika u preuzimanju postprandijalnih lipoproteinskih partikula rezultuje razlikama u regulisanju hepatičkih LDL receptora, što za uzvrat doprinosi razlikama u nivou ukupnog i LDL holesterola (85,86). Brojne populacione analize koje opisuju ulogu apoE polimorfizma na varijacije nivoa lipida u plazmi su ustanovile različite efekte za specifične izoforme ApoE. Ustanovljeno je da e3 alel doprinosi veoma malo nivou lipida, što se tiče varijacija, te se on uzima kao "normalan", reper. Nasuprot e2 i e4, ili E2 i E4 izoforme, imaju definitivan uticaj, nekada i dramatičan, na nivoe lipida i lipoproteina. ApoE2 teži ka vezi sa povišenim nivoima ApoE i TG i sniženim nivoima ApoB i holesterola. Uticaj ApoE2 i ApoE4 na lipidne varijacije u populaciji je direktna posledica njihovih funkcionalnih razlika od ApoE3. Procenjeno je da genetički polimorfizam apoE gena objašnjava 14-18% varijabilnosti koncentracije holesterola u plazmi (95).

Važno polje istraživanja metabolizma lipoproteina je određivanje doprinosa svakog ApoE receptora u odstranjivanju lipoproteina koji sadrže ApoE, kao i efekta polimorfizma apoE na ovaj fenomen *in vivo*. Struktura apoE izoformi možda može da objasni razlike u afinitetu ovog apolipoproteina za njegove različite receptore u fiziološkim i patološkim stanjima (96).

2.2.1.3. Povezanost apoE alelnih varijanti i metaboličkog sindroma

Na osnovu važne uloge ApoE u lipidnom i lipoproteinskom metabolizmu, sigurno je da polimorfizam apoE gena može služiti kao potencijalna determinanta MetS.

Značajan broj autora utvrdio je vezu između apoE gena i MetS (84,85,77,78,79,80,81,82,83). ApoE gen se ubraja u genetičke faktore za pojavu MetS jer kodira apolipoproteinE koji ima veoma važnu ulogu u metabolizmu lipida. Dislipidemija predstavlja značajni činilac MetS.

Tao i sar. (97) su ustanovili da je e4 alel značajno povezan sa prevalencom MetS prema NCEP i IDF definiciji. ApoE izoforme pokazuju različite biološke aktivnosti kroz svoje interakcije sa lipoproteinskim receptorima sa krajnjim ishodom na koncentracije holesterola u plazmi. ApoE e4 je povezan sa višim, a e2 sa nižim nivoima ukupnog holesterola i LDL u poređenju sa e3 formom. Kod muškaraca je utvrđeno i da je nivo TG bio viši među ispitanicima sa e2 i e4 alelom, a HDL niži u grupi sa e4 alelom u odnosu na kontrolu. Rezultati ukazuju da nosioci e4 alela, posebno muškarci, imaju veću verovatnoću za obolevanje od MetS prema NCEP kriterijumu. Tao i sar. (97) smatraju da apoE polimorfizam ima pojedinačan uticaj na komponente MetS i u svojoj studiji pokazuju značajnu vezu između e2 alela i hipertrigliceridemije i kod muškaraca i kod žena. U nekoliko narednih studija utvrđeno je da je e4 alel u vezi sa prevalencom MetS i nosioci e4 alela su imali viši krvni pritisak po NCETP kriterijumu (97). U nedavnoj studiji mlađe indijske populacije sa akutnim infarktom miokarda nisu pronađene veze između apoE polimorfizma i MetS. Međutim, manja studija na populaciji Indijaca takođe potvrđuje češću pojavu dislipidemije i MetS kod e4 nosilaca u odnosu na kontrolne subjekte (98). Meta-analiza 19 studija sa 9751 subjektom pokazala je da e3e4 nosioci imaju niže nivoe HDL holesterola nego e3e3 nosioci (99). Većina studija je pokazala pozitivnu vezu e4 forme i telesne težine (84). Arbones-Mainar i sar. (100) su pokazali da su miševi nosioci e3 u poređenju sa e4 nosiocima hranjeni „zapadnjačkom ishranom“ (brza hrana bogata mastima i ugljenim hidratima) bili više skloni ka razvoju nekoliko karakteristika MetS, kao što je povišena insulinska rezistencija, smanjena intolerancija masti i povećanje veličine masnih ćelija. Navedeni rezultati ukazuju da pozitivna veza između e4 alela i centralne gojaznosti može biti posledica razvoja drugih karakteristika MetS, kao što je insulinska rezistencija. Dodatno, dati rezultati sugerišu da e4 izoforma može biti u vezi sa MetS, što je već

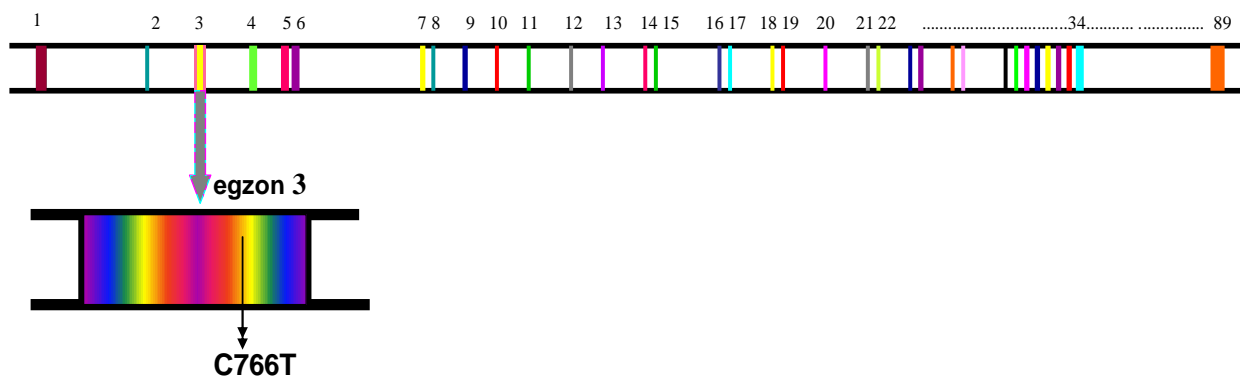
prikazano u drugim epidemiološkim studijama (100). Podaci iz ARIC studije (Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study) koja uključuje 15 000 subjekata prikazuje da su ApoE izoforme kod ljudi povezane sa ITM u sledećem redosledu ApoE4<ApoE3<ApoE2 (101). Međutim, Oh i sar. (102) ukazuju da kod starijih žena sa familijarnim opterećenjem dijabetesom, apo e4/4 i apo e3/4 genotipovi imaju veze sa povišenim obimom struka i gojaznošću (102). Slično, u epidemiološkoj studiji u populaciji Rumuna, zdrave kontrolne individue u poređenju sa gojaznim subjektima obolelim od MetS, imaju nižu frekvenciju e4 alela (88). Olivieri i sar. (103) su takođe utvrdili razliku u zastupljenosti apoE genotipova kod osoba sa MetS i e4 alel je bio značajno povezan sa pojavom MetS. Pojedinačnim analizama povezanosti apoE genotipova sa 5 karakteristika MetS, nosioci e4 alela su bili zastupljeniji u grupi ispitanika sa hipertenzijom, dok za gojaznost, nivo glukoze i TG nije nađena značajna veza (103). Sima i sar. (85) su utvrdili da je učestalost e4 alela viša u grupi sa MetS u odnosu na kontrolu i da apo e3e4 genotip pozitivno korelira sa visokim nivoima TG, glukoze, ITM, a negativno sa HDL vrednostima. Frekvencija apo e3/2 je bila viša kod zdravih subjekata i u vezi sa normalnim nivoima holesterola TG, LDL-a i glukoze. Oni ističu da značajne razlike u apoE alelnim frekvencijama zdravih subjekata i pacijenata sa MetS dokazuju da se apoE polimorfizam može smatrati glavnim, nezavisnim faktorom rizika za MetS (85).

Već dugo je poznato ateroprotektivno dejstvo ApoE zbog svoje sposobnosti da pospešuje uklanjanje aterogenih lipoproteina iz cirkulacije i formaciju HDL partikula koje sadrže ApoE. Međutim skorašnji rezultati koji se tiču ApoE i gojaznosti pokazuju da ukoliko postoji suvišak unetih lipida ovakvo ateroprotektivno dejstvo može delovati suprotno, povećavajući taloženje unetih lipida u masno tkivo, što je rezultat prisustva ApoE prepoznajućih receptora na površini adipocita. U suštini skorašnja saznanja identifikuju apoE ekspresiju kao ključni periferni doprinos razvoju gojaznosti i povezanim metaboličkim disfunkcijama (88).

2.2.2. Polimorfizam LRP1 gena

LRP1 gen je lociran na hromozomu 12q13-14 i sastoji se od 89 egzona (Sl.2), kodira protein koji se eksprimira u mnogim tkivima i organima, uključujući jetru, pluća,

mozak i razne ćelijske tipove, kao što su hepatociti, fibroblasti, glatke mišićne ćelije, neuroni i makrofazi (13). Analiza sekvence ovog gena utvrdila je prisustvo nekoliko polimorfizama. Utvrđeno je postojanje mutacije koja ne menja sekvencu aminokiselina u proteinu u okviru egzona 3 LRP1 gena i koja doprinosi nastanku Alchajmerove bolesti, cerebralne amiloidne angiopatije (14), povišenog nivoa FVIII u plazmi i rizika od venskog tromboembolizma (15), utiče na ekspresiju markera za diferencijaciju adipocita i održavanje nivoa lipida unutar zrelih adipocita, a ima i ključnu ulogu u metabolizmu lipida (16). Pomenuti polimorfizam CT lokalizovan u egzonu 3 LRP1 gena i nalazi se na poziciji 766 (14). Po prvi put Masson i sar. (16) navode da je LRP1 ekspresija pod kontrolom pozitivne povratne sprege u humanom masnom tkivu i sugerišu da pomenuti receptor može biti važna meta individualne terapije gojaznosti.



Slika 2. Struktura LRP1 gena

LRP1 ima ključnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima. Putem regulacije ekstracelularne proteolitičke aktivnosti ima značajnu ulogu u regulaciji ćelijskog rasta, migraciji ćelija, remodeliranju i regeneraciji tkiva, ali i progresiji i invaziji tumora (104, 105). Zahvaljujući ulozi u pomenutim procesima istražena je asocijacija LRP1 gena i različitih patoloških stanja.

Masson i sar. (16) su utvrdili da je LRP1 ekspresija neophodna za diferencijaciju adipocita. Utišavanje LRP1 u preadipocitima pomoću malih interferirajućih RNK (siRNA) značajno inhibiše ekspresiju PPR γ , HSL i aP2 adipocitnih markera diferencijacije i dovodi do lipidno osiromašenih ćelija nesposobnih da podstaknu lipolizu. Masson i sar. (16) su

potvrdili ključnu ulogu LRP1 u održavanju lipidnog nivoa u zrelih adipocitima. Do sada tačna uloga LRP1 gena u gojaznosti ljudi još uvek nije utvrđena.

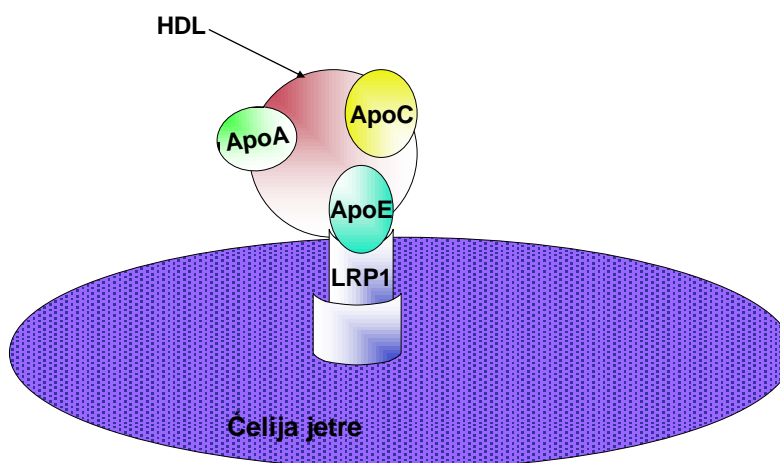
LRP1 je veoma važan za kontrolu proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i zaštitu od ateroskleroze, što je dokumentovano činjenicom da su LRP1 deficijentni miševi (knock-out) pokazali povišenu osetljivost za razvoj aterosklerotskih lezija (106). LRP1 deficijentni miševi hranjeni visokim sadržajem holesterola u ishrani razvijaju masivne formacije penastih ćelija na zidu arterija dovodeći do potpune okluzije lumena aorte i mezenteričkih arterija, a tako i smrti životinja zbog progresivne masivne obstrukcije krvnih sudova. Mehanizam putem kog LRP1 štiti od aterosklerotskih lezija je posredovan putem kontrole bar dva različita signalna puta u kontroli proliferacije glatkih mišićnih ćelija od strane receptora: trombocitnog faktora rasta BB, PDGF-BB (engl. platelet derived growth factor BB) i transformišućeg faktora rasta β , TGF β (engl. transforming growth factor β) signalnih puteva koji zajedno imaju glavnu ulogu u toku ateroskleroze. Hiperplazija glatkih mišićnih ćelija aorte povezana sa nedostatkom LRP1 je udružena sa značajno povećanom ekspresijom PDGF-BB i TGF β . Dakle LRP1 funkcioniše kao fiziološki integrator ćelijske lipidne homeostaze putem signala koji regulišu ćelijsku proliferaciju i integritet vaskularnog zida. Lenting i sar. (107) i Saenko i sar. (108) su pokazali da LRP1 ima bitnu ulogu u uklanjanju faktora koagulacije VIII iz cirkulacije, regulišući na taj način njegove nivoe u plazmi. Neels i sar. (109) su potvrdili potencijalni doprinos LRP1 u regulaciji koagulacione kaskade kroz interakciju sa faktorom VIII.

Pored svog velikog doprinosa zaštiti od ateroskleroze, skorašnja istraživanja su takođe pokazala i ulogu LRP1 i jednog od njegovih liganada, aktivatora plazminogena u tkivu, tPA, u regulaciji vaskularnog tonusa i propustljivosti krvno-moždane barijere (KMB). Rezultati istraživanja sugerišu da tPA zavisna propustljivost KMB zahteva ekspresiju LRP1 gena. Regulacija propustljivosti KMB je veoma važna za neurološku homeostazu i štiti mozak od toksina koji konstantno prodiru u cirkulaciju iz spoljašnje sredine i kroz creva. LRP1 ima važnu ulogu u CNS, posebno u neuronima gde ima visoku ekspresiju i gde interaguje sa brojnim proteinima neurona. Miševi koji su bez LRP1 imaju ozbiljne poremećaje kretanja, hiperaktivnost i preranu smrt (106). Nekoliko studija ukazuje na značajnost polimorfizama gena koji kodiraju lipoproteinske receptore na nastanak

Alchajmerove bolesti (110, 111). Među analiziranim genima, najčešće su detektovani polomorfizmi LRP1 gena i apoE gena (110).

U plućima je ustanovljena nova važna uloga LRP1 tokom inflamatornog odgovora. LRP1 je važna komponenta koja reguliše pokretanje urođenog imunog odgovora. Ovakva uloga LRP1 u makrofazima nije bitna samo za pluća već i za druga tkiva kao što su aorte i u uklanjanju ćelija podleglih apoptozi, veoma važna fiziološka funkcija za vreme razvoja i održanja ćelijske homeostaze (106).

Pošto LRP1 u jetri učestvuje u uklanjanju aterogenih apoE bogatih lipoproteina iz cirkulacije proučena je njegova uloga u jetri za vreme ateroskleroze (Sl. 3). Hepatički LRP1 ima čisto zaštitnu ulogu u aterogenezi, ali je nezavisan od plazma holesterola. Mehanizam putem kog hepatički LRP1 utiče na razvoj aterosklerotskih lezija nije jasan.



Slika 3. Preuzimanje HDL-a vezivanjem ApoE za LRP1 receptor na ćeliji jetre

2.2.2.1. Populaciono genetičke studije LRP1 gena

Postoji etnička varijabilnost LRP1 gena u različitim etničkim grupama. Posmatrano u čitavoj humanoju populaciji frekvencija alela egzona 3 LRP1 gena iznosi 22% za T alel i 78% za C alel. Na afričkom kontinentu frekvencije su 22% T alel i 78% C alel, dok je u Americi frekvencija T alela 19%, a C alela 81%. U Aziji je frekvencija T alela najviša i iznosi 32%, a C alela najniža sa 68%. U Evropi je frekvencija alela T najniža i iznosi 14%, a C alela najviša sa svojih 86% (112). Panza i sar. (17) su ustanovili da frekvencija alela C

LRP1 gena pokazuje značajan trend opadanja od severa ka jugu Evrope sa pratećim porastom frekvencije T alela, ali samo kod pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti. Oni su u uzorku obolelih od Alchajmerove bolesti ustanovili opadajući trend od severnog ka južnom delu Evrope frekvencije CC LRP1 genotipa i obrnut trend za frekvenciju LRP1 CT genotipa (17). U populaciji Srbije nisu rađene analize zastupljenosti alela egzona 3 LRP1 gena.

2.2.2.2. Značaj LRP1 gena u metabolizmu lipida

Protein srodan receptoru lipoproteina niske gustine (engl. low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP1), je endocitni multifunkcionalni receptor od 600kDa. Nalazi se na površini ćelije i član je LDL receptorske genetičke familije. Ima ulogu u dve biološke funkcije: endocitozi brojnih liganada i regulaciji ćelijskih signalnih puteva. Putem svog ekstracelularnog domena LRP1 se vezuje sa najmanje 40 različitih liganada. Njegova sveprisutna ekspresija i značajna konzervacija strukture i sekvence među vrstama, kao i odsustvo funkcionalne kodirajuće mutacije kod ljudi, ukazuju da je LRP1 nezamenjiv za ćelijsku fiziologiju. Kako LRP1 ima važnu ulogu u endocitozi i regulaciji signalnih puteva učestvuje i u brojnim fiziološkim procesima uključujući regulaciju lipidnog metabolizma, proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i neurološki razvoj. U vaskularnom zidu LRP1 igra glavnu ulogu u kontroli proliferacije glatkih mišićnih ćelija i štiti od ateroskleroze. Nedavno je ustanovljena uloga LRP1 i u katabolizmu koagulacionog faktora VIII i regulaciji njegovih koncentracija u plazmi. LRP1 posreduje u endocitotičkom unošenju lipida iz hrane u hepatocite vezujući se sa ApoE, LpL i hepaticku lipazu. Zanimljivo je da se LRP1 ekspresuje u adipocitima i insulinska stimulacija LRP1 povećava endocitotičko preuzimanje triglicerida i holesterol estera iz ostataka lipoproteina u postprandijalnim adipocitima u sinergističkom delovanju sa lipoproteinskom lipazom. (104,106, 113,114).

LRP1 receptor je jedan od glavnih ApoE vezujućih receptora u jetri, mišićima, srcu i masnom tkivu. Pošto učestvuje u tako velikom broju fizioloških procesa kao koreceptor i u interakciji sa brojnim proteinima kroz svoj citoplazmatički domen, funkcionalno rasvetljavanje ovih mehanizama i dalja identifikacija LRP1 partnera može otvoriti nove aspekte u lečenju metaboličkih oboljenja, kao što su poremećaji lipidnog metabolizma, ateroskleroze, gojaznosti, Alchajmerove bolesti, ali i zapaljenskih procesa (104, 109, 110).

Ishranom indukovana gojaznost i njene ozbiljne posledice kao što su dijabetes, KVB i kancer izuzetno brzo su postale jedan od najvećih globalnih zdravstvenih problema. Tako da je razjašnjavanje i razumevanje ćelijskih i molekularnih mehanizama, putem kojih masti unešene hranom izazivaju gojaznost i dijabetes, od izuzetne važnosti u cilju identifikovanja preventive i terapijskih strategija (115). Pravilno skladištenje i procesuiranje masnog tkiva je ključno, jer čim ovaj proces ne funkcioniše pravilno višak cirkulišućih slobodnih masnih kiselina (SMK) biva preuzet od strane nemasnih tkiva, vodeći do metaboličkih komplikacija kao što su IR i DMT2. Prvi korak u skladištenju lipida je ulazak slobodnih masnih kiselina u adipocite. Trigliceridi transportovani u proteinima bogatim trigliceridima (TRL), kao što su hilomikroni i VLDL, bivaju razgrađeni od strane lipoproteinske lipaze (LPL) do SMK, koje se zatim preuzimaju od strane adipocita. U perifernim tkivima kao što je masno tkivo katabolizam TG i skladištenje SMK je katalizovano od strane LPL. LPL je glavni enzim metabolizma triacilglicerolom bogatih lipoproteina koji omogućava ulazak i reesterifikaciju SMK u masnom tkivu. LRP1 interaguje sa apoE bogatim hilomikronima i VLDL ostacima i stimulisan je od strane insulina u adipocitima, rezultujući povećanim preuzimanjem TG i holesterol estera iz preostalih lipoproteina. Generisani su miševi kojima je inaktivisan LRP1 receptor unutar adipocita („knock-out” miševi) kako bi se ustanovila njegova uloga u posredovanju TRL na ishranom indukovanu gojaznost i dijabetes. Deficijentni miševi su pokazali odloženo postprandijalno uklanjanje lipida, redukovanu telesnu težinu, manje masne depoe, lipidno osiromašene tamne adipocite, poboljšanu glukoznu toleranciju i povišenu potrošnju energije zbog pojačane mišićne termogeneze (115).

Mehanizam kojim apoE moduliše dijabetes i gojaznost indukovanu ishranom jeste kroz svoju ulogu u lipidnom transportu i redistribuciji lipida između različitih ćelija i tkiva. Ovaj proces je diktiran ekspresijom nivoa i distribucije različitih ApoE vezujućih receptora na tkiva kao što je jetra, mišići, srce i masno tkivo. Tri apoE vezujuća receptora koja se ističu svojom ekspresijom u ovim tkivima su LDL receptori, VLDL receptori i LRP1. Iako ovi receptori dele funkcije vezivanja i internalizacije lipoproteina koji sadrže ApoE, postoje jasne razlike u afinitetu za različite lipoproteine. LDL receptor vezuje ostatke hilomikrona i VLDL kao i LDL, ali slabo interaguje sa hilomikronima u začetku i VLDL. VLDL receptor preferira IDL i imobilizuje lipoproteinsku lipazu na površini ćelije za hidrolizu pre

preuzimanja masnih kiselina u ćelije. Nasuprot LRP1 preferira interakciju sa apoE obogaćenim hilomikronima i VLDL ostacima. LRP1 je takođe odgovoran za LPL posredovanu endocitozu čitavih lipoproteinskih partikula. Tako dok ekspresija VLDL receptora u tkivima sa visoko energetske metabolizmom može da moduliše osetljivost na ishranom indukovanoj gojaznosti i dijabetes preko LPL katalizovanog preuzimanja masnih kiselina, visoki nivoi ekspresije LRP1 u adipocitima sugerišu da LRP1 može delovati sa apoE i/ili LPL u posredovanju efekata TRL u gojaznosti indukovanoj ishranom. Imajući u vidu studije koje su utvrdile značaj masnog tkiva u kontroli homeostaze glukoze i balansa energije, postavljena je hipoteza da je ekspresija LRP1 u adipocitima takođe ključni modulator glukoze i energetske homeostaze. Izvršena je specifična inaktivacija LRP1 gena u adipocitima miševa („knock-out” miševi) i time je pokazano da je u odsustvu LRP1 asimilacija TRL u masno tkivo oštećena, rezultujući u smanjenju masne mase. Dobijeni podaci su takođe otkrili da su glukozni metabolizam i energetske balans pojačani kod „knock-out” miševa. Metaboličke promene koje su ustanovljene kod mužjaka miševa su takođe bile primetne i kod ženki, ali manje izražene. Data saznanja identifikuju LRP1 kao kritični regulator energetske homeostaze adipocita, gde funkcionalno oštećenje LRP1 dovodi do redukovano lipidnog transporta, povišene osetljivosti na insulin i mišićnu potrošnju energije (116).

Do danas nema publikovanih podataka o ulozi polimorfizama LRP1 gena u determinaciji MetS niti korelacije sa pojedinačnim komponentama MetS.

3 CILJ RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. utvrditi polimorfnost apoE i LRP1 gena grupi ispitanika sa MetS i kontrolnoj grupi, odnosno odrediti genotip svake osobe
2. ustanoviti povezanost pojedinih alelnih varijanti apoE i LRP1 gena i pojave metaboličkog sindroma
3. utvrditi povezanost polimorfizma apoE i LRP1 gena i svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijuskog parametra u obe ispitivane grupe
4. ustanoviti povezanost kompozitnih genotipova apoE i LRP1 gena i svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijuskog parametra u obe ispitivane grupe

4 HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. u obe grupe ispitanika najčešća alelna forma apoE gena je e3, a za njim slede e4 i e2, gde je učestalost e4 alela značajno veća u eksperimentalnoj grupi
2. u obe grupe ispitanika najčešća alelna forma LRP1 gena je C, dok je učestalost alelne forme T značajno veća u eksperimentalnoj grupi
3. alel e4 apoE gena i T alela LRP1 gena su u pozitivnoj korelaciji sa povišenim sistolnim krvnim pritiskom, dijastolnim krvnim pritiskom, nivoom triglicerida, LDL holesterola, a u negativnoj korelaciji sa HDL nivoom holesterola
4. e4/e3 i e4/e4 genotipovi apoE gena su u pozitivnoj korelaciji sa sa povišenim sistolnim krvnim pritiskom, dijastolnim krvnim pritiskom, nivoom triglicerida, LDL holesterola, a u negativnoj korelaciji sa HDL nivoom holesterola, kao i CT i TT genotipovi LRP1 gena
5. alel e4 apoE gena i T alela LRP1 gena su u pozitivnoj korelaciji sa povišenim nivoom glikemije naše i vrednostima C reaktivnog proteina, kao i sa obimom struka i indeksom telesne mase
6. prisustvo e4 alela apoE gena i T alela LRP1 gena povećavaju šansu za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na preostale alele ova dva gena

5 MATERIJAL I METODE RADA

5.1 Konstrukcija i način izbora uzorka

Istraživanje je prospektivno, obuhvaćene su dve grupe ispitanika, kontrolna i eksperimentalna grupa.

Kontrolnu grupu čini 30 normalno uhranjenih osoba, oba pola, starosne dobi od 18-65 godina, koji nisu u srodstvu i kod kojih ne postoje verifikovana oboljenja kardiovaskularnog sistema, jetre, bubrega, centralnog nervnog sistema kao i drugi endokrinološki i metabolički poremećaji i da nisu pod medikamentoznom terapijom koja može imati efekat na metabolizam lipida, lipoproteina, ugljenih hidrata i telesnu kompoziciju (hipolipidemi, oralni hipoglikemi, β -blokatori, diuretici, hormonska supstitucionarna terapija,...).

Eksperimentalnu grupu čini 63 bolesnika, muškog i ženskog pola sa utvrđenim metaboličkim sindromom, starosne dobi od 18-65 godina, koji nisu u srodstvu. Kriterijum za uključivanje u ispitivanu grupu određen je IDF definicijom, gde je svaki ispitanik imao obim struka iznad zadatih vrednosti $\text{♂} > 94\text{cm}$, $\text{♀} > 80\text{cm}$, i bar još dva od sledećih faktora $\text{TG} \geq 1,7\text{mmol/l}$ ili terapija (Th) TG, HDL: $\text{♂} \leq 1,04\text{mmol/l}$ $\text{♀} \leq 1,3\text{mmol/l}$ ili Th HDL, $\text{SKP} \geq 130\text{mmHg}$ ili $\text{DKP} \geq 85\text{mmHg}$ ili Th povišenog krvnog pritiska, glikemija našte $\geq 5,6\text{mmol/l}$ (uključujući dijabetes melitus).

Svaka osoba uključena u istraživanje je informisana o cilju i značaju ispitivanja, a svoju saglasnost za dobrovoljno učestvovanje u istraživanju potvrdila je svojim potpisom na pripremljeni obrazac. Istraživanje je odobreno od strane Etičke Komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i Etičke komisije Kliničkog centra Vojvodina.

Istraživanje je sprovedeno u sledećim ustanovama:

1. Klinički centar Vojvodina, Institut za interne bolesti, Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Novi Sad
2. Prirodno-matematički fakultet Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, Laboratorija za genetiku

5.2 Metode rada

5.2.1 Fizički pregled

Svakoj osobi izvršen je fizički pregled sa merenjem sistolnog (SKP) i dijastolnog krvnog pritiska (DKP) korišćenjem sfingomanometra Rivva-Rocci, u sedećem položaju nakon 10-15 minuta mirovanja.

5.2.2 Antropometrijska merenja

Sprovedena su sledeća antropometrijska merenja: telesne mase (TM), telesne visine (TV), obima struka (OS) i izračunavanje indeksa telesne mase (ITM), (*BMI-body mass index*). Za merenje telesne mase korišćena je standardna medicinska decimalna vaga sa preciznošću merenja od 0.1kg, za merenje telesne visine korišćen je standardni antropometar sa preciznošću merenja 0.1cm. Indeks telesne mase izračunat je kao odnos telesne mase u kilogramima i kvadrata telesne visine izražen u metrima (kg/m^2). Obim struka meren je fleksibilnom mernom trakom (preciznost merenja 0.1 cm), u stojećem stavu, na sredini rastojanja najniže tačke rebarnog luka i najviše tačke bedrenog grebena karlične kosti.

5.2.3 Određivanje biohemijskih parametara

Standardnim laboratorijskim metodama u obe grupe za svaku osobu određeni su sledeći parametri: lipidski i lipoproteinski status (ukupni holesterol; HDL holesterol; LDL holesterol; trigliceridi, index ateroskleroze), glikemija našte, insulinemija, CRP-C reaktivni protein. Procena stepena insulinske rezistencije vršena je primenom HOMA-IR (*homeostasis model assessment of insulin resistance*) prema formuli (glikemija x insulin)/22,5 (117), kojim se dobijaju vrednosti insulinske senzitivnosti i funkcionalnog kapaciteta β -ćelija pankreasa (procentno izraženo u odnosu na normalnu vrednost). Model HOMA je adekvatan i pouzdan metod za procenu promena u insulinskoj rezistenciji, jer primarno precizno određuje vrednost bazalne insulinske rezistencije. Ovo je metod koji se sve više primenjuje u prospektivnim epidemiološkim studijama, jer obezbeđuje pouzdane

mere bazalne insulinske senzitivnosti uz primenu formule: $\text{HOMA IR indeks} = \text{glukoza našte} \times \text{insulin bazalni} / 25$.

Ukupan holesterol i trigliceridi su određeni korišćenjem komercijalnog Boehringer Mannheim GmbH kita. HDL holesterol određen je metodom precipitacija sa Na-fosforvolfratom, dok je LDL holesterol izračunat korišćenjem formule prema Friedewald i sar. (118). Nivo glukoze u plazmi određen je korišćenjem Dialab glucose GOD-PAP metode. Nivo CRP-a određen je Latex imunoturbidimetrijskom metodom. Svi uzorci krvi uzeti su nakon 12-časovnog gladovanja.

5.2.4 Određivanje polimorfizma apoE i LRP1 gena

DNK svake osobe uključene u studiju izolovana je fenol-hloroform metodom prema Kocher i sar. (119). Genotipizacija svake osobe urađena je anonimno, bez znanja o pripadnosti osobe kontrolnoj, odnosno eksperimentalnoj grupi.

Polimorfizam apoE gena određen je PCR-RFLP metodom. Deo četvrtog egzona apoE gena svake osobe umnožen je standardnim setom prajmera F4 (5' A CAG AAT TCG CCC CGG CCT GGT ACA C 3') i F6 (5' TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3'). PCR amplifikacija urađena je prema modifikovanoj metodi Hixon i Vernier (87) na Eppendorf Thermocycler-u. PCR reakcija finalnog volumena 25 μ l sadržala je oko 100ng genomske DNK, 0,4 μ M svakog prajmera, 200 μ M svakog deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1,5U Taq polimeraze, 1X Taq pufer, 2,5 mM MgCl₂, 0,5xQ-solution. Inicijalna denaturacija podešena je na 95⁰C u toku 5 minuta, a sledilo je 30 ciklusa sa fazama denaturacije na 95⁰C 1 minut, vezivanja prajmera na 60⁰C 1 minut i elongacije na 72⁰C 2 minuta. Amplifikovani produkti podvrgnuti su restrikcionoj digestiji sa HhaI endonukleazom u toku 3h na 37⁰C.

Polimorfizam egzona 3 LRP1 gena, C766T, određen je PCR-RFLP metodom. Deo egzona tri LRP1 gena svake osobe umnožen je standardnim setom prajmera F (5' CCA TAG CCA GCT TGT TCA TG 3') i R (5' ACG GGA GAG TAG AGA GTG G3'). PCR amplifikacija urađena je prema modifikovanoj metodi Kang i sar. (110) na Eppendorf Thermocycler-u. PCR reakcija finalnog volumena 25 μ l sadržala je oko 100ng genomske DNK, 0,4 μ M svakog prajmera, 200 μ M svakog deoksinukleotida (dATP, dTTP, dCTP,

dGTP), 1,5U Taq polimeraze, 1X Taq pufer, 2,5 mM MgCl₂, 0,5xQ-*solution*. Inicijalna denaturacija podešena je na 94⁰C u toku 2 minuta, a sledilo je 29 ciklusa sa fazama denaturacije na 94⁰C 30 sekundi, vezivanja prajmera na 55⁰C 30 sekundi i elongacije na 72⁰C 30 sekundi, a potom finalna elongacija na 72⁰C 5 minuta. Amplifikovani produkti podvrgnuti su restrikcionoj digestiji sa FokI endonukleazom u toku 5h na 55⁰C.

RFLP markeri se koriste za određivanje genotipa. Za određivanje genotipa apoE gena korišćen je HhaI enzim koji prepoznaje i seče sekvencu GCGC. Za određivanje genotipa LRP1 gena korišćen je FokI enzim koji prepoznaje i seče sekvencu GGATGNN.

Produkti digestije su razdvojeni na 4% MetaPhore agaroznom gelu u postupku elektroforeze na konstantnoj voltaži od 100V. Nakon razdvajanja produkti digestije su bojani etidijum bromidom i vizualizovani pod UV transiluminatorom i gelovi su fotografisani Polaroid kamerom. Određen je DNK profil svake osobe u odnosu na apoE i LRP1 gen i utvrđeno je da li je osoba homozigot ili heterozigot kao i koje alele nosi u svom genotipu.

5.2.5 Statistička obrada i prezentacija rezultata

Statistička analiza dobijenih podataka izvršena je u programu STATISTICA , verzija 10.0 (120). Za sve parametre izračunati su pokazatelji deskriptivne statistike, a za alele, genotipove i haplotipove izračunate su apsolutne frekvencije. Na osnovu t-testa za nezavisne uzorke izvršeno je testiranje značajnosti razlike aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara između ispitivane i kontrolne grupe. Postojanje veze modaliteta alela, genotipa i haplotipa i pripadnosti kontrolnoj ili ispitivanoj grupi utvrđeno je χ^2 -testom nezavisnosti obeležja. U svim realizovanim testovima za prag značajanosti uzeta je vrednost 0,05. Multivarijacionom analizom varijanse testirano je postojanje statistički značajne razlike između različitih genotipova i haplotipova u pogledu svih antropometrijskih i biohemijskih parametara istovremeno, dok je jednofaktroskom analizom varijanse testirana razlika za svaki parametar zasebno. Za parametre kod kojih je utvrđena statistički značajna razlika, Tuckey-evim testom su utvrđeni genotipovi i haplotipovi između kojih su te razlike značajne. Količnik verovatnoće za svaki alel (OR) sa

procenjenim 95% intervalima poverenja izračunati su u cilju istraživanja šanse za pojavu metaboličkog sindroma, kao i za svaki od antropometrijskih i biohemijskih parametara.

6 REZULTATI

U radu je ukupno pregledano i opisanim metodama analizirano 93 ispitanika, podeljenih u dve grupe. Eksperimentalnu grupu ispitanika činilo je 63 bolesnika sa utvrđenim metaboličkim sindromom. Kontrolnu grupu činilo je 30 zdravih ispitanika. Svim ispitanicima su određene antropometrijske mere i biohemijski parametri. U obe grupe ispitanika uspešno je determinisan genotip apoE i LRP1 gena svake osobe.

6.1 Analiza antropometrijskih i biohemijskih parametara

Najvažniji pokazatelji deskriptivne statistike određeni su za antropometrijske mere i biohemijske parametre u obe ispitivane grupe – kontrolnoj (Tab.3) i eksperimentalnoj (Tab.4)

Tabela 3. Deskriptivna statistika kontrolne grupe

Kontrolna grupa	Aritmetička sredina	Medijana	Minimum	Maksimum	Varijansa	Standardna devijacija
Starost	38,70	37,00	17,00	62,00	94,91	9,74
TM	87,33	84,50	47,00	166,00	786,94	28,05
TV	170,13	179,00	58,00	198,00	987,98	31,43
ITM	25,99	24,90	19,10	37,10	18,88	4,34
OS	88,90	90,00	64,00	119,00	169,68	13,03
SKP	120,50	120,00	100,00	140,00	126,47	11,25
DKP	77,33	80,00	60,00	100,00	113,33	10,65
Uk.holesterol	5,18	4,9	3,63	9,00	1,37	1,17
TG	3,57	4,55	0,48	7,82	6,57	2,56
HDL	1,45	1,28	0,62	3,47	0,38	0,62
LDL	2,29	1,35	0,76	5,52	2,07	1,44
Non HDL	4,03	3,76	2,97	6,02	0,75	0,87
LDL/HDL	3,27	3,35	1,51	5,35	0,74	0,86
Glikemija	4,67	4,69	3,30	6,10	0,45	0,67
IRI	8,44	6,90	2,90	21,10	18,63	4,32
HOMA IRI	1,80	1,40	0,59	5,06	1,16	1,08
CRP	1,88	0,50	0,10	18,10	13,07	3,61

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase;OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IRI-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

Tabela 4. Deskriptivna statistika eksperimentalne grupe

Eksperimentalna grupa	Aritmetička sredina	Medijana	Minimum	Maksimum	Varijansa	Standardna devijacija
Starost	42,10	42,00	19,00	65,00	162,99	12,77
TM	123,30	116,90	73,00	236,30	1189,45	34,49
TV	170,86	170,00	151,00	200,00	127,67	11,30
ITM	41,50	40,00	27,10	60,95	80,37	8,97
OS	125,67	124,00	88,00	171,00	343,13	18,52
SKP	139,37	140,00	100,00	200,00	381,85	19,54
DKP	89,60	90,00	65,00	140,00	201,86	14,21
Uk.holesterol	5,48	5,28	3,00	9,61	1,95	1,40
TG	2,12	1,71	0,45	23,36	8,57	2,93
HDL	0,97	0,91	0,62	1,69	0,05	0,22
LDL	3,68	3,62	1,56	6,29	1,17	1,08
Non HDL	4,51	4,25	2,28	8,70	1,68	1,30
LDL/HDL	3,86	3,71	2,13	6,15	0,99	0,99
Glikemija	5,18	4,90	3,30	13,00	1,88	1,37
IRI	15,32	12,50	2,26	42,30	80,84	8,99
HOMA IRI	3,65	2,85	0,60	13,87	6,64	2,58
CRP	12,62	9,50	0,10	65,70	157,86	12,56

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase;OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IRI-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

Primenom Studentovog t-testa testirano je postojanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina antropometrijskih mera i biohemijskih parametara kontrolne i eksperimentalne grupe (Tab.5).

Utvrđena je statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara kontrolne i eksperimentalne grupe za sledeće parametre na nivou $p < 0,01$; telesna masa, indeks telesne mase, obim struka, sistolni krvni pritisak, dijastolni krvni pritisak, HDL, LDL, IRI, HOMA IR1 i C reaktivni protein; a na nivou $p < 0,05$; trigliceridi, LDL/HDL.

Tabela 5. Studentov t-test između kontrolne i eksperimentalne grupe

	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	Kontrolna grupa	Eksperimentalna grupa		
Starost	38,70	42,10	-1,29	0,20
TM**	87,33	123,30	-4,98	0,00
TV	170,13	170,86	-0,16	0,87
ITM**	25,99	41,50	-8,97	0,00
OS**	88,90	125,67	-9,77	0,00
SKP**	120,50	139,37	-4,91	0,00
DKP**	77,33	89,60	-4,20	0,00
Uk.holesterol	5,18	5,48	1,01	0,31
TG*	3,57	2,12	2,33	0,02
HDL**	1,45	0,97	5,47	0,00
LDL**	2,29	3,68	-5,19	0,00
Non HDL	4,03	4,51	-1,87	0,06
LDL/HDL*	3,27	3,86	-2,79	0,01
Glikemija	4,67	5,18	-1,93	0,06
IRI**	8,44	15,32	-3,97	0,00
HOMA IR1**	1,80	3,65	-3,76	0,00
CRP**	1,88	12,62	-4,58	0,00

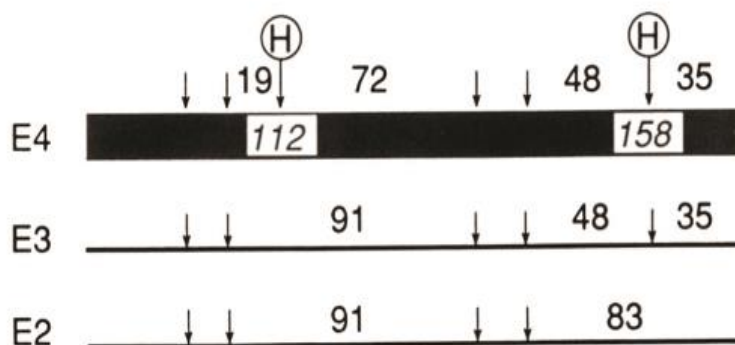
TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase;OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

6.2 Polimorfizam apoE gena i metabolički sindrom

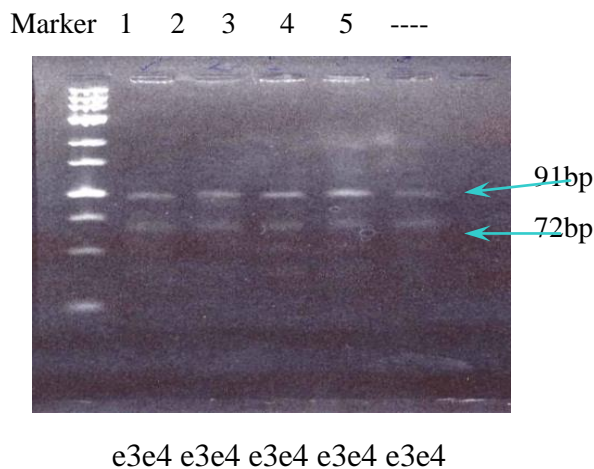
PCR reakcijom umnožen je deo četvrtog egzona apoE gena uspešno kod svakog ispitanika i dobijen je produkt dužine oko 245bp. RFLP metodom uspešno je određen genotip svakog ispitanika.

1. Za određivanje genotipa apoE gena korišćen je HhaI enzim koji prepoznaje i seče sekvencu GCGC unutar dobijenog PCR produkta apoE gena (SI.4). Alel e4 poseduje 6 mesta na kojima sečenje može biti izvršeno, uključujući i argininske rezidue (GCGC) na pozicijama 112 i 158. Alel e3 na poziciji 112 sadrži cisteinske rezidue (GTGC) i zbog toga kod ovog alela neće biti sečenja na tom mestu, tj. postojaće 5 mesta sečenja. E2 kodira cistein i na poziciji 112(GTGC) i 158(GTGC), zbog toga će kod njega biti ukinuta 2 mesta sečenja, dakle postojaće 4 mesta sečenja. Na osnovu mogućih mesta sečenja HhaI enzima alel e4 detektovan je na osnovu fragmenta dužine 72bp i kraćih slabije vidljivih fragmenata (48bp,35bp,19bp). Alel e3 determinisan je na osnovu fragmenta dužine 91bp i dva kraća fragmenta (48bp,35bp) i alel e2 je određen na osnovu prisustva dva fragmenta dužine 83bp i 91bp.



Slika 4. Mesta sečenja HhaI enzima unutar egzona 4 apoE gena

Direktnim očitavanjem sa gelova utvrđeni su genotipovi apoE gena u ispitivanoj i kontrolnoj grupi (Sl. 5).



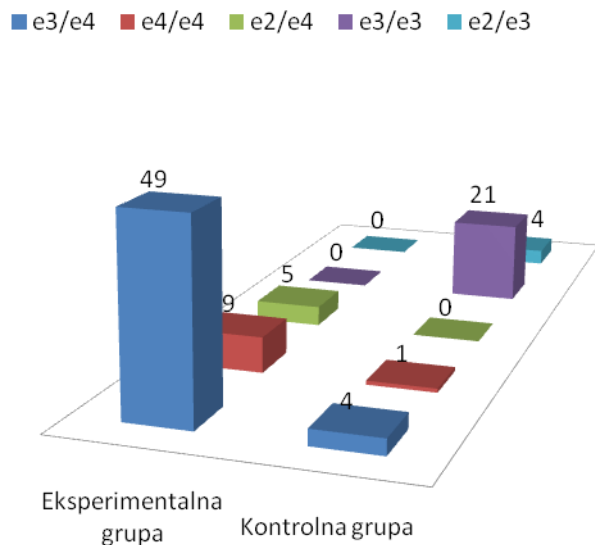
Slika 5. RFLP profil sa očitanim genotipovima apoE gena

Određena je zastupljenost svakog genotipa apoE gena u ukupnom ispitivanom uzorku kao i u svakoj ispitivanoj grupi pojedinačno (Tab. 6; Sl.6).

Tabela 6. Relativna zastupljenost apoE genotipa

Grupa	apoE genotip					Ukupno
	e3e4	e4e4	e2e4	e3e3	e2e3	
Eksperimentalna grupa	77,78%	14,29%	7,94%	0,00%	0,00%	100,00%
Kontrolna grupa	13,33%	3,33%	0,00%	70,00%	13,33%	100,00%
Ukupno	56,99%	10,75%	5,38%	22,58%	4,3%	100,00%

Utvrđena je razlika u distribuciji genotipova između ove dve grupe. Ističe se veća frekvencija genotipa e3e4 u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu. U eksperimentalnoj grupi je utvrđeno najčešće prisustvo e3e4 (77,78%) genotipa, dok je u kontrolnoj grupi najčešća forma e3e3 (70,00%) genotipa. Najzastupljeniji genotip u ukupnom uzorku je e3e4 (56,99%).



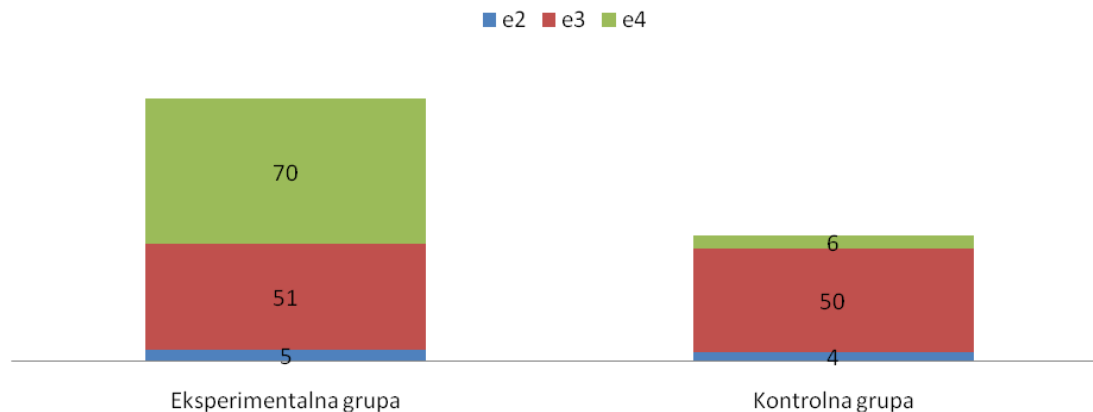
Slika 6. Broj genotipova apoE gena u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi

Određena je i zastupljenost svakog alela apoE gena u ukupnom ispitivanom uzorku kao i u svakoj ispitivanoj grupi pojedinačno (Tab. 7; SI.7).

Tabela 7. Relativna zastupljenost apoE alela

Grupa	aleli			Ukupno
	e2	e3	e4	
Eksperimentalna grupa	3,97%	40,48%	55,56%	100,00%
Kontrolna grupa	6,67%	83,33%	10,00%	100,00%
Ukupno	4,84%	54,3%	40,86%	100,00%

U eksperimentalnoj grupi je utvrđeno najčešće prisustvo e4 (55,56%) alela, dok je u kontrolnoj grupi najčešći alel e3 (83,33%). Najzastupljeniji alel u obe ispitivane grupe posmatrane zajedno je e3 (54,3%).



Slika 7. Broj alela apoE gena u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi

χ^2 testom nezavisnosti testirano je postojanje asocijacije prisustva genotipova apoE gena (Tab.8) i pripadnosti ispitanika kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi. Zatim je istim testom ispitano postojanje asocijacije prisustva pojedinih alela apoE gena (Tab.9) i pripadnosti ispitanika kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi.

Tabela 8. Povezanost apoE genotipova i metaboličkog sindroma

$\chi^2=71,96$ $p=0,000$	apoE genotip										Ukupno
	e3e4		e4e4		e2e4		e3e3		e2e3		
	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	
Kontrolna grupa	4	17,10	1	3,23	0	1,61	21	6,77	4	1,29	30
Eksperimentalna grupa	49	35,90	9	6,77	5	3,39	0	14,23	0	2,71	63
Ukupno	53	53,00	10	10,00	5	5,00	21	21,00	4	4,00	93

emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Na osnovu rezultata χ^2 testa nezavisnosti utvrđeno je da postoji veza između prisustva različitih genotipova apoE gena i MetS(veza između prisustva različitih genotipova i pripadnosti eksperimentalnoj grupi) na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=71,96$)

Tabela 9. Povezanost alela apoE gena i metaboličkog sindroma

$\chi^2=35.0037$ $p=0,000$	Aleli						Ukupno
	e3		e4		e2		
	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	
Kontrolna grupa	50	32,58	6	24,52	4	2,90	60
Eksperimentalna grupa	51	68,42	70	51,48	5	6,10	126
Ukupno	101	101,00	76	76,00	9	9,00	186

emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Na osnovu rezultata χ^2 testa nezavisnosti utvrđeno je da postoji veza između prisustva različitih alela apoE gena i MetS (veza između prisustva različitih alela i pripadnosti eksperimentalnoj grupi) na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=35.0037$).

Nadalje su putem χ^2 testa nezavisnosti, ustanovljene veze između prisustva različitih genotipova apoE gena u ukupnom ispitivanom uzorku i vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra koje odstupaju od zadatih referentnih vrednosti za: ITM>30kg/m²; OS>80cm ♀, OS>94cm ♂; SKP>130mmHg; DKP>85mmHg; HDL< 1,3mmol/l ♀, HDL<1,04mmol/l♂; LDL>3 mmol/l; CRP >10mg/l (Tab. 10).

Na osnovu rezultata χ^2 testa nezavisnosti utvrđeno je da postoji veza između prisustva različitih genotipova i vrednosti:

- ITM iznad 30kg/m² na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=48,0497$)
- OS iznad 80cm za žene i 94cm za muškarce na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=36,7330$)
- SKP>130mmHg na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=19,8593$)
- DKP>85mmHg na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=18,6024$)
- HDL-a ispod 1,3mmol/l za žene i 1,04mmol/l za muškarce na nivou $p<0,05$ ($\chi^2=11,9389$)
- LDL>3 mmol/l na nivou $p<0,05$ ($\chi^2=10,9778$)
- CRP >10mg/l na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=18,3105$)

Tabela 10. Povezanost genotipova apoE gena i merenih antropometrijskih i biohemijskih parametara

χ^2 -test	Granične vrednosti parametara	apoE genotip										Ukupno	
		e3e4		e4e4		e2e4		e3e3		e2e3			
		emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.
$\chi^2=48,0497$ $p=0,000$	ITM>30kg/m ²	47	37,04	9	6,98	5	3,49	4	14,67	0	2,79	65	65,00
	ITM<30kg/m ²	6	15,95	1	3,01	0	1,50	17	6,32	4	1,20	28	28,00
$\chi^2=36,7330$ $p=0,000$	OS>80cm♀, OS>94cm♂	50	42,74	10	8,06	5	4,03	8	16,93	2	3,22	75	75,00
	OS<80cm♀, OS<94cm♂	3	10,25	0	1,93	0	0,96	13	4,06	2	0,77	18	18,00
$\chi^2=19,8593$ $p=0,000$	SKP>130mmHg	36	33,62	10	6,34	5	3,17	7	13,32	1	2,53	59	59,00
	SKP<130mmHg	17	19,37	0	3,65	0	1,82	14	7,67	3	1,46	34	34,00
$\chi^2=18,6024$ $p=0,000$	DKP>85mmHg	28	25,07	9	4,73	3	2,36	4	9,93	0	1,89	44	44,00
	DKP<85mmHg	25	27,92	1	5,26	2	2,63	17	11,06	4	2,10	49	49,00
$\chi^2=2,53690$ $p=0,634$	TG>1,7mmol/l	25	27,92	6	5,26	4	2,63	12	11,06	2	2,10	49	49,00
	TG<1,7mmol/l	28	25,07	4	4,73	1	2,36	9	9,93	2	1,89	44	44,00
$\chi^2=11,9389$ $p=0,010$	HDL<1,3mmol/l♀, HDL<1,04mmol/l♂	39	34,76	9	6,55	3	3,27	9	13,77	1	2,62	61	61,00
	HDL>1,3mmol/l♀, HDL>1,04mmol/l♂	14	18,23	1	3,44	2	1,72	12	7,22	3	1,37	32	32,00
$\chi^2=10,9778$ $p=0,021$	LDL>3 mmol/l	42	37,04	8	6,98	4	3,49	9	14,67	2	2,79	65	65,00
	LDL<3 mmol/l	11	15,95	2	3,01	1	1,50	12	6,32	2	1,20	28	28,00
$\chi^2=8,24258$ $p=0,083$	Glikemija >5,6 mmol/l	15	37,04	4	6,98	2	3,49	1	14,67	0	2,79	22	22,00
	Glikemija <5,6 mmol/l	38	15,95	6	3,01	3	1,50	20	6,32	4	1,20	71	71,00
$\chi^2=18,3105$ $p=0,000$	CRP >10mg/l	26	17,66	4	3,33	0	1,66	1	7,00	0	1,33	31	31,00
	CRP <10mg/l	27	35,33	6	6,66	5	3,33	20	14,00	4	2,66	62	62,00
Ukupno		53	53,00	10	10,00	5	5,00	21	21,00	4	4,00	93	93,00

ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; CRP-C reaktivni protein; emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Analiza varijanse

U sledećem koraku su istražene razlike u antropometrijskim i biohemijskim parametrima između ispitanika sa različitim apoE genotipom, koje su ispitane jednofaktorskom multivarijacionom analizom varijanse, kao i jednofaktorskim univarijacionim analizama varijanse za svaki parametar posebno. Naknadnim poređenjima aritmetičkih sredina navedenih parametara Tukey-evim HSD testom utvrđene su statistički značajne razlike u merenim antropometrijskim i biohemijskim parametrima između pojedinačnih genotipova apoE gena.

Jednofaktorska multivarijaciona analiza varijanse

Jednofaktorskom multivarijacionom analizom varijanse istražena je razlika u antropometrijskim i biohemijskim parametrima između ispitanika sa različitim apoE genotipom u ukupnom ispitivanom uzorku. Kao zavisna promenljiva analizirana je linearna kombinacija sledećih parametara: TM, ITM, OS, SKP, DKP, ukupni holesterol, TG, HDL, LDL, LDL/HDL, glikemija našte i CRP. Na osnovu dobijenih rezultata analize utvrđena je statistički značajna razlika između ispitanika sa različitim apoE genotipom u linearnoj kombinaciji navedenih parametara na nivou $p < 0,01$, dok je statistika F testa izračunata kao količnik faktorske i rezidualne varijanse po formuli: $F = VA/VR$, iznosila 2,68.

Jednofaktorska univarijaciona analiza varijanse

Jednofaktorskom univarijacionom analizom varijanse istraženo je postojanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara pacijenata sa različitim genotipovima (Tab. 11).

Za parametre kod kojih je, na osnovu dobijenih rezultata analize varijanse, utvrđena statistički značajna razlika može se zaključiti da postoji sistematski uticaj apoE genotipa (Tab. 11).

Tabela 11. Jednofaktorska univarijaciona analiza varijanse za apoE genotip

Jednofaktorska univarijaciona analiza varijanse		F	p
Genotip apoE	TM**	5,87	0,000
	ITM**	15,64	0,000
	OS**	22,58	0,000
	SKP**	6,87	0,000
	DKP**	5,24	0,000
	HDL*	2,59	0,040
	LDL**	4,01	0,000
	LDL/HDL*	2,61	0,041
	HOMA IR 1*	3,33	0,013
	CRP**	4,47	0,000

TM-telesna masa; ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; LDL/HDL-index ateroskleroze; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein; **p<0,01; *p<0,05 ; Statistika F testa je količnik faktorske i rezidualne varijanse; F=VA/VR

Jednofaktorskom univarijacionom analizom varijanse nije utvrđena statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina te ni uticaj apoE gena kod sledećih parametara:

- Ukupni holesterol
- TG
- Glikemija našte

Tukey HSD test

Naknadnim poređenjima aritmetičkih sredina parametara za koje je potvrđena statistički značajna razlika kod različitih apoE genotipova, Tukey-evim HSD testom utvrđene su sledeće statistički značajne razlike:

- Za parametar **TM** između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4.
- Za parametar **ITM** između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4 i između pacijenata sa genotipom e2e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4

- Za parametar **OS** između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4, između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e2e4 i između pacijenata sa genotipom e2e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4.
- Za parametar **SKP** između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4 i između pacijenata sa genotipom e2e3 i pacijenata sa genotipom e4e4.
- Za parametar **DKP** između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4 i između pacijenata sa genotipom e2e3 i pacijenata sa genotipom e4e4.
- Za parametar **LDL** između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e2e4
- Za parametar **CRP** između pacijenata sa genotipom e3e3 i pacijenata sa genotipom e3e4 i e4e4

Unakrsni odnosi (engl. Odds ratio, OR)

Daljom obradom podataka određene su vrednosti „unakrsnih odnosa“ (OR – Odds ratio) za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra u odnosu na prisustvo različitih alela apoE gena (Tab. 12).

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 12., može se zaključiti da prisustvo e4 alela kod ispitanika višestruko povećava šansu za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametara, a posebno za OS (11 puta) i ITM (7 puta) u odnosu na nosioce e2 i e3 alela.

Tabela 12. OR za apoE alele i merene antropometrijske i biohemijske parametre

		e2	e3	e4
ITM>30kg/m²	OR	0,52	0,2	7
	CI (95%)	0,13-2,01	0,09-0,41	3,07-15,95
OS>80cm[♀], OS>94cm[♂]	OR	0,83	0,13	11
	CI (95%)	0,16-4,18	0,04-0,36	1,17-3,62
SKP>130mmHg	OR	1,16	0,31	3,21
	CI (95%)	0,28-4,79	0,16-0,59	1,66-6,19
DKP>85mmHg	OR	0,54	0,38	2,98
	CI (95%)	0,13-2,23	0,21-0,69	1,63-5,46
Uk.holesterol>5,2mmol/l	OR	2,18	1,34	0,64
	CI (95%)	0,44-10,81	0,74-2,44	0,35-1,17
TG>1,7mmol/l	OR	1,84	0,90	0,99
	CI (95%)	0,44-7,62	0,50-1,61	0,55-1,77
HDL<1,3mmol/l[♀], HDL<1,04mmol/l[♂]	OR	0,4	0,5	2,47
	CI (95%)	0,10-1,54	0,27-0,94	1,29-4,73
LDL>3mmol/l	OR	0,85	0,46	2,27
	CI (95%)	0,20-3,54	0,24-0,89	1,16-4,47
Glikemija>5,6mmol/l	OR	0,91	0,46	2,20
	CI (95%)	0,18-4,59	0,23-0,92	1,11-4,39
CRP>10mg/l	OR	0	0,61	2,20
	CI (95%)	#	0,33-1,13	1,18-4,10

ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine, CRP-C reaktivni protein

Na osnovu izračunatih vrednosti za OR ustanovljeno je da prisustvo e4 alela kod ispitanika višestruko povećava šansu (11,25 puta) za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce e2 i e3 alela (Tab. 13).

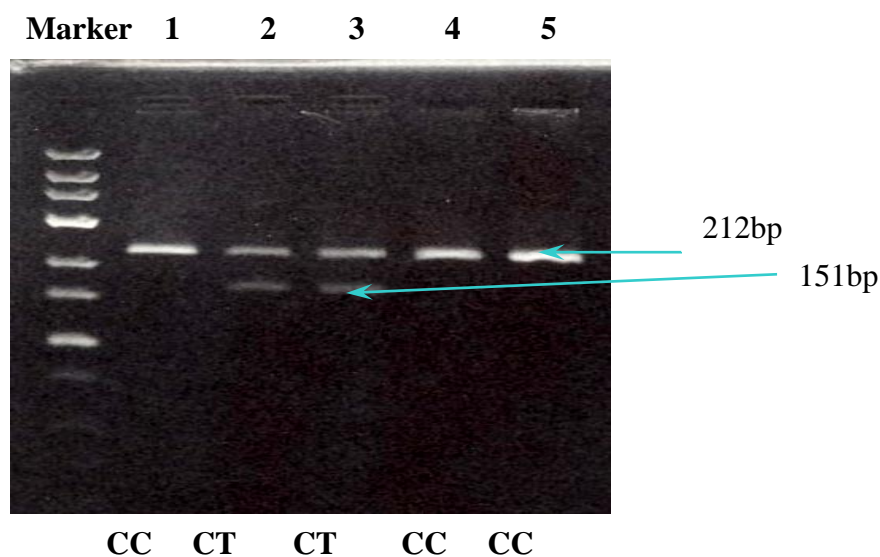
Tabela 13. OR za apoE alele i pojavu metaboličkog sindroma

Aleli apoE		Eksperimentalna grupa (MetS)
e4	OR	11,25
	CI(95%)	4,51-28,05
e3	P	<0,05
	OR	0,136
	CI(95%)	0,06-0,29
e2	P	>0,05
	OR	0,57
	CI(95%)	0,14-2,23
	P	>0,05

6.3 Polimorfizam LRP1 gena i metabolički sindrom

PCR reakcijom uspešno je amplifikovan egzon 3 LRP1 gena svakog ispitanika i dobijen je produkt dužine 212bp. Za određivanje genotipa LRP1 gena primenjena je RFLP metoda prilikom koje je korišćen FokI enzim koji prepoznaje i seče sekvencu GGATGNN unutar dobijenog PCR produkta. Ukoliko je došlo do mutacije na poziciji 766 nukleotid C biva zamenjen nukleotidom T i sečenje se odvija, pa se detektuje prisustvo T alela LRP1 gena na osnovu prisustva dva DNK fragmenta dužine 151bp i oko 60bp. U odsustvu mutacije ne dolazi do sečenja te PCR produkt ostaje ceo i detektujemo DNA fragment dužine 212bp.

Direktnim očitavanjem sa gelova utvrđeni su genotipovi egzona 3 LRP1 gena (LRP1ex3) u ispitivanoj i kontrolnoj grupi (Sl. 8).



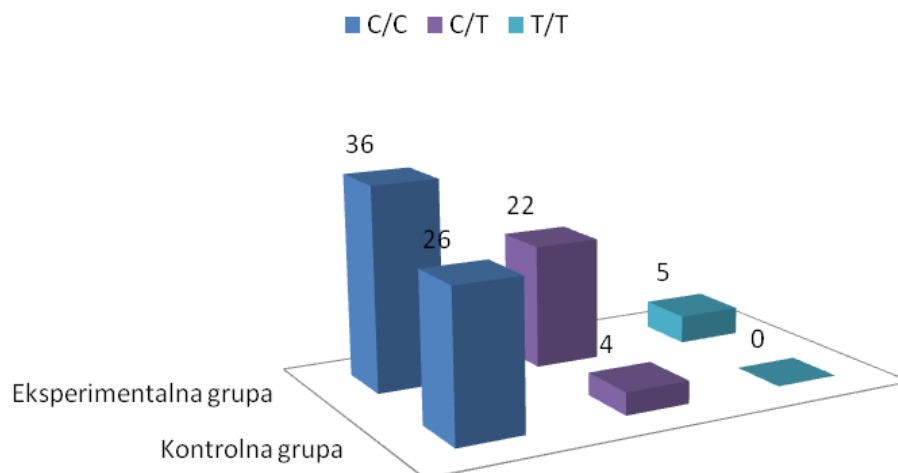
Slika 8. RFLP profil sa očitanim genotipovima egzona 3 LRP1 gena

Određena je zastupljenost svakog genotipa egzona 3 LRP1 gena u ukupnom ispitivanom uzorku, kao i u svakoj ispitivanoj grupi pojedinačno (Tab. 14; Sl.9).

Tabela 14. Relativna zastupljenost LRP1 ex3 genotipa

Grupa	LRPex3 genotip			Ukupno
	CC	CT	TT	
Eksperimentalna grupa	57,14%	34,92%	7,94%	100,00%
Kontrolna grupa	86,67%	13,33%	0,00%	100,00%
Ukupno	66,67%	27,96%	5,38%	100,00%

Utvrđena je razlika u distribuciji genotipova između dve grupe ispitanika. Prisutna je veća frekvencija genotipa CT i TT u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu. U eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi je utvrđeno najčešće prisustvo CC genotipa (e-57,4%; k-86,67%), dok je TT genotip utvrđen samo u eksperimentalnoj grupi (7,94%). Najzastupljeniji genotip u ukupnom uzorku je CC (66,67%).



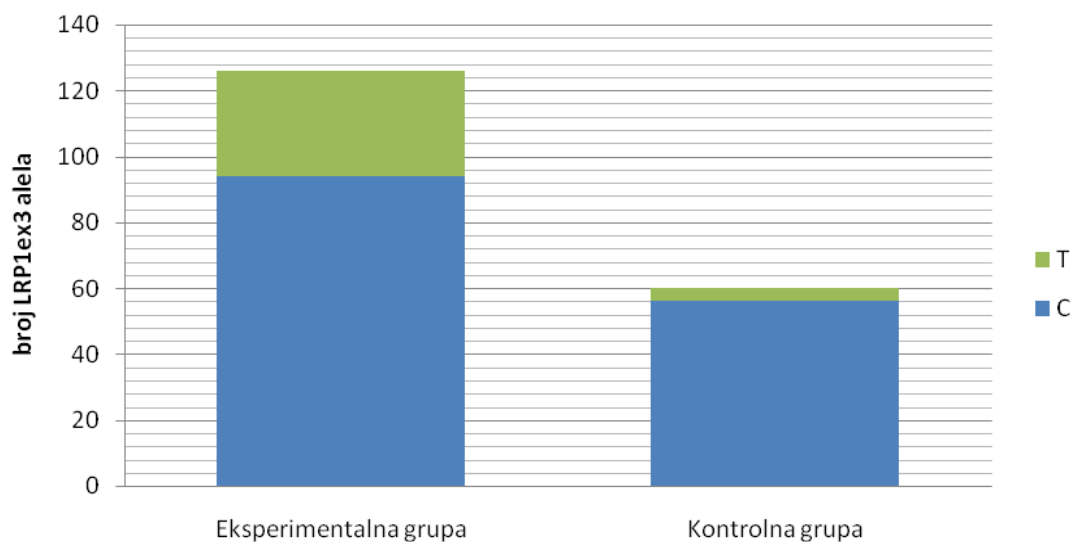
Slika 9. Broj genotipova LRP1 ex3 gena u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi

Određena je i zastupljenost svakog alela LRP1 gena u ukupnom ispitivanom uzorku kao i u svakoj ispitivanoj grupi pojedinačno (Tab. 15; Sl.10).

Tabela 15. Relativna zastupljenost LRP1 ex3 alela

Grupa	aleli		Ukupno
	C	T	
Eksperimentalna grupa	74,60%	25,40%	100,00%
Kontrolna grupa	93,33%	6,67%	100,00%
Ukupno	80,65%	19,35%	100,00%

U eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi je utvrđeno najčešće prisustvo C (e-74,60%; k-93,33%) alela, dok je T alel (25,4%) češći u eksperimentalnoj grupi. Najzastupljeniji alel u obe ispitivane grupe posmatrane zajedno je C (80,65%).



Slika 10. Broj alela LRP1 ex3 gena u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi

Utvrđeno je postojanje asocijacije prisustva genotipova egzona 3 LRP1 gena (Tab. 16) i pojedinih alela (Tab. 17) i pripadnosti ispitanika kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi χ^2 testom nezavisnosti.

Tabela 16. Povezanost LRP1 ex3 genotipova i metaboličkog sindroma

	LRPex3 genotip						Ukupno
	CC		CT		TT		
	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	
χ²=8,49349 p=0,010							
Kontrolna grupa	25	18,71	5	10,64	0	0,64	30
Eksperimentalna grupa	33	39,29	28	22,35	2	1,35	63
Ukupno	58	58,00	33	33,00	2	2,00	93

emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Rezultati χ^2 testa nezavisnosti pokazuju da postoji veza između prisustva različitih genotipova LRP1 gena i MetS (veza između prisustva različitih genotipova i pripadnosti eksperimentalnoj grupi) na nivou $p < 0,01$ ($\chi^2 = 8,49$).

Tabela 17. Povezanost LRP1 ex3 alela i metaboličkog sindroma

	Aleli				Ukupno
	C		T		
	emp.	oček.	emp.	oček.	
χ²=9,1353 p=0,000					
Kontrolna grupa	56	48,39	4	11,61	60
Eksperimentalna grupa	94	101,61	32	24,39	126
Ukupno	150	150,00	36	36,00	186

emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

χ^2 test nezavisnosti prikazuje i da postoji veza između prisustva različitih alela LRP1 gena i MetS (veza između prisustva različitih alela i pripadnosti eksperimentalnoj grupi) na nivou $p < 0,01$ ($\chi^2 = 9,13$).

Potom su putem χ^2 testa nezavisnosti, ustanovljene veze između prisustva različitih genotipova LRP1 ex3 gena u ukupnom ispitivanom uzorku i vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra koje odstupaju od zadatih referentnih vrednosti za: ITM > 30 kg/m²; OS > 80 cm ♀, OS > 94 cm ♂; SKP > 130 mmHg; DKP > 85 mmHg; HDL < 1,3 mmol/l ♀, HDL < 1,04 mmol/l ♂; LDL > 3 mmol/l; CRP > 10 mg/l (Tab. 18).

Na osnovu rezultata χ^2 testa nezavisnosti utvrđeno je da postoji veza između prisustva različitih genotipova i vrednosti:

- ITM iznad 30 kg/m² na nivou $p < 0,05$ ($\chi^2 = 7,01234$) i
- LDL > 3 mmol/l na nivou $p < 0,01$ ($\chi^2 = 15,9979$)

Tabela 18. Povezanost genotipova LRP1 ex3 gena i merenih antropometrijskih i biohemijskih parametara

χ^2 -test	Granične vrednosti parametara	LRP1 ex3 genotip						Ukupno	
		CC		CT		TT		emp.	oček.
		emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.		
$\chi^2=7,01234$ $p=0,031$	ITM>30kg/m ² ITM<30kg/m ²	38	43,33	22	18,17	5	3,49	65	65,00
		24	18,66	4	7,82	0	1,50	28	28,00
$\chi^2=1,87590$ $p=0,396$	OS>80cm♀, OS>94cm♂ OS<80cm♀, OS<94cm♂	48	50,00	22	20,96	5	4,03	75	75,00
		14	12,00	4	5,03	0	0,96	18	18,00
$\chi^2=3,04556$ $p=0,217$	SKP>130mmHg SKP<130mmHg	38	39,33	16	16,49	5	3,17	59	59,00
		24	22,66	10	9,50	0	1,82	34	34,00
$\chi^2=3,30749$ $p=0,191$	DKP>85mmHg DKP<85mmHg	26	29,33	14	12,30	4	2,36	44	44,00
		36	32,66	12	13,69	1	2,63	49	49,00
$\chi^2=0,344088$ $p=0,849$	TG>1,7mmol/l TG<1,7mmol/l	33	32,66	14	13,69	2	2,63	49	44,00
		29	29,33	12	12,30	3	2,36	44	49,00
$\chi^2=0,492193$ $p=0,783$	HDL<1,3mmol/l♀, HDL<1,04mmol/l♂ HDL>1,3mmol/l♀, HDL>1,04mmol/l♂	40	40,66	17	17,05	4	3,27	61	61,00
		22	21,33	9	8,94	1	1,72	32	32,00
$\chi^2=15,9979$ $p=0,000$	LDL>3 mmol/l LDL<3 mmol/l	35	43,33	25	18,17	5	3,49	65	65,00
		27	18,66	1	7,82	0	1,50	28	28,00
$\chi^2=1,01354$ $p=0,600$	Glikemija >5,6mmol/l Glikemija <5,6mmol/l	13	14,66	8	6,15	1	1,18	22	22,00
		49	47,33	18	19,84	4	3,81	71	71,00
$\chi^2=0,609305$ $p=0,735$	CRP >10mg/l CRP <10mg/l	19	20,66	10	8,66	2	1,66	31	31,00
		43	41,33	16	17,33	3	3,33	62	62,00
Ukupno		62	62,00	26	26,00	5	5,00	93	93,00

ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; CRP-C reaktivni protein; emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Analiza varijanse

U narednom koraku istražene su razlike u antropometrijskim i biohemijskim parametrima između ispitanika sa različitim LRP1 ex3 genotipom, koje su ispitane jednofaktorskom multivarijacionom analizom varijanse, kao i jednofaktorskim univarijacionim analizama varijanse, za svaki parametar posebno. Naknadnim poređenjima aritmetičkih sredina navedenih parametara Tukey-evim HSD testom utvrđene su statistički značajne razlike između pojedinačnih genotipova LRP1 ex3 gena u merenim antropometrijskim i biohemijskim parametrima.

Jednofaktorska multivarijaciona analiza varijanse

Jednofaktorskom multivarijacionom analizom varijanse istražena je razlika u antropometrijskim i biohemijskim parametrima između ispitanika sa različitim LRP1 ex3 genotipom. Kao zavisna promenljiva analizirana je linearna kombinacija sledećih parametara: TM, ITM, OS, SKP, DKP, ukupni holesterol, TG, HDL, LDL, LDL/HDL, glikemija našte i CRP. Na osnovu dobijenih rezultata analize utvrđena je statistički značajna razlika između ispitanika sa različitim LRP1 genotipom u linearnoj kombinaciji navedenih parametara na nivou $p < 0,01$, dok je statistika F testa izračunata kao količnik faktorske i rezidualne varijanse po formuli: $F = VA/VR$, iznosila 4,08.

Jednofaktorska univarijaciona analiza varijanse

Jednofaktorskom univarijacionom analizom varijanse istraženo je postojanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara pacijenata sa različitim genotipovima (Tab. 19).

Na osnovu dobijenih rezultata analize varijanse, utvrđena je statistički značajna razlika za sledeće parametre te se može zaključiti da postoji sistematski uticaj egzona 3 LRP1 genotipa (Tab. 19).

Tabela 19. Jednofaktorska univariaciona analiza varijanse

Jednofaktorska univariaciona analiza varijanse		F	p
Genotip LRP1 ex3	ITM*	4,47	0,010
	OS**	6,59	0,000
	SKP*	4,67	0,012
	LDL**	40,54	0,000
	LDL/HDL**	11,52	0,000

ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; LDL-lipoproteini male gustine; LDL/HDL-index ateroskleroze; **p<0,01; *p<0,05 ; Statistika F testa je količnik faktorske i rezidualne varijanse; F=VA/VR

Jednofaktorskom analizom varijanse nije utvrđena statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina te ni uticaj egzona 3 LRP1 gena kod sledećih parametara:

- TM
- DKP
- Uk. holesterol
- TG
- HDL
- Glikemija našte
- CRP

Tukey HSD test

Naknadnim poređenjima aritmetičkih sredina parametara za koje je potvrđena statistički značajna razlika kod različitih LRP1 genotipova, Tukey-evim HSD testom utvrđene su sledeće statistički značajne razlike:

- Za parametar **ITM** između pacijenata sa genotipom TT i pacijenata sa genotipom CC i CT.
- Za parametar **OS** između pacijenata sa genotipom TT i pacijenata sa genotipom CC i CT.
- Za parametar **SKP** između pacijenata sa genotipom TT i pacijenata sa genotipom CC i CT.
- Za parametar **LDL** između pacijenata sa genotipom CC i pacijenata sa genotipom CT i TT.
- Za parametar **LDL/HDL** između pacijenata sa genotipom CT i pacijenata sa genotipom CC.

Unakrsni odnosi (engl. odds ratio,OR)

Daljom obradom podataka određene su vrednosti „unakrsnih odnosa“ (OR – Odds ratio) za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra u odnosu na prisustvo različitih alela egzona 3 LRP1 gena (Tab. 20).

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da prisustvo T alela kod ispitanika višestruko povećava šansu za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti ITM (4,24 puta) i LDL (20,26 puta) u odnosu na nosioce C alela.

Tabela 20. OR za LRP1 ex3 alele i merene antropometrijske i biohemijske parametre

Vrednosti parametara	Aleli	C	T
ITM>30kg/m²	OR	0,23	4,24
	CI (95%)	0,07-0,70	1,42-12,65
	p	p>0,05	p<0,05
OS>80cm_♀, OS>94cm_♂	OR	0,46	2,16
	CI (95%)	0,15-1,39	0,71-6,58
	p	p>0,05	p>0,05
SKP>130mmHg	OR	0,61	1,63
	CI (95%)	0,27-1,35	0,73-3,64
	p	p>0,05	p>0,05
DKP>85mmHg	OR	0,5	2
	CI (95%)	0,23-1,05	0,95-4,2
	p	p>0,05	p>0,05
Uk.holesterol>5,2mmol/l	OR	1,05	0,94
	CI (95%)	0,51-2,19	0,45-1,95
	p	p>0,05	p>0,05
TG>1,7mmol/l	OR	1,14	0,87
	CI (95%)	0,55-2,36	0,42-1,81
	p	p>0,05	p>0,05
HDL<1,3mmol/l_♀, HDL<1,04mmol/l_♂	OR	0,80	1,24
	CI (95%)	0,36-1,76	0,56-2,72
	p	p>0,05	p>0,05
LDL>3mmol/l	OR	0,04	20,26
	CI (95%)	0,00-0,37	2,70-152,04
	p	p>0,05	p<0,05
Glikemija>5,6mmol/l	OR	0,76	1,31
	CI (95%)	0,33-1,73	0,57-2,98
	p	p>0,05	p>0,05
CRP>10mg/l	OR	0,67	1,47
	CI (95%)	0,32-1,41	0,70-3,10
	p	p>0,05	p>0,05

ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni holesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine, CRP-C reaktivni protein

Na osnovu izračunatih vrednosti za OR ustanovljeno je da prisustvo T alela kod ispitanika višestruko povećava šansu (4,76 puta) za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce C alela (Tab. 21).

Tabela 21. OR za LRP1 ex3 alele i pojavu metaboličkog sindroma

Aleli LRP1 ex 3		Eksperimentalna grupa (MetS)
C	OR	0,20
	CI (95%)	0,07-0,62
	P	>0,05
T	OR	4,76
	CI (95%)	1,60-14,18
	P	<0,05

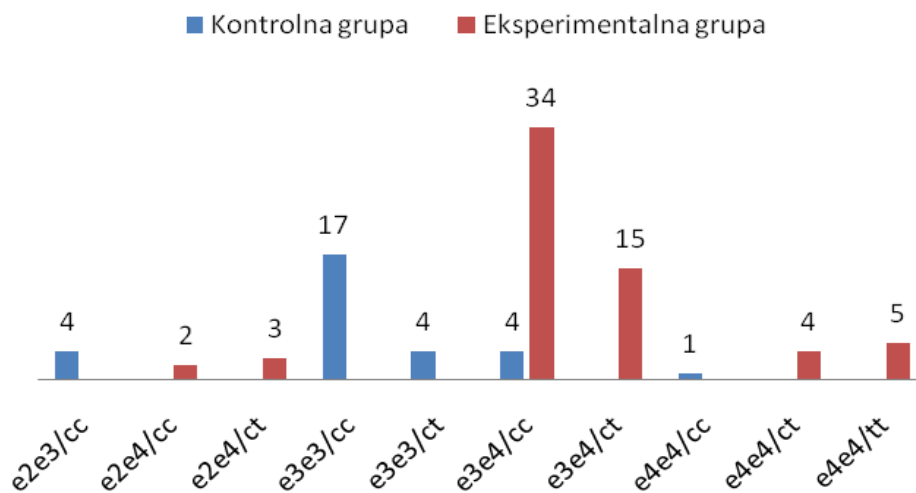
6.4 Kompozitni genotip apoE i LRP1 gena i metabolički sindrom

Geni apoE i LRP1 se ne nalaze na istom hromozomu i nisu vezani geni. Međutim, produkti ova dva gena učestvuju u istim metaboličkim putevima i da bi se sagledao kombinovani uticaj ova dva gena na fenotip, određen je kompozitni genotip svakog ispitanika i utvrđena je zastupljenost svakog kompozitnog genotipa u ukupnom ispitivanom uzorku kao i u svakoj ispitivanoj grupi pojedinačno (Tab.22; Sl.11)

Tabela 22. Relativna zastupljenost kompozitnih genotipova u

Grupa	Kompozitni genotip										Ukupno
	e2e3/cc	e2e4/cc	e2e4/ct	e3e3/cc	e3e3/ct	e3e4/cc	e3e4/ct	e4e4/cc	e4e4/ct	e4e4/tt	
Kontrolna grupa	13,33%	0,00%	0,00%	56,67%	13,33%	13,33%	0,00%	3,33%	0,00%	0,00%	100,00%
Eksperimentalna grupa	0,00%	3,17%	4,76%	0,00%	0,00%	53,97%	23,81%	0,00%	6,35%	7,94%	100,00%
Ukupno	4,30%	2,15%	3,23%	18,28%	4,30%	40,86%	16,13%	1,08%	4,30%	5,38%	100,00%

Kompozitni genotip e3e4/cc pokazao je veću zastupljenost u eksperimentalnoj u odnosu na kontrolnu grupu. Kompozitni genotipovi e2e3/cc, e3e3/cc, e3e3/ct, i e4e4/cc detektovani su samo u kontrolnoj grupi, dok su e2e4/cc, e2e4/ct, e3e4/ct, e4e4/ct i e4e4/tt pronađeni samo u eksperimentalnoj grupi. Najzastupljeniji kompozitni genotip u ukupnom uzorku je e3e4/cc (40,86%).



Slika 11. Broj kompozitnih genotipova u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi

Zatim je utvrđeno postojanje asocijacije prisustva pojedinih kompozitnih genotipova i pripadnosti ispitanika kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi χ^2 testom nezavisnosti (Tab. 23).

Tabela 23. Povezanost kompozitnih genotipova apoE i LRP1 gena i metaboličkog sindroma

	$\chi^2=76,62$ $p=0,000$	Kompozitni genotip										Ukupno
		e2e3/cc	e2e4/cc	e2e4/ct	e3e3/cc	e3e3/ct	e3e4/cc	e3e4/ct	e4e4/cc	e4e4/ct	e4e4/tt	
Kontrolna grupa	emp.	4	0	0	17	4	4	0	1	0	0	30
	oček.	1,29	0,65	0,97	5,48	1,29	12,26	4,84	0,32	1,29	1,61	30,00
Eksperimentalna grupa	emp.	0	2	3	0	0	34	15	0	4	5	63
	oček.	2,71	1,35	2,03	11,52	2,71	25,74	10,16	0,68	2,71	3,39	63,00
Ukupno	emp.	4	2	3	17	4	38	15	1	4	5	93
	oček.	4,00	2,00	3,00	17,00	4,00	38,00	15,00	1,00	4,00	5,00	93,00

emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

χ^2 testom nezavisnosti je utvrđeno da postoji veza između prisustva različitih kompozitnih genotipova i MetS (veza između prisustva različitih kompozitnih genotipova i pripadnosti eksperimentalnoj grupi) na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=76,62$).

Potom su putem χ^2 testa nezavisnosti, ustanovljene veze između prisustva različitih kompozitnih genotipova u ukupnom ispitivanom uzorku i vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra koje odstupaju od zadatih referentnih vrednosti za: ITM>30kg/m²; OS>80cm ♀, OS>94cm ♂; SKP>130mmHg; DKP>85mmHg; HDL< 1,3mmol/l ♀, HDL<1,04mmol/l♂; LDL>3 mmol/l; CRP >10mg/l (Tab. 24).

Na osnovu rezultata χ^2 testa nezavisnosti utvrđeno je da postoji veza između prisustva različitih kompozitnih genotipova i vrednosti:

- ITM iznad 30kg/m² na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=54,4528$)
- OS iznad 80cm za žene i 94cm za muškarce na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=41,7566$)
- SKP>130mmHg na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=22,7929$)
- DKP>85mmHg na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=19,8586$)
- LDL>3 mmol/l na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=28,3929$)
- CRP >10mg/l na nivou $p<0,01$ ($\chi^2=76,62$)

Tabela 24. Povezanost kompozitnih genotipova i merenih parametara

χ^2 -test	Granične vrednosti parametara	frekvencije	Kompozitni genotipovi									Ukupno	
			e2e3/cc	e2e4/cc	e2e4/ct	e3e3/cc	e3e3/ct	e3e4/cc	e3e4/ct	e4e4/cc	e4e4/ct		e4e4/ft
$\chi^2=54,4528$ p=0,000	ITM>30kg/m ²	emp.	0	2	3	4	0	32	0	15	4	5	65
		oček.	2,79	1,39	2,09	11,88	2,79	26,55	10,48	0,69	2,79	3,49	65,00
	ITM<30kg/m ²	emp.	4	0	0	13	4	6	0	1	0	0	28
		oček.	1,20	0,60	0,90	5,11	1,20	11,44	4,51	0,30	1,20	1,50	28,00
$\chi^2=41,7566$ p=0,000	OS>80cm _♀ , OS>94cm _♂	emp.	2	2	3	8	0	35	15	1	4	5	75
		oček.	3,22	1,61	2,41	13,70	3,22	30,64	12,09	0,80	3,22	4,03	75,00
	OS<80cm _♀ , OS<94cm _♂	emp.	2	0	0	9	4	3	0	0	0	0	18
		oček.	0,77	0,38	0,58	3,29	0,77	7,35	2,90	0,19	0,77	0,96	18,00
$\chi^2=22,7929$ p=0,000	SKP>130mmHg	emp.	1	2	3	7	0	27	9	1	4	5	59
		oček.	2,53	1,26	1,90	10,78	2,53	24,10	9,51	0,63	2,53	3,17	59,00
	SKP<130mmHg	emp.	3	0	0	10	4	11	6	0	0	0	34
		oček.	1,46	0,73	1,09	6,21	1,46	13,89	5,48	0,36	1,46	1,82	34,00
$\chi^2=19,8586$ p=0,012	DKP>85mmHg	emp.	0	1	2	4	0	20	8	1	4	4	44
		oček.	1,89	0,94	1,41	8,04	1,89	17,97	7,09	0,47	1,89	2,36	44,00
	DKP>85mmHg	emp.	4	1	1	13	4	18	7	0	0	1	49
		oček.	2,10	1,05	1,58	8,95	2,10	20,02	7,90	0,52	2,10	2,63	49,00
$\chi^2=12,7310$ p=0,175	TG>1,7mmol/l	emp.	2	2	2	12	0	16	9	1	3	2	49
		oček.	2,10	1,05	1,58	8,95	2,10	20,02	7,90	0,52	2,10	2,63	49,00
	TG<1,7mmol/l	emp.	2	0	1	5	4	22	6	0	1	3	44
		oček.	1,89	0,94	1,41	8,04	1,89	17,97	7,09	0,47	1,89	2,36	44,00
$\chi^2=16,5515$	HDL<1,3mmol/l _♀ , HDL<1,04mmol/l _♂	emp.	1	1	2	9	0	28	11	1	4	4	61
		oček.	2,62	1,31	1,96	11,15	2,62	24,92	9,83	0,65	2,62	3,27	61,00

χ^2 -test	Granične vrednosti parametara	frekvencije	Kompozitni genotipovi									Ukupno	
			e2e3/cc	e2e4/cc	e2e4/ct	e3e3/cc	e3e3/ct	e3e4/cc	e3e4/ct	e4e4/cc	e4e4/ct		e4e4/ft
p=0,051	HDL>1,3mmol/l♀, HDL>1,04mmol/l♂	emp.	3	1	1	8	4	10	4	0	0	1	32
		oček.	1,37	0,68	1,03	5,84	1,37	13,07	5,16	0,34	1,37	1,72	32,00
$\chi^2=28,3929$	LDL>3 mmol/l	emp.	2	1	3	5	4	27	15	0	3	5	65
		oček.	2,79	1,39	2,09	11,88	2,79	26,55	10,48	0,69	2,79	3,49	65,00
p=0,000	LDL<3 mmol/l	emp.	2	1	0	12	0	11	0	1	1	0	28
		oček.	1,20	0,60	0,90	5,11	1,20	11,44	4,51	0,30	1,20	1,50	28,00
$\chi^2=13,2267$	Glikemija >5,6mmol/l	emp.	0	1	1	1	0	11	4	0	3	1	22
		oček.	0,94	0,47	0,70	4,02	0,94	8,98	3,54	0,23	0,94	1,18	22,00
p=0,154	Glikemija <5,6mmol/l	emp.	4	1	2	16	4	27	11	1	1	4	71
		oček.	3,05	1,52	2,29	12,97	3,05	29,01	11,45	0,76	3,05	3,81	71,00
$\chi^2=76,62$	CRP >10mg/l	emp.	0	0	0	1	0	18	8	0	2	2	31
		oček.	1,33	0,66	1,00	5,66	1,33	12,66	5,00	0,33	1,33	1,66	31,00
p=0,000	CRP <10mg/l	emp.	4	2	3	16	4	20	7	1	2	3	63
		oček.	2,66	1,33	2,00	11,33	2,66	25,33	10,00	0,66	2,66	3,33	63,00
Ukupno		emp.	4	2	3	17	4	38	15	1	4	5	93
		oček.	4,00	2,00	3,00	17,00	4,00	38,00	15,00	1,00	4,00	5,00	93,00

ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL- lipoproteini male gustine; CRP-C reaktivni protein; emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Analiza varijanse

Istražene su razlike u antropometrijskim i biohemijskim parametrima između ispitanika sa različitim kompozitnim genotipom, koje su ispitane jednofaktorskom multivarijacionom analizom varijanse, kao i jednofaktorskim univarijacionim analizama varijanse, za svaki parametar posebno. Naknadnim poređenjima aritmetičkih sredina navedenih parametara Tukey-evim HSD testom utvrđene su statistički značajne razlike između pojedinačnih kompozitnih genotipova u merenim antropometrijskim i biohemijskim parametrima.

Jednofaktorska multivarijaciona analiza varijanse

Jednofaktorskom multivarijacionom analizom varijanse istražena je razlika u antropometrijskim i biohemijskim parametrima između ispitanika sa različitim kompozitnim genotipom. Kao zavisna promenljiva analizirana je linearna kombinacija sledećih parametara: TM, ITM, OS, SKP, DKP, ukupni holesterol, TG, HDL, LDL, LDL/HDL, glikemija našte i CRP. Na osnovu dobijenih rezultata analize utvrđena je statistički značajna razlika između ispitanika sa različitim kompozitnim genotipom u linearnoj kombinaciji navedenih parametara na nivou $p < 0,01$, dok je statistika F testa izračunata kao količnik faktorske i rezidualne varijanse po formuli: $F = VA/VR$, iznosila 2,61.

Jednofaktorska univarijaciona analiza varijanse

Jednofaktorskom univarijacionom analizom varijanse istraženo je postojanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara pacijenata sa različitim kompozitnim genotipovima (Tab. 25).

Tabela 25. Jednofaktorska univarijaciona analiza varijanse

Jednofaktorska univarijaciona analiza varijanse		F	p
Kompozitni genotip	TM**	3,54	0,000
	ITM**	8,08	0,000
	OS**	11,78	0,000
	SKP**	3,44	0,000
	DKP*	2,46	0,010
	LDL**	18,98	0,000
	LDL/HDL**	4,80	0,000
	CRP*	2,15	0,031

ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine, CRP-C reaktivni protein; Statistika F testa je količnik faktorske i rezidualne varijanse; F=VA/VR; **p<0,01; *p<0,05

Za parametre kod kojih je, na osnovu dobijenih rezultata analize varijanse, utvrđena statistički značajna razlika može se zaključiti da postoji sistematski uticaj kompozitnih genotipova.

Jednofaktorskom analizom varijanse nije utvrđena statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina te ni uticaj kompozitnih genotipova za sledeće parametre:

- Uk. kolesterol
- TG
- HDL
- Glikemija našte

Tukey HSD test

Naknadnim poređenjima aritmetičkih sredina navedenih parametara Tukey-evim HSD testom utvrđene su sledeće statistički značajne razlike:

- Za parametar **TM** između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/cc i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/ct; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/ct i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/ct i e4e4/tt.
- Za parametar **ITM** između pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e3/cc i

pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e3e4/ct, e4e4/ct i e4e4/tt; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/cc i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/ct, e3e4/ct i e4e4/tt; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/ct i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/ct i e4e4/tt.

- Za parametar **OS** između pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e3/cc i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e3e4/ct, e4e4/ct i e4e4/tt; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/cc i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/ct, e3e4/ct i e4e4/tt; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/ct i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/ct, e4e4/tt, e2e4/ct i e3e4/ct.
- Za parametar **SKP** između pacijenata sa kompozitnim genotipom e4e4/tt i pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e3/cc, e3e3/cc i e3e3/ct.
- Za parametar **LDL** između pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e3/cc i pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e4/ct, e3e3/ct i e3e4/ct; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e4/ct i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/cc i e4e4/ct; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/cc i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/ct, e4e4/tt, e2e4/ct, e3e4/cc i e3e3/ct; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e3/ct i pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/cc, e4e4/cc i e4e4/ct.
- Za parametar **LDL/HDL** između pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e3/cc i pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e4/ct; između pacijenata sa kompozitnim genotipom e3e4/ct i pacijenata sa kompozitnim genotipom e2e3/cc, e3e3/cc i e3e4/cc.

Unakrsni odnosi (engl. odds ratio,OR)

Daljom obradom podataka izračunate su vrednosti „unakrsnih odnosa“ (OR – Odds ratio) za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra u odnosu na prisustvo različitih kompozitnih genotipova (Tab. 26).

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da prisustvo kompozitnog genotipa e3e4/cc kod ispitanika višestruko povećava šansu za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti ITM (3,55 puta), OS (4,37 puta) i CRP-a (2,9 puta) u odnosu na nosioce ostalih kompozitnih genotipova. Prisustvo kompozitnog genotipa e4e4/ct kod ispitanika višestruko povećava šansu za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti glikemije našte (11,05 puta) u odnosu na nosioce ostalih kompozitnih genotipova.

Tabela 26. OR za kompozitne genotipove i merene parametre

Vrednosti parametara	Kompozitni genotipovi	e2e3/cc	e2e4/cc	e2e4/ct	e3e3/cc	e3e3/ct	e3e4/cc	e3e4/ct	e4e4/cc	e4e4/ct	e4e4/tt
ITM>30kg/m ²	OR CI (95%) p	/	/	/	0,07 0,02-0,26 >0,05	/	3,55 1,27-9,91 <0,05	/	/	/	/
OS>80cm [♀] OS>94cm [♂]	OR CI (95%) p	0,21 0,02-1,67 >0,05	/	/	0,11 0,03-0,38 >0,05	/	4,37 1,16-16,37 <0,05	/	/	/	/
SKP>130mmHg	OR CI (95%) p	0,17 0,01-1,78 >0,05	/	/	0,32 0,10-0,95 >0,05	/	1,76 0,73-4,26 >0,05	0,84 0,27-2,60 >0,05	/	/	/
DKP>85mmHg	OR CI (95%) p	/	1,11 0,06-18,39 >0,05	2,28 0,20-26,11 >0,05	0,27 0,08-0,92 >0,05	/	1,43 0,62-3,29 >0,05	1,33 0,44-4,03 >0,05	/	/	4,8 0,51-44,69 >0,05
Uk.holesterol>5,2mmol/l	OR CI (95%) p	1,85 0,18-18,55 >0,05	0,59 0,03-9,85 >0,05	/	3,93 0,89-12,8 >0,05	/	0,06 0,02-0,19 >0,05	/	/	0,18 0,01-1,87 >0,05	/
TG>1,7mmol/l	OR CI (95%) p	0,89 0,12-6,62 >0,05	/	1,82 0,16-20,90 >0,05	2,52 0,81-7,87 >0,05	/	0,48 0,20-1,12 >0,05	1,42 0,46-4,38 >0,05	/	/	0,58 0,09-3,65 >0,05
HDL<1,3mmol/l [♀] <1,04mmol/l [♂]	OR CI (95%) p	0,16 0,01-1,61 >0,05	0,51 0,03-8,54 >0,05	1,05 0,09-12,05 >0,05	0,51 0,17-1,51 >0,05	/	1,86 0,75-4,59 >0,05	1,54 0,44-5,29 >0,05	/	/	2,17 0,23-20,32 >0,05
LDL>3mmol/l	OR CI (95%) p	0,41 0,05-3,08 >0,05	0,42 0,02-6,99 >0,05	/	0,11 0,03-0,36 >0,05	/	1,09 0,44-2,71 >0,05	/	/	1,30 0,12-13,13 >0,05	/
Glikemija>5,6mmol/l	OR CI (95%) p	/	/	/	0,16 0,02-1,31 >0,05	/	1,62 0,62-4,27 >0,05	1,21 0,34-4,27 >0,05	/	11,05 1,08-112,3 <0,05	0,79 0,08-7,53 >0,05
CRP>10mg/l	OR CI (95%) p	/	/	/	0,09 0,01-0,76 >0,05	/	2,90 1,19-7,08 <0,05	2,73 0,88-8,41 >0,05	/	2,06 0,27-15,43 >0,05	1,35 0,21-8,57 >0,05

Izračunatim vrednostima za OR ustanovljeno je da prisustvo e3e4/cc kompozitnog genotipa kod ispitanika višestruko povećava šansu (7,62 puta) za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce ostalih kompozitnih genotipova (Tab. 27).

Tabela 27. OR za kompozitne genotipove i pojavu metaboličkog sindroma

Kompozitni genotip	Eksperimentalna grupa (MetS)	
e3e4/cc	OR	7,62
	CI (95%)	2,38-24,39
	P	<0,05
Ostali kompozitni genotipovi	OR	0,13
	CI (95%)	0,05-0,73
	P	>0,05

6.5 Zavisnost pojave metaboličkog sindroma u odnosu na pol

U daljem istraživanju utvrđeno je da li postoji uticaj pola na ulogu genetičkih determinanti u pojavi i razvoju metaboličkog sindroma. Iz tog razloga χ^2 testom nezavisnosti je ispitano postojanje asocijacije muškog i ženskog pola i pripadnosti ispitanika kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi, a rezultati su prikazani tabelama kontigencije (Tab. 28).

Tabela 28. Povezanost pola i metaboličkog sindroma

$\chi^2=3,40869$ $p=0,060$	Pol				Ukupno	
	ženski		muški		emp.	oček.
	emp.	oček.	emp.	oček.		
Kontrolna grupa	11	15,16	19	14,83	63	63,00
Eksperimentalna grupa	36	31,83	27	31,16	30	30,00
Ukupno	47	47,00	46	46,00	93	93,00

emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Na osnovu rezultata χ^2 testa nezavisnosti utvrđeno je da ne postoji veza između polne pripadnosti i pripadnosti eksperimentalnoj ili kontrolnoj grupi.

Zatim je χ^2 testom nezavisnosti utvrđena asocijacija prisustva pojedinih genotipova apoE i LRP1 gena i pripadnosti ispitanika muškom i ženskom polu za svaku grupu pojedinačno (Tab. 29). Na osnovu rezultata χ^2 testa nezavisnosti utvrđeno je ne postoji veza između prisustva različitih genotipova apoE gena i prisustva različitih genotipova LRP1 gena i pripadnosti muškom ili ženskom polu ni u kontrolnoj ni u eksperimentalnoj grupi.

Tabela 29. Povezanost genotipova apoE i LRP1 gena i pola

χ^2 test	apoE genotip		e3e4		e4e4		e2e4		e3e3		e2e3		Ukupno	
	frekvencije		emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.	emp.	oček.
$\chi^2=1,13$ 807 p=0,761	Kontr. grupa	♀	1	1,46	0	0,36	/	/	8	7,70	2	1,46	11	11,00
		♂	3	2,53	1	0,63	/	/	13	13,30	2	2,53	19	19,00
		ukupno	4	4,00	1	1,00	/	/	21	21,00	4	4,00	30	30,00
$\chi^2=3,4333$ 3 p=0,172	Eksp. grupa	♀	31	28,00	3	5,14	2	2,85	/	/	/	/	36	36,00
		♂	18	21,00	6	3,85	3	2,14	/	/	/	/	27	27,00
		ukupno	49	49,00	9	9,00	5	5,00	/	/	/	/	63	63,00
χ^2 test	LRP1 genotip		CC		CT		TT		Ukupno					
	frekvencije		emp.	oček.	emp.	oček.	emp.		oček.		emp.	oček.		
$\chi^2=0,71$ 7703 p=0,39 5	Kontr. grupa	♀	10	9,16	1	1,83	/	/	11	11,00	10	9,16		
		♂	15	15,83	4	3,16	/	/	19	19,00	15	15,83		
		ukupno	25	25,00	5	5,00	/	/	30	30,00	25	25,00		
$\chi^2=3,09$ 219 p=0,21 1	Eksp. grupa	♀	22	21,14	1	12,00	/	/	36	36,00	22	21,14		
		♂	15	15,85	4	9,00	/	/	27	27,00	15	15,85		
		ukupno	25	25,00	5	5,00	/	/	63	63,00	25	25,00		

Eksp. grupa- ekperimentalna grupa; Kontr. grupa- kontrolna grupa; emp.-empirijske frekvencije; oček.-očekivane frekvencije

Primenom Studentovog t-testa testirano je postojanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara između i muškog i ženskog pola unutar kontrolne (Tab. 30), eksperimentalne (Tab. 31), kao i unutar obe ispitivane grupe (Tab. 32).

Tabela 30. Studentov t-test između ženskog i muškog pola kontrolne grupe

Kontrolna grupa	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	Ženski pol	Muški pol		
Starost*	43,8182	35,7368	2,35485	0,022
TM	80,4545	90,2632	-0,91307	0,365
TV**	146,0000	184,1053	-3,90905	0,001
ITM*	23,5727	26,9421	-2,51580	0,011
OS**	75,7273	94,9474	-5,89853	0,000
SKP**	112,2727	125,2632	-3,63457	0,000
DKP**	70,0000	81,5789	-3,33414	0,000
Uk,holesterol	5,7145	4,9068	1,90301	0,064
TG**	0,8200	5,1679	-7,91517	0,000
HDL	1,4318	1,4563	-0,10262	0,915
LDL**	3,9100	1,3442	9,53216	0,000
Non HDL	4,2836	3,8753	1,25505	0,213
LDL/HDL*	2,8664	3,5026	-2,05164	0,042
Glikemija	4,5391	4,7468	-0,80811	0,420
IRI	7,4455	9,0184	-0,96056	0,348
HOMA IR1	1,4979	1,9767	-1,17896	0,248
CRP	1,9909	1,8158	0,12568	0,900

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni holesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL- ukupan holesterol bez HDL holesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

Utvrđena je statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara ženskog i muškog pola kontrolne grupe za sledeće parametre na nivou:

p<0,01; TV, OS, SKP, DKP, Uk. Holesterol, TG, LDL.

p<0,05 ; Starost, ITM, LDL/HDL.

Tabela 31. Studentov t-test između ženskog i muškog pola eksperimentalne grupe

Eksperimentalna grupa	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	Ženski pol	Muški pol		
Starost	43,0000	40,8889	-0,64646	0,523
TM*	113,8972	135,8296	2,61263	0,011
TV**	163,8611	180,1852	8,11922	0,000
ITM	41,2347	41,8481	0,26674	0,798
OS*	120,9583	131,9630	2,42348	0,010
SKP	137,2222	142,2222	1,00513	0,312
DKP	87,5000	92,4074	1,36618	0,176
Uk,holesterol	5,7017	5,1933	-1,44248	0,154
TG	2,2531	1,9359	-0,42267	0,675
HDL*	1,0233	0,8974	-2,32800	0,021
LDL	3,8617	3,4289	-1,58830	0,112
Non HDL	4,6761	4,2959	-1,15389	0,255
LDL/HDL	3,8458	3,8767	0,12086	0,902
Glikemija	5,3344	4,9815	-1,01086	0,314
IRI	13,9961	17,0911	1,36141	0,175
HOMA IR1	3,5239	3,8084	0,43075	0,665
CRP	14,1806	10,5370	-1,14184	0,257

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase;OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL- ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

Utvrđena je statistički značajna razlika između između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara ženskog i muškog pola eksperimentalne grupe za sledeće parametre na nivou:

p<0,01; TV

p<0,05 ; Starost, TM, OS, HDL.

Tabela 32. Studentov t-test između ženskog i muškog pola ispitivanih grupa

Ispitivane grupe	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	Ženski pol	Muški pol		
Starost	43,1915	38,7609	-1,81290	0,071
TM	106,0702	117,0087	1,44388	0,153
TV**	159,6809	181,8043	6,41011	0,000
ITM	37,1011	35,6913	-0,63480	0,523
OS	110,3723	116,6739	1,24733	0,214
SKP	131,3830	135,2174	0,95320	0,342
DKP	83,4043	87,9348	1,53686	0,121
Uk,holesterol*	5,6987	5,0696	-2,33603	0,020
TG*	1,9177	3,2709	2,31559	0,024
HDL	1,1189	1,1283	0,09902	0,928
LDL**	3,8730	2,5678	-5,21520	0,000
Non HDL	4,5843	4,1222	-1,89270	0,063
LDL/HDL	3,6166	3,7222	0,51285	0,604
Glikemija	5,1483	4,8846	-1,04954	0,298
IRI	12,4630	13,7567	0,73948	0,468
HOMA IR1	3,0497	3,0519	0,00433	0,997
CRP	11,3277	6,9348	-1,83973	0,063

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

Utvrđena je statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara ženskog i muškog pola ispitivanih grupa za sledeće parametre na nivou:

p<0,01; TV, Uk. Holesterol, LDL,

p<0,05 ; TG.

Zatim je primenom Studentovog t-testa testirano postojanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara između nosilaca e3e3 i e3e4 genotipa unutar obe ispitivane grupe (Tab. 33), među pripadnicama ženskog pola (Tab. 34) i među pripadnicima muškog pola (Tab.35) .

Tabela 33. Studentov t-test između e3e3 i e3e4 genotipa ispitivanih grupa

Ispitivane grupe	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	e3e3	e3e4		
Starost	38,4762	40,1887	-0,54686	0,586165
TM	85,6667	118,5736	-3,90381	0,000211
TV	171,0000	171,1321	-0,02994	0,976201
ITM	26,7762	39,8066	-5,94690	0,000000
OS	89,4286	120,3302	-6,92426	0,000000
SKP	120,4762	135,5660	-3,42031	0,001034
DKP	77,6190	87,7358	-2,90219	0,004914
Uk,holesterol	5,6967	5,3738	0,93769	0,351538
TG	1,1076	2,0709	-1,38589	0,170057
HDL	1,2071	0,9836	3,46324	0,000902
LDL	2,3314	3,5025	-3,49111	0,000826
Non HDL	4,0943	4,3928	-0,94260	0,349037
LDL/HDL	3,3686	3,8075	-1,77517	0,080096
Glikemija	4,5724	5,1349	-1,71869	0,089969
IRI	9,0524	14,7296	-2,75804	0,007366
HOMA IR1	1,8798	3,4797	-2,70846	0,008440
CRP	2,3333	12,3132	-3,73574	0,000372

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni holesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan holesterol bez HDL holesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

Utvrđena je statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara nosilaca e3e3 i e3e4 genotipa unutar obe ispitivane grupe, na nivou $p < 0,01$ za: TM, ITM, OS, SKP, DKP, HDL, LDL, IRI, HOMA IR1 i CRP

Tabela 34. Studentov t-test između e3e3 i e3e4 genotipa za ženski pol

Ženski pol ukupnog uzorka	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	e3e3	e3e4		
Starost	43,1250	42,3125	0,16951	0,866
TM*	77,7500	112,4125	-2,32616	0,025
TV	151,3750	164,0000	-1,97639	0,055
ITM**	25,6875	40,4203	-4,08279	0,000
OS**	81,3750	118,5156	-5,17319	0,000
SKP**	113,1250	132,8125	-3,07120	0,003
DKP*	71,2500	85,3125	-2,46979	0,018
Uk,holesterol	5,8650	5,6025	0,45343	0,652
TG	0,8850	2,2038	-0,93217	0,357
HDL*	1,3387	1,0484	2,49576	0,017
LDL	4,1237	3,7859	0,76170	0,450
Non HDL	4,5263	4,5528	-0,04896	0,961
LDL/HDL	3,1187	3,7409	-1,53382	0,133
Glikemija	4,3812	5,3322	-1,51444	0,138
IRI	8,5750	14,0581	-1,67316	0,102
HOMA IR1	1,6900	3,5515	-1,71712	0,094
CRP*	2,6375	12,5344	-2,68151	0,010

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

Utvrđena je statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara nosilaca e3e3 i e3e4 genotipa kod pripadnica ženskog pola,

na nivou $p < 0,01$ za: ITM, OS, SKP

na nivou $p < 0,05$ za TM, TV, DKP, HDL i CRP

Tabela 35. Studentov t-test između e3e3 i e3e4 genotipa za muški pol

Muški pol ukupnog uzorka	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	e3e3	e3e4		
Starost	35,6154	36,9524	-0,32353	0,748
TM**	90,5385	127,9619	-4,34392	0,000
TV	183,0769	182,0000	0,37933	0,706
ITM**	27,4462	38,8714	-4,10893	0,000
OS**	94,3846	123,0952	-5,16853	0,000
SKP*	125,0000	139,7619	-2,39347	0,022
DKP*	81,5385	91,4286	-2,42427	0,021
Uk,holesterol	5,5931	5,0252	1,39938	0,171
TG	1,2446	1,8686	-1,70509	0,097
HDL**	1,1262	0,8848	4,76925	0,000
LDL**	1,2285	3,0705	-5,79023	0,000
Non HDL	3,8285	4,1490	-0,90059	0,374
LDL/HDL	3,5223	3,9090	-1,23889	0,224
Glikemija	4,6900	4,8343	-0,56930	0,573
IRI*	9,3462	15,7529	-2,33321	0,026
HOMA IRI*	1,9966	3,3702	-2,30619	0,027
CRP*	2,1462	11,9762	-2,37263	0,023

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL-lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI- insulin; HOMA IRI-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

Utvrđena je statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara nosilaca e3e3 i e3e4 genotipa kod pripadnika muškog pola,

na nivou p<0,01 za: TM, ITM, OS, HDL, LDL

na nivou p<0,05 za SKP, DKP, IRI, HOMA IRI i CRP

Primenom Studentovog t-testa testirano postojanje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara između ženskog i muškog pola unutar grupe nosilaca e3e4 genotipa (Tab. 36).

Tabela 36. Studentov t-test između ženskog i muškog pola e3e4 genotipa.

e3e4 grupa	Aritmetička sredina		t-statistika	p-vrednost
	Ženski pol	Muški pol		
Starost	42,3125	36,9524	1,47032	0,147
TM	112,4125	127,9619	-1,60121	0,115
TV**	164,0000	182,0000	-9,00447	0,000
ITM	40,4203	38,8714	0,56716	0,573
OS	118,5156	123,0952	-0,85373	0,397
SKP	132,8125	139,7619	-1,32009	0,192
DKP	85,3125	91,4286	-1,52112	0,134
Uk,holesterol	5,6025	5,0252	1,43187	0,158
TG	2,2038	1,8686	0,37397	0,709
HDL*	1,0484	0,8848	2,29495	0,025
LDL*	3,7859	3,0705	2,27090	0,027
Non HDL	4,5528	4,1490	1,08093	0,284
LDL/HDL	3,7409	3,9090	-0,58189	0,563
Glikemija	5,3322	4,8343	1,23334	0,223
IRI	14,0581	15,7529	-0,66717	0,507
HOMA IR1	3,5515	3,3702	0,24476	0,807
CRP	12,5344	11,9762	0,16529	0,869

TM-telesna masa; TV-telesna visina, ITM-indeks telesne mase; OS-obim struka, SKP-sistolni krvni pritisak; DKP-dijastolni krvni pritisak; Uk.holesterol-ukupni kolesterol; TG-trigliceridi; HDL- lipoproteini velike gustine; LDL- lipoproteini male gustine; Non HDL-ukupan kolesterol bez HDL kolesterola; LDL/HDL-index ateroskleroze; IRI-insulin; HOMA IR1-homeostasis model assesment of insuline resistance; CRP-C reaktivni protein

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

Utvrđena je statistički značajna razlika između aritmetičkih sredina antropometrijskih i biohemijskih parametara ženskog i muškog pola nosilaca e3e4 genotipa.

na nivou $p < 0,01$ za: TV

na nivou $p < 0,05$ HDL, i LDL

7 DISKUSIJA

Određivanje doprinosa polimorfizma apoE gena kao i njegovih receptora među kojima je LRP1 je veoma značajno u istraživanju metabolizma lipoproteina i lipida. Struktura izoforme ApoE ili LRP1 može da objasni razlike u afinitetu ApoE za receptor u fiziološkim i patološkim stanjima. Na osnovu važne uloge apoE gena u lipidnom i lipoproteinskom metabolizmu, sasvim je sigurno da apoE polimorfizam, kao i polimorfizam LRP1 gena, čiji produkt predstavlja glavni apoE receptor u jetri i mozgu, mogu služiti kao potencijalna determinanta metaboličkog sindroma, koji karakteriše skup metaboličkih poremećaja među kojima su i poremećen lipidni i lipoproteinski metabolizam

7.1 Analiza antropometrijskih i biohemijskih parametara

Poređenjem eksperimentalne grupe ispitanika sa kontrolnom grupom u merenim antropometrijskim i biohemijskim parametrima utvrđeno je više statistički značajnih razlika, što je i očekivano.

Što se tiče uzrasta i pola, nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih grupa što nam ukazuje da je uzorak ujednačen.

U eksperimentalnoj grupi nađena je značajno veća vrednost: telesne mase, indeksa telesne mase, obima struka, sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, kao i nivoa triglicerida, HDL, LDL, LDL/HDL, insulina, HOMA IR i CRP-a, što je i očekivano posebno za OS, SKP, DKP, TG i HDL koji su determinante MetS po IDF definiciji. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika za neke očekivane parametre kao što je nivo Non HDL holesterola ($p=0,06$) i glikemije našte ($p=0,06$), koja je i jedan od parametara iz IDF definicije MetS, p vrednosti koje su veoma blizu praga značajnosti, ukazuju da bi eventualno veći broj uključenih subjekata doveo do značajnih razlika i u ovim parametrima.

7.2 Polimorfizam apoE gena i metabolički sindrom

Na osnovu testiranja povezanosti između prisustva varijanti apoE gena i metaboličkog sindroma, kao i povezanosti različitih genotipova apoE gena i vrednosti svakog pojedinačnog antropometrijskog i biohemijskog parametra koje odstupaju od

zadatih, zatim analizom varijanse i na osnovu vrednosti unakrsnih odnosa (OR), pokazano je da polimorfizam apoE gena ispoljava različite povezanosti sa determinantama metaboličkog sindroma.

U radu je determinisano pet genotipova od kojih je najzastupljeniji e3e4, zatim e3e3, potom e4e4, pa e2e4 i na kraju e2e3. Genotip e2e2 nije detektovan. Sima i sar. (85) su u svom istraživanju utvrdili najčešću pojavu e3e3 genotipa, zatim e3e4, potom e2e3, pa e2e2, zatim e4e4 i na kraju e2e4 sa najnižom frekvencijom pojavljivanja. Utvrđene razlike u učestalosti apoE genotipova mogu biti posledica samih etničkih razlika, ali i manjeg broja subjekata u našem istraživanju. U grupi pacijenata uočava se statistički značajno veći broj osoba genotipa e3e4 u odnosu na kontrolu, što je u saglasnosti sa Sima i sar (85) .

Analiza distribucije apoE alela u ispitivanoj i kontrolnoj grupi, prema očekivanju pokazuje statistički značajno veću frekvenciju alela e4 u eksperimentalnoj grupi. I u drugim studijama nađena je slična korelacija prisustva alela e4 apoE gena i pojave MetS (85,103, 121, 122) .

U populaciji zdravih osoba Srbije alel e3 nađen je u 73,6% slučajeva, e2 14,9% i e4 11,5% (121). U istraživanju Djan (86) u populaciji zdravih osoba frekvencija e3 alela bila je najviša, zatim e4, pa e2, gde se uočava smanjena frekvencija alela e2 i povećana frekvencija alela e3 u odnosu na Stanković i sar. (121), dok je u grupi pacijenata obolelih od ishemijske bolesti srca (IBS) povećana frekvencija e4 alela, a smanjena e3, dok je frekvencija e2 alela vrlo slična u ovom radu. Frekvencije alela u kontrolnoj grupi naših rezultata pokazuju da je najzastupljeniji alel e3, zatim e4, pa e2 alel (e3 83,33% i e4 10%, e2 6,67%), što je veoma slično sa Stanković i sar. (121) i Djan (86), osim za e2 alel čija se zastupljenost razlikuje u oba navedena istraživanja. Dok su u eksperimentalnoj grupi aleli bili zastupljeni u frekvenciji za e2 3,97%, e3 40,48%, e4 55,56%, što nije u saglasnosti sa eksperimentalnom grupom Djan (86) za frekvencije e3 i e4 alela. Objašnjenje za ova odstupanja može biti razlika eksperimentalnih grupa, jer je u istraživanju Djan (86) grupu sačinjavao isključivo muški pol mlađi od 45 godina, oboleli od IBS, a naše istraživanje uključuje uzrast od 19-60 godina obolelih od MetS gde je veći značaj poremećenog lipidnog metabolizma. Olivieri i sar. (103) su u grupi obolelih od MetS ustanovili sledeće alelne frekvencije za e2 alel 6,5%, e3 alel 79,55% i e4 alel 14%. U poređenju sa navedenim rezultatima Olivieri i sar.(103), naši rezultati ukazuju na višu frekvenciju e4 alela i nižu

frekvenciju e3 alela u eksperimentalnoj grupi, a razlike mogu biti posledica formiranja eksperimentalne grupe, jer su Olivieri i sar. (103) u svoje istraživanje uključili veći broj subjekata isključivo muškog pola. Ista grupa autora je u kontrolnoj grupi ustanovila frekvenciju e3 alela od 86,2%, e4 alela od 7,7% i e2 alela od 6,1%. Frekvencije sva tri alela u kontrolnoj grupi našeg istraživanja pokazale su veoma slične frekvencije sa pomenutom grupom autora. Analiza apoE polimorfizma Sima i sar. (85) je pokazala alelne frekvencije sledećeg redosleda: e3 (79,5%), e4 (11,04%), e2 (9,46%), čime su potvrdili sličnu distribuciju alela u rumunskoj populaciji kao u drugim populacijama belaca. Utvrđeni rezultati su takođe pokazali najveću frekvenciju e3 alela (54,3%), zatim e4 (40,86%) što je više nego kod pomenutih autora i frekvencija e2 (4,84%) što je nešto niže od rezultata Sima i sar. (85).

Utvrđena statistički značajna razlika u frekvencijama alela između grupe obolelih od MetS i kontrolne grupe pokazuje da se apoE polimorfizam, odnosno e4 alel, može smatrati veoma važnim nezavisnim faktorom rizika za razvoj metaboličkog sindroma.

Sima i sar. (85) su ustanovili da je frekvencija e4 alela značajno viša u grupi obolelih od MetS u poređenju sa kontrolama i da e4 alel ima pozitivnu korelaciju sa povišenim nivoom TG, glukoze, ITM, a negativno korelira sa nivoima HDL-a. Rezultati našeg istraživanja su u skladu sa Sima i sar. (85) što se tiče ITM, glukoze i HDL holesterola, a takođe je i e4 alel značajno frekventniji u grupi obolelih ($p=0,000$). Prema Scuteri i sar. (122) utvrđena je pozitivna korelacija između e4 alela i viših nivoa glukoze našte, a prema Stiefel i sar. (123) je pronađena pozitivna korelacija između e4 i nivoa insulina. Olivieri i sar. (103) nisu utvrdili značajno više nivoe glukoze našte kod e4 nosilaca u odnosu na nosioce druga dva alela, kod subjekata koji nisu oboleli od dijabetesa. Rezultati istraživanja obe ispitivane grupe su potvrdili vezu između e4 alela i nivoa glukoze kao kod Scuteri i sar. (122) na osnovu dobijenih vrednosti OR (OR=2,21 95% CI 1,11-4,39). U našem istraživanju, analizom varijanse, utvrđen je i značajan uticaj e3e4 i e4e4 genotipova na nivo insulina na osnovu dobijene p vrednosti ($p=0,005$), što je u saglasnosti sa Stiefel i sar (123).

Brojne populacione studije dokazale su efekat apoE alela na koncentraciju lipida u plazmi. Prosečan doprinos e4 alela u značajnom povećanju koncentracije ukupnog holesterola u zdravoj populaciji je dokazan, te je ovaj alel imenovan za predisponirajući alel

ateroskleroze. Prva istraživanja ukazala su da postoji razlika u nivou holesterola u plazmi i apoE varijante genotipa. Kontula i sar. (124) i Eggertsen i sar. (125) uočili su pozitivnu korelaciju alela e3 i e4 sa nivoom holesterola u serumu, kao i pozitivnu korelaciju e4 sa LDL holesterolom, dok nije utvrđena veza polimorfizama apoE i HDL holesterola i nivoa triglicerida u analiziranoj populaciji. Rezultati našeg istraživanja su potvrdili pozitivnu korelaciju e4 alela sa LDL holesterolom, ali je utvrđena i korelacija e4 alela sa sniženim nivoima HDL holesterola, što se ne podudara sa rezultatima Eggertsen i sar. (125). Ilveskoski i sar. (126) takođe nisu našli korelaciju apoE genotipa sa parametrima HDL holesterola i krvnog pritiska, te naši rezultati nisu u skladu sa prikazanim, jer ukazuju na uticaj apoE genotipa na snižene nivoe HDL holesterola i povećane vrednosti SKP i DKP. Chen i sar. (127) dokazali su povezanost alela e4 i broja oboljenja krvnih sudova, kao i vezu alela e4 sa povećanim nivoom ukupnog i LDL holesterola, što je potvrđeno dobijenim rezultatima za oba parametra za e4 alel. U populaciji dece iz Portugala utvrđeno je da antropometrijski parametri, procenat masne mase i krvni pritisak, kao ni nivo glukoze i HOMA IR vrednosti, nisu različiti među grupama e2e3, e3e3 i e3e4. U našem istraživanju je utvrđeno drugačije. Na osnovu dobijenih rezultata za TM, ITM, OS, SKP i DKP, između e3e3 i e3e4 grupe. Guerra i sar. (128) su kod nosilaca e3e4 genotipa ustanovili značajno viši nivo ukupnog holesterola, HDL i LDL/HDL, u odnosu na e2e3 i e3e3 nosioce, pa su naši rezultati za vrednosti LDL/HDL, dobijeni analizom varijanse sa $p=0,04$, u skladu sa navedenima, a p vrednost ukazuje da bi rezultat verovatno pokazao veću značajnost da je broj ispitanika veći. U istraživanju Djan (86) pokazano je da je u grupi ispitanika genotipa e3e4 statistički značajno veći obim struka, ITM, insulin i HOMA IR, dok za ostale parametre nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na e3e3 nosioce. Rezultati ove studije su u saglasnosti sa Djan (86) za sledeće parametre: OS ($p=0,000$), ITM ($p=0,000$), i HOMA IR ($p=0,013$), gde je za svaki parametar utvrđena statistički značajna razlika između e3e4 i e3e3 nosilaca. U istraživanju Djan (86) nije utvrđena statistički značajna razlika između grupa ispitanika genotipa e3e3 i e3e4 u koncentraciji lipida u plazmi i ukoliko se posmatra parametar, nivo LDL holesterola, uočava se da u grupi e3e3 on iznosi $3,0\pm 0,8$ mmol/l, a u grupi e3e4 $3,5\pm 1,0$ mmol/l ($p=0,098$). Interval poverenja u prikazanom istraživanju za analizirani parametar je veoma širok (OR 2,23, CI 0,78 – 6,33), što pokazuje da sa poređenjem uzoraka od 60 ispitanika, ne može da se ispolji značajnost razlika u ovom

parametru. To može biti jedan od razloga što u istraživanju Djan (86) nije uočena razlika u lipidnom statusu zavisna od apoE polimorfizama. U istraživanjima drugih autora gde je ova veza dokazana broj ispitanika se kreće od oko 250 pa sve do 10000. Dobijeni rezultati u našoj studiji u koju je uključeno 93 ispitanika, su HSD Tukey testom za svaki parametar pojedinačno utvrđene statistički značajne razlike između $\epsilon 3\epsilon 3$ i $\epsilon 3\epsilon 4$ genotipova za koncentracije lipida u plazmi: ukupni holesterol ($p=0,000$), LDL ($p=0,005$), LDL/HDL ($p=0,04$), što nije u saglasnosti sa Djan (86). Utvrđena razlika može biti posledica razlike u eksperimentalnim grupama i ukupnom broju ispitanika.

Dallongeville i sar. (99) su kroz meta analizu 9751 subjekta utvrdili da $\epsilon 3\epsilon 4$ nosioci imaju niže nivoe HDL holesterola u odnosu na $\epsilon 3\epsilon 3$ nosioce. U ovoj studiji je pokazano da $\epsilon 4$ alel povećava šansu za nizak nivo HDL na osnovu dobijenih vrednosti OR (OR=2,47, 95%CI 1,29-4,73), pa $\epsilon 3\epsilon 4$ nosioci imaju niže nivoe HDL holesterola u odnosu na $\epsilon 3\epsilon 3$ nosioce.

U studiji Oh i sar. (102) lipidni status se nije značajno razlikovao između subjekata sa $\epsilon 3\epsilon 3$ i $\epsilon 3\epsilon 4$ genotipom, međutim dobijeni rezultati naše studije su pokazali značajnu razliku u nivoima ukupnog holesterola ($p=0,000$), LDL-a ($p=0,005$), između subjekata sa $\epsilon 3\epsilon 3$ i $\epsilon 3\epsilon 4$ genotipom, dok je za HDL i LDL/HDL analizom varijanse pronađena statistička značajnost uticaja genotipa na nivo HDL-a i LDL/HDL, ali nije zabeležena značajnost između pojedinačnih genotipova post hoc testom. Primenom analize varijanse nije utvrđena značajnost uticaja genotipa na nivo TG.

Nekoliko studija je ispitalo vezu između polimorfizma apoE gena i metaboličkog sindroma u različitim populacijama. Presek istraživanja na 552 kardiovaskularna pacijenta koji nisu oboleli od dijabetesa i nisu na terapiji hipolipidemicima pokazuje da su nosioci $\epsilon 4$ alela imali pozitivnu korelaciju sa prevalencom MetS, a dobijeni rezultati naše studije se podudaraju na osnovu OR vrednosti za $\epsilon 4$ alel i povezanosti sa grupom obolelih, (OR=11,25% CI 4,51-28,05).

Alel $\epsilon 4$ je pokazao značajnu povezanost sa pojavom MetS. Olivieri i sar. (103) su analizirali pojedinačno povezanost pet komponenti MetS sa apoE genotipovima. Ustanovili su da nosioci $\epsilon 4$ alela pokazuju značajno veće prisustvo među subjektima sa povišenim krvnim pritiskom (OR 1,71 95% CI 1,09–2,68). Ovakav rezultat je potvrđen u našem istraživanju, na osnovu rezultata pojedinačno za SKP (OR 3,21 95%CI 1,66-6,19 i DKP

(OR 2,98 95%CI 1,63-5,46). Olivieri i sar. (103) nisu utvrdili značajnost prisustva e4 alela i pojave viših nivoa glukoze, centralne gojaznosti i nivoa TG, dok su naši rezultati prikazali veću šansu za povišene nivoe glukoze i centralnu gojaznost u slučaju prisustva e4 alela na osnovu OR: za glukozu (OR 2,2, 95% CI 1,11-4,39); centralnu gojaznost (OR 11 95% CI 3,23-37,42), što je u suprotnosti sa rezultatima Olivieri i sar. (103). Nakon korekcije za sve komponente MetS, prema Olivieri i sar. (103), e4 nosioci su pokazali značajnu povezanost sa pojavom MetS analizom logističke regresije, a jačina povezanosti je izražena „unakrsnim odnosom” (OR 2,41 95% CI 1,02-5,68). Na osnovu naših rezultata potvrđena je povezanost e4 alela i MetS takođe na osnovu OR (OR 11,25, 95% CI 4,51-28,05), što je u saglasnosti sa Olivieri i sar.

Prema Olivieri i sar. (103) rezultati dobijeni modelom logističke regresije su pokazali da je povezanost e2 alela i pojave hipertrigliceridemije veća u odnosu na druga dva alela (OR 11,25 95% CI 4,51-28,05), što nije u saglasnosti sa studijama drugih autora, a ni naše istraživanje nije potvrdilo navedenu povezanost (85, 102, 103).

Pošto različite ApoE izoforme imaju različit afinitet za vezivanje sa specifičnim lipoproteinskim receptorima, gde pripada i LRP1 receptor, krajnji ishod je promena nivoa TG i holesterola u plazmi, čime je dokazan efekat apoE gena na koncentraciju lipida u plazmi. Do sada je poznat doprinos e4 alela u značajnom povećanju koncentracije ukupnog holesterola, te se ovaj alel smatra za predisponirajući alel ateroskleroze.

Studija o riziku od ateroskleroze u društvu (Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)) (101) na 15000 subjekata prikazala je povezanost ApoE izoformi sa ITM : ITM ApoE4<ApoE3<ApoE2. Utvrđeni rezultati u našoj studiji su u skladu sa ARIC studijom na osnovu OR analize: ITM za e4 alel (OR=7 95% CI 3,07-15,95), e3 (OR=0,2 95% CI 0,09-0,41) , e2 (OR=0,52 95% CI 0,13-2,01) .

Povezanost e3e4 i e4e4 genotipa, sa markerima MetS, ukazuje na prediktivni karakter e4 alela za narušene referentne vrednosti navedenih parametara i razvoj MetS. Našim istraživanjem je pokazano da nosioci e4 alela imaju 11,25 puta veću šansu za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce e3 i e2 alela apoE gena.

7.3 Polimorfizam LRP1 gena i MetS

Konkretan uticaj LRP1 C677T polimorfizma u različitim patološkim stanjima i dalje nije razjašnjen. Iako C677T polimorfizam ne dovodi do aminokiselinske supstitucije, niti

do izmene mesta obrade primarnog transkripta, Beneš i sar. (105) smatraju da se C677T varijanta ne može smatrati neutralnim polimorfizmom i navode tri moguća objašnjenja. Polimorfizam bi mogao imati uticaj na ekspresiju LRP1 gena, a time i na broj LRP1 receptora na površini ćelije. Pomenuti polimorfizam može imati uticaj na afinitet LRP1 receptora za svoje ligande, među kojima je nama značajan ApoE, razmatran u ovom istraživanju i C677T varijanta bi mogla menjati signalnu aktivnost LRP1.

Hatanaka i sar. (129) su utvrdili da polimorfizam egzona 3 LRP1 gena utiče na efikasnost isecanja egzona 3, dovodeći do malog, ali značajnog smanjenja pune dužine iRNK T alela, nagoveštavajući da tako nastaje funkcionalno aktivna varijanta proteina.

Na osnovu iznetih rezultata naše studije može se videti da je polimorfizam LRP1 gena povezan na različite načine sa determinantama MetS. U populaciji Srbije do sada nisu rađene analize zastupljenosti alela egzona 3 LRP1 gena, tako da naši rezultati predstavljaju prve korake u ovoj oblasti u zemlji. U istraživanju je utvrđena značajna razlika u distribuciji genotipova između dve grupe ispitanika. Prisutna je veća frekvencija genotipa CT i TT u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na moguću povezanost T alela i determinanti MetS. Panza i sar. (17) su u uzorku obolelih od Alchajmerove bolesti ustanovili niže frekvencije CC genotipa u odnosu na frekvenciju CT genotipa u kontrolnoj grupi, gde je utvrđeno najčešće prisustvo CC genotipa (86,67%), zatim CT genotip (13,33%), dok je TT genotip nije detektovan. Vasquez-Higuera i sar. (130) su u kontrolnoj grupi utvrdili frekvencije od 83% CC genotipa, 15% CT i 2% TT genotipa, a naše istraživanje je pokazalo slične frekvencije, osim što TT genotip nije detektovan u kontrolnoj grupi. U eksperimentalnoj grupi utvrdili smo sledeće frekvencije CC (57,14%), CT (34,92%), TT (7,94%), što je različito od pomenutih autora na uzorku obolelih od Alchajmerove bolesti gde su utvrđene sledeće frekvencije: CC (78%), CT (21%), TT (1%). Razlika može biti objašnjena prirodom eksperimentalne grupe.

Hatanaka i sar. (129) nisu utvrdili razlike ni u frekvenciji genotipova, ni u frekvenciji alela između kontrolne grupe i grupe obolelih od Alchajmerove bolesti. U japanskoj populaciji je prema Hatanaka i sar. (129) frekvencija T alela (9,5%), inače niža nego u Evropi (~14%), a mogući uzrok je dugogodišnja genetička izolacija Japanaca pa time i drugačija genetička prošlost u odnosu na ostale etničke grupe.

U Evropi je frekvencija alela T najniža i iznosi 14%, a C alela najviša sa svojih 86% , rezultati naše studije pokazuju slične frekvencije gde je C alel zastupljen 80,65%, a T alel 19,35% u ukupnom uzorku. Panza i sar. (17) su ustanovili da frekvencija alela C pokazuje značajan trend opadanja od severa ka jugu Evrope sa pratećim porastom frekvencije T alela , ali samo kod pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti.

U eksperimentalnoj grupi je utvrđeno češće prisustvo T alela (25,4%) u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,01$). Prema Beneš i sar. (105) takođe je utvrđeno značajno veće prisustvo T alela (21%) u grupi žena obolelih od raka dojke u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$).

Rezultati su utvrdili povezanost CT genotipa i pripadnost eksperimentalnoj grupi na nivou $p = 0,01$. Genotip TT je detektovan samo u eksperimentalnoj grupi. Takođe je utvrđena i povezanost samog alela putem χ^2 testa nezavisnosti na nivou $p = 0,000$, što ukazuje da se T alel može smatrati faktorom rizika za razvoj MetS.

Što se tiče lipidskog statusa Masson i sar. (16) su ustanovili da LRP1 ima izuzetno važnu ulogu u lipidnom metabolizmu, a njegova sinteza je izuzetno velika u toku diferencijacije adipocita kod miševa i ljudi. Svoje zaključke baziraju na istraživanju u kome su „utišavanjem“ LRP1 gena kod miševa utvrdili značajnu inhibiciju ekspresije nekoliko markera za diferencijaciju adipocita, koje je dovelo do formiranja lipidno osiromašenih ćelija. Potom su utvrdili da kod potpuno diferenciranih adipocita „utišavanje“ LRP1 gena snižava nivo lipida u ćeliji i povećava bazalnu lipolizu. Međutim ustanovili su da je sposobnost zrelih adipocita za pokretanje lipolize potpuno nezavisna od LRP1 ekspresije. Na osnovu iznetog Masson i sar. (16) zaključuju da LRP1 ima značajnu ulogu u kontroli adipogeneze i lipidnoj homeostazi, pa bi zato mogao biti važna meta terapije gojaznosti.

Studije u vezi sa LRP1 ekspresijom i humanim masnim tkivom su za sada izuzetno oskudne. U nama dostupnoj literaturi, do sada, nisu pronađeni podaci u vezi sa polimorfizmom egzona 3 LRP1 gena i pojedinačnih antropometrijskih i biohemijskih parametara obrađenih u našem istraživanju, te će nadalje biti izneti rezultati povezanosti LRP1 gena i obrađenih parametara iz našeg istraživanja.

Alel T je pokazao značajnu povezanost sa pojavom MetS. Analizirana je pojedinačno povezanost pet komponenti MetS sa LRP1 genotipovima i utvrđeno je da su nosioci T alela značajno više prisutni među subjektima sa povišenim vrednostima ITM, OS,

SKP, ukupnog holesterola, LDL-a i LDL/HDL indeksa. Utvrđena razlika u vrednostima parametara između CC i CT nosilaca i CC i TT nosilaca kao i između CT i TT nosilaca ukazuje da je prisustvo T alela u genotipu odgovorno za statistički značajne razlike i da nosioci ovog alela imaju značajno narušene referentne vrednosti navedenih parametara koje nam ukazuju na njegovu važnu ulogu u metabolizmu lipida.

Daljom obradom podataka na osnovu rezultata OR prikazano je da prisustvo T alela kod ispitanika višestruko povećava šansu za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti ITM, ukupnog holesterola i LDL u odnosu na nosioce C alela.

Nakon korekcije za sve komponente MetS, nosioci T alela su pokazali značajnu povezanost sa pojavom MetS OR analizom. U našem istraživanju je polazano da nosioci T alela LRP1 gena imaju 4,76 puta veću šansu za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce C alela.

7.4 Kompozitni genotip i MetS

Izneti rezultati podržavaju pretpostavku da apoE i LRP1 varijante pojedinačno doprinose pojavi i razvoju metaboličkog sindroma i ukazuju na asocijaciju sa determinantama metaboličkog sindroma. Do sada u nama dostupnoj literaturi nisu objavljene studije u vezi sa zajedničkim uticajem apoE i LRP1 gena na fenotip MetS i asocijacijom sa pojedinačnim determinantama metaboličkog sindroma. Stoga naše istraživanje predstavlja jedno od retkih sa ispitivanjem uticaja kompozitnog genotipa sa metaboličkim sindromom.

Hatanaka i sar. (129) su na uzorku japanske populacije ispitali vezu kompozitnog genotipa apoE i LRP1 gena kod pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti. Pacijenti sa CC genotipom su imali raniji uzrast pojave bolesti od pacijenata sa T alelom, posebno ukoliko su i nosioci e2 i e3 alela, u odnosu na nosioce e4 alela. Oni su na osnovu utvrđenih frekvencija alela i genotipova u ispitivanim grupama naglasili da je moguća protektivna uloga T alela kod nosilaca e2 i e3 alela što se tiče uzrasta za pojavu Alchajmerove bolesti, ali da e4 alel ima prejak uticaj na razvoj bolesti pa protektivna uloga prisustva T alela ne dolazi do izražaja.

Viša zastupljenost e3e4/cc kompozitnog genotipa u eksperimentalnoj grupi i pojava e2e4/cc, e2e4/ct, e3e4/ct, e4e4/ct i e4e4/tt genotipova isključivo u eksperimentalnoj grupi,

ukazuje na prethodno iznete asocijacije e4 alela i T alela sa determinantama MetS i samim MetS, kao i na zajednički doprinos za razvoj MetS.

Utvrđeno je da nosioci i e4 alela i T alela u svom kompozitnom genotipu imaju značajno narušene referentne vrednosti: ITM, OS, SKP, LDL, LDL/HDL, i pokazuju statistički značajnu razliku ($p < 0,01$) za vrednosti parametara u odnosu na druge kompozitne genotipove, što potvrđuje njihov zajednički uticaj na navedene parametre. Može se primetiti da su svi navedeni parametri već pomenuti u istom kontekstu kod apoe4 nosilaca i LRP1 T nosilaca pojedinačno, ali je kod apoe4 nosilaca utvrđen uticaj na veći broj parametara .

Rezultati dobijeni OR analizom su nam prikazali da je e3e4/cc kompozitni genotip odgovoran za veću šansu za narušene referentne vrednosti ITM i OS, što ukazuje na veći doprinos e4 alela u odnosu na T alel. Takođe je prikazana i veća šansa za povišene vrednosti CRP-a kod e3e4/cc individua u odnosu na druge kompozitne genotipove, te se može zaključiti da doprinos ima samo e4 alel za parametar CRP. Međutim na osnovu OR rezultata, može se zaključiti da prisustvo kompozitnog genotipa e4e4/ct kod ispitanika višestruko povećava šansu za pojavu odstupanja od referentnih vrednosti glikemije našte (11,05 puta) u odnosu na nosioce ostalih kompozitnih genotipova, što pokazuje sinergistički efekat e4 i T alela za dati parametar, za koji nije utvrđena statistički značajna razlika prilikom analize između genotipova za svaki gen pojedinačno.

Na osnovu rezultata ustanovljeno je da prisustvo e3e4/cc kompozitnog genotipa kod ispitanika višestruko povećava šansu (7,62 puta) za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce ostalih kompozitnih genotipova, pa nas to navodi na zaključak da e4 alel ima najveći doprinos za pojavu i razvoj MetS u odnosu na sve ostale alele unutar kompozitnog genotipa.

Rezultatima utvrđena povezanost T alela LRP1 gena sa determinantama MetS nije zanemarljiva, pa se T alel može smatrati faktorom rizika za razvoj MetS, međutim u kombinaciji sa apoE genom najveći doprinos ima e4 alel. Rezultatima je pokazano da utvrđivanje kompozitnog genotipa može biti relevantno za procenu verovatnoće od oboljevanja od MetS.

7.5 Zavisnost pojave metaboličkog sindroma u odnosu na pol

U proteklih deset godina pojava MetS postala je češća među muškarcima u odnosu na žene. Činjenica da nagomilavanje masti, kao komponenta MetS, ima različit „šablon“

kod ženskog i muškog pola doprinosi razlikama u prevalenci sindroma između polova. Kapacitet za lipogenezu i lipolizu variraju u odnosu na telesni region i polnu pripadnost, zbog razlike u izlučenim hormonima. Ženske osobe u dobu pre menopauze su više sklone subkutanom nagomilavanju masti, dok su starije žene i muškarci skloniji tzv. centralnoj ili androidnoj gojaznosti. Rizik od KVB i pojave DMT2 treba razmatrati u odnosu na pol, gde će se veća pažnja pridavati povišenim trigliceridima kod žena i obimu struka kod muškaraca. Centralni tip gojaznosti značajno povećava rizik od KVB i pojave DMT2. Do sada je opisano više od 70 gena koji doprinose gojaznosti, a za neke polimorfizme je utvrđeno da imaju različit uticaj u odnosu na pol, što navodi na zaključak da nasledeni faktori mogu imati različit uticaj između muškaraca i žena. Ustanovljene činjenice ukazuju da se patofiziologija MetS razlikuje u odnosu na pol, a samim tim i rizik od KVB i DMT2. Pomenute razlike mogu imati značaj u prevenciji, dijagnostici i terapiji sindroma (131).

U preglednom radu Regitz-Zagrotsek i sar. (132) navodi se postojanje polne razlike u patofiziologiji MetS i da je prevalenca MetS u Evropi veća kod muškaraca u odnosu na žene, posebno u mlađem dobu (20-39 godina). Istaknuto je da je centralna gojaznost više zastupljena kod muškaraca i predstavlja glavni izvor slobodnih masnih kiselina i adipocitokina za jetru i dovodi do razvoja insulinske rezistencije, dislipidemije i povišenog krvnog pritiska, dok subkutana (periferna) gojaznost koja se javlja kod žena dozvoljava viši stepen gojazosti za izazivanje istih metaboličkih poremećaja kod žena. U našem istraživanju nije utvrđena veza između polne pripadnosti i pripadnosti grupi obolelih od MetS, ali je utvrđena statistički značajna razlika između ženskog i muškog pola svih ispitivanih subjekata za sledeće parametre: ukupni holesterol, LDL i TG, koja prikazuje pomenutu razliku u lipidnom metabolizmu između polova navedenu od strane Regitz-Zagrotsek i sar. (132). Pomenuti autori su takođe naglasili da su povišeni TG veći faktor rizika za metaboličke poremećaje kod žena nego kod muškaraca, što je u našem istraživanju i potvrđeno, jer su rezultati unutar kontrolne grupe pokazali statistički značajno niže vrednosti TG kod žena (0,82mmol/l) u odnosu na muškarce (5,17mmol/l), koji nisu imali metaboličke poremećaje, bez obzira na značajno viši rezultat za TG.

U našem istraživanju, na osnovu rezultata unutar grupe obolelih od MetS, utvrđena je statistički značajna razlika između ženskog i muškog pola za parametre: TV, TM, OS i HDL, gde je jasno da TV i TM pokazuju logično očekivanu statistički značajnu razliku, dok

je za HDL i OS dobijena razlika najverovatnije usled različitih referentnih vrednosti koje su za ova dva parametra polno specifične. Krotkiewski i sar. (133) su u svojoj studiji gojaznih utvrdili viši krvni pritisak, nivo TG, glukoze našte i insulina kod muškog pola, što u našoj studiji nije pronađeno.

Prema Mosher i sar. (134) razumevanje polnih razlika u uticaju interakcije apoE gena i povećanog unosa ugljenih hidrata na nivo HDL holesterola je od velikog značaja. Unos ugljenih hidrata i apoE polimorfizam pokazali su značajan polno specifični uticaj. Kod svih muškaraca su utvrdili sličan pad nivoa HDL-a pri povećanom unosu ugljenih hidrata, međutim, kod ženskog pola su samo e4 nosioci pokazali značajno niži nivo HDL holesterola, dok nije utvrđena nikakva povezanost sa nivoom HDL-a i povećanim unosom ugljenih hidrata kod žena koje nemaju apoe4 alel (134). Rezultati našeg istraživanja su takođe ustanovili značajnu razliku ($p=0,02$) kod žena nosilaca e4 alela u odnosu na žene bez e4 alela u svom genotipu, dok u muškom polu između nosioca e4 alela i onih koji nisu nosioci e4 alela nije utvrđena značajna razlika.

8 ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Najčešća alelna forma apoE gena u obe ispitivane grupe je e3, a za njim slede e4 i e2, gde je učestalost e4 alela značajno veća u eksperimentalnoj grupi. Time je prva hipoteza istraživanja potvrđena.
2. U obe ispitivane grupe najčešća alelna forma LRP1 gena je C, dok je učestalost alelne forme T značajno veća u eksperimentalnoj grupi. Druga hipoteza istraživanja je takođe potvrđena.
3. Alel e4 apoE gena je u pozitivnoj korelaciji sa povišenim sistolnim krvnim pritiskom, dijastolnim krvnim pritiskom, nivoom LDL holesterola, a u negativnoj korelaciji sa HDL nivoom holesterola. Alel T LRP1 gena je u pozitivnoj korelaciji sa povišenim sistolnim krvnim pritiskom, nivoom LDL holesterola, indeksom LDL/HDL, a u negativnoj korelaciji sa HDL nivoom holesterola. Dakle, treća hipoteza je delimično potvrđena, jer nije utvrđena korelacija između e4 alela apoE gena i nivoa triglicerida, ni između T alela LRP1 gena i triglicerida. Za e4 alel nije utvrđena korelacija sa indeksom LDL/HDL, dok za T alel nije utvrđena korelacija sa povišenim dijastolnim krvnim pritiskom.
4. Genotipovi e3e4 i e4e4 apoE gena su u pozitivnoj korelaciji sa povišenim sistolnim krvnim pritiskom, dijastolnim krvnim pritiskom, nivoom LDL holesterola, a u negativnoj korelaciji sa HDL nivoom holesterola, dok su CT i TT genotipovi LRP1 gena u pozitivnoj korelaciji sa nivoom LDL holesterola. Time je četvrta hipoteza delimično potvrđena što se tiče korelacije nivoa triglicerida i e3e4 i e4e4 genotipova apoE gena, kao i CT i TT genotipova LRP1 gena. Za CT i TT genotipove LRP1 gena nije utvrđena ni pretpostavljena pozitivna korelacija sa povišenim sistolnim i dijastolnim krvnim pritiskom i negativna korelacija sa nivoom HDL holesterola.
5. Definisani su i novi odnosi između apoE i LRP1 alela i nekih od antropometrijskih i biohemijskih parametara: utvrđena je pozitivna korelacija e4 alela apoE gena sa nivoom glikemije našte i vrednostima C reaktivnog proteina i pozitivna korelacija T alela LRP1 gena sa obimom struka i indeksom telesne mase. Time je ispunjena i peta hipoteza istraživanja.

6. Utvrđeno je da prisustvo e4 alela apoE gena kod ispitanika povećava šansu za 11,5 puta za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce e2 i e3 alela, dok T alel LRP1 gena povećava šansu za 4,76 puta u odnosu na nosioce C alela.
7. Utvrđeni su i novi odnosi između genotipova oba istražena gena i nekih od antropometrijskih i biohemijskih parametara; utvrđeno je da su e3e4 i e4e4 genotipovi apoE gena u pozitivnoj korelaciji sa obimom struka, indeksom telesne mase i vrednostima C-reaktivnog proteina, dok su CT i TT genotipovi LRP1 gena u pozitivnoj korelaciji sa indeksom telesne mase, obimom struka i vrednostima C-reaktivnog proteina.
8. Utvrđeno je da prisustvo e3e4/cc kompozitnog genotipa kod ispitanika višestruko povećava šansu (7,62 puta) za pojavu metaboličkog sindroma u odnosu na nosioce ostalih kompozitnih genotipova.

MetS predstavlja kompleksno poligeno multifaktorsko oboljenje metabolizma. Poznavanjem genetičke predispozicije mogu se korigovati faktori sredine podložni promenama čime se pojava i razvoj bolesti može odložiti ili sprečiti. Utvrđivanje genetičke osnove MetS je jedan od potrebnih koraka kako u prevenciji nastanka oboljenja, uštedi troškova lečenja, tako i u dizajniranju ciljane terapije.

9 LITERATURA:

1. Blaha MJ, Bansal S, Rouf R, Golden SH, Blumenthal RS, Defilippis AP. A practical „ABCDE” approach to the metabolic syndrome. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:932-41.
2. Executive summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
3. Moses AC, Abrahamson MJ. Therapeutic approaches to insulin resistance. In: Moller DE. *Insulin resistance*. Chichester: John Willey; 1993; p. 385-410.
4. Micić D, Kendereški A, Šumarac-Dumanović M. *Insulinska rezistencija*. Beograd: Medicinska knjiga; 1994. str. 89-97.
5. Choi BCK, Shi F. Risk factors for diabetes mellitus by age, and sex: results of the National Population Health Survey. *Diabetologia* 2001; 44(10):1221-31.
6. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002; 288(21):2709-16.
7. Lempiainen P, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M, Kuusisto J. Insulin resistance syndrome predicts coronary heart disease events in elderly nondiabetic men. *Circulation*. 1999; 100:123-8.
8. Scuteri A, Najjar S, Morrell C, Lakatta E. The metabolic syndrome in older individuals: prevalence and prediction of cardiovascular events. *Diabetes Care* 2005; 28:882-7.
9. Bruno G, Merletti F, Biggeri A, Barger G, Ferrero S, Runzo C: Metabolic syndrome as a predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study. *Diabetes Care* 2004; 2689-94.
10. Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL. Apolipoprotein E-e4 Protects Against Severe Liver Disease Caused by Hepatitis C Virus. *Hepatology* 2002; 36(2):456-463.
11. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res*. 2011; 50(1): 62-74.
12. Anoop S, Anoop M, Meena K, Luthra K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. *Indian J Med Res* 2010; 132: 363-378.

13. Franchini M, Montagna M. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: new functions for an old molecule. *Clin Chem lab Med* 2011; 49(6): 967-970
14. Christoforidis M, Schober R, Krohn K. Genetic-morphologic association study: association between the low density lipoprotein-receptor related protein (LRP1) and cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005; 31:11-19
15. Vormittag R, Bencur P, Ay C, Tengler T, Vukovich T, Quehenberger P, Mannhalter C, Pabinger I. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 polymorphism 663 C>T affects clotting factor VIII activity and increases the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2007; 5:497-502
16. Masson O, Chavey C, Dray C, Meulle A, Daviaud D, Quilliot D, Muller C, Valet P, Liaudet-Coopman E. LRP1 Receptor Controls Adipogenesis and Is Up-Regulated In Human and Mouse Obese Adopose Tissue. *PLoS ONE* 2009; 4(10):e7422
17. Panza F, Dintrono A, Colacicco AM, Capurso C, Basile AM, Capurso S, Capurso A, Solfrizzi V. Regional European Differences in Allele and Genotype Frequences of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Polymorphism in Alzheimers Disease. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 2004; 126B: 69-73.
18. Philips C, Lopez-Miranda H, Perez-Jimenez F, Mc Manus R, Roche H. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Current Opinion in Cardiology* 2006; 21:185-193
19. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.
20. Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F, Silink M. Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. *Diabetes Care* 2004; 27: 1798-1811.
21. Kassi E, Pervanidou P, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine* 2011; 9:48
22. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; 33: 351–75.
23. Kylin E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyka “mie-Hyperurika” miesyndrom. *Zentralblatt fuer Innere Medizin* 1923; 44: 105–27. (German)

24. Vague J. Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity. 1947. *Obes Res* 1996; 4(2): 201–3.
25. Reaven GM. Banting lecture 1988 Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37(12): 1595–607.
26. Nikolić A, Nikolić D, Stanimirović V. Metabolički sindrom X ili sindrom insulinske rezistencije. *Vojnosanitetski Pregled* 2007; 64(1): 45-51.
27. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J. The Metabolic Syndrome: A Global Public Health Problem and a New Definition. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2005; 12(6):295-300.
28. Zimmet P. Diabetes epidemiology as a trigger to diabetes research. *Diabetologija* 1999; 42: 499-518.
29. Khoo CM, Liew CF, Chew SK, Tai ES. The impact of central obesity as a prerequisite for the diagnosis of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15:262-9.
30. Kwiterovich PO Jr. Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol* 2002; 90: 30i–47i.
31. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15:539–53.
32. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999; 16: 442-443.
33. Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, Howard J, Hunninghake DB, Illingworth DR, Luepker RV, McBride P, McKenney JM, Pasternak RC, Stone NJ, Horn LV. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-2497.
34. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The Metabolic Syndrome: Time for a Critical Appraisal: Join statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:2289-2304.

35. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23:469-80.
36. Gale EA. The myth of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 2005; 48:1679-83.
37. Gale EA. Should we dump the metabolic syndrome? Yes. *BMJ* 2008; 336:640.
38. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:2289-304.
39. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2008; 28:629-36.
40. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spetis JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005; 112:2735-2752.
41. Wannamethee SG, Sharper AG, Lennon L, Morris RW. Metabolic syndrome vs Framingham risk score for prediction of coronary heart disease, stroke, and type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2005; 165:2644-50.
42. Day C. Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diabetes Vasc Disc res* 2007; 4:32-8.
43. Prentice AM. The emerging epidemic of obesity in developing countries. *International Journal of Epidemiology* 2006; 35:93-9.
44. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing worlds growing challenge. *N Engl J Med* 2007; 356:213-5.
45. James WP, Nelson M, Ralph A, Leather S. Socioeconomic determinants of health: the contribution of nutrition to inequalities in health. *British Medical Journal* 1997; 314:1545-49.
46. World Health Organization members. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series, No. 894. Geneva; 2000
47. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S adults. *Diabetes Care* 2004; 27:2444-9.

48. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 2005; 28:2745-9.
49. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents - Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 2003; 157:821-7.
50. Cook S, Auinger P, Li C, Ford ES. Metabolic syndrome rates in United States adolescents, from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *Journal of Pediatrics* 2008; 152:165-70.
51. Oleg Sidorenkov, Odd Nilssen, Andrej M Grjibovski, Metabolic syndrome in Russian adults: associated factors and mortality from cardiovascular diseases and all causes. *BMC Public Health* 2010; 10:23
52. Assmann G, Guerra R, Fox G, Cullen P, Schulte H, Willett D, Grundy SM. Harmonizing the definition of the metabolic syndrome: Comparison of the Criteria of the Adult Treatment Panel III and the International Diabetes Federation in United States American and European populations. *American Journal of Cardiology* 2007; 99:541-8.
53. Palaniappan L, Carnethon M, Fortmann SP. Association between microalbuminuria and the metabolic syndrome: NHANES III. *Am J Hypertens* 2003; 16:952-8.
54. Hu G, Lindstrom J, Jousilahti P, et al. The increasing prevalence of metabolic syndrome among finnish men and women over a decade. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; 93:832-6.
55. Lorenzo C, Serrano-Rios M, Martinez-Larrad MT, Gonzales-Sanches JL, Sealen S, Vilena A, Gonzales-Villipando C, Williams K, Haffner SM. Geographic variations of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III definitions of the metabolic syndrome in nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2006; 29:685-91.
56. http://www.danas.rs/dodaci/zdravlje/glavni_krivac_za_bolesti_srca_i_dijabetes.63.html?news_id=144520
57. Vorgučin I, Vlaški J, Naumović N, Katanić D. Poređenje dva definisana kriterijuma za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma kod prekomerno uhranjene i gojazne dece u Vojvodini. *Vojnosanitetski Pregled* 2011; 68(6): 500-505.

58. Budimka N, Milka P. Učestalost metaboličkog sindroma u polulaciji grada Novog sada. *Medicinski Pregled* 2001; LIV (1-2): 17-20.
59. Timar O, Sester F, Levy E. Metabolic syndrome X: A review. *Can J Cardiol* 2000; 16(6):779-789
60. Lee CM, Huxley RR, Woodward M, Zimmet, P, Shaw, J, Cho NH, Kim HR, Viali S, Tominaga M, Vistisen D, Borch-Johnsen K, Colagiuri S. Comparisons of Metabolic Syndrome Definitions in Four Populations of the Asia-Pacific Region. *Metab Syndr Relat Disord* 2008; 6:37-46.
61. Al-Lawati JA, Mohammed AJ, Al-Hinai HQ, Jousilahti P. Prevalence of the metabolic syndrome among Omani adults. *Diabetes Care* 2003; 26:1781-5.
62. Khader Y, Bateiha A, El-Khateeb M, Al-Shaikh A, Ajlouni K. High prevalence of the metabolic syndrome among Northern Jordanians. *J Diabetes Complications* 2007; 21:214-9.
63. Gupta R, Deedwania PC, Gupta A, Rastogi S, Panwar RB, Kothari K. Prevalence of metabolic syndrome in an Indian urban population. *Int J Cardiol* 2004; 97:257–61.
64. Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: Application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 2002; 156:1070-7.
65. Wilson PWF, D'Agostino RB, Parise H, Meigs JB. The metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2002; 51:A242.
66. Rosengren A, Hawken S, Ôunpuu S, Liwa K, Zubaid M, Almahmed WA, Blacket KN, Sitthi-amorn C, Sato H, Yusuf S. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 953–62.
67. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937–52.
68. Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, Rinfret S, Schiffrin EL, Eisenberg MJ: The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56:1113-1132.

69. Daly CA, Hildebrandt P, Bertrand M, Ferrari R, Remme W, Simoons M, Fox KM. Adverse prognosis associated with the metabolic syndrome in established coronary artery disease: data from the EUROPA trial. *Heart*. 2007;93(11):1406-1411.
70. Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K, Pyorala K. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med* 2004;164:1066–76.
71. Lee J, Heng D, Ma S, Chew SK, Hughes K, Tai ES. The metabolic syndrome and mortality: the Singapore Cardiovascular Cohort Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 69:225-30.
72. Maksimovic M, Vlajinac H, Radak D, Marinkovic J, Jorga J. Relationship between peripheral arterial disease and metabolic syndrome. *Angiology* Feb 3 2009.
73. Adolphe A, Cook LS, Huang X. A cross-sectional study of intima-media thickness, ethnicity, metabolic syndrome, and cardiovascular risk in 2268 study participants. *Mayo Clin Proc* 2009; 84(3):221-228.
74. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 7–18.
75. Ordovas JM, Corella D, Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Kidney International* 2008; 74:10-14.
76. De Graaf J, Swinkels DW, de Haan AFJ, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Both inherited susceptibility and environmental exposure determine the low-density lipoprotein-subfraction pattern distribution in healthy Dutch families. *Am J Hum Genet* 1992; 51:1295-1310.
77. De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clinical Chemistry* 2008; 54: 945–955.
78. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34: 2–11.
79. Groop L. Genetics of the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition* 2000; 83(1):39-48
80. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *The American Journal of Human Genetics* 1962; 77(8): 353-63.
81. Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35: 595–601.

82. Philips C, Jose Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic determinants of the metabolic syndrome. *Current Opinion in Cardiology* 2006; 21: 185-193.
83. Song Q, Wang SS, Zafari AM. Genetics of the Metabolic Syndrome. *Hospital Physician* 2006; 51-61
84. Povel CM, Boer JMA, Imholz S, Dolle MET, Feskens EJM. Genetic variants in lipid metabolism are independently associated with multiple features of the metabolic syndrome. *Lipids in Health and disease* 2011; 10:118
85. Sima A, Lordan A, Stancu C. Apolipoprotein E polymorphism-a risk factor for metabolic syndrome. *Clin Chem Med* 2007; 45(9): 1149-1153.
86. Đan I. (2009) Polimorfizam apoE gena kod bolesnika sa ishemijskom bolešću srca. Završni rad, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad.
87. Hixon JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *Journal of Lipid Research* 1990; 31:545-548.
88. Kypreos KE, Karagiannides I, Fotiadou EH, Karavia EA, Brinkmeier MS, Giakoumi SM, Tsompanidi EM. Mechanisms of obesity and related pathologies: Role of apolipoprotein E in the development of obesity. *FEBS Journal* 2009; 276: 5720-5728
89. Sparks DL, Connor DJ, Sabbagh NM, Petersen RB, Lopez J, Browne P. Circulating cholesterol levels, apolipoprotein E genotype and dementia severity influence the benefit of atrovastatin treatment in Alzheimers disease: results of the Alzheimers Disease Cholesterol-Lowering Treatment (ADCLT) trial. *Acta Neurol Scand* 2006; 114(185): 3-7
90. Toniutto P, Fattovich G, Fabris C, Minisini R, Burlone M, Pravadelli C, Peraro L, Falleti E, Caldera F. Genetic Polymorphism at the Apolipoprotein E Locus Affects the Outcome of Chronic Hepatitis B. *Journal of Medical Virology* 2010; 82: 224-231.
91. Burt TD, Agan BK, Marconi VC, Wejing HE, Kulkarni H, Mold JE, Cabrois M, Huang Y, Mahley RW, Dolan MJ, McCune JM, Ahuja SK. Apolipoprotein (apo)E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE e4e4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(25):8718-8723.

92. Lee KS, Jang Y, Chung Y-K, Chung JH, Oh BH, Hong CH. Relationship between the diagnostic components of metabolic syndrome (MS) and cognition by ApoE genotype in elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2010; 50:69-72.
93. Kuhlman I, Minihane AM, Huebbe P, Nebel A, Rimbach G. Apolipoprotein E genotype and hepatitis C, HIV and herpes simplex disease risk: a literature review. *Lipids in Health and Disease* 2010; 9:8
94. Đan I, Stokić E, Sakač D, Đan M, Obreht D, Erak M, Jovanović N. Case-control study of apoE gene polymorphism in young CHD patients and controls in the Serbian population. *Arch.Biol.Sci.* 2011; 61(1):89-98.
95. Aceves D, Ruiz B, Nuno P, Roman S, Zepeda E, Panduro A. Heterogeneity of apolipoprotein E polymorphism in different Mexican populations. *Human Biology* 2006; 78(1):65-75.
96. Lepšanović L. (1997) Metabolizam lipoproteina i njegovi poremećaji. Srpsko Lekarsko društvo-Društvo lekara Vojvodine, Novi Sad.
97. Tao MH, Liu JW, LaMonte MJ, Liu J, Wang L, He Y, Li XY, Wang LN, Ye L. Different associations of apolipoprotein E polymorphism with metabolic syndrome by sex in an elderly Chinese population. *Metabolism Clinical and Experimental* 2011; (60):1488-1496
98. Das M, Pal S, Ghosh A. Synergistic effects of ACE (I/D) and ApoE (HhaI) gene polymorphisms among the adult Asian Indians with and without metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;86: e58-61.
99. Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta analysis. *J Lipid Res* 1992; 33:447-454.
100. Arbones-Mainar JM, Jonson LA, Altenburg MK, Maeda N. Differential modulation of diet-induced obesity and adipocyte functionality by human apolipoprotein E3 and E4 in mice. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1595-1605.
101. Volcik Ka, Barkley RA, Hutchinson RG, Mosley TH, Heiss G, Sharrett AR, Ballantyne CM, Boerwinkle E. Apolipoprotein E polymorphisms predict low density lipoprotein cholesterol levels and carotid artery wall thicknes but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants. *Am J Epidemiol* 2006; 164:342-348.

102. Oh JY, Barret-Connor E. Apolipoprotein E polymorphism and lipid levels differ by gender and family history of diabetes: the Rancho Bernardo Study. *Clin Genet* 2001; 60:132-137
103. Olivieri O, Martinelli N, Bassi A, et al. ApoE epsilon2/epsilon3/epsilon4 polymorphism, ApoC-III/ApoE ratio and metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:1149-53.
104. Franchini M, Montagna M. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: new functions for an old molecule. *Clin Chem lab Med* 2011; 49(6): 967-970
105. Beneš P, Jurajda M, Žaloudík J, Izakovičová-Hollá L, Vácha J. C766T low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (*LRP1*) gene polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003; 5:R77-R81 .
106. Boucher P, Herz J. Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond. *Biochemical Pharmacology* 2011; 81: 1-5.
107. Lenting PJ, Neels JG, Van Den Brg BM, Clijsters PP, Meijerman DW, Pannekoek H, Van Mourik JA, Mertens K, Van Zonneveld AJ. The light chain of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 1999; 274: 23734-9.
108. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 1999; 274: 37685-92.
109. Neels JG, Bovenschen N, van Zonneveld AJ, Lenting PJ. Interaction between factor VIII and LDL receptor-related protein. Modulation of coagulation? *Trends Cardiovasc Med* 2000; 11: 251-7.
110. Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ, Katzman R. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 1997; 49:56-61
111. Bian L, Yang DJ, Guo TW, Qin W, Sun Y, Feng GY, He L. Association study of the A2M and LRP1 genes with Alzheimers disease in the Han Chinese. *Biol Psychiatry* 2005; 58:731-737
112. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=12:57540765-57541765;v=rs2306692;vdb=variation;vf=1890007#102187_tablePanel

113. Gauthier A, Vassiliou G, Benoist F, McPherson R. Adipocyte low density lipoprotein receptor-related protein gene expression and function is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2003; 278(14): 11945-11953.
114. Lillis AP, van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 2008; 88(3): 887-918.
115. Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuno MI, Fernandez-Garcia D, Gomez-Huelgas R, Tinahones FJ, Cardona F. Adipose Tissue Gene Expression of Factors Related to Lipid Processing in Obesity. *PLoS ONE* 2011; 6(9): e24783.
116. Hofmann SM, Zhou L, Perez-Tilve D, Greer T, Grant E, Wancata L, Thomas A, Pfluger PT, Basford JE, Gilham D, Herz J, Tschop MH, Hui DY. Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest* 2007; 117: 3271-3282.
117. Mathews DR, Hosher JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1984; 28:412-419.
118. Friedewald WT, Lavy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
119. Kocher TD, Thomas KW, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers (cytochrome b/12S ribosomal DNA/control region/evolutionary genetics/molecular phylogenies). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86:6196-6200.
120. StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com
121. Stanković S, Glišić S, Alavantić D. Apolipoprotein E gene DNA polymorphism in Serbian population. *Jugoslovenska Medicinska Biohemija* 1999; 18: 9-15
122. Scuteri A, Najjar SS, Muller D, Andres R, Morrell CH, Zonderman AB, Lakkata EG. ApoE4 allele and the natural history of cardiovascular risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E322–327

123. Stiefel P, Montilla C, Muniz-Grijalvo O, García-Lozano R, Alonso A, Miranda M L, Pamies E, Villar J. Apolipoprotein E gene polymorphism is related to metabolic abnormalities, but does not influence erythrocyte membrane lipid composition or sodium-lithium countertransport activity in essential hypertension. *Metabolism* 2001;50:157–160
124. Kontula K, Aalto-Setälä K, Kuusi T, Hämäläinen L, Syvänen AC. Apolipoprotein E Polymorphism Determined by Restriction Enzyme Analysis of DNA Amplified by Polymerase Chain Reaction: Convenient Alternative to Phenotyping by Isoelectric Focusing. *Clinical Chemistry* 1990; 36/12:2087-2092
125. Eggertsen G, Tegelmann R, Ericsson S, Angelin B, Berglund L. Apolipoprotein E Polymorphism in a Healthy Swedish Population: Variation of Allele Frequency with Age and Relation to Serum Lipid Concentrations. *Clinical Chemistry* 1993; 39(10): 2125-2129.
126. Ilveskoski E, Loimaala A, Mercuri MF, Lehtimäki T, Pasanen M, Nenonen A, Oja P, Gene Bond M, Koivula T, Karhunen PJ, Vuori I. Apolipoprotein E polymorphism and carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *Atherosclerosis* 2000; 153: 147-153
127. Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, Sopko G, Pauly DF, Merz CNB, Kamboh I. APOE polymorphism and angiographic coronary artery disease severity in the Women's ischemia syndrome evaluations (WISE) study. *Atherosclerosis* 2003; 169: 159-167
128. Guerra A, Rego C, Castro EMB, Seixas S, Rocha J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on cardiovascular risk factors in obese children. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2003; 47: 49-54
129. Hatanaka Y, Kamino K, Fukuo K, Mitsuda N, Nishiwaki-Ueda Y, Sato N, Satoh T, Yamamoto H, Yoneda H, Imagawa M, Miki T, Ohta S, Ogihara T. Low density lipoprotein receptor-related protein gene polymorphisms and risk for late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *Clin Genet* 2000; 58:319-323.
130. Vasquez-Higuera JL, Mateo I, Sanchez-Juan P, Rodriguez-Rodriguez E, Pozueta A, Infante J, Berciano J, Combarros O. Genetic Interaction between Tau and the Apolipoprotein E

Receptor LRP1 Increases Alzheimer's Disease Risk. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2009; 28:116-120.

131. Power ML, Schulkin J. Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. *British Journal of Nutrition* 2008; 99:931-940.
132. Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol* 2006; 95:136-147.
133. Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjorstrom L, Smith U. Impact of Obesity on Metabolism in Men and Women. *J. Clin. Invest.* 1983; 1150-1162.
134. Mosher MJ, Lange LA, Howard BV, Lee ET, Best LG, Fabsitz RR, MacCluer JW, North KE. Sex-specific interaction between *APOE* genotype and carbohydrate intake affects plasma HDL-C levels: the Strong Heart Family Study. *Genes Nutr.* 2008; 3(2): 87-97.