

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Sanja S. Soskić

**Asocijacija promena antropometrijskih i  
metaboličkih parametara i aktivnosti  
enzima antioksidativne zaštite sa  
polimorfizmom LEP G-2548A u genu za  
leptin kod gojaznih osoba u Srbiji**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Сања С. Соскић

**Асоцијација промена  
антропометријских и метаболичких  
параметара и активности ензима  
антиоксидативне заштите са  
полиморфизмом LEP G-2548A у гену  
за лептин код гојазних особа у Србији**

Докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Sanja S. Soskić

**Association of changes in  
anthropometric and metabolic  
parameters and activities of  
antioxidative enzymes with leptin gene  
polymorphism LEP G-2548 in obese  
people in Serbia**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata mr Sanje S. Soskić,  
izabrana je u sastavu:

dr Esmā R. Isenović, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke "Vinča",  
Beograd, redovni profesor, Univerzitet privredne akademije u Novom Sadu,  
Stomatološki fakultet Pančevo – mentor,

dr Jelena Đorđević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet  
- mentor,

dr Edita Stokić, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski  
fakultet - član,

dr Nasta Tanić, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke "Vinča",  
Beograd – član,

dr Tanja Jevđović, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet – član

na \_\_\_\_\_ redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Biološkog fakulteta Univerziteta u  
Beogradu, održanoj \_\_\_\_\_ 2016. godine. Svojom odlukom broj \_\_\_\_\_ od  
\_\_\_\_\_ 2016., Oblasno Veće Prirodnih Nauka Univerziteta u Beogradu je potvrdilo da  
kandidat mr Sanja S. Soskić može da pristupi javnoj odbrani svoje doktorske disertacije pod  
naslovom: "Asocijacija promena antropometrijskih i metaboličkih parametara i aktivnosti  
enzima antioksidativne zaštite sa polimorfizmom LEP G-2548A u genu za leptin kod gojaznih  
osoba u Srbiji"

Datum i mesto javne odbrane: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke "Vinča" pod rukovodstvom prof. dr Esme R. Isenović naučnog savetnika i redovnog profesora Univerziteta prirodne akademije u Novom Sadu Stomatološkog fakulteta u Pančevu u okviru projekta 173033 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Neposrednom mentoru i rukovodiocu prof. dr Esmi Isenović najtoplije se zahvaljujem što mi je pružila priliku da upoznam svet molekularne endokrinologije. Zahvaljujem joj se na poverenju, bezgraničnom strpljenju, entuzijazmu i stručnoj pomoći koja mi je omogućila da iskažem puni doprinos u realizaciji ove doktorske disertacije.*

*Mentoru dr Jeleni Đorđević redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu zahvaljujem se na izuzetno detaljnom pregledu teze, ogromnom strpljenju i dobronamernim sugestijama i kritikama.*

*Zahvaljujem se prof. dr Editi Stokić redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu na spremnosti za saradnju i shvatanju da bez multidisciplinarnog sagledavanja nema pravog napretka u istraživanju.*

*Zahvaljujem se kolegini dr Nasti Tanić višem naučnom saradniku na velikoj stručnoj pomoći i prijateljskom pristupu tokom eksperimentalne izrade ove doktorske teze.*

*Dr Tanji Jevđović docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu zahvaljujem se na velikom trudu tokom čitanja teze i na korisnim sugestijama.*

*Dragom kolegi dr Milanu Obradoviću naučnom saradniku najtoplije se zahvaljujem na velikodušnoj i nesebičnoj stručnoj pomoći, kao i na bezgraničnom strpljenju prilikom tehničkog uobličenja ove doktorske disertacije.*

*Dragoj kolegini dr Emini Sudar Milovanović naučnom saradniku zahvaljujem se na velikoj pomoći tokom eksperimentalne izrade ove doktorske teze.*

*Zahvaljujem se kolegini dr Ljiljani Stojković naučnom saradniku na svesrdnoj i nesebičnoj stručnoj pomoći i prenešenom znanju pri statističkoj analizi podataka dobijenih u okviru ove doktorske disertacije.*

*Najiskrenije se zahvaljujem koleginicama i saradnicima na projektu: dr Vladanu Bajiću naučnom savetniku, Sonji Zafirović, Aleksandri Jovanović, Ivani Resanović, Julijani Stanimirović, i Anastasiji Panić koji su svojom kolegijalnošću i prijateljstvom učestvovali i doprineli izradi moje doktorske teze.*

*Dragim koleginicama i prijateljicama dr Sanji M. Glišić višem naučnom saradniku, dr Snežani Jovanović-Čupić naučnom saradniku i dr Mileni Krajnović naučnom saradniku zahvaljujem se na bezrezervnoj podršci i pomoći uvek kada mi je bila potrebna.*

*Mom tati i bratu hvala na bezgraničnoj ljubavi i podršci uvek i svuda.*

*Mom sinu Lazaru hvala na nesebičnoj ljubavi i optimizmu koji su mi davali snage da istrajem.*

*Ovu tezu posvećujem mojoj mami Zlati prerano otrgnutoj iz mog zagrljaja*

## SAŽETAK

**Naslov doktorske disertacije: "Asocijacija promena antropometrijskih i metaboličkih parametara i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite sa polimorfizmom LEP G-2548A u genu za leptin kod gojaznih osoba u Srbiji"**

Stopa rasta gojaznosti predstavlja glavni javni zdravstveni problem. U Evropi je njena učestalost u opsegu 10-25% kod muškaraca i 10-30% kod žena. Prevalenca gojaznosti je povećana u Srbiji i ona je postala značajan zdravstveni problem kod odraslih u Srbiji: do 54% ispitanika odraslog stanovništva je gojazno. Gojaznost je bolest koja se definiše kao patološka akumulacija telesne masne mase, koja može nastati kao rezultat povećanog unosa energije i smanjene potrošnje energije. Danas se smatra da je genetska predispozicija za nastanak gojaznosti jedan od glavnih faktora rizika za pojedince, ali identifikaciju gena koji su uključeni u nastanak gojaznosti je još uvek teško razjasniti. S obzirom na činjenicu da je koncentracija leptina znatno povećana kod gojaznih osoba, a istovremeno je proporcionalna telesnoj masi, gen leptina (*LEP*) je procenjivan u odnosu na genetičke varijante koje bi eventualno mogle biti u vezi sa patofiziologijom gojaznosti i njenim komplikacijama. Leptin je hormon protein kodiran genom gojaznosti (*ob*), a sintetiše ga pretežno belo masno tkivo. Centralni nervni sistem, tačnije jedra hipotalamusa su meta u kojima leptin ispoljava većinu svojih efekata na metabolizam energije. Leptin ostvaruje nekoliko sistemskih efekata kao što: su smanjenje unosa hrane, povećanje energetske potrošnje, kao i smanjenje metaboličke efikasnosti. Pored toga, leptin utiče na širok spektar bioloških funkcija poput metabolizma lipida i glukoze, sintezu glukokortikoida kao i insulina, a postoji sve više dokaza da je leptin uključen i u patogenezu inflamatornih i autoimunih bolesti. Adekvatne masne naslage i koncentracija leptina smanjuju potrebu za unosom hrane, a omogućavaju potrošnju energije putem raznih neuroendokrinih osa i autonomne aktivnosti. Retki sindromi gojaznosti su povezani sa mutacijama *LEP* gena kod ljudi. Česta genetička varijanta jednog nukleotida u 5' promotorskom regionu koji se sastoji u supstituciji G u A na nukleotidu (nt) -2548 (*LEP* G-2548A, -dbSNPID rs7799039) uzvodno od starta transkripcije ATG u promotoru *LEP* je povezan sa varijacijama

koncentracije leptina u plazmi i indeksom telesne mase (BMI) kod gojaznih osoba. Pokazano je da genetička varijanta *LEP* G-2548A utiče na ekspresiju i sekreciju leptina u masnom tkivu. Iako *LEP* varijante mogu biti važne za patofiziologiju humane gojaznosti i sa njom povezanih komplikacija, rezultati asocijacije genetičke varijante *LEP* G-2548A sa gojaznošću su kontradiktorni.

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je da se ispituju moguće asocijacije genetičke varijante *LEP* G-2548A sa gojaznošću povezanih antropometrijskih i metaboličkih parametara i aktivnosti antioksidativnih enzima u populaciji gojaznih osoba. U studiji je uključena grupa koju je činio 31 ispitanik sa hiperalimentacionim tipom gojaznosti (prosečne starosti  $39,26 \pm 11,45$  godina, BMI:  $41.51 \pm 9.22$  kg/m<sup>2</sup>) i grupa od 36 zdravih, normalno uhranjenih osoba (prosečne starosti:  $33.55 \pm 6.46$  godina; BMI:  $22.63 \pm 1.94$  kg/m<sup>2</sup>). Uzorci krvi su sakupljeni za izolaciju DNK, serumu za određivanje koncentracije leptina i lipida, lipoproteina, slobodnih masnih kiselina (SMK), azot monoksida (NO) i C- reaktivnog proteina (CRP) kao markera inflamacije i za merenja 4-hidroksi-2-nonenola (4-HNE), markera lipidne peroksidacije i aktivnosti antioksidativnih enzima, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR), kao i određivanje ukupnog antioksidativnog statusa (TAS). Genotipovi varijante *LEP* G-2548A su određeni lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i restrikcionom analizom sintetisanih fragmenata DNK (RFLP).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su gojazni ispitanici imali značajno veću telesnu masu (BW), indeks telesne mase (BMI), obim struka (WC), sistolni krvni pritisak (SBP) i dijastolni krvni pritisak (DBP). Kod gojaznih ispitanika uočen značajno viši nivo insulina našte u plazmi (FPI) i 2 sata posle jela (2 h PI), indeks rezistencije na insulin našte (HOMA-IR) i 2 sata posle jela (2 h HOMA-IR), lipoproteina male gustine (LDL), kao i odnos LDL/lipoproteini velike gustine (HDL), triglicerida (TG), apolipoproteina B (ApoB), dok su nivoi HDL i apolipoprotein AI (ApoA-I) bili značajno niži u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Nisu uočene značajne promene nivoa glukoze našte u plazmi (FPG), kao ni 2 sata posle jela (2 h PG), ukupnog holesterola (TC) i lipoproteina (a) (Lp (a)) između gojaznih i kontrolnih ispitanika. Nivoi leptina bili su značajno viši kod gojaznih ispitanika u poređenju sa

kontrolnim. Raspodela frekvencije genotipova varijante *LEP* G-2548A je bila u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži i kod gojaznih i kod kontrolnih ispitanika. Distribucija frekvencija genotipova se nije značajno razlikovala između ispitivanih grupa. Učestalost alela G i alela A za genetičku varijantu *LEP* G-2548A je: 0,60 i 0,40 u grupi gojaznih i 0,53 i 0,47 u kontrolnoj grupi.

Rezultati ove doktorske teze pokazuju postojanje statistički značajne asocijacije između genotipova varijante *LEP* G-2548A i antropometrijskih parametara BW, WC i BMI kod kontrolnih ispitanika. Koristeći dominantni model kod kontrolnih ispitanika nosilaca heterozigota GA i kontrolnih ispitanika nosilaca homozigota AA pokazana je statistički značajno manja telesna masa, obim struka i indeks telesne mase u poređenju sa kontrolnim ispitanicima nosiocima homozigota GG. Takođe, koristeći dominantan model kod kontrolnih ispitanika nosilaca heterozigota GA i kontrolnih ispitanika nosilaca homozigota AA koncentracija NO u plazmi bila je statistički značajno veća u poređenju sa kontrolnim ispitanicima nosiocima homozigota GG. Takođe, rezultati pokazuju postojanje statistički značajne asocijacije između genotipova varijante *LEP* G-2548A i metaboličkih parametara LDL i ApoB kod gojaznih ispitanika. Koristeći kodominantni model kod gojaznih ispitanika nosilaca genotipa AA varijante *LEP* G-2548A utvrđena je značajna asocijacija sa nižim nivoom LDL u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima genotipa GA, odnosno, nosiocima genotipa GG. Koristeći recisivni model analize, kod gojaznih ispitanika nosilaca genotipa AA uočena je značajna asocijacija sa nižim nivoom LDL u odnosu na gojazne ispitanike nosioce genotipa GG kao i gojazne ispitanike nosioce genotipa GA. Koristeći kodominantni model analize kod gojaznih ispitanika nosilaca genotipa AA uočeno je postojanje značajne asocijacije sa nižim nivoom ApoB u odnosu na gojazne ispitanike nosioce genotipa GA. Za ostale ispitivane parametre nije uočeno postojanje asocijacije sa *LEP* G-2548A.

U zaključku, ovo je prva studija koja istražuje asocijaciju genetičke varijante *LEP* G-2548A sa antropometrijskim i metaboličkim parametrima i aktivnosti antioksidativnih enzima kod gojaznih osoba u srpskoj populaciji. U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je postojanje asocijacije između genetičke varijante *LEP* G-2548A sa antropometrijskim parametrima (BW, WC i BMI) i markerom inflamacije (NO) kod



kontrolnih ispitanika, kao i sa metaboličkim parametrima (LDL i ApoB) kod gojaznih ispitanika.

Ključne reči: **gojaznost, leptin, *LEP* G-2548A, genetička varijanta, antropometrijski parametri, metabolički parametri, antioksidativni enzimi, lipidi**

Naučna oblast: **Biologija**

Uža naučna oblast: **Molekularna endokrinologija**

UDK broj: **577.21: [616.39: [591.476:591.133.3]]:611/612(043.3)**

## ABSTRACT

**Title of doctoral dissertation: "Association of changes in anthropometric and metabolic parameters and activities of antioxidative enzymes with leptin gene polymorphism LEP G-2548 in obese people in Serbia"**

The growth in obesity rates presents a major public health concern. In Europe, its prevalence is within the range of 10–25% in men and 10–30% in women. The prevalence of obesity increased in Serbia and it became a significant public health problem among adults: up to 54% examinees of adult populations were obese. Obesity is a disease defined as abnormal accumulation of body fat mass, which may arise as a result of increased energy intake and decreased energy expenditure. Genetic predisposition to obesity has been reported as a major risk factor for individuals, but identification of the involved genes is still difficult to elucidate. Considering the fact that leptin concentration is significantly increased in obese persons and at the same time is proportional with body weight, the leptin gene (*LEP*) has been evaluated for polymorphisms that could potentially be related to the pathophysiology of obesity and its complications. Leptin is a protein hormone encoded by the obese (*ob*) gene, and is synthesized predominantly by white adipose cells. Central nervous system, namely hypothalamic nuclei, is the target where leptin exerts most of its effects on energy metabolism. Leptin has several systemic effects such as decreases food intake, increases energy expenditure, and decreases metabolic efficiency. In addition, leptin has been shown to influence a wide spectrum of biological functions, such as lipid and glucose metabolism, synthesis of glucocorticoids as well as insulin, and there is an increasing evidence that leptin is involved in the pathogenesis of inflammatory, and autoimmune diseases. Adequate fat stores and leptin concentrations decrease the need for food intake however, allow expenditure of energy *via* a variety of neuroendocrine axes, autonomic outputs and activities. Rare obesity syndromes are associated with mutations of *LEP* in humans. A common single nucleotide polymorphism within the 5' promoter region consisting in G to A substitution at nucleotide (nt) -2548 (*LEP* G-2548A, -dbSNPID rs7799039) upstream of the ATG start site, in *LEP* promoter has been associated with variations in the concentrations of plasma leptin and body mass index (BMI) in obese individuals. It has been shown that *LEP* G-2548A polymorphism influences expression

and secretion of leptin in adipose tissue. Although the *LEP* variants may be important to the pathophysiology of human obesity and associated complications, the associations of *LEP* G 2548A polymorphism with obesity have been inconclusive.

The one of the aims of this doctoral dissertation was to investigate possible associations of *LEP* promoter polymorphism *LEP* G-2548A and obesity-associated anthropometric and metabolic parameters and activities of antioxidative enzymes in obese population. Group of 31 examinees with hyperalimentary type of obesity (mean age:  $39.26 \pm 11.45$  years; BMI:  $41.51 \pm 9.22$  kg/m<sup>2</sup>) and 36 healthy, nonobese, normal weight examinees (mean age:  $33.55 \pm 6.46$  years; BMI:  $22.63 \pm 1.94$  kg/m<sup>2</sup>) were studied. Blood samples were collected for DNA isolation, serum leptin and serum lipids, lipoproteins, free fatty acid (FFA), nitrogen oxide (NO) and C- reactive protein (CRP) as markers of inflammation measurements as well as for 4-hydroxy -2- nonenol (4-HNE), i.e. marker of lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) together with total antioxidant status (TAS). *LEP* G-2548A genotypes were determined by PCR restriction fragment length polymorphism based analyses.

Results from this doctoral dissertation show that obese examinees had significantly higher body weight (BW), BMI, waist circumference (WC), systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) compared with control examinees. As for metabolic parameters the obese subjects had significantly higher fasting plasma insulin (FPI), 2 h plasma insulin (2 h PI) values, homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR), 2 h HOMA-IR levels, low density lipoproteins (LDL), LDL/high density lipoproteins (HDL) ratio, triglycerides (TG), apolipoprotein B (ApoB) levels while HDL and apolipoprotein A-I (ApoA-I) levels were significantly lower compared with control examinees. No significant changes of fasting plasma glucose (FPG), 2 h plasma glucose (2 h PG), total cholesterol (TC) and lipoprotein (a) (Lp(a)) levels between obese and control examinees were observed. Leptin levels were significantly higher in obese examinees compared with control.

The genotype frequency distribution for *LEP* G-2548A gene polymorphism was in Hardy–Weinberg equilibrium for both obese and control examinees. The distribution of the genotype frequencies was not significantly different between the studied groups.

The frequencies of alleles G and A for *LEP* G-2548A polymorphism was: 0.60 and 0.40 in the obese group, and 0.53 and 0.47 in control group.

Statistically significant associations between *LEP* G-2548A genotypes and anthropometric parameters BW, WC and BMI in control examinees were observed. Results obtained by using dominant model of analysis show that control examinees with GA heterozygote and AA homozygote, both have significantly lower levels of BW, WC and BMI compared with control examinees with GG homozygote. The same analysis shows that control examinees with GA heterozygote and AA homozygote both, have significantly higher levels of NO concentration compared with control examinees with GG homozygote. Furthermore, results show statistically significant associations between *LEP* G-2548A genotypes and metabolic parameters LDL and ApoB in obese examinees. Using codominant model of analysis, results show that obese examinees with AA homozygote have significantly lower levels of LDL compared with both the obese examinees with GG homozygote and obese examinees with GA heterozygote. Recessive model of analysis demonstrate that AA homozygote have significantly lower levels of LDL compared with both, obese examinees with GG homozygote and obese examinees with GA heterozygote. Analysis by using codominant model shows that obese examinees with homozygote AA have significantly lower levels of ApoB compared with obese examinees with GA heterozygote. No other association was found.

In conclusion, this is the first study that investigates the association between *LEP* G-2548A polymorphism with anthropometric and metabolic parameters and activities of antioxidant enzymes in Serbian population. Results generated within this doctoral thesis show the association between *LEP* G-2548A polymorphism with anthropometric parameters (BW, WC and BMI) and marker of inflammation (NO) in control examinees and with metabolic parameters (LDL and ApoB) in obese examinees.

Key Words: **obesity, leptin, *LEP* G-2548A, polymorphism, anthropometric parameters, metabolic parameters, antioxidative enzymes, lipids**

Scientific Group: **Biology**

Specific Area Within a Group: **Molecular Endocrinology**

UDK number: **577.21: [616.39: [591.476:591.133.3]]:611/612(043.3)**

## SPISAK SKRAĆENICA

**2h HOMA-IR** indeks rezistencije na insulin 2h posle doručka

**2h PG** koncentracija glukoze u plazmi 2h posle doručka – (*engl. 2h plasma glucose*)

**2h PI** koncentracija insulina u plazmi 2h posle doručka – (*engl. 2h plasma glucose*)

**4-HNE** 4-hidroksi- 2-nonenol

**AAP** 4-aminoantipirin

**AgRP** peptid sličan Aguti proteinu – (*engl. agouti-related peptide*)

**AK** amino kiselina

**Alu** repetitivna sekvenca

**AOS** antioksidativni zaštitni sistem

**Apo-AI** apolipoprotein – AI

**ApoB** apolipoprotein B

**ApoC** apolipoprotein C

**ApoE** apolipoprotein E

**ARC** lučno jedro – (*lat. nucleus arcuatus*)

**BMI** indeks telesne mase – (*engl. body mass index*)

**BSA** albumin iz govedeg seruma – (*engl. bovine serum albumin*)

**BW** telesna masa - (*engl. body weight*)

**C/EBP** vezujuće mesto za CCAAT/pojačivač-vezujući protein

**CAT** katalaza

**CETP** protein za transfer holesterol estera – (*engl. cholesteryl ester transfer protein*)

**CNS** centralni nervni sistem

<b>CREB</b>	transkripcijski regulator koji se vezuje za regulatorne sekvence DNK koje odgovaraju na ciklični adenozin monofosfat (cAMP)
<b>CRH</b>	domen citokinskog receptora
<b>CRP</b>	C – reaktivni protein – ( <i>engl. C- reactive protein</i> )
<b>CSF3</b>	stimulirajućim faktorom kolonije 3 – ( <i>engl. colony-stimulating factor 3</i> )
<b>DBP</b>	dijastolni krvni pritisak
<b>DDC</b>	dietilditiokarbamat
<b>DHBS</b>	3,5-dihloro-2-hidroksibenzen sulfonat
<b>DMH</b>	dorzomedijalno jedro hipotalamusa
<b>DMT2</b>	dijabetes tipa 2 – ( <i>engl. type 2 diabetes mellitus</i> )
<b>eNOS</b>	endotelna azot monoksid sintaza
<b>ERE</b>	regulatornih sekvenci koje odgovaraju na estrogen – ( <i>engl. estrogen response element</i> )
<b>ERK</b>	kinaze regulisane vanćelijskim signalom – ( <i>engl. extracellular signal-regulated kinases</i> )
<b>FN III</b>	domen fibronektina tip III
<b>FPG</b>	koncentracija glukoze u plazmi pre doručka – ( <i>engl. fasting plasma glucose</i> )
<b>FPI</b>	koncentracija insulina u plazmi pre doručka – ( <i>engl. fasting plasma insulin</i> )
<b>GABA</b>	gama-aminobuterna kiselina
<b>GH</b>	hormon rasta – ( <i>engl. growth hormone</i> )
<b>GPx</b>	glutation peroksidaza
<b>GR</b>	glutation reduktaza
<b>GRE</b>	regulatorna sekvenca koja odgovara na glukokortikoide
<b>GSH</b>	oksidovani glutation
<b>GSSG</b>	redukovani glutation
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	vodonik peroksid

<b>HbA<sub>1c</sub></b>	glikozilovani hemoglobin – ( <i>engl. glycosilated haemoglobin</i> )
<b>HDL</b>	lipoproteini velike gustine – ( <i>engl. high-density lipoproteins</i> )
<b>HOMA-IR</b>	indeks rezistencije na insulin pre doručka – ( <i>engl. homeostatic model assessment of insulin resistance</i> )
<b>HRP</b>	peroksidaza iz rena – ( <i>engl. horseradish peroxidase</i> )
<b>IDL</b>	lipoprotein intermedijarne gustine – ( <i>engl. intermediate-density lipoprotein</i> )
<b>IGD</b>	domen nalik imunoglobulinu
<b>IL-6</b>	interleukin- 6
<b>INT</b>	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolijum hlorid
<b>IR</b>	rezistencija na insulin - ( <i>engl. insulin resistance</i> )
<b>JAK</b>	samo druga kinaza – ( <i>engl. just another kinase</i> )
<b>LD</b>	neslučajna asocijacija alela – ( <i>engl. linkage disequilibrium</i> )
<b>LDL</b>	lipoproteini male gustine – ( <i>engl. low-density lipoproteins</i> )
<b>LEP G-2548A</b>	genetička varijanta G-2548A u genu za leptin
<b>LEP/Ob</b>	gen za leptin
<b>LEP-R</b>	receptor za leptin
<b>LH</b>	lateralno jedro hipotalamusa
<b>LIF</b>	inhibitorni faktor leukemije
<b>Lp(a)</b>	lipoprotein (a)
<b>LPL</b>	lipoproteinska lipaza
<b>LV</b>	leva komora – ( <i>engl. left ventriculum</i> )
<b>MAPK</b>	mitogenom aktivirane protein kinaze – ( <i>engl. mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>MCR</b>	melanokortinski receptor
<b>MER11</b>	sekvenca srednjeg ponavljanja frekvencije
<b>MetS</b>	metabolički sindrom – ( <i>engl. metabolic syndrome</i> )



<b>NADPH</b>	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
<b>NF-κB</b>	nukleusni faktor κB – ( <i>engl. nuclear factor κB</i> )
<b>NO</b>	azot monoksid – ( <i>engl. nitric oxide</i> )
<b>NO<sub>2</sub></b>	nitrit
<b>NO<sub>3</sub></b>	nitrat
<b>NOX</b>	NADPH oksidazni put
<b>NPY</b>	neuropeptid Y – ( <i>engl. neuropeptide Y</i> )
<b>NTD</b>	N-terminalni domen
<b>OxS</b>	oksidativni stres – ( <i>engl. oxidative stress</i> )
<b>PAI-1</b>	inhibitor aktivatora plazminogena-1 – ( <i>engl. plasminogen activator inhibitor-1</i> )
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimeraze – ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
<b>PI3-K</b>	fosfatidilinozitol 3-kinaze – ( <i>engl. phosphoinositide 3-kinase</i> )
<b>PKB</b>	protein kinaze B – ( <i>engl. Protein Kinase B</i> )
<b>POMC</b>	proopiomelanokortin – ( <i>engl. proopiomelanocortin</i> )
<b>PTP1B</b>	protein tirozin fosfataze 1B – ( <i>engl. protein tyrosine phosphatase 1B</i> )
<b>RFLP</b>	restrikciona analiza sintetisanih fragmenata DNK
<b>ROS</b>	reaktivne vrste kiseonika – ( <i>engl. reactive oxygen species</i> )
<b>SBP</b>	sistolni krvni pritisak
<b>sdLDL</b>	male guste LDL čestice – ( <i>engl. small dense LDL</i> )
<b>SHP-2</b>	SH2 domen homologije 2 slične Src
<b>SLR</b>	selektivna rezistencija na leptin – ( <i>engl. selective leptin resistance</i> )
<b>SMK</b>	slobodne masne kiseline – ( <i>engl. free fatty acids</i> )
<b>SOCS3</b>	supresor signalizacije citokina 3 – ( <i>engl. suppressor of cytokine signaling</i> )
<b>SOD</b>	superoksid dismutaza
<b>Sp-1</b>	protein specifičnosti 1

<b>STAT</b>	pretvarač signala i aktivator transkripcije – ( <i>engl. signal transducer and activator of transcription</i> )
<b>TAS</b>	ukupni antioksidativni status – ( <i>engl. total antioxidative status</i> )
<b>TATA</b>	TATA blok
<b>TC</b>	ukupni holesterol – ( <i>engl. total cholesterol</i> )
<b>TEA</b>	trietanolamin
<b>TEMED</b>	tetrametiletildiamin
<b>TG</b>	trigliceridi – ( <i>engl. triglycerides</i> )
<b>TMB</b>	tetrametilbenzidin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	faktor nekroze tumora $\alpha$ - ( <i>engl. tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>VLDL</b>	lipoproteini veoma male gustine – ( <i>engl. very low-density lipoproteins</i> )
<b>VMH</b>	ventromedijalno jedro hipotalamusa
<b>WC</b>	obim struka – ( <i>engl. waist circumference</i> )
<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	stimulišući hormon $\alpha$ -melanokortin – ( <i>engl. alpha-melanocyte-stimulating hormone</i> )

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Gojaznost .....	2
1.1.1. Definicija i nastanak gojaznosti.....	2
1.1.2. Dijagnostikovanje gojaznosti .....	3
1.1.3. Epidemiologija gojaznosti .....	5
1.1.4. Tipovi i podtipovi gojaznosti.....	6
1.1.5. Mortalitetne i morbiditetne karakteristike gojaznosti.....	7
1.2. Masno tkivo .....	14
1.2.1. Uloga mrkog i belog masnog tkiva .....	14
1.2.2. Uloga masnog tkiva u nastanku komplikacija gojaznosti .....	15
1.3. Leptin .....	16
1.3.1. Istorijat leptina.....	16
1.3.2. Struktura proteina leptina .....	16
1.3.3. Biosinteza leptina .....	17
1.3.4. Sekretacija leptina .....	18
1.3.5. Transport leptina.....	19
1.3.6. Uloga leptina u regulaciji energetskog balansa .....	19
1.3.7. Receptor za leptin .....	21
1.3.8. Signalna transdukcija i način delovanja leptina nakon vezivanja za svoj receptor	23
1.3.9. Rezistencija na leptin.....	26
1.3.10. Fiziološka uloga leptina.....	27
1.3.11. Struktura gena za leptin .....	28
1.3.12. Genetička varijanta G-2548A u genu za LEP .....	29
1.3.13. Genetička varijanta LEP G-2548A i gojaznost .....	30

1.4.	Oksidativni stres (OxS).....	30
1.4.1.	Antioksidativni zaštitni sistem (AOS).....	31
1.4.2.	Enzimske komponente AOS.....	32
1.4.3.	Neenzimske komponente AOS.....	33
1.4.4.	OxS i gojaznost.....	34
2.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	38
2.1.	HIPOTEZA.....	38
2.2.	CILJEVI.....	39
3.	MATERIJAL I METODE.....	40
3.1.	Ispitanici.....	40
3.2.	Metode rada.....	41
3.2.1.	Antropometrijska merenja.....	41
3.2.2.	Merenje krvnog pritiska.....	41
3.2.3.	Biohemijske analize krvi.....	41
3.2.4.	Određivanje lipidnog profila.....	42
3.2.5.	Određivanje koncentracije inflamatornih markera.....	44
3.2.6.	Određivanje koncentracije insulina u serumu ispitanika.....	46
3.2.7.	Određivanje parametra OxS 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE).....	48
3.2.8.	Određivanje parametara AOS.....	48
3.2.9.	Analiza genetičke varijante gena za leptin.....	51
3.2.10.	Statistička analiza rezultata.....	58
4.	REZULTATI.....	60
4.1.	Demografski podaci kontrolne i gojazne grupe ispitanika.....	60
4.2.	Antropometrijske karakteristike kontrolnih i gojaznih ispitanika.....	60
4.3.	Određivanje faktora rizika razvoja komplikacija gojaznosti kontrolnih i gojaznih ispitanika.....	61

4.3.1.	Krvni pritisak kontrolnih i gojaznih ispitanika.....	61
4.3.2.	Parametri metabolizma glukoze i koncentracije insulina kontrolnih i gojaznih ispitanika.....	62
4.3.3.	Koncentracija leptina u serumu kontrolnih i gojaznih ispitanika.....	66
4.3.4.	Određivanje koncentracije markera inflamacije - NO i CRP kod kontrolnih i gojaznih i ispitanika.....	67
4.4.	Parametri metabolizma lipida i lipoproteina kontrolnih i gojaznih ispitanika.	68
4.5.	Ispitivanje parametra oksidativnog stresa i parametara antioksidativne zaštite u krvi kontrolnih i gojaznih ispitanika.....	72
4.5.1.	Određivanje parametra OxS, markera lipidne peroksidacije - 4-HNE.....	72
4.5.2.	Određivanje parametara AOS gojaznih i kontrolnih ispitanika.....	73
4.6.	Asocijacija antropometrijskih parametara, faktora rizika, parametara metabolizma glukoze, lipida i lipoproteina, kao i parametara OxS i AOS sa genetičkom varijantom G-2548A u genu za leptin.....	75
4.6.1.	Genetička varijanta u genu za leptin .....	76
4.6.2.	Asocijacija antropometrijskih parametara sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin.....	77
5.	DISKUSIJA.....	84
5.1.	Antropometrijski parametri gojaznih ispitanika .....	85
5.2.	Faktori rizika kardiovaskularnih oboljenja gojaznih ispitanika.....	86
5.3.	Parametri metabolizma glukoze kod gojaznih ispitanika .....	87
5.4.	Parametri metabolizma lipida, lipoproteina i nivo SMK gojaznih ispitanika..	88
5.5.	Promene u koncentraciji inflamatornih markera gojaznih ispitanika .....	92
5.6.	Parametar OxS i enzimi AOS gojaznih ispitanika.....	94
5.7.	Asocijacija antropometrijskih parametara, faktora rizika, parametara metabolizma glukoze i lipida, markera inflamacije, parametara OxS i enzima AOS sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin.....	96
6.	ZAKLJUČCI.....	101
7.	LITERATURA.....	103

# 1. UVOD

Gojaznost poprima razmere epidemije i jedna je od najčešćih hroničnih, nezaraznih bolesti, kako u svetu, tako i kod nas. U Srbiji je jedan od važnijih zdravstvenih problema sa učestalošću do 54% (Grujic i sar., 2010). Povećanje telesne mase rezultuje brojnim metaboličkim poremećajima, kao što su rezistencija na insulin (IR), aterogena dislipidemija i hipertenzija (NIH 1998; Must i sar., 1999). Takođe, gojaznost je bitan faktor rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, kao što su bolesti koronarnih i cerebralnih krvnih sudova, moždani udar, infarkt miokarda itd, koje su vodeći uzrok smrti u svetu (WHO 2009). Poznato je da masno tkivo služi kao skladište energije, ali su sekretorni produkti ovog tkiva uključeni u kompleksnu patogenezu metaboličkih poremećaja povezanih sa gojaznošću. Adipozno tkivo stvara veliki broj različitih bioaktivnih peptida poznatih kao adipocitokini, u koje spada i leptin (Zhang i sar., 1994; Havel 2000). Kod gojaznih ispitanika je pokazano povišenje nivoa leptina, koje se smanjuje sa redukcijom kalorijskog unosa (Havel 2000; Stokic i sar., 2015). Signalni put leptina se ukršta sa signalnim putem insulina, i oni zajedno utiču na regulaciju apetita, unos hrane i potrošnju energije. Današnja izučavanja gena za leptin (LEP) su usmerena na traženje genetičkih varijanti potencijalno povezanih sa patofiziologijom gojaznosti, dijabetesom, kao i komplikacijama udruženim sa ovim patološkim stanjima. Supstitucija G u A na nukleotidu -2548 uzvodno od start kodona ATG u promotoru gena za leptin (LEP G-2548A) je genetička varijanta asocirana sa povećanim stvaranjem i sekrecijom leptina (Constantin i sar., 2010). Međutim, različite populacione studije ove genetičke varijante pokazuju kontradiktorne rezultate.

Poznato je iz literature da u stanju gojaznosti, kao i mnogim drugim patofiziološkim stanjima, dolazi do povećanja reaktivnih vrsta kiseonika i azota (Sies i sar., 2005; Nikolic i sar., 2011). Skorija saznanja o obnavljanju poremećene aktivnosti antioksidativnih enzima kod ob/ob miševa ukazuje na ulogu leptina u modulaciji aktivnosti ovih enzima (Shimabukuro i sar., 1997). Enzimskom komponenta

antioksidativnog zaštitnog sistema (AOS) čini prvu liniju antioksidativne zaštite i to su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR), dok je neenzimska komponenta sekundarna linija odbrane i čine je vitamini E i C,  $\beta$ -karoteni i tiolova jedinjenja (Xia i sar., 1995; Sies i sar., 2005).

S obzirom na činjenicu da je koncentracija leptina značajno povećana kod gojaznih osoba i proporcionalna telesnoj masi (Considine i sar., 1996; Mantzoros 1999), aktuelno je izučavanje asocijacije genetičke varijante u genu za leptin sa antropometrijskim i metaboličkim parametrima (Hoffstedt i sar., 2002). Iako genetičke varijante leptina mogu biti važne u patofiziologiji humane gojaznosti i njenih komplikacija (Paracchini i sar., 2005; Portoles i sar., 2006; Stokic i sar., 2014) asocijacija genetičke varijante *LEP* G-2548A sa antropometrijskim i metaboličkim parametrima u stanjima gojaznosti nije u potpunosti objašnjena (Li i sar., 1999; Wang i sar., 2006; Duarte i sar., 2007; Stokic i sar., 2014).

## **1.1. Gojaznost**

### **1.1.1. Definicija i nastanak gojaznosti**

Gojaznost se definiše kao oboljenje koje se karakteriše prekomernim nagomilavanjem telesne masti koje narušava zdravlje i utiče na razvoj niza komplikacija. Dakle, gojaznost predstavlja patološko stanje organizma koje nastaje, uglavnom prekomernim unošenjem hranljivih materija, pri čemu dolazi do povećanja ukupne telesne mase, na račun povećanja telesne masti (Mayer 1969; Bray 1979; Vasiljević i sar., 2002). Gojaznost nastaje kada energetske unos premašuje energetske potrošnje koja je neophodna za održavanje kako bazalnog metabolizma, tako i za fizičke aktivnosti (Bray 1989). Kada se poremeti ravnoteža između unosa hrane i energetske potrošnje, višak kalorija (energije) se deponuje u organizmu u vidu energetske rezerve (glikogen i masti) (Spiegelman i Flier 2001). Energetske rezerve se troše u situacijama povećanih potreba organizma za energijom ili ukoliko organizam gladuje (Spiegelman i Flier 2001). U odnosu na uzroke nastanka razlikuju se sledeći tipovi gojaznosti:

- **Nasledna gojaznost** se ponekad javlja u sklopu naslednih sindroma (tzv. Sindromima gojaznosti) kao što su: Turnerov sindrom, Kohenov sindrom, Pradez-Vili-Lobhartov sindrom i drugi (Pi-Sunyer 2000)

- **Hiperalimentaciona gojaznost** i/ili gojaznost usled fizičke neaktivnosti najčešći su uzročnici gojaznosti savremenog doba, jer je prekomerno unošenje hrane bogate energijom udruženo sa fizičkom neaktivnošću (Pi-Sunyer 2000)

- **Gojaznost uzrokovana endokrinološkim i metaboličkim poremećajima.** Ovaj tip gojaznosti nastaje usled poremećaja lučenja hormona (Kušijev sindrom, nedostatak hormona rasta). Takođe u menopauzi i trudnoći može nastati gojaznost (Pi-Sunyer 2000)

- **Gojaznost nastala usled oboljenja centralnog nervnog sistema.** Ovaj tip gojaznosti uzrokuju: traume ili tumori regija hipotalamusa odgovornih za regulaciju osećaja gladi i sitosti (Pi-Sunyer 2000)

- **Jatrogena gojaznost** –primena raličitih lekova kao što su antidepresivi, kortikosteroidi i drugi, mogu da dovedu do gojaznosti. (Pi-Sunyer 2000).

### **1.1.2. Dijagnostikovanje gojaznosti**

U cilju određivanja telesne strukture fizički aktivne populacije najčešće su korišćene antropometrijske metode.

#### **1.1.2.1. Antropometrijska merenja**

Antropometrijska merenja čini skup relativno jednostavnih procedura za procenu telesnog sastava. Merenjem dimenzija ljudskog tela kao što su: telesna visina, telesna masa (BW; *engl. body weight*), debljina kožnih nabora, obim struka (WC; *engl. waist circumference*) i dijаметar ekstremiteta, i primenom određenih matematičkih jednačina dobijaju se podaci o telesnoj gustini i veličini masne i bezmasne mase tela (Ferland i sar., 1989). Iz literature se može uočiti da je predložen niz antropometrijskih parametara u pozitivnoj korelaciji sa faktorima rizika, kao i sa morbiditetom i



mortalitetom ili su predloženi antropometrijski parametri pokazatelji veličine masne mase (Chumlea i Guo 1994). Još uvek se traga za najidealnijim parametrom koji bi imao visoku senzibilnost u detekciji smanjenja rizika nakon smanjenja telesne mase s jedne strane, a s druge strane idealni parametar bi sa velikom verovatnoćom mogao da ukaže na rizik nastanka gojaznosti (Chumlea i Guo 1994).

#### **1.1.2.1.1. Indeks telesne mase (BMI)**

Kao prva instanca u dijagnostici gojaznosti koristi se vrednost indeksa telesne mase (BMI; *engl. body mass index*) koji je u korelaciji kako sa masnom masom, tako i sa velikim brojem faktora rizika i niza komplikacija uzrokovanih gojaznošću. I pored svoje dobre korelacije sa navedenim faktorima, BMI ipak pokazuje izvesne varijacije kako u odnosu na pol, starost, rasnu i etničku pripadnost, tako i u odnosu na nivo fizičke aktivnosti (Lev-Ran 2001; Prentice i Jebb 2001). Prema preporukama Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) prekomerna telesna masa ili predgojaznost odgovara izmerenim vrednostima BMI između 25 i 29,9 kg/m<sup>2</sup>, dok se stanje gojaznosti definiše kada je vrednost BMI iznad 30 kg/m<sup>2</sup>. Vrednosti BMI iznad 40 kg/m<sup>2</sup> ukazuju na ekstremnu gojaznost (WHO 2000).

#### **1.1.2.1.2. Merenje obima struka**

Pored određivanja stepena gojaznosti neophodno je i poznavanje i veličine intraabdominalnog masnog tkiva koje je odgovorno za pojavu metaboličkih komplikacija, stoga je merenje obima struka neophodno (Pi-Sunyer 2000). Obim struka upravo predstavlja marker veličine intraabdominalnih masnih depoa. Uočeno je povećanje rizika nastanka niza poremećaja (naročito kardiovaskularnog sistema) kod muškaraca čiji je obim struka preko 94 cm, a ovaj rizik se povećava sa povećanjem obima struka preko 102 cm. Kod žena su te vrednosti niže i iznose 80 cm, odnosno, 88 cm (Pi-Sunyer 2000).

### **1.1.2.1.3. Merenje debljine kožnih nabora**

Merenje debljine potkožnog masnog tkiva se smatra vrlo korisnim parametrom kako u proceni veličine masne mase, tako i u proceni distribucije masnog tkiva. Telesna gustina se izračunava merenjem debljine određenog broja kožnih nabora. Zbir debljine kožnih nabora koji je izmeren na različitim tačkama tela može se koristiti za izračunavanje telesne gustine, a pod pretpostavkom da je gustina masnog kao i bezmasnog tkiva konstantna (Heyward i Stolarczyk 1996). Formule za izračunavanje posebno su definisane za pojedine starosne grupe, ali isto tako i za rasne i etničke grupacije, kao i za sportiste (Heyward i Stolarczyk 1996).

### **1.1.3. Epidemiologija gojaznosti**

Epidemiološki podaci pokazuju da od gojaznosti u svetu pati 10-60% odraslog stanovništva (Vasiljević i sar., 2002; Nguyen i El-Serag 2010). U industrijski visoko razvijenim zemljama gojaznost ima tendenciju stalnog porasta (Vague 1947; Pettitt i sar., 1982; Simopoulos i Van Itallie 1984; WHO 1989; Colditz 1992; Epstein i Higgins 1992; Pi-Sunyer 1993; Kuczmarski i sar., 1994; Sjostrom 1994; Foreyt i Goodrick 1995; Manson i sar., 1995; McGinnis i Lee 1995; Vasiljević i sar., 2002). Podaci SZO (WHO 2000) pokazuju da je u 2015. godini u svetu bilo 2,3 milijarde osoba sa prekomernom telesnom masom i više od 700 miliona gojaznih osoba (WHO 2000). Učestalost gojaznosti se progresivno povećava, čak i u populaciji starijih ljudi (WHO 1989; Vasiljević i sar., 2002). Epidemiološki podaci ispitivanja sprovedenih u sedam industrijski razvijenih zemalja (Francuska, Nemačka, Italija, Španija, Velika Britanija, SAD i Japan) ukazuju na rapidni porast gojaznosti u poslednjih 10-15 godina (Vasiljević i sar., 2002). U svim gore navedenim zemljama, sem Japana, smatra se da više od jedne četvrtine stanovništva pati od gojaznosti ili od prekomerne telesne mase (Vasiljević i sar., 2002; Nguyen i El-Serag 2010). Kada se govori o prevalenci gojaznosti ona je viša u SAD i Australiji nego u Evropi, dok je ekstremna gojaznost daleko najprisutnija u SAD (Vasiljević i sar., 2002; Nguyen i El-Serag 2010). U zemljama zapadne Evrope, Francuskoj, Nemačkoj, Italiji i Velikoj Britaniji smatra se da je oko 25% stanovništva gojazno (Seidell 1995). Ukoliko se tendencija rasta broja

gojaznih nastavi ovim tempom procenjuje se da će do 2230. godine svi Amerikanci biti gojazni (Sjostrom 1994; Vasiljević i sar., 2002).

Gojaznost je jedan od velikih zdravstvenih problema u Srbiji. Po poslednjim istraživanjima koje je objavio Institut za zaštitu zdravlja Srbije iz 2000. god, epidemiološki podaci za našu zemlju su sledeći:

- Više od polovine odraslog stanovništva Srbije (54%) ima problem prekomerne uhranjenosti (predgojaznost i gojaznost), pri čemu je 36,7% odraslih predgojazno, dok je 17,3% gojazno.

- Najveću ukupnu prevalencu (predgojaznost+gojaznost) ima Vojvodina (58,5%).

- Prosečna vrednost BMI u populaciji odraslog stanovništva Srbije je:  $26 \pm 4,74$  kg/m<sup>2</sup>.

- U ruralnim predelima je nešto viši prosečan BMI od  $26,3 \pm 4,93$  kg/m<sup>2</sup> u odnosu na urbane predele gde je  $25,8 \pm 4,61$  kg/m<sup>2</sup>.

#### **1.1.4. Tipovi i podtipovi gojaznosti**

##### **1.1.4.1. Tipovi gojaznosti**

Na osnovu distribucije masno-tkivnih depoa razlikuju se dva tipa gojaznosti:

1. **ginoidni** (gluteofemoralna, ginoidna ili "gojaznost u obliku kruške") karakteriše ga nagomilavanje masnih depoa pretežno subkutano u regionu kukova i butina i smatra se da ima delimično zaštitnu ulogu u slučaju komplikacija metaboličkog sindroma (MetS) (Hollmann i sar., 1997; Harlan i sar., 2011).

2. **androidni** (visceralna, abdominalna ili gojaznost u obliku „jabuke“) masni depoi se nagomilavaju uglavnom intraabdominalno i subkutano oko abdomena i osobe sa ovim tipom gojaznosti imaju veći rizik od razvoja metaboličkih poremećaja i kardiovaskularnih oboljenja (Hollmann i sar., 1997).

### **1.1.4.2. Podtipovi gojznosti**

Uzimajući u obzir tri osnovna aspekta na osnovu kojih se sagledava problem gojznosti (stepen uhranjenosti, udeo masne mase u ukupnoj telesnoj masi i abdominalnu distribuciju masnog tkiva), a u cilju prevencije gojznosti (Karelis i sar., 2004) definisano je nekoliko podtipova gojznosti baziranih na opservaciji da sve gojazne osobe ne ispoljavaju uvek sve metaboličke i kardiovaskularne poremećaje, a takođe i na zapažanju da se isti poremećaji mogu naći i kod normalno uhranjenih osoba. Na osnovu toga razlikuju se metabolički zdrave i metabolički rizično gojazne osobe, kao i metabolički gojazne i metabolički zdrave normalno uhranjene osobe (Wajchenberg 2000; Karelis i sar., 2004).

Klinička opservacija pokazuje da nezavisno od BMI, normalno uhranjene ili gojazne osobe mogu predstavljati zdravi ili nezdravi metabolički profil. Na osnovu BMI i metaboličkog profila osobe mogu biti klasifikovane u četiri fenotipa: 1) mršavi i zdravi, 2) mršavi i nezdravi (takođe poznati kao mršavi spolja, gojazni iznutra ili metabolički gojazni ali sa normalnom telesnom masom), 3) gojazni i nezdravi i 4) gojazni i zdravi (metabolički zdravi gojazni ili gojazni senzitivni na insulin) (An i sar., 2000; Couillard i sar., 2000; Hong i sar., 2000).

### **1.1.5. Mortalitetne i morbiditetne karakteristike gojznosti**

#### **1.1.5.1. Mortalitetne karakteristike gojznosti**

Podaci velikog broja epidemioloških studija pokazuju da je gojaznost oboljenje koje je udruženo sa povećanim rizikom mortaliteta (Manson i sar., 1987; Allison i sar., 1997). Pokazano je da je indeks telesne mase između 23-25 kg/m<sup>2</sup> udružen sa minimalnim mortalitetom, dok je rizik od mortaliteta veći kada je vrednost BMI iznad 30 kg/m<sup>2</sup> (Vasiljević i sar., 2002; Saguy i Riley 2005). Gojazne osobe (BMI>30 kg/m<sup>2</sup>) imaju dva do tri puta veći rizik od smrti u odnosu na osobe sa normalnom telesnom masom, dok preterano gojazne osobe (BMI>35 kg/m<sup>2</sup>) imaju kraći životni vek za pet do dvadeset godina u odnosu na osobe sa normalnom telesnom masom istog pola i godina (Cannon 2008). Uticaj gojznosti na razvitak komplikacija i povećani mortalitet može se objasniti dvostrukim delovanjem: direktnim, neposrednim uticajem gojznosti na

nastanak izvesnih oboljenja (naročito kardiovaskularnih) i indirektnim efektom na druge faktore rizika (arterijska hipertenzija, dijabetes, hiperlipoproteinemije) (Vasiljević i sar., 2002; Saguy i Riley 2005).

### **1.1.5.2. Morbiditetne karakteristike gojaznosti**

S obzirom na svoje razmere, sama gojaznost predstavlja ozbiljan zdravstveni problem imajući u vidu da sa sobom povlači povećan rizik nastanka niza bolesti. Gojaznost je udružena sa razvojem čitavog niza komplikacija, tako da praktično ne postoji organ ili sistem organa koji nisu zahvaćeni u ovom oboljenju (**Slika 1.**) (Stokic 2004).

Stoga je određivanje metaboličkih parametara u stanjima gojaznosti od izuzetne važnosti u prevenciji metaboličkih komplikacija uzrokovanih gojaznošću. Od mnogobrojnih metaboličkih parametara koji se određuju kod gojaznih osoba, navešćemo samo neke od njih, koji su određivani u okviru ove doktorske disertacije:

#### **1. Parametri metabolizma glukoze**

- merenje koncentracije glukoze i koncentracije insulina u plazmi gojaznih osoba pre jela (FPG; *engl. fasting plasma glucose*; FPI; *engl. fasting plasma insulin*), kao i 2 sata posle jela (2h PG; *engl. 2h plasma glucose*; 2h PI; *engl. 2h plasma insulin*).
- izračunavanje indeksa rezistencije na insulin pre (HOMA-IR; *engl. homeostatic model assessment of insulin resistance*) i 2 sata posle jela (2h HOMA-R)
- merenje nivoa glikozilovanog hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>; *engl. glycosilated haemoglobin*).

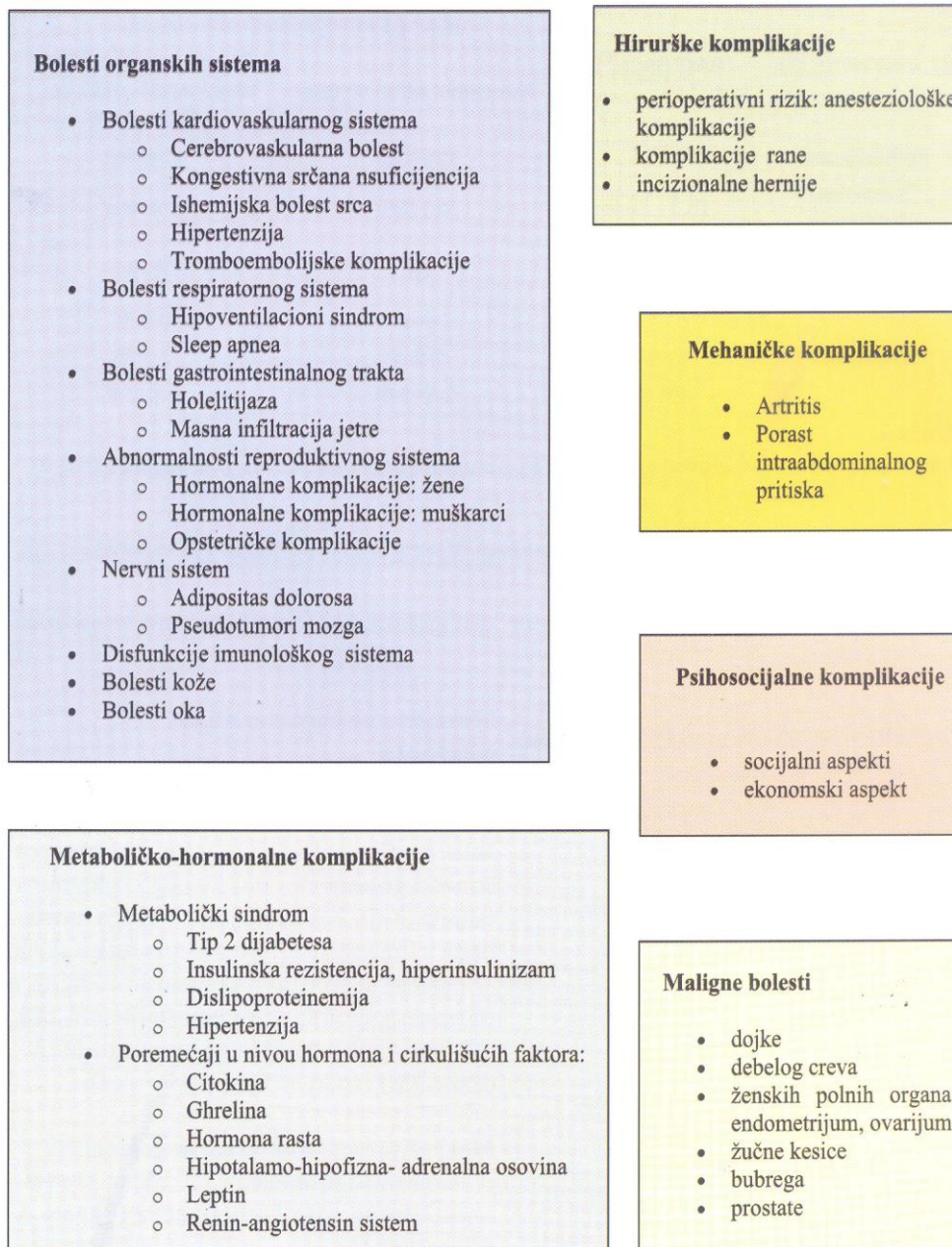
#### **2. Parametri metabolizma lipida**

- merenje koncentracije ukupnog holesterola (TC; *engl. total cholesterol*), triglicerida (TG; *engl. triglycerides*), lipoproteina velike gustine (HDL; *engl. high-density lipoproteins*), izračunavanje lipoproteina male gustine (LDL; *engl. low-density lipoproteins*) i odnosa LDL/HDL.
- merenje koncentracije apolipoproteina - AI (Apo-AI), apolipoproteina B (ApoB) i lipoproteina a (Lp(a)).

- merenje nivoa slobodnih masnih kiselina (SMK; *engl. free fatty acids*)

### 3. Parametri inflamacije

- merenje koncentracije azot monoksida (NO; *engl. nitric oxide*) i koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP; *engl. C- reactive protein*)



Slika 1. Morbiditetne posledice gojaznosti. Slika preuzeta iz knjige (Stokic 2004).

### 1.1.5.2.1. Uloga gojaznosti u razvoju kardiovaskularnih oboljenja

Kardiovaskularne komplikacije koje su povezane sa gojaznošću doprinose visokoj stopi morbiditeta i mortaliteta (Barbosa i sar., 2011). Sve komponente MetS su nezavisni uzročnici kardiovaskularnih događaja kao što su moždani udar, kardiomiopatije, bolest koronarnih arterija, infarkt miokarda, srčana insuficijencija i iznenadan srčani zastoj (Knudson i sar., 2007).

Kod gojaznih osoba prekomerne naslage masnog tkiva mehanički vrše pritisak na krvne sudove što uzrokuje otežan rad srca, dok se s druge strane, usled gojaznosti povećava i sama površina organizma te je potrebna i veća količina krvi za njegovo perfundovanje. Da bi organizam sa prekomernim masnim naslagama zadovoljio svoje uvećane metaboličke potrebe, volumen krvi koja cirkuliše i minutni volumen srca se povećavaju (Poirier i sar., 2006). Povećanje minutnog volumena srca kod gojaznih osoba uglavnom potiče od količine krvi koja se ispumpava iz srca pri kontrakciji, iako je zbog povećane simpatičke aktivnosti povećana i frekvencija srčanih kontrakcija (Messerli i sar., 1987). Kod takvih osoba, usled povećanog volumena krvi, dolazi do dilatacije i povećane napregnutosti zida leve komore (LV; *engl. left ventriculum*), što zatim dovodi do njene hipertrofije (Vasan 2003). Kod gojaznih osoba je česta pojava i povišenog krvnog pritiska (hipertenzije) (Sing i sar., 2003). Kod gojaznih osoba muškog i ženskog pola sa porastom BMI raste incidenca pojave hipertenzije (Sing i sar., 2003). Smatra se da su patofiziološki mehanizmi razvoja hipertenzije u gojaznosti višestruki (Kurukulasuriya i sar., 2011; Sudar i sar., 2012).

Pokazano je i postojanje pozitivne korelacije između telesne mase i srčane funkcije (Poirier i sar., 2006). Masne ćelije se nagomilavaju između mišićnih vlakana ili dovode do degeneracije kardiomiocita, što ima za posledicu poremećaje u sprovođenju ćelijskih signala signalne transdukcije u samom srcu (Poirier i sar., 2006). Gojaznost i prekomerna telesna masa predstavljaju najčešći faktor rizika kod pacijenata koji su pretrpeli infarkt miokarda (Lopez-Jimenez i Cortes-Bergoderi 2011). Više od dve trećine pacijenata sa koronarnom bolešću srca ima povećanu masu tela ili je gojazno (Romero-Corral i sar., 2006; Lopez-Jimenez i sar., 2008). Gojaznost kod adolescenata i odraslih osoba povezana je i sa učestalom pojavom ranih aterosklerotskih lezija (McGill i sar., 2002). Ateroskleroza koronarnih krvnih sudova počinje ili je ubrzana različitim

mehanizmima koji su karakteristični za stanja gojaznosti, kao što su povećan simpatički tonus, povećanje koncentracije SMK, povećan intravaskularni volumen i napregnutost vaskularnog zida, inflamacija i promene u lipoproteinima koji povećavaju aterogeni potencijal (Lopez-Jimenez i Cortes-Bergoderi 2011). Osim toga, protrombotsko stanje kod gojaznih osoba verovatno doprinosi nastanku akutnih koronarnih događaja (nefatalni infarkt miokarda i nestabilna angina pectoris) (Scarabin i sar., 1996; Lopez-Jimenez i Cortes-Bergoderi 2011) (Kurukulasuriya i sar., 2011; Sudar i sar., 2012).

Čuvena studija Framingham Heart Study (Higgins i sar., 1988) je pokazala da je gojaznost nezavistan faktor ishemijske bolesti srca. Takođe, autori iste studije pokazali su da bez obzira na pol, pojava kardiovaskularnih oboljenja raste sa povećanjem telesne mase. Rezultati epidemioloških studija (Mathew i sar., 2008) su pokazali da sa porastom indeksa telesne mase dolazi do značajnog razvoja ishemijske bolesti srca.

Zavisno od stepena gojaznosti kako kod muškaraca, tako i kod žena (Gustafson 2010) povećava se i broj faktora rizika, koji povećavaju rizik nastanka ishemijske bolesti srca. Gojazne osobe imaju dvostruko veći rizik za nastanak srčane insuficijencije u poređenju sa osobama koje imaju normalan indeks telesne mase (Krum i Abraham 2009). Pacijenti sa uznapredovalom gojaznošću, koji imaju srčanu insuficijenciju bez disfunkcije LV, dijagnostikuju se kao pacijenti sa kardiomiopatijom povezanom sa gojaznošću (Wong i sar., 2004). Ranije se smatralo da gojaznost može biti uzrok srčane insuficijencije samo preko intermedijarnih mehanizama kao što su hipertenzija ili koronarna bolest srca, ali postoje studije koje su pokazale da i drugi faktori mogu biti uzročnici kardiomiopatije povezane sa gojaznošću, kao što je hipertrofija LV povezana sa gojaznošću, koja ne može biti objašnjena samo povećanim krvnim pritiskom (Lopez-Jimenez i Cortes-Bergoderi 2011).

#### **1.1.5.2.2. Uloga gojaznosti u razvoju dijabetesa**

Dijabetes tipa 2 (DMT2) razvija se kao jedna od posledica gojaznosti, naročito gojaznosti abdominalnog tipa. Od ukupnog broja obolelih od DMT2 80-90% njih je gojazno (Stokic 2004; Eckel i sar., 2011). Smatra se da se u osnovi ove povezanosti nalazi poremećaj hiperinsulinemija i insulin-zavisno preuzimanje glukoze, što je



delimično uslovljeno promenama u samom masnom tkivu. Neki od faktora rizika za razvoj DMT2 su: abdominalna gojaznost, godine starosti, način života (pušenje, mala fizička aktivnost, alkohol, konzumiranje crvenog mesa i trans masnih kiselina, smanjeno unošenje dijetnih vlakana). Telesna masa, indeks telesne mase i obim struka su značajni prediktori individualnog rizika od DMT2. Rizik nastanka DMT2 je povezan sa intraabdominalnim masnim depozitima (Joost 2008). Veliki broj epidemioloških studija jasno pokazuju povezanost gojaznosti i rizika razvoja DMT2. Tako je uočeno da sa porastom indeksa telesne mase iznad  $30 \text{ kg/m}^2$  dolazi do povećanja rizika za razvoj DMT2 (Calle i sar., 1999; Kwok i sar., 2008). Rizik za razvoj ove bolesti je veći ukoliko je reč o visceralnom tipu gojaznosti. Jedan od bitnih razloga razvoja DMT2 je i IR pojava koja dovodi do kompenzativne hiperinsulinemije.

### **1.1.5.2.3. Gojaznost, rezistencija na insulin i kardiovaskularna oboljenja**

Rezistencija na insulin predstavlja stanje u kome je poremećen odgovor na insulin tj. insulin nije u mogućnosti da adekvatno ostvari svoje biološke efekte (Sowers i sar., 1994; Reaven i sar., 1996; Nolan i sar., 1997; Hunter i Garvey 1998). Rezistencija na insulin je nesposobnost perifernih ciljnih tkiva da odgovore na adekvatan način, čak i na fiziološke koncentracije insulina u cirkulaciji, stoga po definiciji IR predstavlja defekt u signalnoj transdukciji insulina (Pessin i Saltiel 2000). Pokazano je da je gojaznost usko povezana sa pojavom IR (Bonadonna i sar., 1990; McFarlane i sar., 2001; Reaven 2001) i sa metaboličkim i hormonskim promenama, kao posledica visceralne gojaznosti karakteristične za MetS (Reaven 2001).

IR može da se javi na tri nivoa u odnosu na oštećenje usled koga je nastala: pre vezivanja insulina za njegov receptor, na nivou receptora za insulin ili usled poremećaja u signalnom putu insulina tj. posle vezivanja insulina za njegov receptor (Hunter i Garvey 1998).

Pretpostavlja se da IR, koja se javlja usled gojaznosti predstavlja prvi korak u razvoju kardiovaskularnih bolesti (Kolterman i sar., 1981; Bogardus i sar., 1985; Godfrey i Barker 2000; Morisco i sar., 2006). Delimično, IR povećava rizik nastanka nekih kardiovaskularnih bolesti zbog hipertenzije i dislipidemije, kao i promena u

adipocitokinima, koje vode inflamaciji krvnih sudova (Shulman 2000; Rask-Madsen i King 2007). Oslabljena senzitivnost na insulin u skeletnim mišićima i jetri direktno je odgovorna za razvoj DMT2 kod čoveka (Shulman 2000). Iako IR u drugim organima kao što je srce, ne dovodi do bolesti *per se*, postoje dokazi koji ukazuju na uticaj IR na patogenezu kardiovaskularnih bolesti (Young 2010).

Kod pacijenata sa poremećajem u radu srca često je prisutna i IR (Witteles i Fowler 2008). Kod gojaznih pacova sa IR pokazana je akumulacija lipida u srcu, disfunkcija u kontraktilnosti LV i poremećena aktivacija insulinske signalne transdukcije i to fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3-K; *engl. phosphoinositide 3-kinase*) i protein kinaze B (PKB; Akt; *engl. Protein Kinase B*) (Boudina i sar., 2005).

#### **1.1.5.2.4. Uloga gojaznosti u poremećaju metabolizma lipida**

Poremećaj metabolizma lipida i lipoproteina postoji kod približno 30% gojaznih osoba (Martin i sar., 1994). Usled prisustva gojaznosti dolazi do razvoja hiperholesterolemije, hipertrigliceridemije, pada nivoa protektivnog HDL) holesterola i porasta nivoa LDL holesterola sa povećanim udelom malih, gustih LDL čestica (Darga i sar., 1994). Gojaznost povećava kardiovaskularni rizik preko faktora rizika kao što su povećani nivo TG, visok nivo lipoproteina male gustine LDL, nizak nivo lipoproteina velike gustine HDL, povišeni nivoi glukoze i insulina u krvi i visok krvni pritisak (Klop i sar., 2013). Svi ovi poremećaji lipida su tipične karakteristike MetS i mogu biti povezani sa inflamacijom koja delimično potiče iz samog masnog tkiva i direktno utiče na endotel krvnih sudova (Klop i sar., 2013). Važna veza između gojaznosti, MetS i dislipidemije je razvoj IR u perifernim tkivima (Klop i sar., 2013).

Nivo HDL holesterola odražava ravnotežu između stope stvaranja HDL i stope njegovog klirensa (Wang i Peng 2011). Međutim, povećani klirens HDL ima više uticaja na smanjenje HDL kod gojaznih osoba (Rashid i sar., 2006). Pokazano je da promene u sastavu HDL posebno povećanje udela TG čine većinu uzroka njegovog povećanog klirensa (Wang i Peng 2011). U stanju gojaznosti i IR masno tkivo oslobađa višak SMK. Nascenti lipoprotein veoma male gustine (VLDL; *engl. very low-density lipoproteins*) oslobođen iz jetre sadrži TG, holesterol, ApoB, apolipoprotein C (ApoC),

apolipoprotein E (ApoE) (Shelness i Sellers 2001). HDL razmenjuje holesterol estre sa VLDL u zamenu za fosfolipide i TG uz prisustvo proteina za transfer holesterol estra (CETP; *engl. cholesteryl ester transfer protein*) za čiju je aktivnost pokazano da je značajno povećana kod gojaznih osoba (Dullaart i sar., 1994). Sa većim uklanjanjem TG iz VLDL usled delovanja lipoproteinske lipaze (LPL) i CETP, sastav VLDL se menja i nastaje lipoprotein intermedijarne gustine (IDL; *engl. intermediate-density lipoprotein*) (Shelness i Sellers 2001). Kao rezultat gojaznosti veći broj HDL čestica je siromašan holesterolom i obogaćen TG. Lipidima siromašan HDL može da se reciklira i da formira nascentne HDL čestice, ali se pretpostavlja da se on najverovatnije izlučuje preko bubrega (Wang i Peng 2011), a HDL ostaci se vezuju za ćelije jetre ili bubrega koji posreduju u preuzimanju, internalizaciji i degradaciji ostataka HDL (Wang i Peng 2011).

## **1.2. Masno tkivo**

Dugi niz godina se smatralo da belo masno tkivo predstavlja neaktivan organ u kome se deponuje višak energije. Međutim, poslednjih godina je postalo jasno da masno tkivo ima kompleksnu ulogu (Hirsch 1984).

### **1.2.1. Uloga mrkog i belog masnog tkiva**

Masno tkivo je specifično vezivno tkivo koga čine adipociti. Pored adipocita u masnom tkivu se nalaze i drugi tipovi ćelija kao što su fibroblasti koji su prekursori adipocita, endotelne ćelije, imune ćelije itd. (Hauner i Loffler 1987). Na osnovu ćelijske strukture, lokalizacije, inervacije i funkcije razlikuju se dve osnovne vrste masnog tkiva: belo i mrko masno tkivo. Pored belog i mrkog masnog tkiva razlikuje se i masno tkivo koštane srži i dojke.

Uloga **mrkog masnog tkiva** je prvenstveno u termoregulaciji (Trayhurn i sar., 1982). Za mrko masno tkivo je karakteristično da je prisutno tokom fetalnog razvića, kao i tokom prvih godina života. Starenjem dolazi do transformacije mrkog u belo masno tkivo (Cinti 2002; Avram i sar., 2005). Takođe, belo masno tkivo se može

transformisati u mrko usled dugotrajnog izlaganja hladnoći. Tokom hladnoće dolazi do hiperplazije i hipertrofije adipocita (Lemieux i sar., 1994; Cannon i Nedergaard 2004; Avram i sar., 2005).

**Belo masno tkivo** se na osnovu anatomske lokalizacije deli na subkutano i visceralno masno tkivo (Cryer 1981). Belo masno tkivo je svojom funkcijom aktivno uključeno u metabolizam lipida i glukoze. Glavna uloga belog masnog tkiva je u skladištenju TG tokom procesa unosa hrane, kao i u oslobađanju SMK onda kada potrošnja energije premašuje unos hrane.

Belo masno tkivo ima vrlo važnu ulogu u kontroli energetske homeostaze u organizmu (Kershaw i Flier 2004; Galic i sar., 2010) kroz brojne endokrine, parakrine i autokrine signale.

### **1.2.2. Uloga masnog tkiva u nastanku komplikacija gojaznosti**

Komplikacije gojaznosti nastaju kao posledica morfoloških i funkcionalnih promena u samom masnom tkivu. Usled morfoloških promena dolazi do uvećanja ukupne mase masno-tkivnih depoa. Kao rezultat funkcionalnih promena dolazi do promena kako inflamatornog, tako i citotoksičnog profila, kao i do promena u endokrinnoj i metaboličkoj funkciji masnog tkiva.

Brojne studije su pokazale da abdominalno masno tkivo, nezavisno od ukupne masne mase predstavlja faktor rizika za razvoj komplikacija gojaznosti (Dvorak i sar., 1999). Centralna ili abdominalna gojaznost koja se odlikuje uvećanjem abdominalne masne mase, posebno njenog visceralnog depoa (Lemieux i sar., 1996; Fujimoto i sar., 1999) u vezi je sa IR, netolerancijom na glukozu, dislipidemijom, koronarnom bolešću srca, cerebrovaskularnim oboljenjima, DMT2, kao i mortalitetom od pomenutih komplikacija (Misra i Vikram 2003; Pi-Sunyer 2004). Poremećeni profil lipida u abdominalnoj gojaznosti čini hipertrigliceridemija, povišen nivo Apo B, malih gustih LDL čestica (sdLDL; engl. small dense LDL) i odnos ukupnog i HDL-holesterola, kao i nizak nivo protektivnog HDL-holesterola (Wajchenberg 2000; Deschenes i sar., 2003; Misra i Vikram 2003; Onat i sar., 2004). Abdominalna gojaznost je i jedan od nezavisnih faktora rizika za razvoj hipertenzije. Pokazano je da je masa visceralnog

masnog tkiva u pozitivnoj korelaciji i sa parametrima ateroskleroze kao što je odnos debljina intima-medija (Misra i Vikram 2003). Kod osoba sa izraženom abdominalnom gojaznošću uočeno je i povećanje ekskrecije albumina, koja značajno potencira kardiovaskularni rizik (Misra i Vikram 2003). Abdominalnu gojaznost prati i porast nivoa inflamatornih markera, kao što su CRP (Pi-Sunyer 2004) i NO. Tako je pokazano da delovanjem na CRP, citokin IL-6 inhibira sintezu endotelne atot monoksid sintaze (eNOS) i reaktivnih vrsta kiseonika (ROS; *engl. reactive oxygen species*), povećava vaskularnu permeabilnost, povećava ekspresiju adhezivnih molekula i na taj način dovodi do formiranja tromba (Stapleton i sar., 2008).

### **1.3. Leptin**

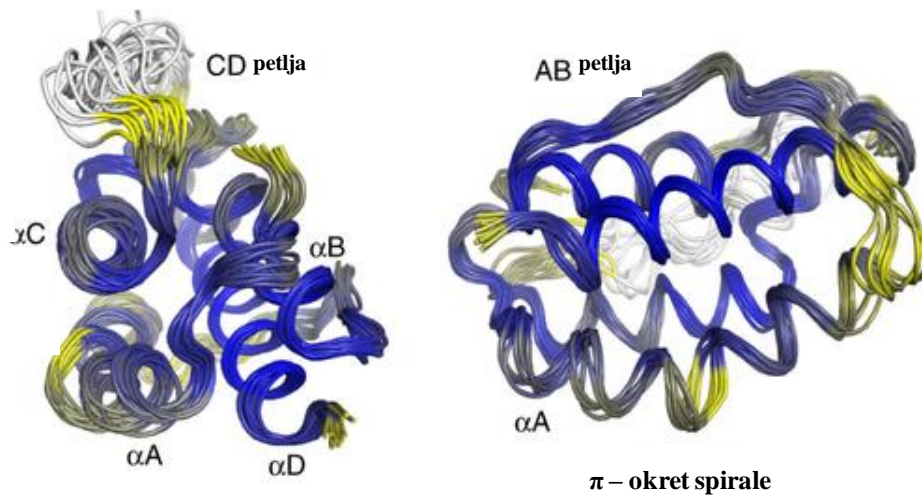
#### **1.3.1. Istorijat leptina**

Rezultati fizioloških eksperimenata Kolemana na gojaznim miševima ukazali su na prisustvo neidentifikovanog hormonskog faktora koji putem cirkulacije kod gojaznih miševa smanjuje masu masnog tkiva (Coleman 1988). Friedman i saradnici su 1994. godine identifikovali nepoznati hormonski faktor i inicijalno ga nazvali *Ob* genski produkt s obzirom da je identifikovan u *ob/ob* gojaznim miševima. Sledeće godine ovaj hormonski faktor je nazvan leptin (*gr. leptos-* tanak) (Abate i sar., 1995). Leptin je peptidni hormon, produkt *Ob* gena koji se luči u masnom tkivu. Sastoji se od 167 amino kiselina sa signalnom sekretornom sekvencom od 21 aminokiseline na amino kraju (Glaum i sar., 1996). Leptin je globularni protein sa terciarnom strukturom sličnom citokinima (Mantzoros i Moschos 1998). Svojim delovanjem leptin reguliše unos hrane, telesnu masu i reproduktivnu funkciju, a ima ulogu i u rastu fetusa, imunskim ili proinflamatornim odgovorima, angiogenezi i lipolizi (Mantzoros i Moschos 1998).

#### **1.3.2. Struktura proteina leptina**

Leptin se kao monomer “pakuje” u heksagonalnu kristalnu formu (Zhang i sar., 1997). Protein leptin čine četiri antiparalelna  $\alpha$ -heliksa (A, B, C i D) povezana dvema

dugim ukrštajućim vezama (AB i CD) i jednom kratkom petljom (BC) raspoređena tako da čine ulevo izvijani spiralni paket (Zhang i sar., 1997) (**Slika 2**). Četiri  $\alpha$ -heliksa čine sledeći ostaci: A, Pro 2–His 26; B, Leu 51–Ser 67; C, Arg 71–Lys 94; D, Ser 120–Ser 143 (Zhang i sar., 1997). Humani protein leptin dužine je 167 AA i molekulske mase 16 kDa (Zhang i sar., 1997). Ispitivanjem strukturne sličnosti pokazano je da protein leptin pokazuje najveću strukturnu sličnost sa citokinima familije IL-6 i stimulirajućim faktorom kolonije 3 (CSF3; *engl. colony-stimulating factor 3*), a u manjem stepenu i sličnost sa drugim citokinima dugog lanca uključujući hormon rasta (GH; *engl. growth hormone*) i laktogen iz placente (Holm i Sander 1996; Zabeau i sar., 2003; Peelman i sar., 2004).



**Slika 2. Protein leptin** (slika preuzeta sa [www.shutterstock.com](http://www.shutterstock.com))

### 1.3.3. Biosinteza leptina

Leptin se proizvodi uglavnom u belom masnom tkivu i proizvod je *Ob/LEP* gena (MacDougald i sar., 1995). Produkcija leptina ali u manjim količinama je takođe detektovana i u drugim tkivima tela uključujući mrko masno tkivo, placentu, fetalna tkiva, želudac, mišići, kostnu srž, zube i mozak. (Chan i sar., 2002).

### 1.3.4. Sekrecija leptina

Vrlo složeni endokrini, neuroendokrini i parakrini signali regulišu sintezu i sekreciju leptina. Lučenje leptina je proporcionalno veličini masne mase i nutritivnom statusu. Sekrecija leptina je veća u subkutanom nego u visceralnom masnom tkivu (Wajchenberg 2000; Fain i sar., 2004). Pokazano je da se nivo leptina u krvi smanjuje u stanju gladovanja što se dovodi u vezu sa adaptivnim fiziološkim odgovorom na stanje gladovanja.

Na sekreciju leptina utiče unos hrane, ukupna telesna masnoća i nekoliko hormona (Mantzoros i Moschos 1998). Insulin i, u manjoj meri, drugi peptidni hormoni pankreasa uključujući glukagon, amilin i pankreasni polipeptid smanjuju unos hrane i imaju uticaj na lučenje leptina. Insulin je glavni regulator proizvodnje leptina (Friedman 2004). Eksperimentalni podaci dobijeni u *in vitro* i *in vivo* studijama pokazuju da insulin stimuliše stvaranje leptina (Nogueiras i sar., 2008). Hiperinsulinemija, i to dugotrajna dovodi do povećanja leptina, dok kratkotrajno delovanje nema efekta (Nogueiras i sar., 2008). Infuzije insulina povećavaju koncentraciju leptina u cirkulaciji kod ljudi (Fliers i sar., 2003), a nivo leptina je značajno smanjen kod glodara sa dijabetesom tipa 1 (Mueller i sar., 1998). Na osnovu *in vitro* ispitivanja pretpostavlja se da insulin stimuliše proizvodnju leptina preko metabolizma glukoze (Mantzoros i Moschos 1998). Blokada transporta glukoze ili glikolize inhibira ekspresiju leptina i lučenje u adipocitima (Mueller i sar., 1998).

Promene u metabolizmu glukoze mogu se objasniti zapažanjem da ishrana bogata mastima za 24 h snižava nivo leptina u cirkulaciji kod ljudi, što doprinosi efektu koji ishrana bogata mastima ima u promovisanju povećanja telesne mase i gojaznosti (Havel 2000). Za razliku od insulina, kateholamini se vezuju za  $\beta_2$  i  $\beta_3$  adrenoreceptore i inhibiraju sintezu leptina (Wabitsch i sar., 1996) što ukazuje na vezu koja postoji između neuroendokrine i simpatičke kontrole endokrine funkcije masnog tkiva tj. na postojanje negativne povratne sprege između mozga i masnog tkiva (Trayhurn i Beattie 2001; Trayhurn i Bing 2006). Kortikosteroidi i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; *engl. tumor necrosis factor alpha*) stimulišu stvaranje leptina, dok ga tiroidni hormoni verovatno smanjuju (Nogueiras i sar., 2008). Smanjen nivo leptina u cirkulaciji posmatran tokom velike potrošnje energije je povezan sa senzacijom gladi kod ljudi

(Mantzoros i Moschos 1998). Tako smanjenje leptina u energetski ograničenim uslovima i smanjenje telesne mase mogu da doprinesu snažnoj sklonosti ka gojenju (Flier i Maratos-Flier 2010). Stoga, leptin se luči iz adipocita u krvotok i prelazi krvno-moždanu barijeru i dospeva u određene regione mozga uključene u regulisanje energetskog balansa u hipotalamusu (Burguera i sar., 2000).

### 1.3.5. Transport leptina

Leptin cirkuliše u krvnom sistemu kako u slobodnom tako i u vezanom obliku za nosač proteina (Mantzoros i Moschos 1998). Slobodna forma je biološki aktivni oblik leptina. Ravnoteža između slobodnog i vezanog leptina je potencijalni regulator bioraspodivnosti leptina (Lahlou i sar., 2000). Leptin cirkuliše preko proteina plazme za koje je delimično vezan, a u CNS ulazi receptor posredovanim transportom u oblasti horoidnih pleksusa. Smatra se da izoforma receptora za leptin LEP-Ra ima najznačajniju ulogu u transportu leptina kroz krvno-moždanu barijeru (Trayhurn i Bing 2006).

### 1.3.6. Uloga leptina u regulaciji energetskog balansa

Dejstvo leptina je posredovano vezivanjem za razne izoforme receptora za leptin (LEP-R) koji su izraženi u različitim tkivima uključujući mozak, jajnike i matične ćelije hematopoze (Burguera i sar., 2000).

Efekti leptina na hipotalamus zavise od prisustva LEP-R (Li 2011). Fei i saradnici su koristeći tehniku lančane reakcije polimeraze (PCR; *engl. polymerase chain reaction*), otkrili LEP-Rb, jednu od izoformi LEP-R receptora koji je odgovoran za *db* fenotip i koji se eksprimira u lučnom jedru tj. *nucleus arcuatus* (ARC), ventromedijalnom (VMH), dorzomedijalnom (DMH) i lateralnom (LH) hipotalamusnom nukleusu, ali nije detektovan u drugim delovima mozga (Fei i sar., 1997). Studije na lezijama ARC, VMH i DMH kod pacova pokazale su pojavu hiperfagije i gojaznosti (Hetherington AW 1942; Brobeck i sar., 1943; Brobeck 1946; Bray i York 1979), dok lezije lateralnog hipotalamusa dovode do afagije (Anand i Brobeck 1951). Model dvojnog centra označava VMH nukleus kao "centar za sitost" i

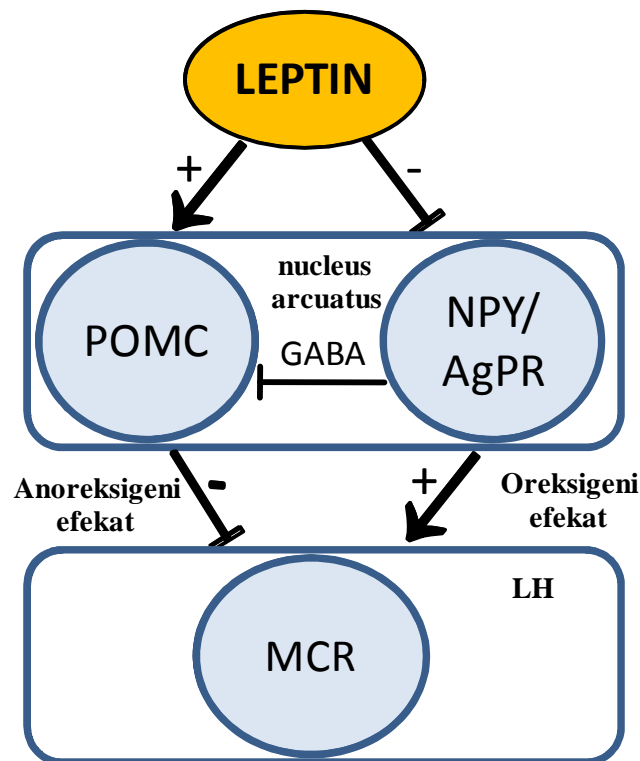


LH nukleus kao "centar za glad" (Stellar 1954). Fei i saradnici su, svojim istraživanjima, ukazali na dominantnu ulogu signalizacije leptina u centralnoj regulaciji energetskeg balansa (Huang i sar., 1996; Mercer i sar., 1996; Couce i sar., 1997; Fei i sar., 1997). Ubrzo nakon otkrića gena *ob*, Stephens i saradnici su pokazali da leptin reguliše unos hrane i metabolizam delom preko inhibicije sinteze i oslobađanja neuropeptida Y (NPY; *engl. neuropeptide Y*) koji se nalazi ARC i stimuliše unos hrane i smanjuje termogenezu (Stephens i sar., 1995).

Kasnije studije su pokazale da leptin inhibira neuralne puteve koji stimulišu unos hrane (oreksigeni) i smanjuje potrošnju energije, i isto tako aktivira neuralne puteve koji inhibiraju unos hrane (anoreksigeni) (Friedman 2004; Horvath i sar., 2009; Diano 2011). Oreksigeni neuropeptidi uključuju NPY i peptid sličan Aguti proteinu (AgRP; *engl. agouti-related peptide*), a anoreksigeni stimulišući hormon  $\alpha$ -melanokortin ( $\alpha$ -MSH; *engl. alpha-melanocyte-stimulating hormone*), produkte proopiomelanokortina (POMC; *engl. proopiomelanocortin*) (Li 2011). Neuron koji su označeni kao AgRP ili POMC i neuron koji eksprimiraju melanokortinske receptore (MCR) obuhvataju sistem melanokortina koji reguliše energetskeg balans (Horvath i sar., 2009; Diano 2011).

Atraktivan i jednostavan model koji pokazuje interakciju između signalizacije leptina i centralne regulacije unošenja hrane može se opisati na sledeći način: leptin utiče na transkripciju POMC čiji se product  $\alpha$ -MSH oslobađa u sinapse što aktivira neurone preko vezivanja za MCR i dovodi do suprimiranja apetita (Li 2011). Istovremeno, leptin inhibira neurone koji sintetišu NPY/AgRP poništavajući antagonistički efekat AgRP na MCR (**Slika 3.**) (Elias i sar., 1999; Cowley i sar., 2001). Neuron NPY/AgRP stimulišu oreksigene odgovore (Horvath i sar., 1992; Horvath i sar., 1997). Značajnost sistema melanokortina je pokazana ne samo time što leptin direktno deluje u hipotalamusu, već i činjenicom da je gubitak funkcije MC-4R, glavnog MCR, najčešći genetički uzrok gojaznosti kod ljudi i kreće se od 3-5% kod ekstremno gojaznih ljudi (Hinney i sar., 1999; Vaisse i sar., 2000). Ukratko, leptin reguliše energetskeg balans moduliranjem aktivnosti neurona NPY/AgRP i neurona POMC u nukleusu ARC (Li 2011). Pinto i saradnici su otkrili još jedan nivo regulacije energetskeg balansa identifikujući brzo obnavljanje neuralnog kruga ARC nukleusa pomoću leptina (Pinto i sar., 2004). Sinapse projektovane na neurone NPY/AgRP i

POMC bile su različite kod *ob/ob* miševa i kod "wild type" miševa (Li 2011). Tretiranje leptinom je normalizovalo gustinu sinapsi tokom šest sati, nekoliko sati pre efekta leptina na unošenje hrane (Li 2011). Ova otkrića ukazuju na to da leptin deluje na hipotalamus i preko neuralne plastičnosti (Li 2011) (Slika 3.).

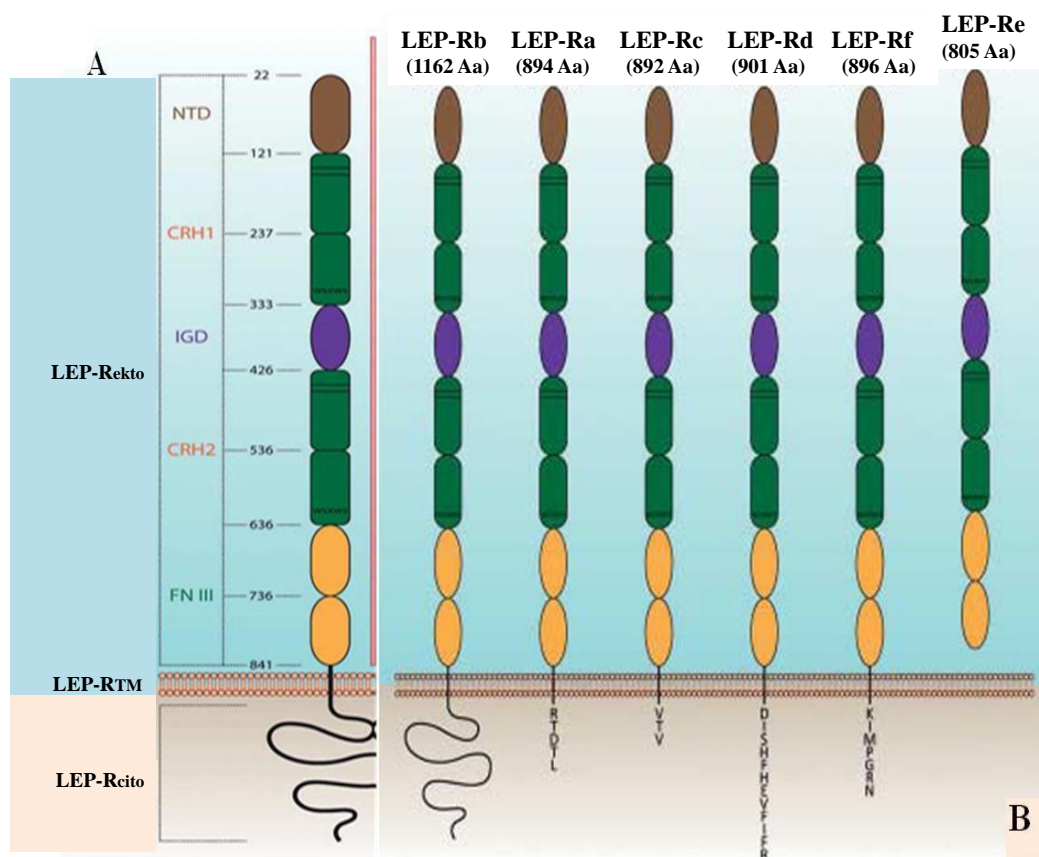


**Slika 3. Regulacija apetita od strane leptina delovanjem na *nucleus arcuatus* hipotalamusa.** POMC – proopiomelanokortin, NPY – neuropeptid Y, AgRP – peptid sličan Aguti proteinu, MCR – melanokortinski receptori, GABA – gama-aminobuterna kiselina.

### 1.3.7. Receptor za leptin

Plejotropna dejstva leptina omogućena su distribucijom LEP-R receptora za leptin (Fruhbeck 2006). Leptin deluje preko transmembranskih receptora koji pokazuju strukturnu sličnost sa klasom I familije receptora za citokine (Tartaglia i sar., 1995; Lee i sar., 1996; Lollmann i sar., 1997; Tartaglia 1997; Myers 2004), što uključuje receptore za IL-2 (interleukin-2), IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, LIF (inhibitorni faktor leukemije), CSF3,

GH, prolaktin i eritropoetin (Bazan 1989; Hegyi i sar., 2004). Članovi ove familije imaju karakteristične ekstraćelijske motive, četiri ostatka cisteina i WSXWS (Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser) sa različitim brojem domena fibronektina tipa III (Bazan 1990). Receptor za leptin LEP-R nastaje u formi nekoliko alternativno iskrojjenih (splajsovanih) varijanti označenih kao LEP-Ra, LEP-Rb, LEP-Rc, LEP-Rd, LEP-Re i LEP-Rf (Lee i sar., 1996; Wang i sar., 1996; Panic i sar., 2015), koje imaju zajednički ekstraćelijski domen od preko 800 amino kiselina (AK), transmembranski domen od 34 AK i varijabilni intraćelijski domen koji je karakterističan za svaku od izoformi receptora za leptin (Fruhbeck 2006). Na taj način, izoforme se klasifikuju u tri klase: kratku, dugu i sekretujuću (Fruhbeck 2006) (Slika 4.).



**Slika 4. Šema strukture receptora za leptin (LEP-R).** Slika preuzeta i modifikovana iz rada (Peelman i sar., 2014). (A) Leptinski receptor sadrži tri dela: ekstraćelijski (LEP-Rekto), transmembranski (LEP-Rtm) i citoplazmatski deo (LEP-Rcito). Ekstraćelijski deo se sastoji od N-terminalnog domena (NTD), dva homologa domena

citokinskog receptora (CRH) (CRH1 i CRH2), domen nalik imunoglobulinu (IGD) i dva membranska proksimalna domena fibronektina tip III (FN III). **(B)** Izoforme leptinskog receptora: najmanje šest različitih LEP-R izoformi mogu se naći kod ljudi od LEP-Ra do LEP-Rf. LEP-Rb je najduža izoforma receptora za leptin sa potpuno funkcionalnim intracelularnim delovima i stoga je jedini funkcionalni izotip. Kratke izoforme (LEP-Ra, LEP-Rc, LEP-Rd i LEP-Rf) imaju jedinstveni C-terminalni deo sačinjen od aminokiselina. LEP-Re je solubilna (sekretujuća) izoforma.

### **1.3.8. Signalna transdukcija i način delovanja leptina nakon vezivanja za svoj receptor**

Leptin je uključen u brojne ćelijske funkcije u organizmu. Ostvarujući svoja dejstva leptin interaguje sa mnogim signalnim faktorima što vodi ukrštanju različitih puteva signalne transdukcije (Fruhbeck 2006).

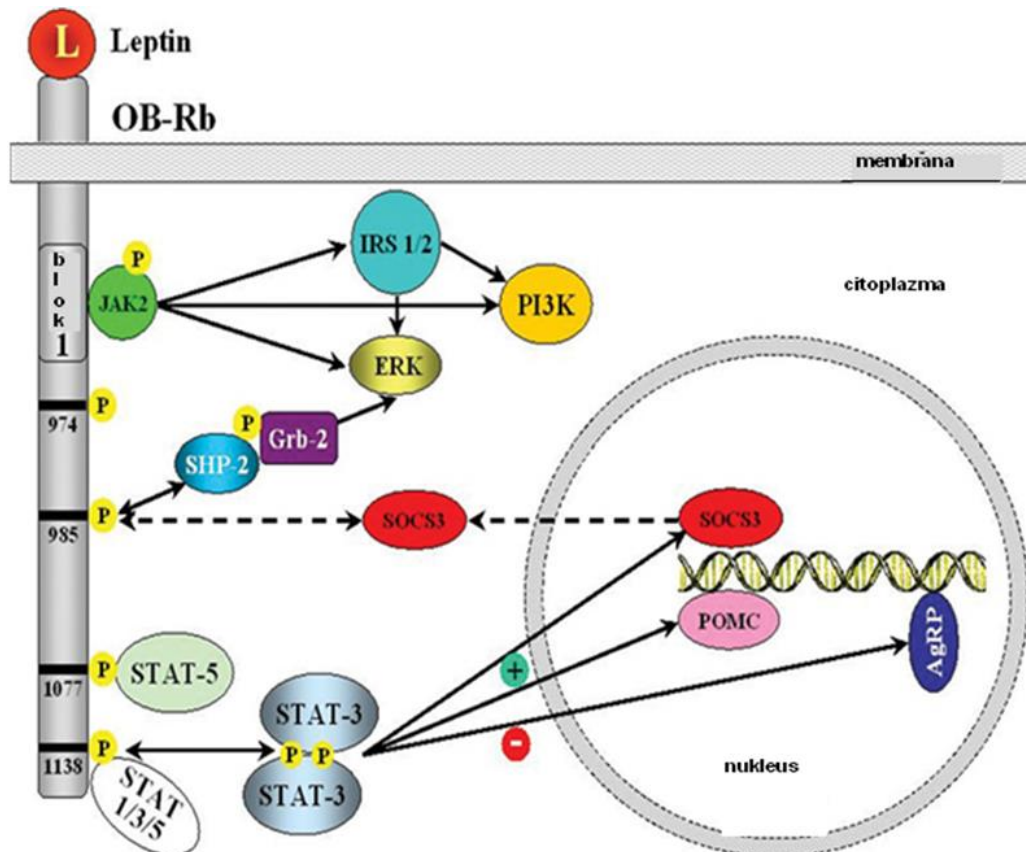
Funkcionalni receptori za citokine sadrže prolinom bogat "box"1 motiv koji je potreban za interakciju i aktivaciju Janus kinaze (JAK; *engl. Janus kinase*) (Ihle i Kerr 1995). Manje konzervirane sekvence označene kao "box"2 takođe imaju ulogu u interakcijama i selektivnosti izoformi JAK. LEP-R nema unutrašnji tirozin kinazni domen i zato vezuje citoplazmatske kinaze, uglavnom JAK2 (Ghilardi i Skoda 1997). "Box"1 i "box"2 motivi su poznati po tome da regrutuju i vezuju JAK (Murakami i sar., 1991; Jiang i sar., 1996). Međutim, za leptinsku signalizaciju, pokazano je da su samo "box"1 i AK u neposrednom okruženju od značaja za aktiviranje JAK (Bahrenberg i sar., 2002; Kloek i sar., 2002). Intraćelijski domen svih LEP-R izoformi sadrži u jukstamembranskom regionu "box" 1 JAK-vezujući domen, dok LEP-Rb takođe uključuje "box"2 motiv i pretvarač signala i aktivator transkripcije (STAT; *engl. signal transducer and activator of transcription*) (Baumann i sar., 1996; Ghilardi i sar., 1996; Heinrich i sar., 2003; Fruhbeck 2006) STAT-vezujuća mesta. Iako je u početku samo LEP-Rb posmatrana kao izoforma koja učestvuje u signalizaciji, isto je pokazano i za kratke izoforme (Kellerer i sar., 1997; Murakami i sar., 1997; Yamashita i sar., 1997; Bjorbaek i sar., 1998; Hileman i sar., 2000). JAK2 proteini povezani su sa membranom

proksimalnih sekvenci receptora intraćelijskog domena, koji je fosforilisan nakon vezivanja liganda (**Slika 5**).

Ukratko, LEP-R kao i drugi citokinski receptori pripada receptorima spregnutim sa tirozin kinazama. Sami nemaju kinaznu aktivnost, ali kada vezuju ligand (leptin), dimerizuju i fosforilišu tirozin receptora nakon autofosforilacije JAK2. Aktivacija tirozin kinaze iz JAK familije dovodi do fosforilacije nizvodno STAT3, koje se vezuju za fosfotirozine LEP-R (Tyr 1138). Nakon fosforilacije dolazi do odvajanja proteina od receptora, potom do homo- ili heterodimerizacije i translokacije proteina u nukleus gde imaju ulogu transkripcionih faktora.

U nukleusu proteini imaju ulogu transkripcionih faktora koji aktiviraju ekspresiju supresora signalizacije citokina 3 (SOCS3; *engl. suppressor of cytokine signaling*) ili proteina tirozin fosfataze 1B (PTP1B; *engl. protein tyrosine phosphatase 1B*) (Howard i sar., 2004; Mori i sar., 2004; Fruhbeck 2006; Panic i sar., 2015). JAK/STAT signalni put zahteva aktivaciju SOCS3 koji služe kao negativni regulatori aktivnosti citokina. Leptin indukuje ekspresiju SOCS3 vezivanjem SH2 domena SOCS3 za Tyr985 ili inhibicijom od SOCS3 zavisne JAK2 fosforilacione aktivnosti.

Pored toga, PTP1B je drugi negativni modulator signalne transdukcije leptina, koji reguliše signalnu transdukciju defosforilacijom JAK2. Prekomerna ekspresija PTPB1 smanjuje fosforilaciju JAK2 i inhibira transkripciju leptinom indukovanog SOCS3 i *c-fos* (Myers i sar., 2012).



**Slika 5. Uloga fosfotirozina LEP-Rb izoforme u signalizaciji leptina.** Slika preuzeta i modifikovana iz rada (Fruhbeck 2006). JAK2 je povezana sa receptorom preko blok1 motiva. Duga izoforma receptora za leptin (LEP-Rb) sadrži četiri važna tirozinska ostatka koji mogu biti mesta vezivanja za signalne proteine sa SH2 domenima. Najvažniji, Tyr1138 regrutuje faktor transkripcije STAT3, koji se potom fosforiliše pomoću JAK2, dimerizuje i premešta u nukleus, gde aktivira ekspresiju SOCS3 i POMC, dok inhibira AgRP. SOCS3 proteini inhibiraju signalizaciju vezivanjem za fosforilisane JAK proteine ili direktno interaguju sa receptorima fosforilanim na tirozinu. Sposobnost SOCS3 da inhibira leptinom stimulisanu fosforilaciju JAK2 i vanćelijskim signalima regulisane kinaze (ERK; *engl. extracellular signal-regulated kinase*) obezbeđuje mehanizam negativne povratne sprege signalizacije leptina. JAK2 – samo druga kinaza 2; IRS1/2 – supstrat za receptor insulina 1 i 2; PI3K – fosfatidilinozitol-3 kinaza; ERK –vanćelijskim signalom regulisana kinaza; Grb-2 – vezujući protein receptora faktora rasta; SHP-2 – SH2 domen homologije 2 slične Src; SOCS3 – supresor signalizacije citokina 3; STAT – pretvarač signala i aktivator transkripcije; POMC – proopiomelanokortin; AgRP – peptid sličan Aguti proteinu.

Forme receptora za leptin sa dugim intracelularnim domenom imaju mogućnost aktivacije i drugih signalnih puteva. Osim JAK-STAT signalnog puta, vezivanje leptina za LEP-R takođe aktivira signalne kaskade fosfoinozitol-3 kinaze (PI3K; *engl. phosphoinositol 3 kinase*) (Rahmouni i sar., 2003) i mitogenom aktivirane protein kinaze/vanćelijskim signalima regulisane kinaze (MAPK/ERK; *engl. mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*) (Rahmouni i sar., 2005). Aktivacija svakog od ovih puteva doprinosi anoreksigenim efektima leptina, odnosno suprimiranju apetita, podsticanju gubitka telesne mase i povećanju termogeneze (Bates i sar., 2003; Rahmouni i sar., 2003; Rahmouni i sar., 2005).

Članovi kinaze regulisane vanćelijskim signalom (ERK) koji pripadaju porodici MAPK su komponente dobro definisanog signalnog puta Ras/Raf/MAPK i aktiviraju se širokim opsegom stimulusa uključujući i leptin (Fruhbeck 2006). Signalni put MAPK može biti stimulisan bilo LEP-Ra ili LEP-Rb, iako u manjem stepenu ovim drugim (Bjorbaek i sar., 1997; Banks i sar., 2000). Iako distalni deo LEP-R nije esencijalan za signalizaciju MAPK, intaktni intraćelijski deo duge forme receptora je potreban da bi se postigla maksimalna aktivacija (Fruhbeck 2006). Ova tvrdnja se bazira na činjenici da leptin može biti "okidač" kaskade MAPK na dva različita načina: fosforilacijom tirozina sa aktivacijom asociranog receptora za JAK2 ili nezavisno od fosforilacije receptora (Bjorbaek i sar., 1997; Hegyi i sar., 2004). SHP-2 je tirozin fosfataza koja sadrži SH2 domen, koji je džep za fosfotirozin receptora. U oba slučaja nishodna signalizacija zahteva prisustvo proteina tirozin fosfataze sa SH2 domenom (Fruhbeck 2006). Iako još nije u potpunosti rasvetljeno koji su molekuli uključeni u transmisiju signalizacije leptina, aktivirane kinaze MAPK/ERK (MEK kinaze) fosforilišu ERK dovodeći do ekspresije *c-fos* i *egr-1* koji učestvuju u ćelijskoj proliferaciji i diferencijaciji (Fruhbeck 2006; Panic i sar., 2015).

### **1.3.9. Rezistencija na leptin**

Termin "rezistencija na leptin" nastao je nedugo po otkriću hormona leptina 1994. godine (Zhang i sar., 1994; Frederich i sar., 1995; Myers i sar., 2012). Koncept rezistencije na leptin podrazumeva da procesi koji izazivaju i/ili rezultuju iz stanja

gojaznosti narušavaju efekte leptina i time doprinose nastanku gojaznosti kao i ometanje potencijalne efikasnosti terapije primenom egzogenog leptina (Myers i sar., 2012).

Rezistencija na leptin nastaje usled:

- nemogućnosti leptina da dođe do ciljnih ćelija,
- smanjene ekspresije LEP-R (Ob-R) i
- poremećene signalizacije sa LEP-R.

Koncept selektivne rezistencije na leptin (SLR; *engl. selective leptin resistance*) i njegove potencijalne posledice po gojaznost i hipertenziju bazira se na tome da u stanju gojaznosti izostaju efekti leptina na apetit, kao i na redukciju telesne mase, ali su očuvani efekti leptina na simpatički nervni sistem (Myers i sar., 2012).

### **1.3.10. Fiziološka uloga leptina**

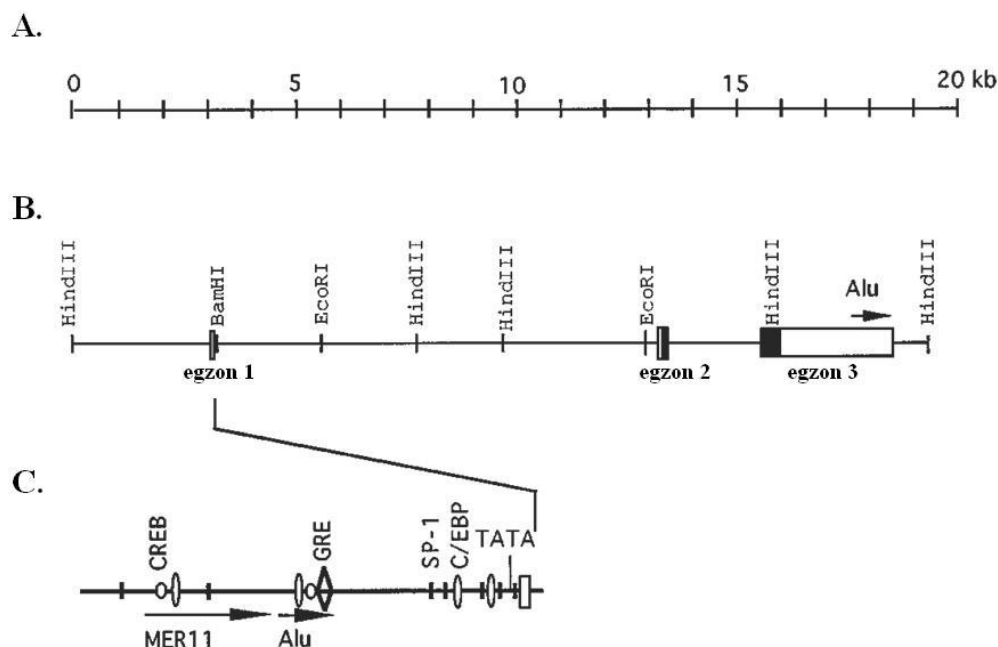
Ciljna tkiva leptina pored hipotalamusa su: skeletni mišići, reproduktivni organi poput placentе, jajnika i testisa (Hoggard i sar., 2001). Centralna uloga leptina je regulacija telesne mase mehanizmom negativne povratne sprege između adipoznog tkiva i centra za sitost koji se nalazi u hipotalamusu (Halaas i sar., 1995).

Leptin svojim delovanjem inicira brojne imunoregulacijske efekte uključujući promociju proliferacije T-limfocita i indukciju proinflamatornih citokina (Loffreda i sar., 1998). Nedostatak leptina je povezan sa povećanom osetljivošću na infekciju. Svojim delovanjem leptin reguliše prirodni i stečeni imunitet kao i procese inflamacije i hematopoeze. Kao proinflamatorni medijator leptin svojim delovanjem stimuliše hemotaksu makrofaga i neutrofila (Heymsfield i sar., 1999) tako što povećava njihovu sposobnost fagocitoze (Zelissen i sar., 2005) kao i oslobađanja citokina. Leptin takođe aktivira monocite i makrofage, a pokazano je da je akutno stvaranje leptina povećano tokom infekcije i inflamacije (Fantuzzi i Faggioni 2000). Leptin zajedno sa adenozin difosfatom izaziva agregaciju trombocita što sugerije ulogu leptina kao mogućeg faktora sprege između gojaznosti i kardiovaskularnih oboljenja povezanih sa dijabetesom (Huang i Li 2000).



### 1.3.11. Struktura gena za leptin

Gen za leptin naziva se *Ob* gen i nalazi se na dužoj ručici hromozoma 7 na poziciji 31.3 (Green i sar., 1995). Sastoji se od tri egzona razdvojenih sa dva introna (Thompson i sar., 1997). Kodirajući region *Ob* gena je 501 nukleotid i nalazi se u egzonomima dva i tri razdvojenih intronom od dve kb (Glaum i sar., 1996). Promotorski region *Ob* gena obuhvata region od tri kb (Chung i sar., 1996). Potrebno je samo prvih 217 bp promotora za bazalnu ekspresiju *Ob* gena u masnom tkivu (Slika 6) (Mantzoros i Moschos 1998).



**Slika 6. Struktura humanog *Ob* gena.** Slika preuzeta i modifikovana iz rada (Gong i sar., 1996).

- A. merna skala u kb;
- B. pozicije tri egzona prikazane su blokovima. Kodirajući region je obeležen crnom bojom, dok su netranslatorni regioni prikazani belom bojom i
- C. promotorski region prikazuje relativne pozicije repetitivnih sekvenci i regulatornih elemenata.

MER11 – sekvenca srednjeg ponavljanja frekvencije; Alu – repetitivna sekvenca; CREB – transkripcioni regulator koji se vezuje za regulatorne sekvence DNK koje odgovaraju na ciklični adenzin monofosfat (cAMP); GRE – regulatorna sekvenca koja

odgovara na glukokortikoide; Sp-1 – protein specifičnosti 1; C/EBP - vezujuće mesto za CCAAT/pojačivač-vezujući protein; TATA- TATA blok.

### 1.3.12. Genetička varijanta G-2548A u genu za LEP

Unutar samog gena za leptin pronađeni su mnogi genski polimorfizmi koji su u vezi sa nastankom gojaznosti. Polimorfizam predstavlja genetičku varijantu koja je u populaciji učestalija od mutacije i zbog toga je pogodna za ispitivanje u genetičkim populacionim studijama. Najispitivanija genetička varijanta jednog nukleotida (SNP; *engl. Single Nucleotide Polymorphism*) u genu za leptin je G-2548A u kome dolazi do supstitucije G sa A u promotorskom regionu na nukleotidu -2548 uzvodno od ATG start kodona (Mammes i sar., 2000). Kada je prisutan nukleotid G definisano je restrikciono mesto (podvučeno u sekvenci) za restriktazu *CfoI* :-2560 5'-CGACAGGGTTGC(G/A)CTGATCCT-3' -2540 (Mammes i sar., 2000). Genetička varijanta G-2548A se nalazi na 5' kraju promotora *LEP* i region u kome je ovaj SNP nalazi se blizu Sp-1 vezujućeg mesta kao i dve repetitivne sekvence MER11 i Alu koje mogu regulisati transkripciju (Hinuy i sar., 2008). *LEP* G-2548A je asociran sa povećanom produkcijom i sekrecijom leptina od strane adipocita (Mammes i sar., 1998; Le Stunff i sar., 2000; Hoffstedt i sar., 2002; Constantin i sar., 2010). Funkcionalnost genetičke varijante *LEP* G-2548A je još uvek diskutabilna i sugerise se da ona može nastati usled neslučajne asocijacije alela (LD, *engl. linkage disequilibrium*) sa drugom funkcionalnom genetičkom varijantom što može uticati na telesnu masu ili nivo leptina u cirkulaciji, a opet varirati od populacije do populacije (Portoles i sar., 2006). Takođe, kontradiktorni su i rezultati analize asocijacije genetičke varijante *LEP* G-2548A i pola (Riestra i sar., 2010). Jedna studija iznela je hipotezu o mogućoj interakciji između genetičke varijante *LEP* G-2548A i regulatornih sekvenci koje odgovaraju na estrogen (ERE; *engl. estrogen response element*) u promotoru *LEP* (Yiannakouris i sar., 2003). Svakako, ovo ne isključuje mogućnost da je pomenuta genetička varijanta u LD sa drugim regulatornim sekvencama koje imaju uticaj na transkripciju *LEP* (Yiannakouris i sar., 2003). Pokazano je da se nukleusni faktori kako iz U937 ćelija tako i iz subkutanih adipocita vezuju sa većim afinitetom za alel -2548A (Hoffstedt i sar., 2002)

što ukazuje da -2548 polimorfno mesto utiče na ekspresiju leptina verovatno na nivou transkripcije LEP.

### **1.3.13. Genetička varijanta LEP G-2548A i gojaznost**

Genetička varijanta G-2548A u genu za leptin je asocirana sa promenom u koncentraciji leptina u plazmi (Mammes i sar., 1998; Le Stunff i sar., 2000; Mammes i sar., 2000; Hoffstedt i sar., 2002). Pokazano je da ova genetička varijanta utiče na ekspresiju i sekreciju leptina u adipoznom tkivu (Hoffstedt i sar., 2002). Iako genetičke varijante u genu za leptin mogu biti važne u patofiziologiji gojaznosti kod ljudi sa pratećim komplikacijama (Paracchini i sar., 2005; Portoles i sar., 2006; Constantin i sar., 2010) asocijacija genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa gojaznošću nije još čvrsto dokumentovana (Paracchini i sar., 2005; Wang i sar., 2006; Duarte i sar., 2007; Constantin i sar., 2010; Sahin i sar., 2013).

Genetska predispozicija za gojaznost je glavni faktor rizika kod ljudi (NIH 1998). Uzimajući u obzir činjenicu da je koncentracija leptina značajno povećana kod gojaznih osoba i da je proporcionalna telesnoj masi, procenjeno je da genetičke varijante u genu za leptin mogu biti povezane sa gojaznošću (Powers i Jackson 2008).

U brazilskoj, francuskoj i studiji sprovedenoj na populaciji tajvanskih Aboridžina je pokazana asocijacija genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa gojaznošću, dok u grčkoj, češkoj, španskoj i rumunskoj studiji nije (Mammes i sar., 2000; Yiannakouris i sar., 2003; Portoles i sar., 2006; Wang i sar., 2006; Bienertova-Vasku i sar., 2008; Hinuy i sar., 2008; Constantin i sar., 2010).

## **1.4. Oksidativni stres (OxS)**

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) imaju mogućnost da reaguju sa biomolekulima svih ćelija i telesnih tečnosti i da ih menjaju. One mogu da nastanu u procesima respiracije u mitohondrijama, fagocitoze, autooksidacije kateholamina, enzimima katalizovanih reakcija, metabolisanja etanola, sinteze eikozanoida i lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina (Halliwell 2006).

OxS nastaje u ćelijskim sistemima u uslovima narušene ravnoteže između stepena produkcije i otklanjanja visokoreaktivnih molekula, odnosno, kada produkcija ROS prevazilazi antioksidativne kapacitete datih sistema (Halliwell i Whiteman 2004). Kada su ćelijski antioksidanti iz bilo kog razloga neaktivni i ne otklanjaju ROS, generisani radikali deluju negativno i oštećuju proteine, lipide i nukleinske kiseline pri čemu narušavaju brojne ćelijske funkcije. Akumulacija ovakvih oštećenja uglavnom dovodi do smrti ćelije mehanizmima nekroze i/ili apoptoze (Esposito i sar., 2006).

U nizu patoloških procesa dolazi do oštećenja ćelija i tkiva usled OxS koji se dešava u organizmu. Dokazano je da su oksidativni procesi u organizmu odgovorni za nastanak: ateroskleroze, fibroze, neuroloških degenerativnih bolesti, malignih bolesti itd. Nakupljanje oštećenih molekula u ćelijama nastalih u toku OxS je i jedan od procesa karakterističnih za starenje (Muradian i Schachtschabel 2001; Esposito i sar., 2006; Nikolic i sar., 2011; Rizzo i sar., 2015).

#### **1.4.1. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS)**

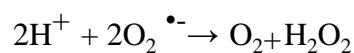
Antioksidativni zaštitni sistem (AOS) nastao je tokom procesa evolucije u aerobnim uslovima kao odgovor na toksično delovanje kiseonika. Funkcija AOS u organizmu je da štiti organizam od štetnog dejstva kao i nekontrolisanog stvaranja ROS u metaboličkim procesima ili da ih održava u niskim koncentracijama u organizmu. Organizam zahvaljujući delovanju antioksidanata ostvaruje antioksidativnu zaštitu. Antioksidanti su supstance koje prisutne u manjoj koncentraciji u odnosu na supstrate koji se oksiduju mogu da spreče ili značajno smanje oksidativno oštećenje (Sies 1991; Nikolic i sar., 2011; Rizzo i sar., 2015).

Postoje tri osnovna nivoa AOS. Prvi nivo obuhvata delove AOS koji sprečavaju stvaranje ROS (transferin, feritin, laktoferin, i drugi) (Sies 1991). Drugi nivo odbrane čine enzimske i neenzimske komponente. Enzimski antioksidanti čine primarnu liniju, dok neenzimski antioksidanti predstavljaju sekundarnu liniju odbrane (vitamin E, vitamin C, beta-karoteni, albumin, estrogini, koenzim Q i dr.) (Halliwell 1997). Treći nivo AOS ostvaruju enzimski antioksidanti koji učestvuju u reparaciji već nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina (fosfolipaza A<sub>2</sub>, proteolitički enzimi, endo- i egz nukleaze, DNK i dr.) (Sies 1991).

### 1.4.2. Enzimske komponente AOS

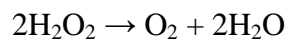
Enzimske komponente AOS čine superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx) i glutation reduktaza (GR) (Sies 1991).

**SOD** je metaloenzim koji katalizuje reakciju dismutacije superoksidnog anjona ( $O_2^{\bullet-}$ ) u vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i  $O_2$ :



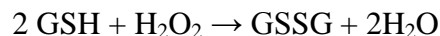
U svim aerobnim ćelijama i vanćelijskim tečnostima postoje tri različite izoenzimske forme SOD: Cu,ZnSOD (SOD1) koja se nalazi u citosolu i ima Cu i Zn u aktivnom mestu, MnSOD (SOD2) koja je najvažnija i lokalizovana u mitohondrijama i vanćelijska ecSOD (SOD3).

**CAT** katalizuje prevođenje  $H_2O_2$  do molekularnog  $O_2$  i  $H_2O$  i sprečava njegovu difuziju u druge delove ćelije:



CAT je enzim lokalizovan u peroksizomima u većini ćelija, dok se kod eritrocita nalazi u citosolu (Sies 1997; Nikolic i sar., 2011). Ovaj enzim za svoj aktivan centar ima vezane četiri subjedinice koje sadrže hem grupu ( $Fe^{3+}$ - protoporfirin).

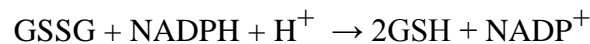
**GPx** je selenoprotein čija je uloga da redukuje niske koncentracije  $H_2O_2$  i lipidne hidroperokside do alkohola i  $H_2O$ :



Kod ljudi postoji 8 izoformi GPx. Najzastupljenija forma je GPx1 koja je lokalizovana u citosolu i mitohondrijama. GPx2 je lokalizovana u citosolu ćelija gastrointestinalnog trakta. Enzim GPx3 lokalizovan je u vanćelijskim tečnostima organizma (plazma). Enzim GPx4 se nalazi u citosolu i membranama i ima jedinstvenu

sposobnost da pored  $\text{H}_2\text{O}_2$  redukuje i fosfolipidne hidroperokside i perokside holesterola (Sies 1997).

**GR** svojim delovanjem katalizuje redukciju oksidovanog glutationa uz učešće koenzima redukovanog nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH).



GR je enzim odgovaran za regeneraciju redukovanog glutationa i stoga je značajan ne samo za procese antioksidativne zaštite, već i za održavanje redoks potencijala ćelije.

### **1.4.3. Neenzimske komponente AOS**

Neenzimski antioksidanti obuhvataju endogene produkte ćelije, nutritivne egzogene materije i sintetske proizvode. Prema afinitetu i rastvorljivosti u lipidima dele se na:

**liposolubilne** - deluju na nivou lipidnog sloja ćelijskih membrana, membrana subćelijskih organela i unutar serumskih proteina (vitamin A i E,  $\beta$ -karoten i koenzim Q) (Cadenas i sar., 1996),

**hidrosolubilne** - deluju u vodenoj fazi pri čemu učestvuju u interakcijama sa liposolubilnim antioksidantima na graničnoj površini membrane (vitamin C, glutation, metionin, albumin, bilirubin, biliverdin, mokraćna kiselina, transferin, laktoferin, ceruloplazmin, histidin i feritin).

Ukupni antioksidativni status (TAS) predstavlja dinamični sistem međusobno zavisnih pojedinačnih antioksidativnih parametara. Smatra se da kooperacija antioksidanata obezbeđuje veću zaštitu od štetnih uticaja ROS u odnosu na svaki pojedinačni antioksidant (Halliwell i Whiteman 2004).

#### 1.4.4. OxS i gojaznost

Danas je sve više dokaza o povećanom OxS u masnom tkivu kod gojaznih osoba što čini osnovu za poremećaj sekrecije adipokina i razvoj metaboličkog sindroma (Furukawa i sar., 2004). Povećani ROS u mitohondrijama nastaju u uslovima povećane koncentracije kako glukoze, tako i masnih kiselina u adipocitima, čija povećana količina dovodi do izmena u redoks potencijalu sekretornih puteva što utiče na koncentraciju i sekreciju pojedinih adipokina. Samo oslobađanje ROS iz masnog tkiva u krvotok doprinosi indukciji IR u skeletnim mišićima, remeti sekreciju insulina u pankreasu i učestvuje u patogenezi ateroskleroze i hipertenzije (Furukawa i sar., 2004).

Pokazano je da je stanje gojaznosti povezano sa nastankom niske hronične sistemske inflamacije u masnom tkivu (Marseglia i sar., 2014). Na stanje inflamacije utiče i aktiviranje urođenog imunskog sistema kod masnog tkiva koje promovira proinflamatorni status i OxS dovodeći do sistemskog akutno-faznog odgovora. Danas je aktuelna hipoteza da inflamacija masnog tkiva kod gojaznih bolesnika igra kritičnu ulogu u patogenezi komplikacija povezanih sa gojaznošću (Xu i sar., 2003).

U fiziološkim, a posebno u patološkim stanjima, adipokini indukuju produkciju ROS stvarajući OxS i kao posledica dolazi do velikog, nepravilnog stvaranja adipokina u masnom tkivu (Fernandez-Sanchez i sar., 2011).

Nekoliko mehanizama je uključeno u stvaranje OxS u stanju gojaznosti. Prvo, višak masnog tkiva je identifikovan kao izvor proinflamatornih citokina, uključujući TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , i IL-6 (Fonseca-Alaniz i sar., 2007). TNF- $\alpha$  je kritični citokin koji utiče na inflamatorni odgovor, imunski sistem, apoptozu adipocita, kao i na metabolizam lipida, povećanje lipogeneze u jetri, signalizaciju insulina i indukovanje OxS. Takođe, povećana količina ROS dovodi do aktivacije nukleusnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B; *engl. nuclear factor  $\kappa$ B*) i aktivacijom NF- $\kappa$ B se pokreće kaskada proinflamatornih citokina (Scherer 2006).

Proizvodnja ROS može biti indukovana TNF- $\alpha$  vezivanjem za specifične receptore i promovisanje NF- $\kappa$ B signalizacije (Chandel i sar., 2001). Nivo TNF- $\alpha$  u serumu je povećan u stanju gojaznosti i smanjen prilikom gubitka telesne mase. TNF- $\alpha$  favorizuje sistemski akutno-fazni odgovor putem oslobađanja IL-6, drugog

proinflatarnog molekula, kao i preko smanjenja sistemskih anti-inflatarnih citokina kao što je adiponektin. Takođe, TNF- $\alpha$  povećava interakciju elektrona sa kiseonikom i generiše superoksidne anjone (Wang i Trayhurn 2006). IL-1 $\beta$  uglavnom oslobađaju monociti kao odgovor na oštećenje tkiva, infekcije ili imunološki stimulans. Nedavno je zapaženo da je IL-1 $\beta$  pokretač proinflatarnog odgovora u gojaznosti putem stvaranja dodatnih proinflatarnih citokina poput IL-6 (Stienstra i sar., 2012; Marseglia i sar., 2014).

IL-6 koji luče razne ćelije (npr. adipociti, endotelne ćelije, beta-ćelije pankreasa, makrofagi i monociti) reguliše energetska homeostazu i inflamaciju, utiče na prelaz iz akutnih u hronične inflamatorne bolesti, kao što su gojaznost i IR (Naugler i Karin 2008) promovisanjem sinteze proinflatarnih citokina. Kod ljudi, veći nivo IL-6 u serumu je povezan sa narušenom tolerancijom na glukozu, dijabetesom, povišenim krvnim pritiskom, a posebno sa gojaznošću (Marseglia i sar., 2014).

Visceralno masno tkivo sekretuje druge molekule koji stimulišu dalju ekspresiju IL-6 oslobađajući dva do tri puta više IL-6 od potkožnog masnog tkiva (Badran i Laher 2011). Takođe, IL-6 može inhibirati aktivnost LPL i kontrolisati apetit i unos energije na nivou hipotalamusa (Stenlof i sar., 2003).

Konačno, akumulirano masno tkivo indukuje sintezu proinflatarnih citokina, uključujući TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6, koji promovišu povećanu stvaranje ROS i azota od strane makrofaga i monocita i to povećanje može biti odgovorno za povećanje OxS (Fonseca-Alaniz i sar., 2007). Dalje, ROS indukuju oslobađanje proinflatarnih citokina i ekspresiju adhezivnih molekula i faktora (Lavrovsky i sar., 2000) putem redoks-senzitivnih faktora transkripcije, posebno NF- $\kappa$ B i NADPH oksidaznog puta (NOX) (Shoelson i sar., 2007). NOX, posebno NOX4 (Bedard i Krause 2007) je enzimski kompleks vezan za membranu koji prenosi elektrone iz NADPH kiseoniku i predstavlja glavni izvor sinteze ROS u adipocitima. Stvoreni radikali kiseonika se dalje konvertuju u vodonik peroksid, koji je duže živeća vrsta ROS. Eksperimentalni modeli su pokazali da "prigušivanje" NOX4 inhibira palmitatom i glukozom stimulirano stvaranje ROS ističući značaj NADPH oksidaze kao nemitohondrijskog izvora ROS u adipocitima (Marseglia i sar., 2014).



Osetljivost na oksidativna oštećenja je veća kod gojaznih osoba zbog osiromašenih izvora antioksidanata uključujući SOD, GPx i CAT, vitamin A, vitamin E, vitamin C i  $\beta$ -karoten (Ozata i sar., 2002). U poređenju sa normalno uhranjenim osobama aktivnost SOD kod gojaznih osoba je znatno manja (Ozata i sar., 2002). Pokazano je da suplementacija antioksidanata može smanjiti OxS i ROS, smanjiti rizik od komplikacija vezanih za gojaznost i povratiti ekspresiju adipokina (Furukawa i sar., 2004).

Drugo, iako u periodu aktivnog rasta organizma dolazi do povećanja SMK povećana akumulacija masti kod gojaznih osoba dovodi do patološkog povećanja nivoa SMK u serumu što povratno narušava metabolizam glukoze (Rzheshovsky 2013), favorizuje akumulaciju masti i glukoze u jetri i mišićima (Tereshin 2007) i promovira veću oksidaciju u mitohondrijama i peroksizomima. Ovaj status dovodi do OxS, oštećenja mitohondrijske DNK, iscrpljivanja adenozin trifosfata (ATP) i na kraju, lipotoksičnosti uključujući razne negativne efekte masnih kiselina na ćelijske strukture (Goossens 2008). Ćelijska oštećenja dovode do visoke produkcije citokina kao što su TNF- $\alpha$ , koji generiše dodatne ROS u tkivima i povećava stopu lipidne peroksidacije (Marseglia i sar., 2014).

Treće, važno je napomenuti da masno tkivo predstavlja izvor bioaktivnih adipokina uključujući leptin, adiponektin, visfatin, rezistin, apelin i inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1; *engl. plasminogen activator inhibitor-1*) koji su bitni za homeostazu fizioloških i patoloških procesa koji uključuju OxS (Marseglia i sar., 2014).

Pokazano je da je koncentracija parametara lipidne peroksidacije 4-hidroksi 2-nonenola (4-HNE) povećana kako u krvi, tako i u mišićima gojaznih osoba u poređenju sa nivoom 4-HNE kod normalno uhranjenih osoba (Russell i sar., 2003; Le Lay i sar., 2014). Štetni efekti 4-HNE su pokazani u adipocitima. Prisustvo 4-HNE dovodi do narušavanja funkcije supstrata za receptor insulina, smanjenja sekrecije adiponektina i povećanja lipolize (Le Lay i sar., 2014). U srcu Zucker gojaznih pacova pokazana je povećana koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije i stimulacija aktivnosti CuZnSOD (Beltowski i sar., 2000). Urođeno gojazne (*ob/ob*) miševa karakteriše povećana koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije u plazmi, jetri i mozgu (Beltowski i sar., 2000). Kod istih miševa pokazano je da dolazi do povećane aktivnosti

GPx u mozgu, smanjenja aktivnosti GPx, GR i CAT u jetri (Beltowski i sar., 2000), kao i smanjenja aktivnosti CuZnSOD (Beltowski i sar., 2000). Rezultati eksperimenata na Zucker gojaznim pacovima podržavaju hipotezu da postoji veza između OxS i gojaznosti i to nezavisno od primarnog uzroka nastanka gojaznosti (Beltowski i sar., 2000).

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. HIPOTEZA**

Polazeći od saznanja da je hormon leptin medijator između masnog tkiva i hipotalamusa, koji kontroliše apetit i trošenje energije polazna hipoteza ove doktorske disertacije je da bi genetička varijanta LEP G-2548A u genu za leptin mogla biti povezana sa promenama u antropometrijskim i metaboličkim parametrima usled poremećaja unosa hrane.

S obzirom da je poznato da je stanje gojaznosti praćeno povećanjem reaktivnih vrsta kiseonika i azota, u okviru ove doktorske disertacije analizirane su asocijacije promena aktivnosti enzima AOS sa genetičkom varijantom LEP G-2548A u genu za leptin kod gojaznih osoba u Srbiji.

Po prvi put su urađena izučavanja asocijacije genetičke varijante LEP G-2548A u genu za leptin sa promenama antropometrijskih i metaboličkih parametara i antioksidativnih enzima kod gojaznih ispitanika u srpskoj populaciji.

## 2.2. CILJEVI

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Izučavanje promena metaboličkih (TG, LDL, HDL, Apo-AI, ApoB, leptin, FPG, 2h PG, FPI, 2h PI, SMK) i antropometrijskih parametara, kao i aktivnosti enzima AOS kod gojaznih i kontrolnih ispitanika nezavisno od genetičke varijante LEP G-2548A u genu za leptin;
- Genotipizacija varijante LEP G-2548A u genu za leptin kod gojaznih i kontrolnih ispitanika;
- Poređenje utvrđene frekvencije genotipova i alela ispitivane genetičke varijante kod gojaznih i kontrolnih ispitanika i
- Utvrđivanje postojanja asocijacija genetičke varijante LEP G-2548A u genu za leptin sa promenama u ispitivanim antropometrijskim i metaboličkim parametrima, kao i aktivnosti enzima AOS kod gojaznih i kontrolnih ispitanika.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Ispitivanu grupu činilo je ukupno 67 osoba oba pola, koje su podeljene u dve grupe: kontrolnih i gojaznih ispitanika. Kontrolnu grupu činilo je 36 normalno uhranjenih osoba oba pola (18 osoba muškog i 18 osoba ženskog pola) prosečne starosne dobi  $33,5 \pm 6,4$  godina sa prosečnom vrednosti BMI  $22,6 \pm 1,9$  kg/m<sup>2</sup>. Grupu gojaznih ispitanika činio je 31 gojazni ispitanik oba pola (10 osoba muškog i 21 osoba ženskog pola) prosečne starosne dobi  $39,2 \pm 11,3$  godina sa prosečnom vrednosti BMI  $41,5 \pm 9,2$  kg/m<sup>2</sup>. Ispitanici obe grupe bili su sličnog srednjeg socioekonomskog statusa. Svaka osoba uključena u istraživanja bila je informisana o cilju i značaju istraživanja i svi ispitanici su dali svoj pismeni pristanak za dobrovoljno učestvovanje u studiji. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Instituta za nuklearne nauke "Vinča", Beograd. Ispitanicima nije postavljena dijagnoza bolesti kardiovaskularnog sistema, jetre, bubrega, centralnog nervnog sistema, malignih i infektivnih bolesti i ispitanici nisu unosili medikamente koji mogu imati uticaj na metabolizam ugljenih hidrata i masti, antioksidativni status, kao i na telesnu masu tokom prethodna tri meseca. Istraživanje je sprovedeno u sledećim ustanovama:

1. Institut za nuklearne nauke "Vinča", Univerzitet u Beogradu, Beograd, Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku,
2. Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Vojvodine, Novi Sad.

Ispitanici su bili podvrgnuti antropometrijskim merenjima, kao i merenju krvnog pritiska. Od svakog ispitanika je uziman uzorak venske krvi posle prekonoćnog gladovanja za analizu metaboličkih, hormonskih i inflamatornih parametara, kao i za genetičku analizu.

## **3.2. Metode rada**

### **3.2.1. Antropometrijska merenja**

Sprovedena su sledeća antropometrijska merenja: merenje telesne mase (BW), telesne visine (BH) i obima struka (WC) na osnovu kojih je računat indeks telesne mase (BMI).

Za merenje BW korišćena je mehanička vaga sa preciznošću merenja od 100 gr.

Telesna visina je merena visinometrom u stojećem položaju sa preciznošću od 1 mm.

Indeks telesne mase (BMI) je izračunavan deljenjem telesne mase (kg) sa kvadratom telesne visine ( $m^2$ ).

Obim struka je meren korišćenjem plastificirane centimetarske trake u stojećem položaju, na kraju izdisaja, na sredini najviše tačke grebena bedrene kosti i donje ivice rebarnog luka. Preciznost merenja je bila 1 mm.

### **3.2.2. Merenje krvnog pritiska**

Sistolni (SBP) i dijastolni krvni pritisak (DBP) mereni su pomoću sfingomanometra (Riva-Rocci) i izražavani u milimetrima živinog stuba sa preciznošću od 1 mm. Merenje je izvršeno u jutarnjim satima u sedećem položaju nakon 10-15 minuta mirovanja od dolaska na kliniku.

### **3.2.3. Biohemijske analize krvi**

#### **3.2.3.1. Izolovanje seruma i plazme iz krvi**

Venska krv je uzorkovana iz lakatnog pregiba i iz krvi su izolovani serum i plazma. Serum je dobijen centrifugiranjem (15 min/3000 rpm) krvi uzete bez antikoagulansa posle završenog procesa koagulacije (20-30 min na sobnoj temperaturi).

Plazma je dobijena centrifugiranjem (15 min/3000 rpm) pune krvi sakupljene u epruvetu sa antikoagulansom (EDTA, heparin) neposredno posle vađenja krvi.

### **3.2.3.2. Određivanje koncentracije glukoze u serumu**

Koncentracija glukoze u serumu svih ispitanika pre prvog jutarnjeg obroka (FPG) i 2 sata posle obroka (2h PG) merene su korišćenjem Dialab glucose GOD-PAP kita prema uputstvu proizvođača.

Princip metode zasniva se na oksidaciji glukoze uz prisustvo enzima glukozo-oksidade u glukonsku kiselinu i vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ). Nastali  $H_2O_2$  reaguje u prisustvu enzima peroksidaze sa 4-aminofenazonom i fenolom u prisustvu enzima peroksidaze gradeći iminohinonsku boju i vodu (Trinderova reakcija). Stvoreni iminohinon dovodi do promene boje reakcione smeše koja se meri apsorpcijom na talasnoj dužini od 500 nm i intenzitet iminohinonske boje direktno je proporcionalan koncentraciji glukoze u uzorku. Na osnovu apsorbance uzorka i poznate apsorbance i koncentracije standardnog rastvora izračunata je koncentracija glukoze i izražena u mmol/l.

### **3.2.4. Određivanje lipidnog profila**

Od lipidnih parametara određivane su vrednosti: ukupnog holesterola (TC), triglicerida (TG), LDL-holesterola, HDL-holesterola, kao i vrednosti apolipoproteina Apo-AI, ApoB i lipoproteina Lp(a). Takođe je određivana i koncentracija SMK.

#### **3.2.4.1. Određivanje koncentracije TC i TG u serumu ispitanika**

Koncentracije TC i TG u serumu ispitanika su mereni u automatskom analizatoru (Olympus AU400 analyser, Beckman Coulter, USA), Koncentracije TC i TG su merene korišćenjem komercijalnih kitova koji se baziraju na metodi enzimskog bojenja (*engl. enzymatic colour test*), korišćenjem komercijalnih kitova za TC (*engl. cholesterol oxidase-peroxidase*) i TG (*engl. lipase/glycerol phosphate*

*oxidase/peroxidase*) prema uputstvu proizvođača. Koncentracije TC i TG su izražavane u mmol/l.

### **3.2.4.2. Određivanje koncentracije LDL i HDL u serumu ispitanika**

Koncentracija HDL je određivana metodom precipitacije korišćenjem natrijumfosfovolframata.

Vrednosti koncentracije LDL su izračunavane korišćenjem Friedewaldove formule za koju su korišćeni podaci prethodno dobijenih vrednosti koncentracija TC, HDL i TG.

$$\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - 0.45 \times \text{TG} \text{ [mmol/l]}$$

Vrednosti dobijene za koncentracije LDL i HDL su izražavane u mmol/l.

Računat je i indeks ateroskleroze kao količnik dobijenih vrednosti LDL- i HDL- holesterola.

### **3.2.4.3. Određivanje koncentracije SMK u serumu ispitanika**

Modifikovanom kolorimetrijskom metodom po Dunkombu određivana je koncentracija SMK u serumu ispitanika. Metoda određivanja SMK se bazira na principu da ekstrahovane SMK u hloroformu u prisustvu odgovarajućeg reagensa stvaraju soli bakra koje u prisustvu dietilditiokarbamata (DDC) grade kompleksno jedinjenje žute boje sa maksimumom apsorpcije svetlosti na 436 nm.

Postupak određivanja koncentracije SMK je započet tako što je u 45µl seruma dodavano po 225 µl vodenog rastvora  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  u koji je prethodno pipetiran trietanolamin (TEA) (pH 7.8). Epruvete su kratko mućkane i nakon mućkanja dodavano je po 1125 µl hloroforma, a potom su epruvete snažno mućkane tokom 20 minuta. Inkubaciona reakciona smeša je centrifugirana 10 minuta na 3000 rpm. Po uklanjanju supernatanta plavo—zelene boje donjoj hloroformskoj fazi sa ekstrahovanim SMK dodavano je 45µl 0,2% DDC i nakon snažnog mućkanja uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Apsorbanca uzoraka i standarda je merena na 436



nm prema slepoj probi u spektrofotometru (Lambda 35UV/VIS, Perkin Elmer). Vrednosti apsorbanci očitavanih za seriju rastvora palmitinske kiseline poznate koncentracije korišćene su za konstruisanje standardne krive. Dobijene vrednosti koncentracija SMK izražavane su u mmol/l.

#### **3.2.4.4. Određivanje koncentracije Apo-AI, ApoB i Lp(a) u serumu ispitanika**

Koncentracije Apo-AI i ApoB u serumu su merene imunoturbodimetrijskom metodom korišćenjem komercijalnih reagenasa za kvantitativno određivanje Apo-AI i ApoB u humanom serumu, prema uputstvu proizvođača. Merenje je rađeno u automatskom analizatoru (Olympus AU400 analyser, Beckman Coulter, USA). Princip metode merenja koncentracija ApoA-I i ApoB je zasnovan na precipitaciji Apo-AI i Apo B iz uzorka sa odgovarajućim monoklonskim Apo antitelima i formiranju imunih kompleksa, koji dovode do povećanja rasejane svetlosti, koja je merena na talasnoj dužini od 540 nm za Apo-AI i 340 nm za ApoB. Povećanje zamućenosti reakcione smeše je proporcionalno koncentracijama Apo-AI i ApoB u uzorku, a dobijene vrednosti su automatski izračunavane iz poznatog standarda.

Određivanje koncentracije Lp(a) u serumu rađeno je korišćenjem stope nefelometrijske metode pomoću komercijalno dostupnog Beckman Coulter reagent-Lp(a) reagensa (LPAX) prema uputstvu proizvođača.

Dobijene vrednosti za koncentracije ApoA-I, ApoB i Lp(a) su izražavane u mg/dl.

#### **3.2.5. Određivanje koncentracije inflamatornih markera**

Merene su koncentracije inflamatornih markera C—reaktivnog proteina (CRP) u serumu i nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) u plazmi kao krajnjih produkata azot monoksida (NO).

### 3.2.5.1. Određivanje koncentracije CRP u serumu ispitanika

Koncentracija CRP u serumu određivana je korišćenjem imunoturbidimetrijskog testa, pomoću kompleta reagenasa za kvantitativno određivanje CRP u serumu (System reagent for the quantitative determination of C-Reactive Protein in human serum) u automatskom analizatoru (Olympus AU400 analyser, Beckman Coulter, USA) prema uputstvu proizvođača. Princip korišćene metode se zasniva na precipitaciji molekula sa humanim anti CRP antitelima koja su imobilisana na lateks česticama. Tako nastali imunokompleksi povećavaju rasipanje svetlosti, tj. smanjuje se intenzitet propuštene svetlosti što je proporcionalno koncentraciji CRP u serumu. Rasipanje svetlosti meri se čitanjem zamućenosti na 570 nm. Koncentracija CRP je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu serije CRP standarda poznate koncentracije i izražavana je u mg/l.

### 3.2.5.2. Određivanje koncentracije $\text{NO}_2^-$ i $\text{NO}_3^-$ kao krajnjih produkata NO u plazmi ispitanika

Koncentracija azot monoksida (NO) u plazmi ispitanika određivana je indirektno, određivanjem koncentracije nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) kao krajnjih produkata NO korišćenjem  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  kompleta (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical I.N. 780001) prema uputstvu proizvođača. Određivanje koncentracije  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  rađeno je u dva koraka: u prvom koraku se  $\text{NO}_3^-$  dodavanjem nitrat reduktaze konvertuju u  $\text{NO}_2^-$ , dok se u drugom koraku dodatkom Grizovog reagensa  $\text{NO}_2^-$  konvertuje u azo jedinjenje tamno ljubičaste boje. Merenjem apsorbance nastalog azo jedinjenja određuje se koncentracija  $\text{NO}_2^-$  čija je apsorpcija meri na na 540 nm.

Esej je rađen u mikrotitarskoj polistirenskoj ploči sa 96 bunarića. Posle nanošenja serije standarda  $\text{NO}_3^-$  poznate koncentracije i uzoraka plazme u mikrotitar ploču u ukupnom volumenu od 80  $\mu\text{l}$ , u svaki bunarić dodavano je po 10  $\mu\text{l}$  kofaktora enzima, a potom i po 10  $\mu\text{l}$  nitrat reduktaze. Nakon inkubacije u trajanju od 3h na sobnoj temperaturi u svaki bunarić dodavano je po 50  $\mu\text{l}$  Grizovog reagensa R1, a odmah potom i po 50  $\mu\text{l}$  Grizovog reagensa R2. Posle inkubacije (10 minuta), očitavana

je apsorbancija na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Perkin Elmer, Wallac 1420 Victor) na 540 nm. Očitavanjem vrednosti apsorbancija za seriju rastvora  $\text{NO}_3^-$  poznate koncentracije konstruisana je standardna kriva i na osnovu nje određivana je koncentracija  $\text{NO}_3^-$  i izražavana je u  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.6. Određivanje koncentracije insulina u serumu ispitanika**

Za kvantitativno merenje koncentracije insulina u serumu pre prvog jutarnjeg obroka (FPI) i koncentracije insulina u serumu 2h posle obroka (2h PI) korišćena je ELISA (*engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) tehnika i ELISA kit za detekciju insulina humanog porekla (Abcam ab100578) prema uputstvu proizvođača. Za izvođenje eseja korišćena je mikrotitar ploča sa 96 bunarića prethodno obloženih antitelima specifičnim za insulin. Standardi i uzorci zapremine 125  $\mu\text{l}$  su pipetirani u bunariće. Bunarići su ispirani i dodavano je biotiničano sekundarno anti-insulinsko antitelo i inkubirano 1 h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja i odstranjivanja nevezanog biotiničanog antitela u bunariće je dodavana peroksidaza iz rena (HRP; *engl. horseradish peroxidase*)-konjugovana streptavidinom u trajanju od 15 minuta. Nakon ponovnog ispiranja dodavan je rastvor tetrametilbenzidina (TMB) tj. supstrat. Razvijena boja bila je proporcionalna koncentraciji prisutnog insulina. Reakcija razvijanja boje je zaustavljena dodavanjem 50  $\mu\text{l}$  "stop" rastvora. Rastvor za stopiranje promenio je boju iz plave u žutu i intenzitet boje bio je proporcionalan koncentraciji insulina merenoj na talasnoj dužini od 450 nm korišćenjem ELISA čitača (WALLAC 1420 VICTOR, Perkin-Elmer) i izražavan je u mIU/mmol. Pored uzoraka korišćen je i set standardnog rastvora humanog insulina u cilju konstruisanja standardne krive na osnovu koje je izračunavana nepoznata koncentracija insulina u uzorcima.

#### **3.2.6.1. Određivanje procene homeostaznog modela rezistencije na insulin pre prvog jutarnjeg obroka (HOMA-IR) i 2h posle obroka (2h HOMA-IR)**

Na osnovu izmerenih koncentracija glukoze i insulina izračunati su HOMA-IR i 2 h HOMA-IR pomoću matematičkih modela.

Homeostatski indeks rezistencije na insulin (HOMA-IR) kao pokazatelj stepena bazalne rezistencije na insulin dobijen je deljenjem proizvoda glikemije našte (pre prvog jutarnjeg obroka) i insulinemije našte (pre prvog jutarnjeg obroka) sa konstantom 22,5, prema formuli

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glukoza našte (mmol/l)} \times \text{insulin našte (\mu U/ml)}}{22,5}$$

Indeks rezistencije na insulin 2h posle doručka izračunavan je prema formuli:

$$2\text{h HOMA-IR} = \frac{\text{glukoza 2h posle doručka (mmol/l)} \times \text{insulin 2h posle doručka (\mu U/ml)}}{22,5}$$

Indeks rezistencije na insulin (HOMA-IR) nam govori kolika je rezistencija na insulin u jetri, i što je ovaj indeks veći znači da je veća rezistencija na insulin.

### 3.2.6.2. Određivanje koncentracije leptina u serumu ispitanika

Za određivanje koncentracije leptina u serumu ispitanika korišćena je ELISA metoda koja se zasniva na principu "sendviča antitela" pomoću ELISA kompleta (ab100581, Abcam) prema uputstvu proizvođača.

Posle nanošenja standarda/uzoraka u mikrotitar ploču obloženu primarnim "hvatač" anti-leptin antitelom i inkubiranja, leptin iz uzoraka se vezivao za dato antitelo. Nakon ispiranja ploča pipetirano je primarno antitelo koje je specifično za detekciju leptina konjugovano biotinom koje se vezuje za različite epitope leptina kompletirajući ELISA "sendvič". Nakon ispiranja kojim je uklanjano nevezano antitelo dodavan je reagens za detekciju, tj. peroksidaza iz rena (HRP) koja je vezana za streptavidin, a koji se specifično vezuje za biotin. Posle ispiranja mikrotitarske ploče dodavan je rastvor supstrata tetrametilbenzidina (TMB) – vodonik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tj. specifičnog supstrata za HRP. Nakon reakcije dobijena je plava boja koja je bila proporcionalna količini vezanog leptina. Reakcija je prekidana dodavanjem sumporne kiseline i nakon toga boja rastvora je prelazila u žutu. Intezitet dobijene žute boje je bio proporcionalan koncentraciji leptina. Vrednosti apsorbanci za leptin očitavane su na talasnoj dužini od 450 nm korišćenjem ELISA čitača (WALLAC 1420 VICTOR, Perkin-Elmer).

Koncentracija leptina određivana je na osnovu standardne krive konstruisane pomoću standardnih rastvora leptina i izražavana je u ng/ml.

### **3.2.7. Određivanje parametra OxS 4-hidroksi-2-nonenala (4-HNE)**

Određivanje koncentracija 4-HNE predstavlja meru lipidne peroksidacije, stoga smo određivali koncentraciju 4-HNE u serumu svih ispitanika.

Za određivanje koncentracije 4-HNE u serumu ispitanika korišćen je komercijalni OxiSelect kit (Cat.br. STA 334). Postupak je izveden tako što su bunarići mikrotitar ploče oblagani HNE konjugatom. Nepoznati HNE proteinski uzorci ili HNE - albumin iz govedeg seruma (BSA; *engl. bovine serum albumin*) standardi su zatim dodavani u HNE konjugat kojim su bili obloženi bunarići. Posle kratke inkubacije dodavano je anti-HNE poliklonalno antitelo što je bilo praćeno dodavanjem sekundarnog antitela konjugovanog peroksidazom iz rena (HRP). Sadržaj HNE proteinskih kompleksa na nepoznatim uzorcima određivan je upoređivanjem sa prethodno određenom HNE-BSA standardnom krivom. Očitavanje je vršeno na 450 nm i izražavano u mmol/l.

### **3.2.8. Određivanje parametara AOS**

Određivanje parametara AOS je obuhvatilo određivanje ukupnog antioksidativnog statusa kao i aktivnosti enzima AOS.

#### **3.2.8.1. Određivanje aktivnosti ukupnog antioksidativnog statusa (TAS)**

TAS test je izveden primenom Randox TAS kita sa Troloksom kao ekvivalentnim standardom.

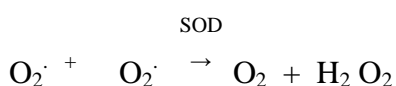
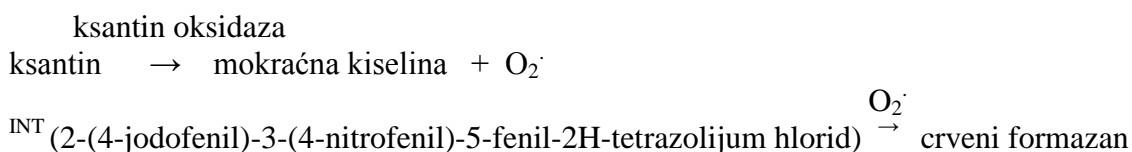
Uzorci plazme pripremljeni su separacijom elemenata krvi iz heparinizovane i centrifugirane (10 min, 4 °C, 2500 x g) venske krvi uzete za biohemijske analize tokom

redovne periodične kontrole zdravlja. Uzorci plazme su čuvani bez dalje pripreme na -20 °C do upotrebe za merenje TAS.

Test određivanja TAS je zasnovan na generisanju stabilnog radikalskog katjona (ABTS • +) iz reakcije u kojoj metmioglobin, koji deluje kao peroksidaza, u prisustvu vodonik peroksida formira radikal koji stupa u interakciju sa hromogenom ABTS. Opadanje apsorpcije ABTS na 600 nm ili pojedinih antioksidanata može biti kvantifikovano, a zatim se porediti sa Troloksom kao standardom pod istim uslovima. TAS analize su izvedene na novoj generaciji Daytona (RX) automatskom hemijskom analizatoru prema uputstvu Randox Co. Troloks standard i uzorak kontrole plazme su mereni istovremeno. Dobijeni rezultati su izraženi u mmol Eq Trolox/L plazme (Pl).

### 3.2.8.2. Određivanje aktivnosti SOD

Za određivanje aktivnosti SOD u serumu ispitanika korišćen je komercijalno dostupan Randox kit (Cat.br.SD 125, Randox Labs, Crumlin, UK). Metoda za određivanje aktivnosti SOD je zasnovana na reakciji koju katalizuje ksantin oksidaza, pri čemu nastaje superoksid radikal ( $O_2^{\cdot -}$ ) koji reaguje sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolijum hloridom (INT) pri čemu nastaje crvena formazan boja. Aktivnost SOD je izračunavana kao procenat inhibicije prethodno navedene reakcije. Jedna SOD jedinica se definiše kao količina enzima koja inhibira 50% brzine redukcije INT pri definisanim uslovima.

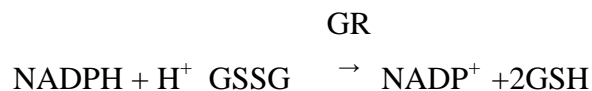


Za određivanje aktivnosti SOD korišćen je uzorak pune krvi sa heparinom ili EDTA. Uzorci krvi zapremine 0,5 ml su centrifugirani 5 min na 3000 rpm, nakon čega je uklanjana plazma. Dobijeni eritrociti su ispirani četiri puta sa po 3 ml 0,9% rastvora NaCl i centrifugirani 10 minuta na 3000 rpm posle svakog ispiranja. Isprani eritrociti

bili su dopunjavani hladnom redestilovanom vodom do zapremine od 2 ml. Smeša sa eritrocitima je inkubirana na +4 °C u trajanju od 15 minuta. Dobijeni lizat je razblaživan sa 0,01 mol/l fosfatnog pufera pH 7,0, tako da je procenat inhibicije opadao između 30% i 60%. Dobijeni rezultati su izraženi u U/mgHb.

### 3.2.8.3. Određivanje aktivnosti GR

Za određivanje aktivnosti GR u serumu ispitanika korišćen je komercijalno dostupan Randox kit (Cat.br. GR2368, Randox Labs, Crumlin, UK). Glutation reduktaza katalizuje redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) do glutationa (GSH) u prisustvu NADPH, koji se oksiduje do NADP<sup>+</sup>.



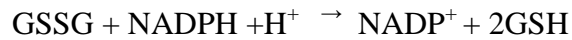
Priprema uzorka:

Za određivanje GR uziman je uzorak pune krvi (0,5 ml) koja je centrifugirana 5 min na 2000 rpm. Uklanjanje su plazma i sloj koji su činili leukociti i trombociti pri čemu se vodilo računa da se ne ukloni previše staloženih eritrocita, čime bi postojao rizik od nereprezentativnog uzorkovanja ćelija. Eritrociti su tri puta ispirani resuspendovanjem u 0,9% NaCl i centrifugirani po 5 min na 2000 rpm posle svakog ispiranja. Lizirane ćelije eritrocita su resuspendovane u 0,5 ml hladne redestilovane vode i ostavljane 10 min na +2 °C - +8 °C. Lizat je centrifugiran 5 min na 2000 rpm. Za esej je razblaživano po 100 µl lizata sa 1,9 ml 0,9% rastvora NaCl. Apsorbanca je merena na 340nm. Rezultati su izraženi u mU/ml.

### 3.2.8.4. Određivanje aktivnosti GPx

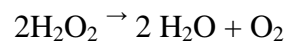
Za određivanje aktivnosti GPx u serumu ispitanika korišćen je komercijalno dostupan Randox kit (Cat br. RS 504, Randox Labs, Crumlin, UK ). Metoda za određivanje aktivnosti GPx je zasnovana na reakciji Paglia i Valentine u kojoj GPx

redukuje kumen peroksid, dok redukuje GSH u GSSG. U prisustvu GR i NADPH oksidovani glutation (GSSG) se odmah prevodi u redukovanu formu (GSH) uz oksidaciju NADPH u  $\text{NADP}^+$ . Opadanje apsorbance je mereno na 340 nm. Dobijeni rezultati su izraženi u U/gHb.



### 3.2.8.5. Određivanje aktivnosti CAT

Za određivanje aktivnosti CAT u serumu ispitanika korišćen je komercijalno dostupan OxiSelect kit (Cat.br. STA 341, Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA). Metoda određivanja aktivnosti CAT se zasniva na razlaganju  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $2\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$  od strane enzima CAT iz uzorka. Brzina razlaganja  $\text{H}_2\text{O}_2$  proporcionalna je aktivnosti CAT. Reakcija u kojoj se dodaje poznata količina  $\text{H}_2\text{O}_2$  je trajala 1 minut. Aktivnost CAT je potom inhibirana dodavanjem natrijumazida, a preostala koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  učestvuje u reakciji 3,5-dihloro-2-hidroksibenzen sulfonata (DHBS) i 4-aminoantipirina (AAP) uz delovanje peroksidaze poreklom iz rena (HRP). Nastala kinonimin boja je fotometrijski merena na 520 nm. Dobijeni rezultati su izraženi u U/gHb.



### 3.2.9. Analiza genetičke varijante gena za leptin

Prvi korak u analizi genetičke varijante gena za leptin je bio izolacija DNK iz krvi ispitanika, nakon čega je sledila:

- amplifikacija fragmenata DNK i



- restrikciona analiza sintetisanih fragmenata DNK.

### 3.2.9.1. Izolacija DNK iz krvi ispitanika

Za izolovanje DNK iz krvi ispitanika korišćena je fenol-hloroformska metoda po Kunkelu i saradnicima. Za izolovanje DNK korišćena je puna krv uzeta u epruvete sa antikoagulansom (Na-citrat ili EDTA).

Uzorku od 3 ml krvi dodavano je 24 ml hladnog lizogenog rastvora. Smeša je homogenizovana u ručnom homogenizeru na ledu u trajanju od 3-5 min. Potom je smeša centrifugirana 10 min na 40K na 4 °C. Supernatant je odlivan, a talogu je dodavano 125 µl rastvora II nakon čega je talog pažljivo resuspendovan. Potom je dodavano 62,5 µl 10% SDS, snažnog deterdženta koji razlaže sve ćelijske membrane uključujući i jedarnu membranu. Zatim je dodavano 50 µl proteinaze K (10 mg/ml) i smeša inkubirana 12h na 37 °C jer je to optimalna temperatura na kojoj proteinaza razlaže sve proteine. Posle inkubacije u smešu je dodavano 0,5 ml ekvilibrisanog fenola pH 7,8, i centrifugirano 19 min na 10 800 rpm na 18 °C. Ekstrakcija fenolom omogućavala je izdvajanje velike količine proteina. Nakon centrifugiranja gornja faza je izvađena i dodavana joj je onolika zapremina smeše fenol-hloroforma (1:1) kolika je bila zapremina izvađene gornje faze i to je centrifugirano 19 min na 10 800 rpm na 18 °C. Izvađenoj gornjoj fazi dodavana je onolika zapremina smeše hloroform-izoamilalkohola (24:1) kolika je bila zapremina gornje faze i ponavljano je centrifugiranje. Dodavanjem hloroforma je uklonjen fenol, a dodavanje izoamilalkohola je smanjilo penu koja nastaje dodavanjem SDS. Centrifugiranje je ponovljeno nakon čega je sledila precipitacija i taloženje DNK. Izvađenoj gornjoj fazi dodavani su ledeni 96% etil-alkohol i 3M natrijum acetat pH 5,0 (2 zapremine 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH i 1/10 zapremine 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 5,0). DNK je taložena u prisustvu Na jona centrifugiranjem 19 min na 11 900 rcf na 4 °C. DNK je ispirana u 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH i nakon ispiranja je rastvorena u 200 µl TE pufera pH 8,0. Uzorci su čuvani na 4°C.

### 3.2.9.2. Merenje koncentracije ekstrahovane DNK

Čistoća dobijene DNK procenjuje se odnosom apsorbancije izmerene na 260 nm i 280 nm. Za čistu DNK očekuje se vrednost 260 nm/280 nm odnosa između 1,8 i 2,0. Koncentracija DNK u  $\mu\text{g/ml}$  izračunava se iz odnosa:  $A_{260} \times \text{razblaženje u kiveti} \times \text{dužina svetlosnog puta u kiveti u cm (1 cm)} \times \text{apsorpcioni faktor za dvolančanu DNK (50)/1000}$ .

### 3.2.9.3. Amplifikacija fragmenata DNK (Lančana reakcija polimeraze-PCR)

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) amplifikuju se fragmenti DNK *in vitro* pri čemu se koriste izuzetno male koncentracije početnog materijala DNK, a sama reakcija se izvodi pomoću DNK termostabilnog enzima polimeraze.

Sekvenca oligonukleotidnih amplimera korišćenih pri detekciji genetičke varijante G-2548A u genu za *LEP* uzeta je iz studije Mammes i saradnika (**Tabela 1**). Komponente za PCR reakcije koje su korišćene za detekciju genetičke varijante G-2548A u genu *LEP* prikazane su u **Tabeli 2**. Temperaturni uslovi za amplifikaciju DNK fragmenata ispitivanog gena dati su u **Tabeli 3**. Svaka serija uzoraka sadržala je obaveznu negativnu (bez DNK) kontrolu i pozitivnu (sa poznatom koncentracijom DNK) kontrolu.

**Tabela 1. Sekvence amplimera za detekciju genetičke varijante G-2548A u genu *LEP***

Oznaka genetičke varijante	Sekvenca oligonukleotida	Oznaka amplimera	Referenca
<i>LEP</i> G-2548A	5'- TTTCCTGTAATTTCCCGTGAG -3'	LEPF	Mammes i sar., 2000.
	5'- AAAGCAAAGACAGGCATAAAAA-3'	LEPR	

LEPF- nizvodni amplimer za detekciju genetičke varijante G-2548A u genu *LEP*;

LEPR- uzvodni amplimer za detekciju genetičke varijante G-2548A u genu *LEP*

**Tabela 2. Komponente korišćene za PCR amplifikaciju fragmenta gena *LEP*.**

Komponente PCR reakcije	finalna koncentracija	količina (μl)
10 x PCR pufer sa Mg <sup>2+</sup> 1,5mM	1 x	2,5
dNTP (2,5mM svaki)	200μM	2
F (10μM)	1 μM	2,5
R (10μM)	1 μM	2,5
genomska DNK (50ng/ μl)		1
Taq polimeraza (5U/μl)	1 U/reakciji	0,2
ddH <sub>2</sub> O		14,3
Ukupno	25 μl	

dNTP- smeša rastvora deoksinukleotida u kojoj je jednak odnos dATP, dCTP, dGTP i dTTP; F- nizvodni amplimer; R- uzvodni amplimer; Taq polimeraza- termostabilna DNK polimeraza

**Tabela 3. Temperaturni uslovi PCR reakcije**

Broj ciklusa	Faza reakcije	Temperatura (°C)	Vreme trajanja faze (min)
1	Inicijalna denaturacija	95	5
35	Denaturacija	94	1
	Hibridizacija	50	1
	Ekstenzija	72	1
1	Finalna ekstenzija	72	5

#### 3.2.9.4. Restrikciona analiza sintetisanih fragmenata DNK (RFLP)

Restrikciona analiza je metoda genetičke analize molekula DNK zasnovana na korišćenju restrikcioni enzima. Ovom analizom se utvrđuje prisustvo ili odsustvo restrikcionog mesta, koje je za svaki enzim striktno definisano specifičnim nizom baza u analiziranoj sekvenci DNK, gena za leptin.

Digestiona smeša korišćena u ovoj analizi prikazana je u **Tabeli 4**. Digestija je vršena u vodenom kupatilu na 37 °C preko noći.

**Tabela 4. Komponente digestione smeše**

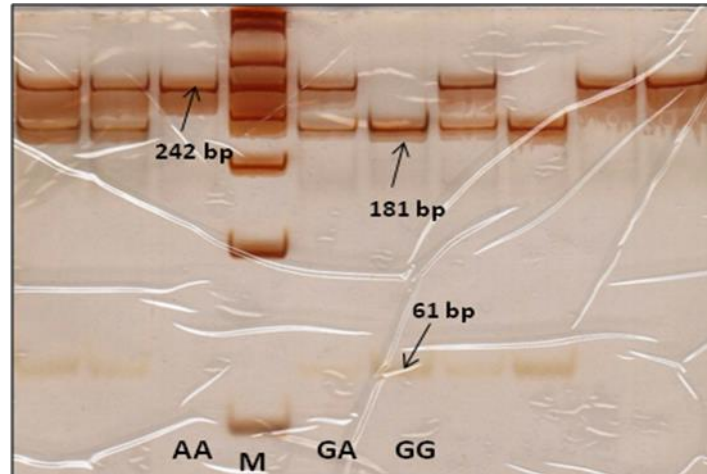
Komponente digestione smeše	Količina (μl)
10x žuti digestioni pufer Tango	1,5
Restrikciona endonukleaza <b><i>HhaI</i></b> (10U/μl) $\begin{array}{c} 5' \dots \text{GCG} \overset{\nabla}{\text{C}} \dots 3' \\ 3' \dots \overset{\blacktriangle}{\text{C}} \text{GCG} \dots 5' \end{array}$	0,1 (1U)
PCR produkt	13,5

### 3.2.9.5. Provera sinteze i veličine DNK fragmenata gena za leptin elektroforezom

Elektroforeza kroz agarozne ili poliakrilamidne gelove je standardna metoda koja se koristi za razdvajanje i identifikaciju molekula u električnom polju. Elektroforetska pokretljivost fragmenata DNK kroz gel zavisi od veličine, odnosno, dužine fragmenta i njegove primarne i sekundarne strukture. Za razdvajanje sintetisanih fragmenata gena za leptin procenat gelova je podešavan u odnosu na očekivanu dužinu. Kontrola uspešnosti PCR reakcije za genetičku varijantu vršena je 60 min na 1,8 % (w/v) agaroznim mini gelovima ili 90 min na 1,8% (w/v) midi gelovima sa 0,5 µg/ml EtBr u Tris-acetatnom puferu. Primenjeno električno polje je bilo 7,5 V/cm. Nakon digestije genetička varijanta G-2548A u genu za *LEP* određivana je elektroforezom na 8% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu u Tris-boratnom puferu. Primenjeno je isto električno polje 7,5 V/cm u trajanju od 2 h. Gelovi su potapani u 10% etanolu u trajanju od 10 min, a zatim u 1% rastvor azotne kiseline u trajanju od 3 min. Gelovi su ispirani destilovanom vodom i potapani u rastvor 12 mmol/l srebro nitrata u trajanju od 15-30 min. Nakon dvostrukog ispiranja destilovanom vodom gelovi su potapani u rastvor 0,28 mol/l natrijum karbonata sa 0,018% formaldehida i ostavljani da stoje do pojave traka, kada je reakcija prekidana dodavanjem 10% sirćetne kiseline. Nakon ispiranja destilovanom vodom gelovi su ostavljani u destilovanoj vodi.

Za pravljenje 15ml 8% poliakrilamidnog gela korišćeno je: 3ml 40% akrilamida, 1,5ml 10xTBE (Tris-boradni pufer), 120 µl amonijum persulfata, 10 µl TEMED (tetrametiletilendiamin) i 10,5ml ddH<sub>2</sub>O.

Dužine sintetisanih fragmenata za genetičku varijantu G-2548A gena za *LEP* bile su za alel G 181bp i 61bp, a za alel A 242bp (**Slika 1**).



**Slika 1. Prikaz poliakrilamidnog gela bojenog srebrom u genotipizaciji varijante G-2548A u genu *LEP*. M-DNK marker 50bp**

### 3.2.10. Statistička analiza rezultata

Vrednosti kontinualnih varijabli su izražene kao aritmetička srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Za poređenje srednjih vrednosti kontinualnih varijabli između grupe gojaznih i grupe kontrolnih ispitanika, kada vrednosti varijabli imaju normalnu raspodelu, korišćen je Studentov *t*-test. Varijable koje su ispitivane *t*-testom su: LDL, odnos LDL/HDL, ApoB, TAS, CAT, obim struka i telesna masa. Za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli između grupe gojaznih i grupe kontrolnih ispitanika, kada vrednosti nisu u normalnoj raspodeli, korišćen je Mann-Whitney U test, i to za sledeće varijable: FPG, 2h PG, FPI, 2h PI, HOMA-IR, 2h HOMA-IR, TC, TG, HDL, SMK, leptin, NO, CRP, ApoAI, Lp(a), SOD, GPx, GR, 4-HNE, BMI, HbA<sub>1c</sub>, SBP i DBP. Frekvencije genotipova i alela ispitivane varijante G-2548A u genu za *LEP* određene su metodom prebrojavanja. Za ispitivanje slaganja distribucija dobijenih frekvencija genotipova u kontrolnoj grupi i grupi gojaznih ispitanika u odnosu na očekivane vrednosti po Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži, kao i za ispitivanje razlika u frekvencijama genotipova i alela između kontrolnih i gojaznih ispitanika, primenjen je  $\chi^2$ -test. Ukupna varijabilnost kontinualnih varijabli kojoj doprinose genotipovi ispitivane varijante, kada su kontinualne varijable u normalnoj raspodeli, ispitana je jednosmernom analizom varijanse (ANOVA). Nakon primene ANOVA testa, razlike

između srednjih vrednosti poređene su LSD Post Hoc testom. Za testiranje razlika vrednosti kontinualnih varijabli po genotipovima, kada varijable nisu u normalnoj raspodeli, korišćen je Kruskal-Wallis ANOVA test. Za ispitivanje asocijacije svih varijabli sa genotipovima ciljne genetičke varijante korišćen je kodomominantni model u kome su sva tri genotipa (GG, GA i AA) ravnopravna. Svi parametri su dodatno analizirani po modelu dominantnog efekta ređeg alela A, koji se ispoljava u prisustvu ili samo jednog alela A ili oba alela A u genotipu. Analizirani su genotip GA i genotip AA u odnosu na GG kao referentni genotip (GA+AA vs. GG). Za LDL je korišćen i treći model - model recesivnog efekta ređeg alela A, koji se ispoljava samo u prisustvu oba alela, stoga je analiziran genotip AA u odnosu na genotip GG i genotip GA (AA vs. GG+GA). U svim testovima vrednosti verovatnoće  $p < 0.05$  smatrane su statistički značajnim. Statistička analiza je urađena primenom kompjuterskih programa Microsoft Excel 7.0 i Statistica ver.8.0 (StatSoftInc, SAD, 2007).



## 4. REZULTATI

### 4.1. Demografski podaci kontrolne i gojazne grupe ispitanika

Kontrolnu grupu ispitanika činilo je 36 normalno uhranjenih muškaraca i žena, a grupu gojaznih 31 gojazna osoba oba pola. Ispitanici iz kontrolne grupe imali su  $33,32 \pm 6,65$  godina, a gojazni ispitanici imali su  $39,26 \pm 11,45$  godina. Odnos polova se nije statistički značajno razlikovao između ove dve grupe ispitanika.

### 4.2. Antropometrijske karakteristike kontrolnih i gojaznih ispitanika

Prva merenja u okviru ove doktorske disertacije bila su merenja nekih od antropometrijskih karakteristika kao što su: telesna masa (BW), obim struka (WC) i indeks telesne mase (BMI) koji opisuju uhranjenost ispitanika.

**Tabela 1. Antropometrijski parametri kontrolnih i gojaznih ispitanika.**

Antropometrijski parametri	Grupe		<i>p</i> -vrednost	
	Kontrolni ispitanici (n=36)	Gojazni ispitanici (n=31)	<i>t</i> -test	Mann-Whitney U test
<b>BW [kg]</b>	71.15±12.35	124.33±28.38	<0,001***	
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	22.63±1.94	41.51±9.22		<0,001***
<b>WC [cm]</b>	83.58±9.14	126.58±19.07	<0,001***	

Broj učesnika (n) u studijskim grupama prikazan je u zagradi. Sve prikazane vrednosti su prikazane kao srednja aritmetička vrednost  $\pm$  SD; BW: telesna masa; BMI: indeks telesne mase; WC: obim struka

Analizom značajnosti razlike u vrednostima antropometrijskih parametara između kontrolnih i gojaznih ispitanika utvrđene su statistički značajno ( $p < 0,001$ ) (**Tabela 1.**) više vrednosti BW, WC i BMI kod gojaznih ispitanika.

Vrednosti telesne mase kod kontrolnih ispitanika bile su između 58,8 kg i 83,5 kg, dok su vrednosti telesne mase kod gojaznih ispitanika bile između 95,95 kg i 152,71 kg. Izračunate vrednosti indeksa telesne mase (BMI) kod kontrolnih ispitanika bile su u opsegu 20,69 kg/m<sup>2</sup> i 24,57 kg/m<sup>2</sup>, dok su vrednosti indeksa telesne mase kod gojaznih ispitanika bile u opsegu 32,29 kg/m<sup>2</sup> i 50,73 kg/m<sup>2</sup>. Izmerene vrednosti obima struka kod kontrolnih ispitanika bile su između 74,44 cm i 92,72 cm, dok su vrednosti obima struka kod gojaznih ispitanika bile između 107,51 cm i 145,65 cm.

### **4.3. Određivanje faktora rizika razvoja komplikacija gojaznosti kontrolnih i gojaznih ispitanika**

Gojaznost je oboljenje samo po sebi, ali je i jedan od faktora rizika za ostale bolesti kao što su dijabetes mellitus i kardiovaskularne bolesti.

U daljem radu određivali smo neke od faktora rizika kao što su krvni pritisak, metabolizam glukoze, lipidni status, nivo leptina, nivo markera inflamacije u ispitivanoj populaciji gojaznih i kontrolnih ispitanika.

#### **4.3.1. Krvni pritisak kontrolnih i gojaznih ispitanika**

U **Tabeli 2.** date su vrednosti dobijene merenjem sistolnog (SBP) i dijastolnog (DBP) krvnog pritiska kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.

**Tabela 2. Vrednosti sistolnog (SBP) i dijastolnog (DBP) krvnog pritiska u grupi gojaznih i kontrolnih ispitanika.**

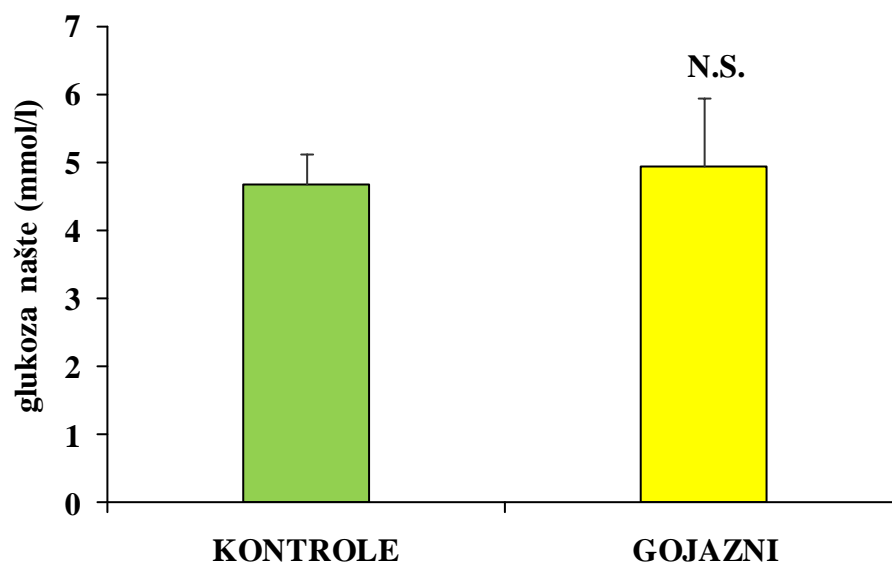
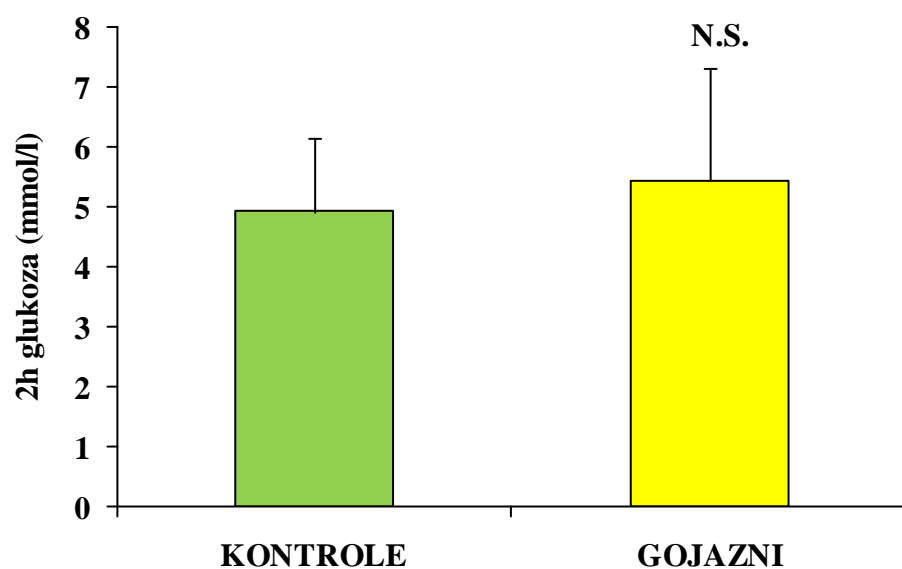
<b>Krvni pritisak</b>	<b>Kontrolni ispitanici</b>	<b>Gojazni ispitanici</b>	<b><i>p</i>-vrednost Mann-Whitney U test</b>
<b>SBP [mmHg]</b>	114.17±9.06	128.39±20.91	<0,001 <sup>***</sup>
<b>DBP[mmHg]</b>	78.19±4.65	84.52±9.25	<0,01 <sup>**</sup>

Vrednosti su prikazane u mmHg kao srednja aritmetička vrednost ± SD.

Kako je prikazano u **Tabeli 2.**, vrednosti SBP i DBP u grupi gojaznih ispitanika bile su statistički značajno veće u poređenju sa vrednostima u grupi kontrolnih ispitanika.

#### **4.3.2. Parametri metabolizma glukoze i koncentracije insulina kontrolnih i gojaznih ispitanika**

Jedna od posledica gojaznosti je i poremećaj metabolizma glukoze kao i narušena tolerancija na glukozu, stoga smo u daljem radu merili koncentraciju glukoze u krvi pre doručka i 2 sata nakon doručka kod obe grupe ispitanika.

**A.****B.**

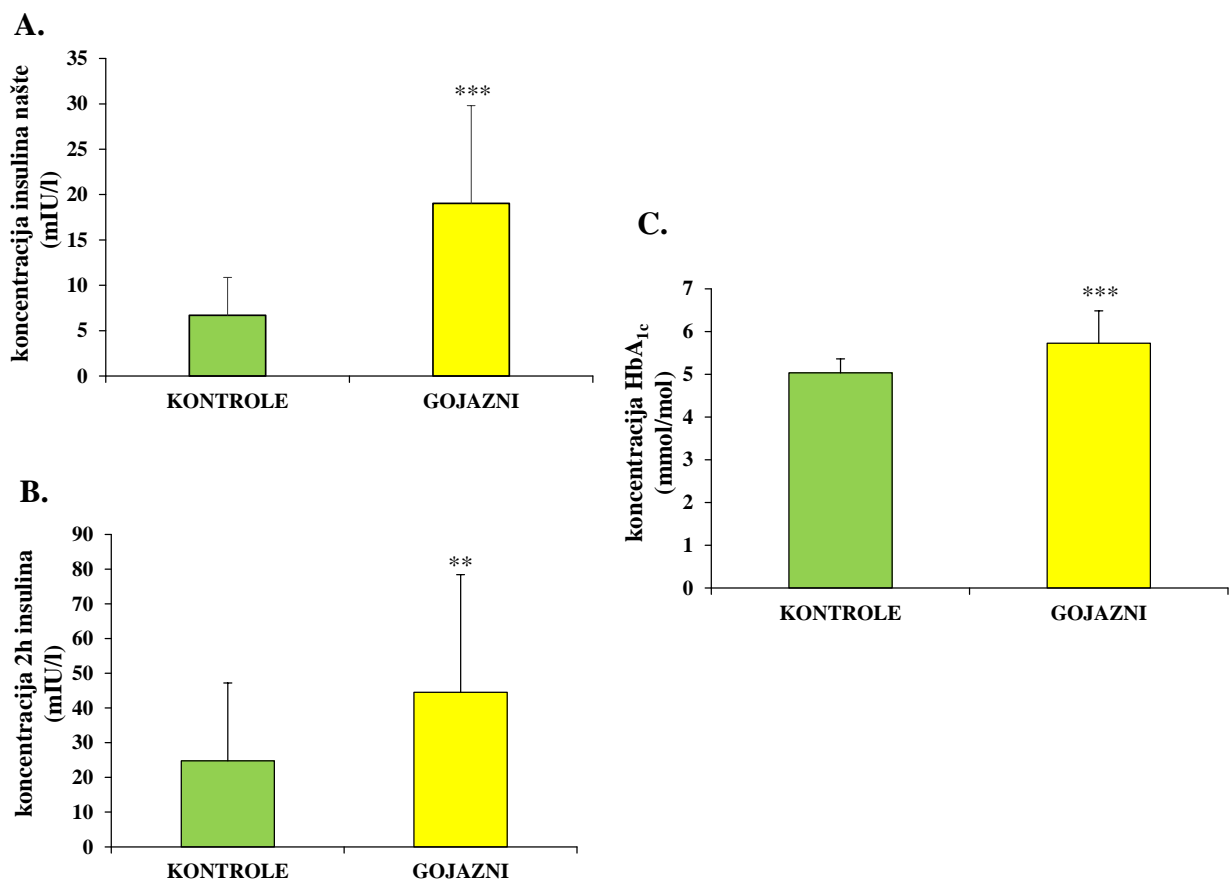
**Slika 1. Koncentracija glukoze u plazmi pre doručka (A) i 2h nakon doručka (B) kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (NS- nije statistički značajno).

Rezultati merenja koncentracije glukoze u krvi našte tj. pre doručka (**Slika 1A**) i koncentracije glukoze u krvi 2 sata nakon doručka (**Slika 1B**) kod kontrolnih i gojaznih ispitanika pokazuju da nije bilo statistički značajnih promena.

Sledeća merenja koja smo sprovedi su bila merenja koncentracije insulina u krvi pre doručka i 2 sata nakon doručka kod obe grupe ispitanika. Dobijene vrednosti prikazane su na **Slici 2**.

Nivo insulina našte u serumu bio je statistički značajno veći za 184% ( $p < 0,001$ ) (**Slika 2A**), dok je nivo insulina u serumu posle doručka bio za 80% veći ( $p < 0,01$ ) (**Slika 2B**) kod gojaznih ispitanika u odnosu na kontrolne.

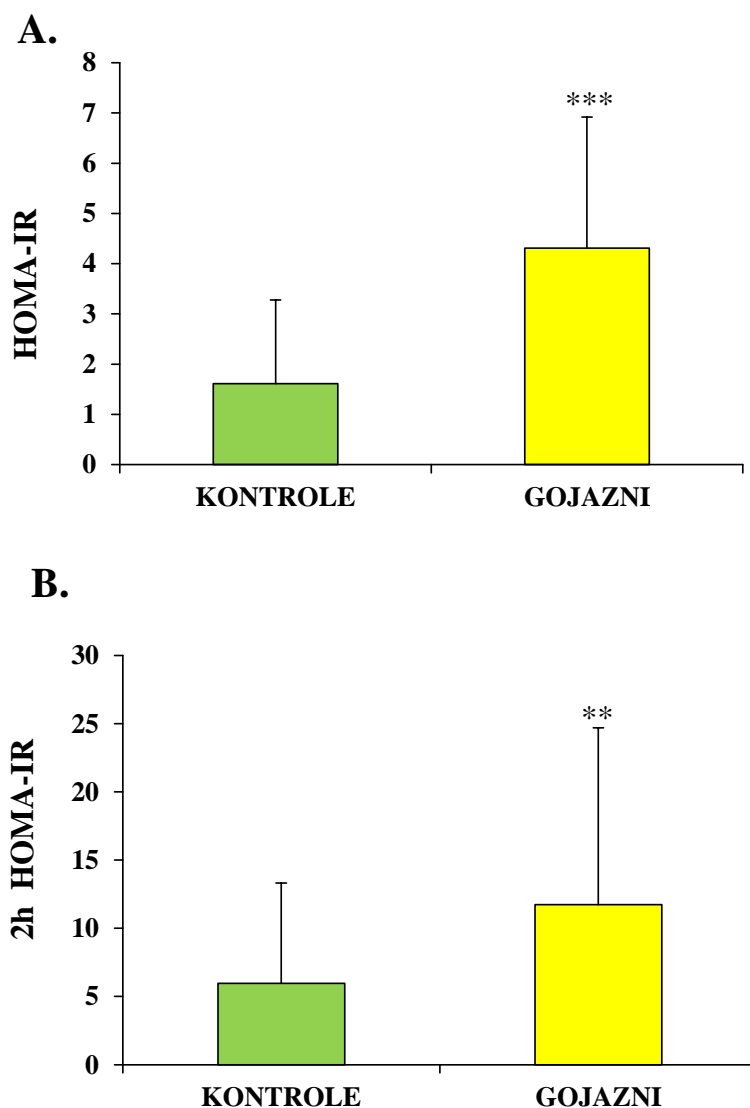
Na **Slici 2C** prikazani su rezultati dobijeni određivanjem glikozilovanog hemoglobina ( $HbA_{1c}$ ), koji predstavlja tromesečni prosek koncentracije glukoze, koliki je životni vek eritrocita. Dobijeni rezultati pokazuju statistički značajno povećanje nivoa  $HbA_{1c}$  ( $p < 0,001$ ) kod gojaznih ispitanika u poređenju sa kontrolnim.



**Slika 2. Koncentracija insulina u serumu pre doručka (A) i 2h nakon doručka (B) kao i koncentracija glikozilovanog hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>) (C) kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u mIU/l za insulin i u mmol/mol za HbA<sub>1c</sub> i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01).

Na osnovu dobijenih vrednosti za koncentracije glukoze i insulina izračunate su vrednosti indeksa rezistencije na insulin (HOMA-IR) primenom matematičkog modela, a dobijeni rezultati prikazani su na **Slici 3**.

Kod gojaznih ispitanika nivo HOMA-IR je statistički značajno ( $p<0,001$ ) povećan za 168% u odnosu na kontrolne ispitanike (**Slika 3A**), dok je kod gojaznih ispitanika nivo 2h HOMA-IR statistički značajno ( $p<0,01$ ) povećan za 97% u odnosu na kontrolne ispitanike (**Slika 3B**). Dobijeni rezultat pokazuje da gojazni ispitanici imaju statistički značajno veći indeks rezistencije na insulin kako pre, tako i 2 sata posle jela u odnosu na kontrolne ispitanike, a to znači da imaju veću rezistenciju na insulin u jetri.

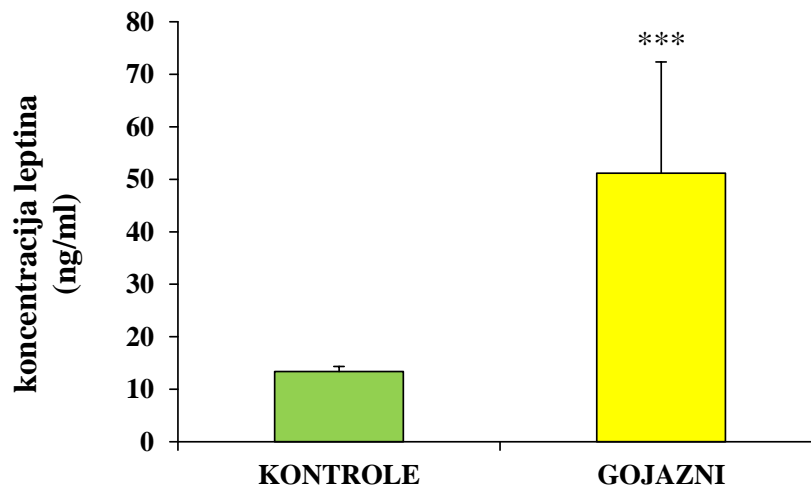


**Slika 3. Indeks rezistencije na insulin (HOMA-IR) pre doručka (A) i 2h nakon doručka (B) kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### **4.3.3. Koncentracija leptina u serumu kontrolnih i gojaznih ispitanika**

Rezultati određivanja koncentracije leptina u serumu gojaznih i kontrolnih ispitanika prikazani su na **Slici 4**. Kod gojaznih ispitanika vrednosti leptina u serumu su statistički značajno ( $p < 0,001$ ) povećane za 283% u odnosu na kontrolne ispitanike.

Prosečna vrednost leptina u krvi je bila 13,36 ng/ml kod kontrolnih ispitanika, odnosno, 51,14 ng/ml kod gojaznih.



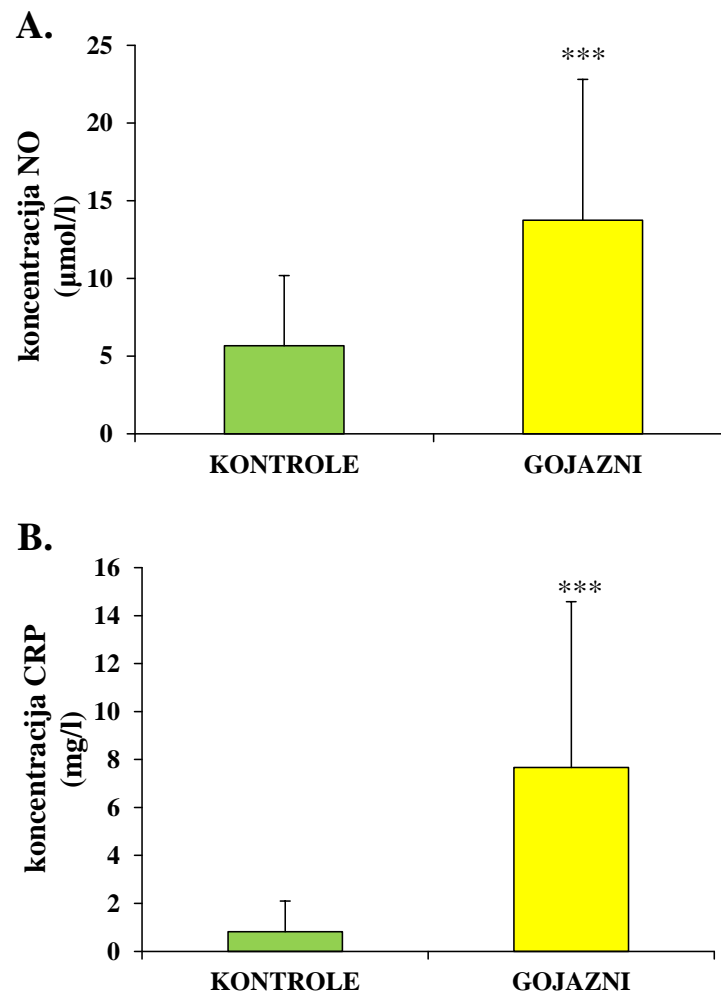
**Slika 4. Koncentracije leptina u serumu kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u ng/ml i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\*p<0,001).

#### 4.3.4. Određivanje koncentracije markera inflamacije - NO i CRP kod kontrolnih i gojaznih i ispitanika

Stanje gojaznosti je ujedno i inflamatorno stanje, stoga su u daljem radu u krvi gojaznih ispitanika, kao i kontrola merene koncentracije nekih od markera inflamacije kao što su (NO i CRP).

Rezultati prikazani na **Slici 5A.** pokazuju da je koncentracija NO u plazmi gojaznih ispitanika statistički značajno povećana za 142% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na nivo NO u plazmi kontrolnih ispitanika. Takođe, nivo izmerenog CRP u serumu gojaznih ispitanika je statistički značajno povećan za 835% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na serum kontrolnih ispitanika (**Slika 5B**).



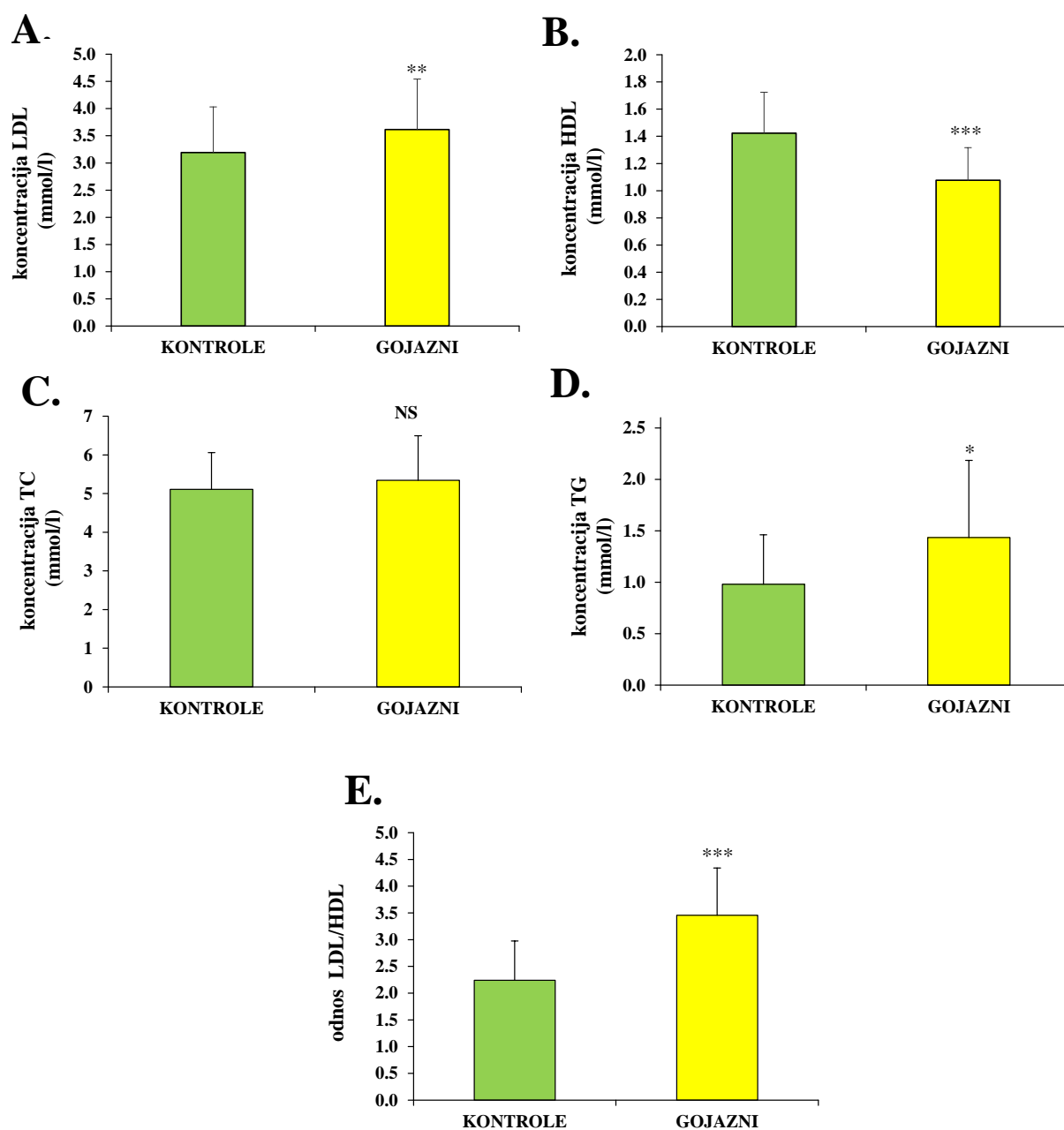


**Slika 5. Koncentracija NO (A) u plazmi i CRP (B) u serumu kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u µmol/l (NO) i mg/l (CRP) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\*p<0,001).

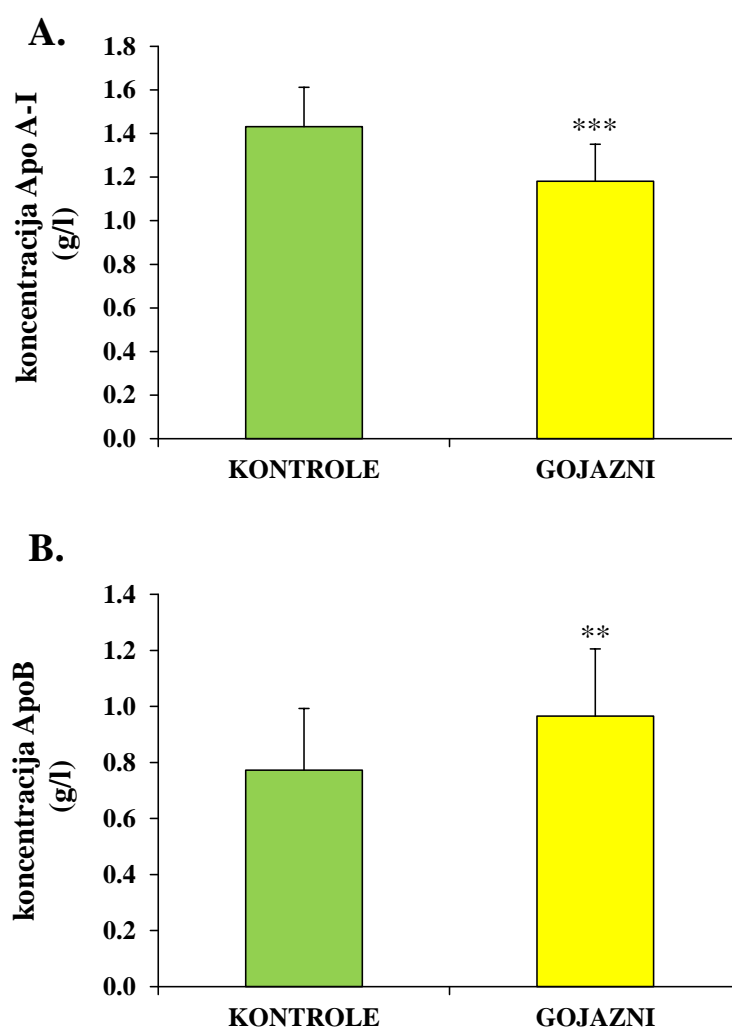
#### **4.4. Parametri metabolizma lipida i lipoproteina kontrolnih i gojaznih ispitanika**

S obzirom da stanje gojaznosti utiče i na promene metabolizma lipida i lipoproteina u daljem radu smo određivali koncentracije LDL, HDL, TC, TG, a takođe i izračunavali odnos LDL/HDL, kao i koncentracije Apo-AI, ApoB, Lp(a) i SMK. Dobijene vrednosti ispitivanih parametara lipidnog profila prikazani su na **Slikama 6-8**.

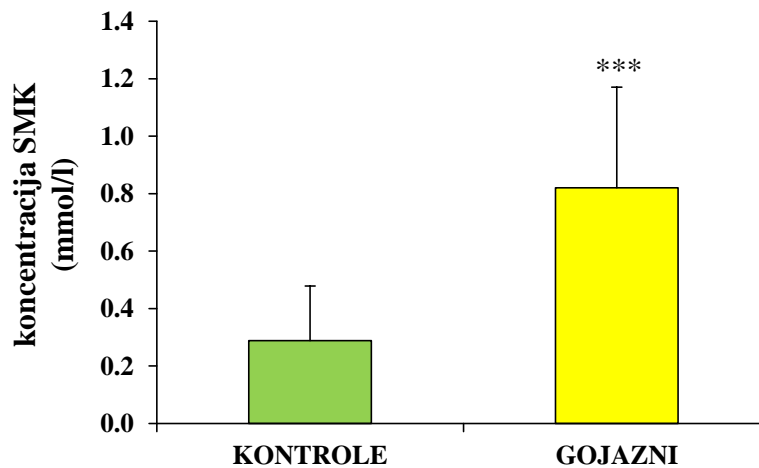
Analizom parametara lipidnog profila u grupi gojaznih ispitanika nađene su statistički značajno više vrednosti za sledeće parametre: LDL (**Slika 6A**), TG (**Slika 6D**), odnos LDL/HDL (**Slika 6E**), ApoB (**Slika 7B**) i SMK (**Slika 8.**). Razlika se ogledala u statistički značajno višim vrednostima navedenih parametara kod gojaznih ispitanika, izuzev koncentracije HDL (**Slika 6B**) i Apo-AI (**Slika 7A**) koje su kod gojaznih ispitanika bile statistički značajno niže u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Nije uočena statistički značajna razlika u vrednostima TC ( $5,06 \pm 0,95$  mmol/l;  $5,34 \pm 1,15$  mmol/l) (**Slika 6C**) i Lp(a) ( $0,20 \pm 0,15$  mmol/l;  $0,21 \pm 0,24$  mmol/l) između grupa kontrolnih i gojaznih ispitanika.



**Slika 6. Koncentracija LDL holesterola (A), HDL holesterola (B), ukupnog holesterola (TC), triglicerida (D) i odnos LDL/HDL (E) u krvi kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; NS – nije statistički značajno).



**Slika 7. Nivo ApoA-I (A) i ApoB (B) kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u g/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\*\*) $p < 0,001$ ; \*\*) $p < 0,01$ ).



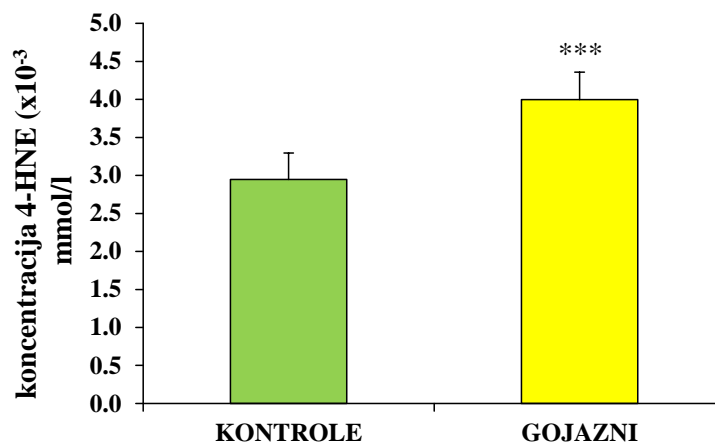
**Slika 8. Koncentracija SMK kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD ( \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.5. Ispitivanje parametra oksidativnog stresa i parametara antioksidativne zaštite u krvi kontrolnih i gojaznih ispitanika

Sledeća ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije bila su usmerena na određivanje 4-HNE jednog od parametara OxS, kao i na određivanje parametara AOS. Od parametara AOS analizirali smo aktivnost enzima: SOD, CAT, GR i GPx. Takođe je određivan ukupni antioksidativni status (TAS) kod gojaznih i kontrolnih ispitanika.

##### 4.5.1. Određivanje parametra OxS, markera lipidne peroksidacije - 4-HNE

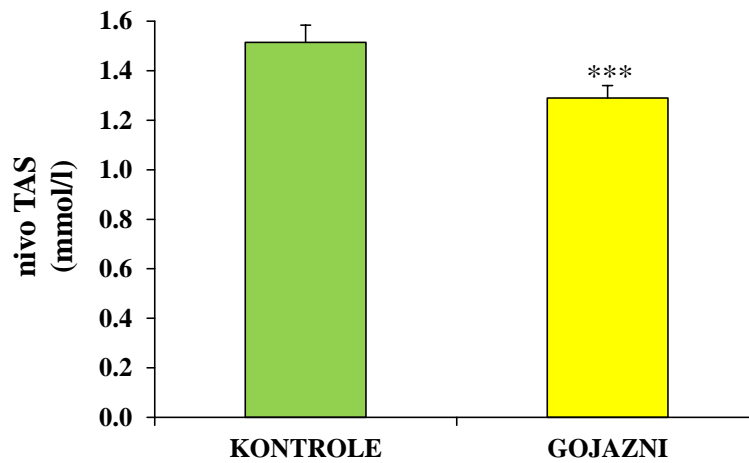
U serumu gojaznih i kontrolnih ispitanika meren je nivo 4-HNE kao parametra OxS tj. lipidne peroksidacije. Dobijeni rezultati (**Slika 9.**) pokazuju da je nivo 4-HNE kod gojaznih ispitanika bio statistički značajno viši za 36% ( $p < 0,001$ ) u odnosu na nivo 4-HNE merenog kod kontrolnih ispitanika.



**Slika 9. Nivo koncentracije 4-HNE u serumu kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u 10<sup>-3</sup>mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\*\*)p<0,001).

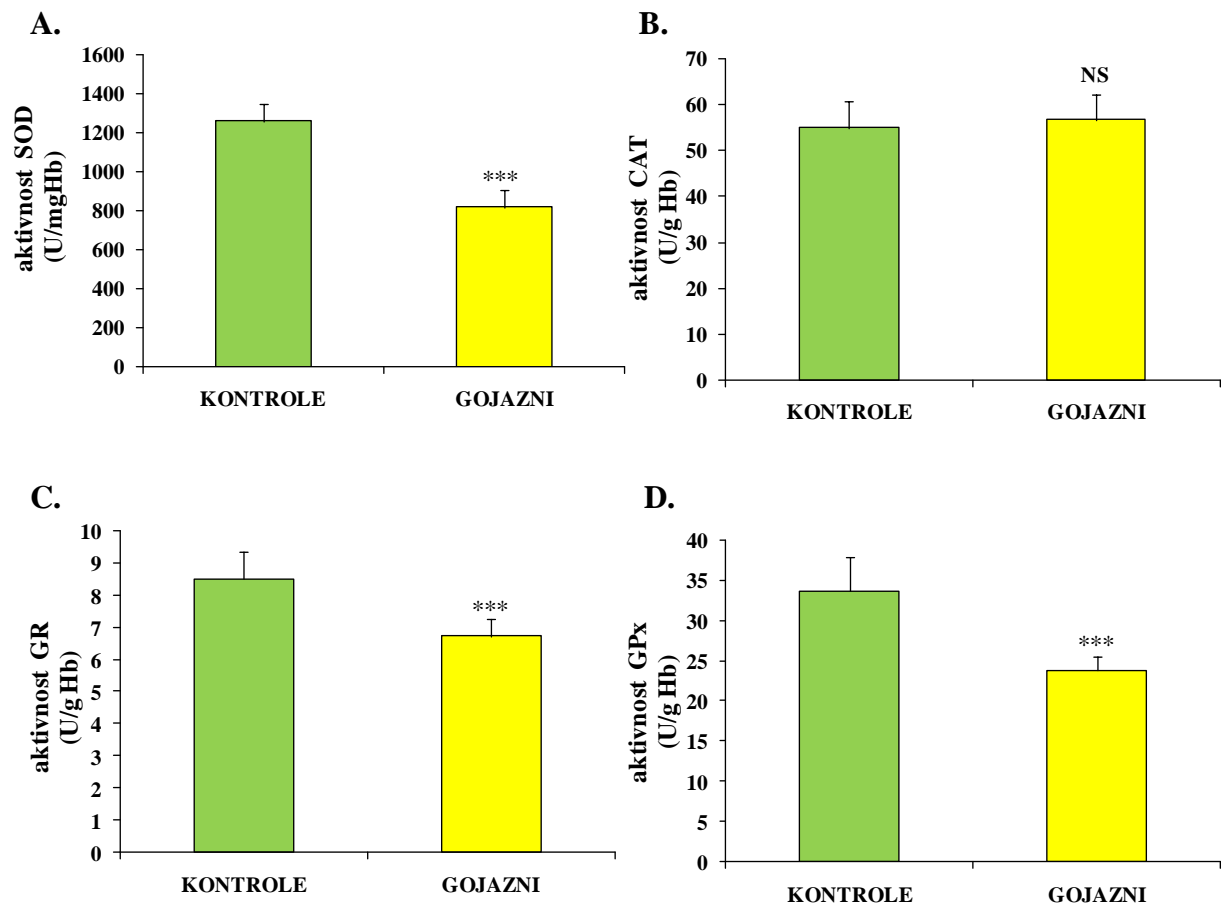
#### 4.5.2. Određivanje parametara AOS gojaznih i kontrolnih ispitanika

Prvi parametar AOS koji smo određivali bio je ukupni antioksidativni status (TAS). Iz prikazanih rezultata na **Slici 10.** uočava se da je nivo TAS kod gojaznih ispitanika statistički značajno smanjen (p<0,001) u poređenju sa vrednostima za TAS kod kontrolnih ispitanika.



**Slika 10. Nivo TAS u krvi kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

Dalja merenja u ovoj doktorskoj disertaciji su obuhvatala određivanje aktivnosti enzima AOS: SOD, CAT, GR i GPx. Rezultati merenja aktivnosti pomenutih enzima prikazani su na **Slici 11**. Dobijeni rezultati pokazuju da su u krvi gojaznih ispitanika aktivnosti enzima SOD (**Slika 11A**), GR (**Slika 11C**) i GPx (**Slika 11D**) statistički značajno smanjene u odnosu na kontrolne ispitanike. Procenti smanjenja kod gojaznih ispitanika za aktivnost enzima SOD je iznosio 35% ( $p < 0,001$ ), za GR 21% ( $p < 0,001$ ) a za GPx 29% ( $p < 0,001$ ). Nije uočena statistički značajna promena za aktivnost CAT između dve ispitivane grupe (**Slika 10B**).



**Slika 11.** Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) (A), katalaze (CAT) (B), glutation reduktaze (GR) (C) i glutation peroksidaze (GPx) (D) u krvi kontrolnih i gojaznih ispitanika. Rezultati su izraženi u U/mgHb (SOD), U/gHb (CAT), mU/ml (GR) i U/gHb (GPx) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*\*\*) $p < 0,001$ ; N.S.- nije statistički značajno).

#### **4.6. Asocijacija antropometrijskih parametara, faktora rizika, parametara metabolizma glukoze, lipida i lipoproteina, kao i parametara OxS i AOS sa genetičkom varijantom G-2548A u genu za leptin**

Pre nego što smo pristupili analizi asocijacije antropometrijskih parametara, faktora rizika, parametara metabolizma glukoze, lipida i lipoproteina, kao i parametara



OxS i AOS sa genetičkom varijantom G- 2548A u genu za leptin, uradili smo analizu genetičke varijante G-2548A u genu za leptin.

#### 4.6.1. Genetička varijanta u genu za leptin

U **Tabeli 3.** predstavljene su relativne frekvencije alela i genotipova varijante G-2548A u genu za leptin u grupi kontrolnih i gojaznih ispitanika. Rezultati pokazuju da u distribuciji ispitivanih alela i genotipova između gojaznih i kontrolnih ispitanika nema statistički značajnih razlika.

**Tabela 3. Relativne frekvencije alela i genotipova varijante G-2548A u genu za leptin u kontrolnoj grupi i grupi gojaznih ispitanika**

Genotip	Gojazni ispitanici		Kontrolni ispitanici		p
	Broj	%	Broj	%	
<b>Svi ispitanici</b>	Broj	%	Broj	%	$\chi^2$
<b>alel G</b>	0,60	/	0,53	/	0,47
<b>alel A</b>	0,40	/	0,47	/	NS
<b>genotip GG</b>	10	32,26	8	25,81	0,73
<b>genotip GA</b>	17	54,84	17	54,84	NS
<b>genotip AA</b>	4	12,90	6	19,35	
<b>Ukupno (n)</b>	31	100	31	100	

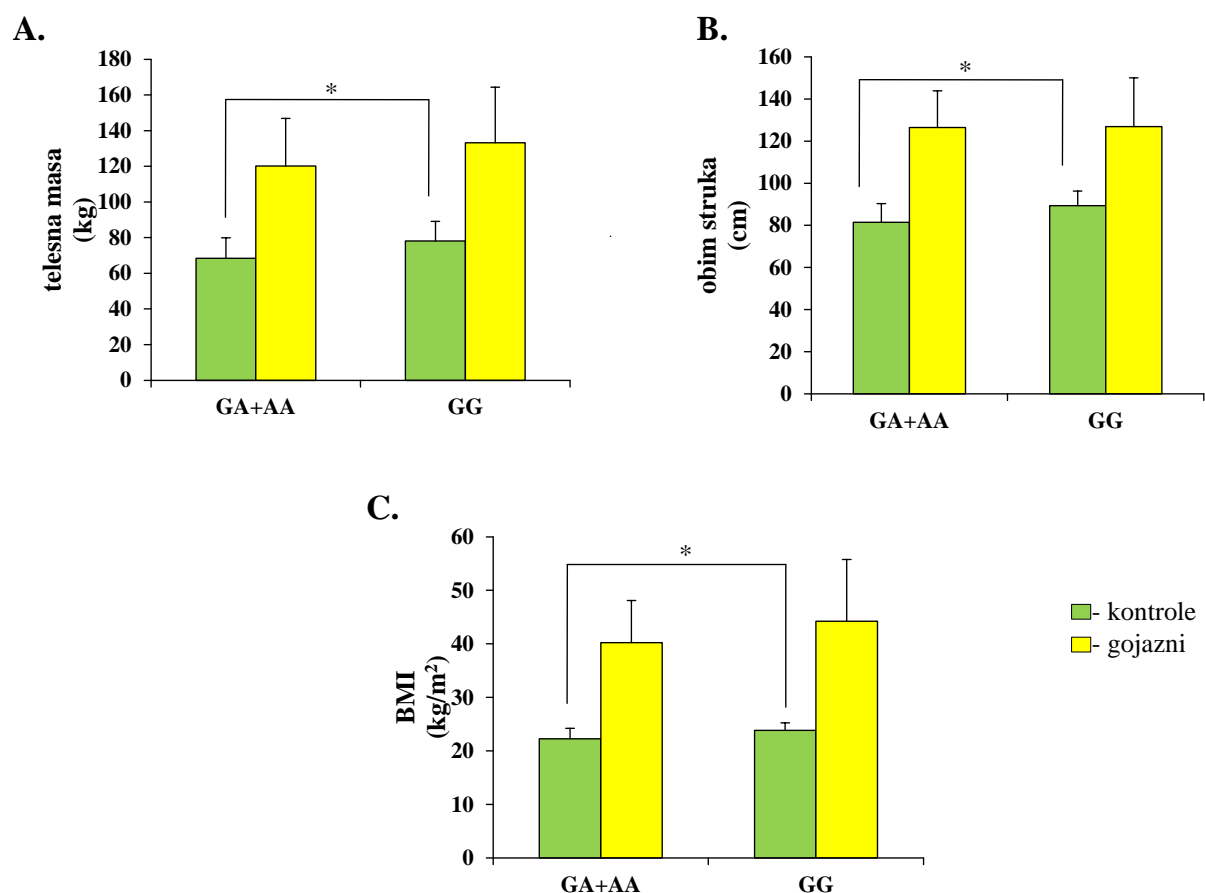
Za utvrđivanje asocijacije antropometrijskih i metaboličkih parametara, kao i parametara OxS i AOS sa genotipovima genetičke varijante *LEP* G-2548A korišćen je kodomominantni model u kome su sva tri genotipa (GG, GA, AA) ravnopravna. Pored toga, za izučavanje asocijacije ispitivanih parametara sa genotipovima date genetičke varijante korišćen je model dominantnog efekta ređeg alela u ovom slučaju alela A, s obzirom da se ovaj efekat ispoljava u prisustvu ili samo jednog alela A ili oba alela A u genotipu. Tačnije, posmatrali smo genotipove GA+AA vs. GG pri čemu je GG bio referentni genotip. Za ispitivanje asocijacije LDL sa genotipovima pomenute genetičke varijante je korišćen treći model - model recesivnog efekta ređeg alela (A). Recesivni

efekat se ispoljava samo u prisustvu oba alela u ovom slučaju AA, pa je tako posmatran genotip AA vs. genotipovi GG+GA.

#### **4.6.2. Asocijacija antropometrijskih parametara sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin**

U daljoj statističkoj analizi ispitivali smo postojanje asocijacije antropometrijskih parametara (telesna masa, obim struka, BMI) sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika. Koristeći kodominantni model utvrdili smo da nema asocijacije antropometrijskih parametara (telesna masa, obim struka, BMI) sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.

Dominantni model je pokazao postojanje značajnih asocijacija antropometrijskih parametara (telesna masa, obim struka i indeks telesne mase) sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih ispitanika (**Slika 12**). Kod kontrolnih ispitanika nosilaca heterozigota GA i kontrolnih ispitanika nosilaca homozigota AA pokazana je statistički značajno manja telesna masa (**Slika 12A**), obim struka (**Slika 12B**) i indeks telesne mase (**Slika 12C**) u poređenju sa kontrolnim ispitanicima nosiocima homozigota GG po dominantnom modelu (**Slika 12**).



**Slika 12. Asocijacija telesne mase (A), obima struka (B) i BMI (C) sa genotipovima varijante *LEP* G-2548A kod kontrolnih i gojaznih ispitanika po dominantnom modelu. Rezultati su izraženi u kg (telesna masa), cm (obim struka) i u kg/m<sup>2</sup> (BMI) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\*p<0,05)**

#### **4.6.2.1. Asocijacija faktora rizika sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kontrolnih i gojaznih ispitanika**

Statističkom analizom smo prvo hteli da utvrdimo da li postoji asocijacija ispitivanih faktora rizika kao što su krvni pritisak, parametri metabolizma glukoze, parametri lipidnog profila, nivo leptina, nivo markera inflamacije sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika. Rezultati dobijeni primenom ANOVA i Kruskal-Wallis testa su pokazali da nije bilo smisla za dalju analizu asocijacije koncentracije leptina i vrednosti SBD i DBP sa genotipovima

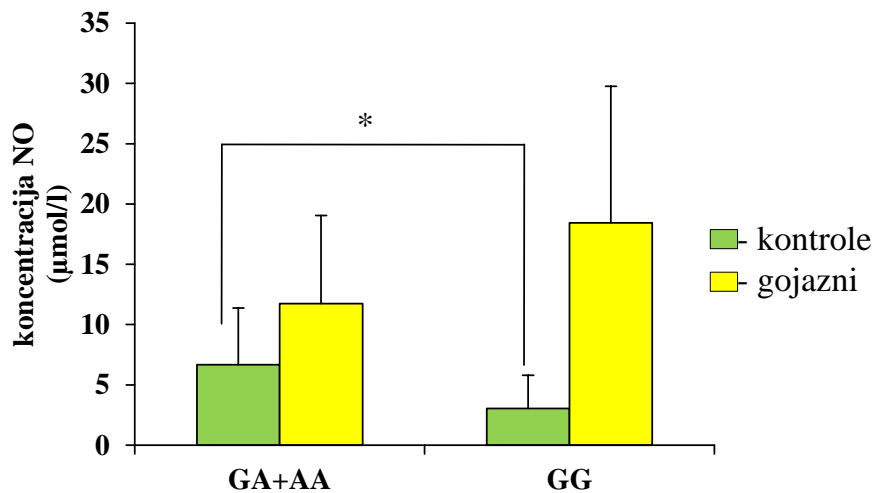
varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika pošto je  $p$  vrednost bila veća od 0,05.

#### **4.6.2.2. Asocijacija parametara metabolizma glukoze i koncentracije insulina sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin**

Sledeći korak u statističkoj analizi bilo je ispitivanje asocijacije parametara glukoznog metabolizma, koncentracije glukoze i insulina u krvi pre doručka, koncentracije glukoze i insulina u krvi 2 sata posle doručka, indeksa rezistencije na insulin pre doručka (HOMA-IR), indeksa rezistencije na insulin 2 sata posle doručka (2 h HOMA-IR) i koncentracije glikozilovanog hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>) sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika. Rezultati dobijeni primenom ANOVA i Kruskal-Wallis testa su pokazali da nije bilo smisla za dalju analizu asocijacije FPG, FPI, 2 h PG, 2 h PI, HOMA-IR, 2 h HOMA-IR i HbA<sub>1c</sub> sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika pošto je  $p$  vrednost bila veća od 0,05.

#### **4.6.2.3. Asocijacija markera inflamacije sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin**

U daljoj analizi ispitivali smo asocijaciju markera inflamacije NO i CRP sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin po kodominantnom i dominantnom modelu kod kontrolnih i gojaznih ispitanika. Na **Slici 13.** su prikazani rezultati analize po dominantnom modelu koji pokazuju da je koncentracija NO u plazmi kontrolnih ispitanika nosilaca heterozigota GA i kontrolnih ispitanika nosilaca homozigota AA bila statistički značajno veća za 54% u poređenju sa kontrolnim ispitanicima nosiocima homozigota GG. Rezultati dobijeni primenom ANOVA i Kruskal-Wallis testa su pokazali da nije bilo smisla za dalju analizu asocijacije CRP sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika pošto je  $p$  vrednost bila veća od 0,05.

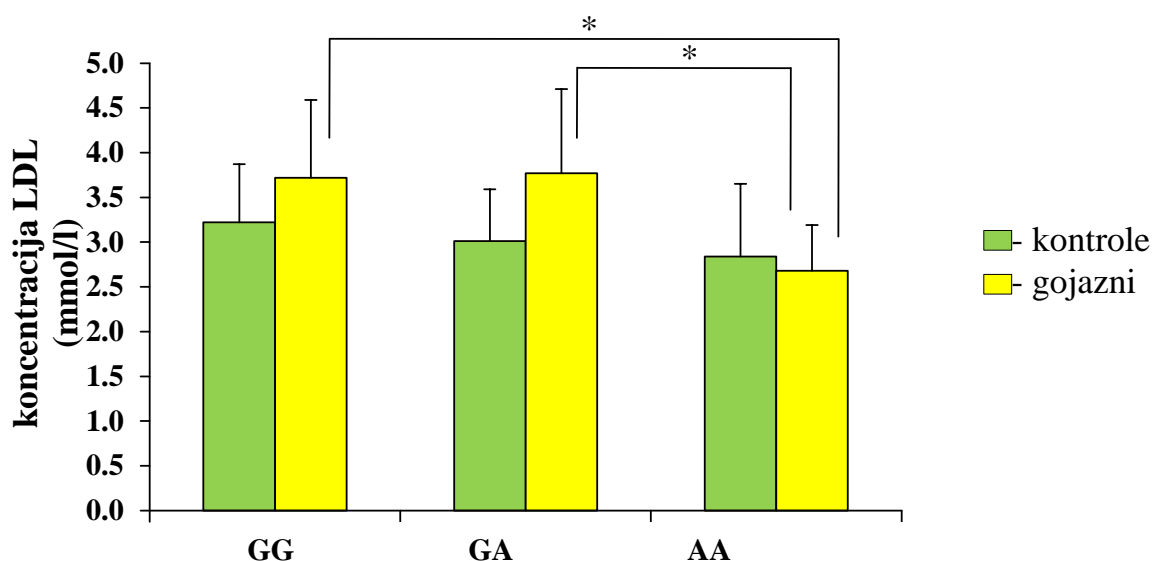


**Slika 13. Asocijacija koncentracije NO u plazmi sa genotipovima varijante *LEP* G-2548A po dominantnom modelu kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u µmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.6.2.4. Asocijacija parametara lipidnog metabolizma sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin

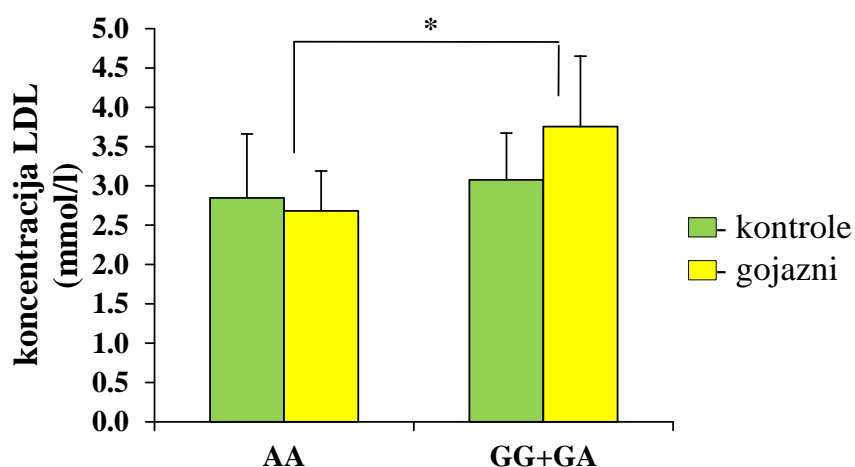
Naredna statistička analiza rezultata odnosila se na asocijaciju parametara metabolizma (LDL, HDL, odnos LDL/HDL, TC, TG i SMK) i lipoproteina (Apo-AI, ApoB, Lp(a)) sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.

Analiza po kodominantnom modelu pokazuje da gojazni ispitanici nosioci homozigota manje učestalog alela A genetičke varijante *LEP* G-2548A imaju statistički značajno manje vrednosti LDL za 28% u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima homozigota GG, odnosno, za 29% manje u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima heterozigota GA što je prikazano na **Slici 14**. Rezultati dobijeni primenom ANOVA i Kruskal-Wallis testa su pokazali da nije bilo smisla za dalju analizu asocijacije HDL, odnosa LDL/HDL, TC, TG, SMK, Apo-AI i Lp(a) sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika pošto je  $p$  vrednost bila veća od 0,05.



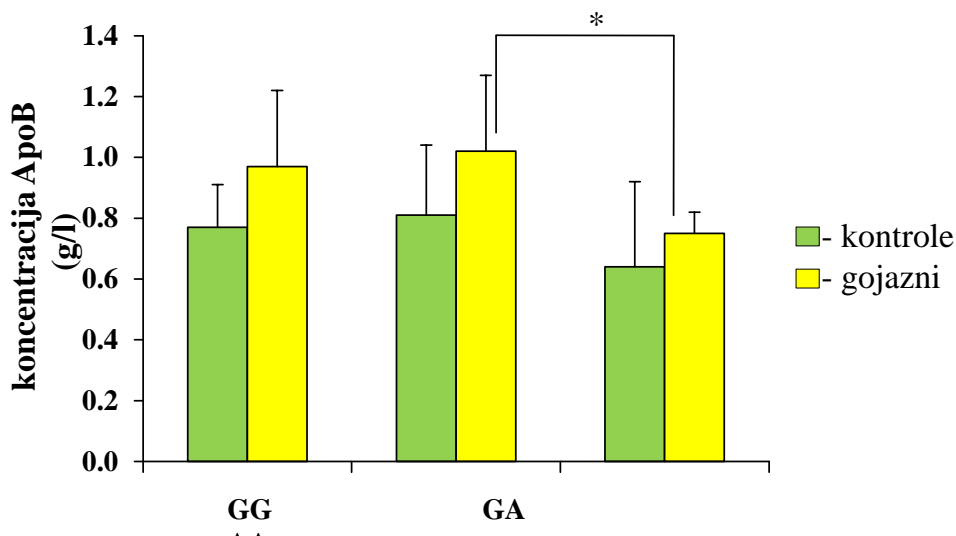
**Slika 14. Asocijacija koncentracije LDL sa genotipovima varijante *LEP* G-2548A po kodominantnom modelu kod kontrolnih i gojaznih ispitanika. Rezultati su izraženi u mmol/l (LDL) i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\* $p < 0,05$ )**

Analiza po recesivnom modelu pokazala je da je nivo LDL kod gojaznih ispitanika nosilaca homozigota AA statistički značajno manji za 28% ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima homozigota GG i gojaznim ispitanicima nosiocima heterozigota GA (Slika 15).



**Slika 15. Asocijacija koncentracije LDL holesterola sa genotipovima varijante *LEP* G-2548A po recesivnom modelu kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u mmol/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost +/- SD (\* $p < 0,05$ ).

Statistička analiza po kodominantnom modelu je pokazala da gojazni ispitanici nosioci homozigota AA genetičke varijante *LEP* G-2548A imaju statistički značajno manje vrednosti ApoB za 26% u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima heterozigota GA (Slika 16).



**Slika 16. Asocijacija koncentracije ApoB sa genotipovima varijante *LEP* G-2548A po kodominantnom modelu kod kontrolnih i gojaznih ispitanika.** Rezultati su izraženi u g/l i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost + SD (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.6.2.5. Asocijacija parametra OxS sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin

Rezultati dobijeni primenom ANOVA i Kruskal-Wallis testa su pokazali da nije bilo smisla za dalju analizu asocijacije 4-HNE sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika pošto je  $p$  vrednost bila veća od 0,05.

#### **4.6.2.6. Asocijacija parametara AOS sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin**

Rezultati dobijeni primenom ANOVA i Kruskal-Wallis testa su pokazali da nije bilo smisla za dalju analizu asocijacije SOD, CAT, GR, GPx i TAS sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin kod kontrolnih i gojaznih ispitanika pošto je  $p$  vrednost bila veća od 0,05.



## 5. DISKUSIJA

Gojaznost poprima razmere epidemije i jedna je od najčešćih hroničnih, nezaraznih bolesti, kako u svetu, tako i kod nas. U Srbiji je jedan od važnijih zdravstvenih problema sa učestalošću do 54%, a u Vojvodini čak do 58% (Grujic i sar., 2010). Povećanje telesne mase rezultuje brojnim metaboličkim poremećajima kao što su IR, aterogena dislipidemija, ali i nastankom kardiovaskularnih bolesti kao što su: bolesti koronarnih i cerebralnih krvnih sudova, moždani udar, infarkt miokarda, hipertenzija, a koje su vodeći uzrok smrti u svetu (NIH 1998; Must i sar., 1999; Stokic i sar., 2015). Poznato je da masno tkivo služi kao skladište energije, ali i da su sekretorni produkti ovog tkiva uključeni u kompleksnu patogenezu metaboličkih poremećaja povezanih sa gojaznošću. Adipozno tkivo stvara veliki broj različitih bioaktivnih peptida poznatih kao adipocitokini, u koje spada i leptin (Stokic i sar., 2015).

Poznato je iz literature da u u stanju gojaznosti, kao i mnogim drugim patofiziološkim stanjima, dolazi do povećanja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i azota. OxS nastaje u ćelijskim sistemima u uslovima narušene ravnoteže između stepena produkcije i otklanjanja visokoreaktivnih molekula, odnosno kada produkcija ROS prevazilazi antioksidativne kapacitete datih sistema (Halliwell i Whiteman 2004). Sve je više dokaza o povećanom OxS u masnom tkivu kod gojaznih osoba što čini osnovu za poremećaj sekrecije adipokina i razvoj MetS (Furukawa i sar., 2004).

Današnja izučavanja gena za leptin (*LEP*) su usmerena na traženje genetičkih varijanti, potencijalno povezanih sa patofiziologijom gojaznosti, dijabetesom, kao i komplikacijama udruženim sa ovim patološkim stanjima.

S obzirom na činjenicu da je koncentracija leptina značajno povećana kod gojaznih osoba i da je povećanje proporcionalno telesnoj masi (Considine i sar., 1996; Mantzoros 1999), aktuelno je izučavanje asocijacije genetičke varijante u genu za leptin sa antropometrijskim i metaboličkim parametrima (Hoffstedt i sar., 2002). Iako

genetičke varijante leptina mogu biti važne u patofiziologiji humane gojaznosti i njenih komplikacija (Paracchini i sar., 2005; Portoles i sar., 2006; Stokic i sar., 2014) asocijacija genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa antropometrijskim i metaboličkim parametrima u stanjima gojaznosti nije u potpunosti objašnjena.

U okviru ove doktorske disertacije sprovedena su istraživanja sa ciljem analize promena antropometrijskih i metaboličkih parametara, kao i aktivnosti enzima AOS kod gojaznih i kontrolnih ispitanika. Takođe, sprovedena su istraživanja u pravcu genotipizacije varijante G-2548A u genu za leptin, kao i poređenja utvrđenih frekvencija genotipova i alela ispitivane genetičke varijante kod obe grupe ispitanika. Utvrđivanje postojanja asocijacije genetičke varijante u genu za leptin sa promenama u analiziranim antropometrijskim i metaboličkim parametrima, kao i aktivnosti enzima AOS su takođe sprovedena.

## **5.1. Antropometrijski parametri gojaznih ispitanika**

Analiza antropometrijskih parametara pokazala je da postoji značajna razlika za telesna masu, indeks telesne mase, obim struka između gojaznih i kontrolnih ispitanika, odnosno, da su svi ispitivani parametri značajno povećani kod gojaznih u odnosu na kontrolne ispitanike. Dobijeni rezultati su očekivani i u skladu su sa rezultatima drugih studija (Hinuy i sar., 2008; Constantin i sar., 2010), koje su takođe pokazale povećanje pomenutih antropometrijskih parametara u gojaznosti.

Prvi parametar koji smo određivali u našem radu bio je izračunavanje BMI. S obzirom da je za izračunavanje BMI potrebno imati izmerene vrednosti telesne mase i telesne visine prvo smo vršili merenje ova dva pomenuta parametra u obe grupe ispitanika. Prosečna vrednost BMI u grupi gojaznih ispitanika iznosila je  $41,51 \pm 9,22$  kg/m<sup>2</sup>, a u grupi kontrolnih ispitanika prosečna vrednost BMI bila je  $22,63 \pm 1,94$  kg/m<sup>2</sup>. Imajući u vidu da je preporuka SZO da se osobe koje imaju BMI veći od 40 kg/m<sup>2</sup> definišu kao ekstremno gojazne (WHO 2000) gojazni ispitanici u našem radu su okarakterisani kao ekstremno gojazni. I pored svoje dobre korelacije sa masnom masom kao i sa velikim brojem faktora rizika za razvoj niza komplikacija uzrokovanih gojaznošću, BMI pokazuje izvesne varijacije u odnosu na pol, starost, rasnu i etničku

pripadnost, kao i na fizičku aktivnost (Lev-Ran 2001; Prentice i Jebb 2001). Zbog toga je pored određivanja stepena gojaznosti (BMI) neophodno i poznavanje veličine intraabdominalnog masnog tkiva koje je odgovorno za pojavu metaboličkih komplikacija (Marin i sar., 1992; Stokic 2004). Sledeća merenja u našoj studiji su bila merenja obima struka kod gojaznih i kontrolnih ispitanika. Na osnovu izmerenih vrednosti obima struka koje su kod gojaznih ispitanika iznosile  $126,58 \pm 19,07$  cm, a kod kontrolnih ispitanika  $83,58 \pm 9,14$  cm može se zaključiti da gojazni ispitanici u našoj studiji imaju abdominalni tip gojaznosti i samim tim povećani rizik za razvoj metaboličkih komplikacija, s obzirom da osobe sa obimom struka preko 100 cm (muškarci) ili 80 cm (žene) imaju veći rizik za nastanak metaboličkih komplikacija (Janssen i sar., 2004; Stokic 2004).

## **5.2. Faktori rizika kardiovaskularnih oboljenja gojaznih ispitanika**

U daljem radu smo merili neke od faktora rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja, kao i neke od metaboličkih parametara, tačnije parametre metabolizma glukoze, lipida i lipoproteina, kao i koncentracije SMK i leptina. Izmerene vrednosti sistolnog (SBP) i dijastolnog (DBP) krvnog pritiska ukazale su na razliku u grupi gojaznih u poređenju sa vrednostima dobijenim za kontrolne ispitanike. Iako su razlike u dobijenim vrednostima SBP i DBP bile male, bile su statistički značajne. Povećanje SBP i DBP kod gojaznih ispitanika ukazuje na prisustvo faktora rizika za razvoj hipertenzije što je i dokumentovano kod gojaznih osoba (Sing i sar., 2003). Kod gojaznih osoba muškog i ženskog pola sa porastom BMI raste incidenca pojave hipertenzije što je delimično u skladu sa našim rezultatima koji takođe pokazuju da su gojazni ispitanici iz naše studije imali značajno povećane vrednosti BMI, kao i blago povišenje krvnog pritiska (Sing i sar., 2003).

Postojanje abdominalnog tipa gojaznosti naročito je povezano sa incidencom kardiovaskularnih bolesti (Clemente i sar., 2015; Gast i sar., 2015; Scheuer i sar., 2015).

U daljem toku studije merili smo nivo leptina u serumu obe ispitivane grupe. Naši rezultati pokazuju da je nivo leptina značajno povećan u grupi gojaznih ispitanika u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Naši rezultati su očekivani i u saglasnosti sa

rezultatima drugih autora koji su takođe pokazali povećan nivo leptina u stanju gojaznosti (Considine i sar., 1996; Mantzoros 1999). Literaturni podaci ukazuju na vezu koja postoji između veličine adipocita i ekspresije leptina (Pantanetti i sar., 2004).

Iako je nivo leptina povećan kod gojaznih osoba, većina gojaznih osoba razvija rezistenciju na leptin. Lokalna rezistencija na leptin povećava nivo leptina koji ne deluje na apetit u hipotalamusu (centralna rezistencija na leptin), ali i na adipocite belog masnog tkiva u kojima SOCS3 inhibira ekspresiju LEP-R. Leptin deluje na metabolizam adipocita i inhibira odgovor adipocita belog masnog tkiva na insulin. Postoji i selektivna rezistencija na leptin pri kojoj u stanju gojaznosti leptin ne reguliše apetit i telesnu masu, ali su očuvana njegova dejstva na simpatički nervni sistem (SNS) (Friedman 2011). Pored toga, pokazano je da pacijenti kod kojih je dijagnostifikovana esencijalna hipertenzija imaju povećan nivo leptina u plazmi (McMinn i sar., 2000). Davanje leptina intravenski dovodi do porasta krvnog pritiska usled porasta simpatičke aktivnosti u bubrežima, nadbubrežnoj žlezdi i mrkom masnom tkivu (McMinn i sar., 2000; Al-Shayji i sar., 2012).

### **5.3. Parametri metabolizma glukoze kod gojaznih ispitanika**

U cilju sagledavanja metaboličkog fenotipa gojaznih ispitanika i utvrđivanja razlika u metaboličkom profilu između gojaznih i kontrolnih ispitanika u daljem radu smo ispitivali parametre metabolizma glukoze, lipida i lipoproteina, kao i nivo SMK.

Tako je pokazano povećanje insulina pre prvog jutarnjeg obroka i 2 sata nakon njega, ali nisu uočene promene glikemije. Rezultati značajnog povećanja obe vrednosti koncentracije insulina u skladu su sa rezultatima drugih studija (Mammes i sar., 2000; Pantanetti i sar., 2004; Hinuy i sar., 2008; Ben Ali i sar., 2009; Constantin i sar., 2010). U stanju gojaznosti hiperinsulinemija nastaje kako zbog povećane sinteze insulina izazvane viškom SMK, tako i zbog smanjenog "klirensa" insulina uglavnom od strane jetre (Stears i sar., 2012; Castro i sar., 2014).

U našoj studiji nije uočeno statistički značajno povećanje koncentracije glukoze pre i posle doručka kod gojaznih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike, ali je zapaženo statistički značajno povećanje glikozilovanog hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>). Ovo

povećanje HbA<sub>1c</sub> bi moglo ukazati na trend ka hiperglikemiji kod gojaznih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike, ali metabolizam glukoze i tolerancija na glukozu nisu toliko narušeni da bi hiperglikemija dostigla prag statističke značajnosti. Na osnovu naših rezultata možemo zaključiti da je visok nivo HbA<sub>1c</sub> u direktnoj vezi sa povećanim rizikom za razvoj dijabetesa i njegovih pratećih komplikacija kod gojaznih ispitanika (Jeffcoate 2004). Takođe, naši rezultati su u skladu sa rezultatima (Koga i sar., 2007) koji pokazuju pozitivnu korelaciju HbA<sub>1c</sub> i vrednosti BMI kod gojaznih ispitanika. Povišena koncentracija HbA<sub>1c</sub> kod gojaznih ispitanika u našoj studiji sugerše da je koncentracija glukoze bila visoka u zadnjih 8-12 nedelja.

Hormon leptin čija je koncentracija značajno povećana u grupi gojaznih ispitanika je uključen u regulaciju metabolizma glukoze. Literaturni podaci pokazuju da leptin *in vitro* utiče na delovanje insulina u hepatocitima, adipocitima i miocitima (Shimamura i sar., 2003; Matsuzawa 2005). Eksperimentalni podaci pokazuju da injeciranje leptina pacovima rezultira u povećanom preuzimanju glukoze u srčanom i skeletnom mišiću, kao i u mrkom masnom tkivu, ali ne i belom masnom tkivu. Leptin u jetri smanjuje glikogenolizu i povećava sintezu glikogena (Shimamura i sar., 2003; Nogueiras i sar., 2008) delujući preko  $\beta$ -adrenergičkih receptora (Nogueiras i sar., 2008).

Pored određivanja koncentracije glukoze i insulina procenjivan je indeks rezistencije na insulin putem izračunavanja HOMA-IR korišćenjem dobijenih koncentracija glukoze i insulina u krvi pre i 2 h posle doručka. Gojazni ispitanici su imali očekivano značajno viši nivo HOMA indeksa u odnosu na kontrolne ispitanike. Osim toga naši rezultati govore da metabolički profil gojaznih ispitanika u našoj studiji karakteriše postojanje rezistencije na insulin u jetri, s obzirom da je HOMA indeks pokazatelj IR u jetri tj. hepatične rezistencije na insulin.

#### **5.4. Parametri metabolizma lipida, lipoproteina i nivo SMK gojaznih ispitanika**

Imajući u vidu epidemiološke podatke koji pokazuju da je poremećaj metabolizma lipida i lipoproteina prisutan kod skoro 30% gojaznih osoba (Stokic 2004;

Nguyen i sar., 2005) i da se najčešći poremećaji javljaju u obliku hiperholesterolemije, hipertrigliceridemije, kao i da dolazi do pada nivoa protektivnog HDL holesterola, a porasta LDL holesterola, u daljem radu smo analizirali parametre metabolizma lipida i lipoproteina, kao i koncentracije SMK u obe ispitivane grupe.

Dobijeni rezultati pokazuju značajno povećanje koncentracije LDL i TG, a značajno smanjenje nivoa HDL u grupi gojaznih ispitanika. Naši rezultati su očekivani i u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Portoles i sar., 2006; Ben Ali i sar., 2009; Constantin i sar., 2010). Povećane koncentracije LDL i TG u grupi gojaznih ispitanika se mogu dovesti u vezu sa IR s obzirom da su gojazni ispitanici iz naše studije na osnovu HOMA-IR indeksa i 2 h HOMA-IR indeksa bili rezistentni na insulin. Poznato je da je jedna od posledica IR i poremećaj metabolizma lipida i lipoproteina (Caglayan i sar., 2005), kao i da usled prisustva IR može doći do nastanka hipertrigliceridemije (Ravi i sar., 2004).

Gojaznost povećava mogućnost razvoja KVB preko faktora rizika kao što su povećani nivo TG, visok nivo lipoproteina male gustine LDL, nizak nivo lipoproteina velike gustine HDL, povišeni nivoi glukoze i insulina u krvi i visok krvni pritisak (Klop i sar., 2013). Metabolički faktori rizika tj. lipidi su povezani sa gojaznošću uz prisustvo povećanog LDL, hiperlipidemije sa akumulacijom aterogenih ostataka i povećane produkcije ApoB od strane jetre (Klop i sar., 2013). Svi ovi poremećaji lipida su tipične karakteristike MetS i mogu biti povezani sa inflamacijom koja delimično potiče iz samog masnog tkiva i direktno utiče na endotel krvnih sudova (Klop i sar., 2013). U prilog ovoj pretpostavci idu i naši rezultati koji pokazuju da je odnos LDL/HDL tj. aterosklerotski indeks značajno veći u grupi gojaznih ispitanika u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Povećani odnos LDL/HDL u kombinaciji sa povišenim nivoom TG takođe je uočen u našoj grupi gojaznih ispitanika i povećava mogućnost nastanka koronarnih bolesti srca.

Lipidna trijada (povećan nivo TG i odnosa LDL/HDL) ili drugačije nazvana aterogena dislipidemija je prisutna u grupi gojaznih ispitanika naše studije. Nivo HDL holesterola odražava ravnotežu između stope stvaranja HDL i stope njegovog klirensa (Wang i Peng 2011). Međutim, povećani klirens HDL ima više uticaja na smanjenje HDL kod gojaznih osoba (Rashid i sar., 2006). Pokazano je da promene u sastavu HDL

posebno povećanje udela TG čine većinu uzroka njegovog povećanog klirensa (Wang i Peng 2011). U stanju gojaznosti i IR masno tkivo oslobađa višak SMK. Nascenti lipoprotein veoma male gustine (VLDL; *engl. very low-density lipoproteins*) oslobođen iz jetre sadrži TG, holesterol, ApoB, apolipoprotein C (ApoC), apolipoprotein E (ApoE) (Shelness i Sellers 2001). HDL razmenjuje holesterol estere sa VLDL u zamenu za fosfolipide i TG uz prisustvo proteina za transfer holesterol estera (CETP; *engl. cholesteryl ester transfer protein*) za čiju je aktivnost pokazano da je značajno povećana kod gojaznih osoba (Dullaart i sar., 1994). Sa većim uklanjanjem TG iz VLDL usled delovanja lipoproteinske lipaze (LPL) i CETP, sastav VLDL se menja i nastaje lipoprotein intermedijarne gustine (IDL; *engl. intermediate-density lipoprotein*) (Shelness i Sellers 2001). Kao rezultat gojaznosti veći broj HDL čestica je siromašan holesterolom i obogaćen TG. Lipidima siromašan HDL može da se reciklira i da formira nascentne HDL čestice, ali se pretpostavlja da se on najverovatnije izlučuje preko bubrega (Wang i Peng 2011), a HDL ostaci se vezuju za ćelije jetre ili bubrega koji posreduju u preuzimanju, internalizaciji i degradaciji ostataka HDL (Wang i Peng 2011).

U našoj studiji nismo uočili značajno povećanje TC u grupi gojaznih ispitanika i ovaj rezultat je u skladu sa rezultatom dobijenim u španskoj genetičkoj populacionoj studiji (Portoles i sar., 2006). Objašnjenje povećane koncentracije TC koja nije dostigla statističku značajnost kod gojaznih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike mogla bi biti usled preraspodele u nastanku holesterola u obliku HDL i LDL čestica u korist LDL čestica. Takođe, poznato je da je za abdominalnu gojaznost karakteristična pojava aterogene dislipidemije, u kojoj je prisutna povećana koncentracija TG zbog povećanog prisustva aterogenih ostataka lipoproteina, smanjena koncentracija HDL holesterola i prisustvo malih, gustih LDL čestica (sdLDL) (Duivenvoorden i sar., 2009; Baldassarre i sar., 2012). Pomenuti literaturni podaci su potvrda naših rezultata tj. povećane vrednosti nivoa TG, LDL, kao i smanjenje vrednosti HDL. Sniženje nivoa HDL je značajna karakteristika dislipidemičnog profila gojaznih osoba što je potvrđeno i našim rezultatima. Epidemiološki podaci pokazuju da smanjenje HDL za 1% povećava rizik za nastanak kardovaskularnih bolesti za 2-3% (McAuley i sar., 2014; Figueroa-Vega i sar., 2015). Studija Correia i saradnika pokazuje da hiperleptinemija, kao i rezistencija na

leptin, osim hipertenzije i poremećaja metabolizma glukoze takođe mogu dovesti i do proaterogenog stanja kod gojaznih osoba (Correia i Rahmouni 2006).

Pored nivoa LDL holesterola u našem radu takođe smo određivali koncentracije Apo-AI i ApoB. Kod gojaznih ispitanika u našem radu značajno je smanjen nivo Apo-AI, a značajno povećan nivo ApoB. Dobijeni rezultati su očekivani imajući u vidu literaturne podatke koji nedvosmisleno pokazuju da ApoB predstavlja direktnu meru broja prisutnih aterogenih čestica u cirkulaciji. Kod gojaznih osoba sa abdominalnom gojaznošću je pokazano da povećanje koncentracije LDL prati povećanje vrednosti ApoB (Lavie i sar., 2015). Rezultati drugih studija takođe ukazuju na vezu između povećanih koncentracija ApoB i smanjenih koncentracija Apo-AI sa pojavom ateroskleroze i kardiovaskularnih oboljenja (Walldius i Jungner 2006).

U aterogene faktore se pored lipida (TC, TG, HDL, LDL), Apo-AI i ApoB takođe ubraja i Lp(a) čiju smo koncentraciju takođe merili kod ispitanika naše studije. Naši rezultati pokazuju da je koncentracija Lp(a) kod gojaznih ispitanika ostala na istom nivou kao kod kontrolnih ispitanika tj. nije bilo značajne razlike.

Gojazni ispitanici u našoj studiji su imali značajno viši nivo SMK u poređenju sa kontrolnom grupom. U stanju gojaznosti dolazi do povećanja koncentracije SMK usled povećanja adipoznog tkiva koje oslobađa više SMK, dok "klirens" SMK može biti redukovano (Boden 2011). Osim toga, povećanje nivoa SMK inhibira antilipolitičko dejstvo insulina što dalje povećava nivo oslobođenih SMK u cirkulaciju (Boden 2011). Mehanizmi kojima SMK mogu izazvati nastanak IR uključuju generisanje lipidnih metabolita (diacilglicerol), proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1) i ćelijski stres, uključujući oksidativni i stres endoplazmatičnog retikuluma (Boden 2011). Akutno povećanim nivoom SMK indukovana rezistencija na insulin nastaje usled inhibicije insulinom posredovane supresije glikogenolize sa malim efektom na glukoneogenezu (Boden i sar, 2002). Nasuprot tome, dugotrajno povišen nivo SMK izgleda da povećava glukoneogenezu. Pokazano je da SMK inhibiraju dejstvo insulina na nivou transporta glukoze stimulisanog insulinom i/ili fosforilacijom inhibiraju signalnu transdukciju insulina (Boden i Chen, 1995; Dresner i sar, 1999). U objašnjenju rezultata povećanog nivoa SMK svakako treba ukazati i na postojanje IR koja je prisutna i u našoj grupi gojaznih ispitanika što je pokazao rezultat za HOMA-IR.



Poremećen insulinski signal u gojaznosti ometa insulinom koordinisano deponovanje, mobilizaciju i iskorišćavanje SMK prevashodno u masnom tkivu, jetri i mišićima (Caglayan i sar., 2005). SMK u jetri dovode do inhibiranja "klirensa" insulina i insulinom posredovane supresije proizvodnje glukoze u jetri. Kao rezultat ovog efekta SMK dolazi do oslobađanja glukoze u cirkulaciju i razvoja hiperinsulinemije (Avram i sar., 2005) koja je uočena u grupi gojaznih ispitanika u našem radu. Takođe, SMK negativno utiču u skeletnim mišićima na senzitivnost insulina, gde dovode do smanjenja insulinom stimulisano iskorišćenja glukoze (Avram i sar., 2005). Ovo je još jedan način podsticanja IR koja je prisutna i kod naših gojaznih ispitanika.

## **5.5. Promene u koncentraciji inflamatornih markera gojaznih ispitanika**

Proinflamatorno stanje se klinički manifestuje porastom nivoa reaktanata akutne faze među kojima značajno mesto zauzima CRP.

U našoj studiji gojazni ispitanici su imali značajno viši nivo CRP u poređenju sa kontrolnim. Ovo povećanje koncentracije CRP koje je udruženo sa gojaznošću je očekivano i podržano literaturnim podacima koji pokazuju postojanje jake i nezavisne asocijacije uvećanja masne mase u ukupnoj telesnoj masi sa povišenim nivoima markera inflamacije (Clemente i sar., 2015).

Ouchi i saradnici su pokazali da se CRP pored jetre takođe sintetiše i u masnom tkivu (Ouchi i sar., 2003). Nivo CRP u cirkulaciji je u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima BMI (Kao i sar., 2009) što potvrđuju i naši rezultati koji pokazuju da gojazni ispitanici imaju veći BMI i veći nivo CRP u serumu. Povećano oslobađanje proinflamatornih citokina kao što je IL-6 iz visceralnog masnog tkiva gojaznih osoba može da dovede do povećane sinteze CRP. Obim struka i akumulacija visceralnog masnog tkiva su u pozitivnoj korelaciji sa CRP što ukazuje na postojanje akutnog inflamatornog procesa i endotelne disfunkcije (Misra i Vikram 2003; Pou i sar., 2007).

U stanju gojaznosti koegzistiraju hronično povišen nivo CRP i rezistencija na leptin (Shamsuzzaman i sar., 2004; Hribal i sar., 2014). Molekularne studije ukazuju da leptin utiče na ekspresiju nivoa CRP indirektno preko dejstva na IL-6, ali i direktno potpomaže stvaranje CRP u jetri i krvnim sudovima (Singh i sar., 2007). Takođe, CRP može regulisati dostupnost leptina u cirkulaciji, jer je pokazano da u vanćelijskom prostoru ova dva molekula koprecipitiraju i ova interakcija smanjuje sposobnost leptina da se veže za svoj receptor i aktivira signalnu transdukciju (Gertler i sar., 2007).

Azot monoksid (NO) koga proizvode mnoge ćelije u organizmu nastaje enzimskom reakcijom katalizovanom jednom od tri izoforme NOS. NO ispoljava svoje vazodilatatorno dejstvo relaksirajući glatke mišićne ćelije i jedan je od bitnih učesnika inflamatornih procesa, ali u visokim koncentracijama NO može ispoljiti citotoksične efekte (Knerr i sar., 2005). Laboratorijsko određivanje NO je ekstremno teško s obzirom na kratak poluživot i vrlo niske koncentracije u biološkim tečnostima. Nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ) i nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ) su najstabilniji metaboliti endogenog NO i dostupni su za kvantitativno određivanje. Iz datih razloga merili smo nivo nitrata/nitrita u plazmi obe grupe ispitanika. Izmerene koncentracije NO u grupi gojaznih ispitanika naše studije su bile značajno veće u poređenju sa vrednostima NO u grupi kontrolnih ispitanika. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima populacionih studija u kojima je takođe uočeno povećanje nivoa NO kod gojaznih ispitanika (Choi i sar., 2001; Ghasemi i sar., 2013).

Povećanje nivoa NO u gojaznosti se može dovesti u vezu sa povećanom koncentracijom proinflamatornih citokina IL-6 za koju je pokazano da dovodi do povećane sinteze i aktivnosti inducibilne azot monoksid sintaze (iNOS). U našem radu nismo merili koncentraciju IL-6, ali rezultati drugih autora nedvosmisleno pokazuju značajno povećan nivo IL-6 u stanju gojaznosti (Roytblat i sar., 2000). Pored toga, pokazano je da je ekspresija NOS veća u visceralnom masnom tkivu, koje je na osnovu izmerenih vrednosti obima struka takođe prisutna kod gojaznih ispitanika naše studije. Veća ekspresija NOS u visceralnom adipoznom tkivu gojaznih ispitanika ima za posledicu i veću produkciju NO, koja je detektovana i u našoj grupi gojaznih ispitanika.

## 5.6. Parametar OxS i enzimi AOS gojaznih ispitanika

Danas su sve brojniji dokazi povećanog OxS u masnom tkivu gojaznih osoba koji čini osnovu za poremećaj sekrecije adipokina i razvoj MetS (Furukawa i sar., 2004). Pokazana je negativna korelacija između nivoa adipokina i parametra lipidne peroksidacije koji je jedan od markera oksidativnog oštećenja (Furukawa i sar., 2004). Rezultati povećanog nivoa 4-HNE se možda mogu dovesti u vezu sa povećanim nivoom slobodnih radikala usled čega dolazi do povećane lipidne peroksidacije i do povećanja nivoa 4-HNE tj. produkta lipidne peroksidacije. Rezultati analize 4-HNE, markera lipidne peroksidacije u našem radu pokazuju da je nivo ovog markera značajno veći u grupi gojaznih ispitanika. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji pokazuju da je nivo 4-HNE takođe povećan u krvi i mišićima gojaznih osoba u odnosu na kontrolne osobe (Russell i sar., 2003; Le Lay i sar., 2014). U našem radu nismo merili koncentracije ROS, ali imajući u vidu činjenicu da lipidna peroksidacija nastaje kao posledica delovanja ROS na polinezasićene masne kiseline lipida (Al-Gubory i sar., 2010; Burton i Jauniaux 2011) možemo pretpostaviti da je nivo ROS u grupi gojaznih ispitanika bio povećan.

Postoje najmanje tri načina na koji gojaznost nezavisno dovodi do lipidne peroksidacije (Olusi 2002). Gojaznost dovodi do povećavanja mehaničkih i metaboličkih opterećenja srca što rezultuje time da se u srcu povećava potrošnja kiseonika pri čemu dolazi do stvaranja ROS. U situaciji kada proizvodnja ROS prevazilazi antioksidativni kapacitet ćelije dolazi do lipidne peroksidacije. Drugi mehanizam uključuje oštećenja ćelija usled pritiska velike telesne mase, tako da usled povreda ćelija dolazi do oslobađanja citokina, koji dovode do stvaranja ROS iz tkiva koje zauzvrat uzrokuje lipidnu peroksidaciju (Olusi 2002). Treći mogući mehanizam je ishrana bogata lipidima, koji mogu biti uključeni u metabolizam kiseonika. Takođe, dvostruke kovalentne veze u molekulima SMK su podložne oksidaciji i upravo zbog toga mogu takođe uzrokovati lipidnu peroksidaciju (Olusi 2002).

Kod gojaznih osoba je pokazano postojanje pozitivne korelacije između markera lipidne peroksidacije, BMI i obima struka (Furukawa i sar., 2004) što je u skladu sa našim rezultatima.

Kako je naše istraživanje bilo usmereno i na proučavanje OxS kao faktora rizika za razvoj komplikacija gojaznosti u cilju procene efikasnosti enzimske komponente AOS u daljem radu smo određivali aktivnost SOD, GR, GPx, CAT, kao i ukupni antioksidativni status (TAS). U skladu sa rezultatima drugih studija naši rezultati su potvrdili značajno manje aktivnosti enzima SOD, GR i GPx u serumu gojaznih ispitanika (Olusi 2002; Ozata i sar., 2002). Takođe je ustanovljen statistički značajno niži TAS u grupi gojaznih ispitanika u odnosu na kontrolne što je u saglasnosti sa drugim studijama (Fenkci i sar., 2003; Lopes i sar., 2003; Vincent i Taylor 2006).

Brojne studije potvrđuju (Gutierrez-Lopez i sar., 2012; Nikolaidis i sar., 2012) izmenjen nivo AOS u gojaznosti, ali i pored toga rezultati su kontradiktorni. Još uvek je otvoreno pitanje postojanja korelacije između obima struka, BMI i ostalih parametara gojaznosti sa pokazateljima AOS. U nekim studijama nije pokazano postojanje ove korelacije (Brown i sar., 2009), u drugim studijama je pokazano postojanje pozitivne korelacije sa porastom BMI (Sfar i sar., 2013) ili negativne korelacije sa BMI (Viroonudomphol i sar., 2000; Mittal i Kant 2009; Olivares-Corichi i sar., 2011). Bougoulia i saradnici su uočili pad aktivnosti GPx kod gojaznih osoba ženskog pola nakon smanjenja telesne mase (Bougoulia i sar., 2006).

Mnogobrojne kliničke studije i *in vitro* ispitivanja govore u prilog izmenjene aktivnosti AOS u stanju gojaznosti (Gutierrez-Lopez i sar., 2012; Nikolaidis i sar., 2012). Dok pojedini istraživači nisu uočili razliku u aktivnosti SOD kod normalno uhranjenih i gojaznih osoba (Brown i sar., 2009), drugi istraživači su uočili niže vrednosti aktivnosti SOD i GPx kod gojaznih osoba (Olusi 2002; Ozata i sar., 2002) što su pokazali i naši rezultati smanjene aktivnosti SOD i GPx.

Kao jedno od mogućih objašnjenja dobijenih kontradiktornih rezultata koji se odnose na aktivnost enzima AOS u gojaznosti je dovođenje u vezu sa različitim stepenom gojaznosti. Tačnije, u samom početku gojaznosti aktivnost enzima AOS može biti povećana, ali dugotrajna gojaznost vodi smanjenju aktivnosti enzima AOS (Savini i sar., 2013). Stanje OxS je povezano sa oboljenjima koja nastaju kao posledica gojaznosti (hiperglikemija, dislipidemija i hipertenzija), a ne sa samom gojaznošću *per*

se (Vincent i Taylor 2006; Stefanovic i sar., 2008). Stoga bismo u našoj studiji mogli dovesti u vezu registrovanu dislipidemiju i blago povećanje arterijskog pritiska sa smanjenjem aktivnosti većine ispitivanih enzima AOS. Da li je smanjenje aktivnosti enzima AOS zaista u korelaciji sa pomenutim stanjima indukovanim gojaznošću kod gojaznih ispitanika naše studije ostaje još uvek otvoreno pitanje i tema je za buduća istraživanja.

### **5.7. Asocijacija antropometrijskih parametara, faktora rizika, parametara metabolizma glukoze i lipida, markera inflamacije, parametara OxS i enzima AOS sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin**

Polazeći od naših kao i rezultata drugih autora koji pokazuju da je koncentracija leptina značajno povećana kod gojaznih osoba (Considine i sar., 1996; Mantzoros 1999; Mammes i sar., 2000; Hinuy i sar., 2008; Ben Ali i sar., 2009; Gomes i sar., 2012) u daljem radu smo procenjivali moguću asocijaciju genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa parametrima gojaznosti i njenim komplikacijama (Powers i Jackson 2008). Stoga smo analizirali genetičku varijantu G-2548A u genu za leptin u grupi gojaznih i kontrolnih ispitanika kako bi se utvrdila moguća asocijacija ove genetičke varijante sa antropometrijskim i metaboličkim parametrima, kao i parametrima AOS u srpskoj populaciji.

Rezultati dobijeni za distribuciju genotipova u našoj pilot studiji su slični rezultatima saopštenim u genetičkim populacionim studijama sprovedenim u Grčkoj, Francuskoj i Poljskoj (Yiannakouris i sar., 2003; Poitou i sar., 2005; Franek i sar., 2010). U našoj studiji učestalost alela G za genetičku varijantu G-2548A u genu za leptin iznosila je 0,60 kod gojaznih ispitanika, a 0,53 u kontrolnoj grupi ispitanika, što je slično rezultatima Constantina i saradnika (Constantin i sar., 2010) koji su pokazali veću učestalost alela G za genetičku varijantu G-2548A u genu za leptin kod gojaznih ispitanika Rumunije u odnosu na kontrolne. U našoj studiji nismo uočili značajnu razliku u distribuciji genotipova i frekvenciji alela genetičke varijante G-2548A u genu

za leptin između gojaznih i kontrolnih ispitanika što je takođe u skladu sa rezultatima dobijenim u rumunskoj genetičkoj populacionoj studiji (Constantin i sar., 2010).

Rezultati koje smo dobili nakon statističke analize po dominantnom modelu pokazuju značajnu asocijaciju telesne mase, obima struka i indeksa telesne mase kod kontrolnih ispitanika sa genotipovima date genetičke varijante u genu za leptin. Kod kontrolnih ispitanika nosilaca genotipova GA i AA utvrđena je značajna asocijacija sa manjom telesnom masom, obimom struka i indeksom telesne mase u odnosu na kontrolne ispitanike nosioce genotipa GG što ukazuje da kontrolni ispitanici nosioci alela A bilo u heterozigotnom ili homozigotnom obliku imaju manji rizik razvoja gojaznosti u odnosu na nosioce homozigota GG sve dok ne postanu gojazni, jer se u stanju gojaznosti gubi protektivno dejstvo alela A.

Izučavanje asocijacije genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa BMI sprovedeno kod francuskih gojaznih ispitanika (Mammes i sar., 2000), zatim gojaznih tajvanskih Aboridžina (Wang i sar., 2006) i gojaznih brazilskih žena (Hinuy i sar., 2008) potvrdila su asocijaciju genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa povećanim BMI.

Rezultati studije sprovedene u rumunskoj populaciji (Constantin i sar., 2010) nisu pokazali postojanje asocijacije genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa indeksom telesne mase i obimom struka, kao ni sa metaboličkim parametrima. Portoles i saradnici su sproveli studiju asocijacije genetičke varijante G-2548A u genu za leptin kod 303 gojaznih ispitanika i 606 kontrolnih ispitanika odabranih iz španske mediteranske populacije i nisu pokazali razliku između nosioca različitih genotipova ove genetičke varijante u srednjoj vrednosti indeksa telesne mase, obima struka i koncentracije lipida u plazmi (Portoles i sar., 2006).

Literaturni podaci koji se odnose na rezultate objavljenih studija drugih autora pokazuju da su rezultati asocijacije genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa gojaznošću ili BMI kontradiktorni (Portoles i sar., 2006) što se može dovesti u vezu sa pojavom neslučajne asocijacije alela (LD; *engl. linkage disequilibrium*) genetičke varijante G-2548A, koja se ne nalazi u konzerviranom regionu gena za leptin, sa drugom funkcionalnom genetičkom varijantom koja bi mogla uticati na fenotip (Portoles i sar., 2006).

U našoj studiji smo uočili porast koncentracije leptina kod gojaznih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike, kao što je i očekivano (Gomes i sar., 2012), ali naši rezultati nisu pokazali postojanje asocijacije između genetičke varijante G-2548A u genu za leptin i povećane koncentracije leptina. Suprotno našim rezultatima, studija izvedena na populaciji brazilskih žena (Hinuy i sar., 2008) pokazuje da je ova genetička varijanta povezana sa povećanjem koncentracije leptina u plazmi. Razlozi neslaganja naših rezultata sa rezultatima drugih autora su posledica mogućih populacionih razlika ili pak razlika u broju ispitanika ili možda različitog dizajna studije. Pokazano je postojanje veze između genotipa GG i povećane koncentracije leptina, koja je ustanovljena kod gojaznih evropskih, brazilskih i tunižanskih učesnika studija (Mammes i sar., 2000; Hinuy i sar., 2008; Ben Ali i sar., 2009). Alel G genetičke varijante G-2548A u genu za leptin je povezan sa povećanim nivoom leptina kod zdravih grčkih ispitanika (Yiannakouris i sar., 2003). Nasuprot tome, kod gojaznih francuskih ispitanika nosioci alela G genetičke varijante G-2548A u genu za leptin imali su smanjen nivo leptina (Mammes i sar., 2000).

U daljem radu smo analizirali asocijaciju parametara metabolizma glukoze (glukoza u krvi našte, glukoza u krvi 2 h nakon doručka, insulin u krvi našte, insulin u krvi 2 h nakon doručka, HOMA-IR indeks, 2 h HOMA-IR indeks) sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin i uočili smo da nema asocijacije genotipova varijante G-2548A u genu za leptin sa parametrima metabolizma ni kod jedne grupe ispitanika naše studije.

Rezultati statističke analize po dominantnom modelu pokazali su postojanje značajne asocijacije koncentracije NO u plazmi kod kontrolnih ispitanika sa genotipovima date genetičke varijante u genu za leptin. Kod kontrolnih ispitanika nosilaca genotipa GA i kontrolnih ispitanika nosilaca genotipa AA utvrđena je značajna asocijacija sa većom koncentracijom NO u odnosu na kontrolne ispitanike nosioce genotipa GG. Uočena asocijacija ukazuje da su kontrolni ispitanici nosioci alela G u homozigotnom obliku zaštićeniji od inflamacije u odnosu na kontrolne ispitanike koji su nosioci heterozigota GA i homozigota AA sve dok ne postanu gojazni, jer se u stanju gojaznosti gubi protektivno dejstvo alela G.

Rezultati statističke analize po dominantnom modelu pokazali su trend asocijacije koncentracije NO u plazmi kod gojaznih ispitanika sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin. Kod gojaznih ispitanika nosilaca genotipa GA i gojaznih ispitanika nosilaca genotipa AA teži se asocijaciji sa većom koncentracijom NO u odnosu na gojazne ispitanike nosioce genotipa GG.

Rezultati naše studije pokazuju da su gojazni ispitanici imali značajno viši nivo LDL, odnosa LDL/HDL, kao i nivo ApoB u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Kod gojaznih ispitanika nosilaca genotipa AA varijante LEP G-2548A utvrđena je značajna asocijacija sa nižim nivoom LDL u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima genotipa GA, odnosno, nosiocima genotipa GG po kodominantnom modelu. Nakon primene statističke analize po recesivnom modelu uočili smo značajnu asocijaciju LDL kod gojaznih ispitanika sa genotipovima date genetičke varijante u genu za leptin. Tako je zapaženo da kod gojaznih ispitanika nosilaca genotipa AA postoji značajna asocijacija sa nižim nivoom LDL u odnosu na gojazne ispitanike nosioce genotipa GG i gojazne ispitanike nosioce genotipa GA. Pored toga, nakon primene statističke analize po kodominantnom modelu zapazili smo značajnu asocijaciju koncentracije ApoB kod gojaznih ispitanika sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin. Dobijeni rezultati su pokazali da kod gojaznih ispitanika nosilaca genotipa AA postoji značajna asocijacija sa nižim nivoom ApoB u odnosu na gojazne ispitanike nosioce genotipa GA.

Rezultati analize asocijacije parametra OxS koncentracije 4-HNE sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin pokazali su izostanak asocijacije u obe grupe ispitanika. Posle analize asocijacije enzima AOS SOD, GPx i GR, kao i TAS sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin takođe nije uočena asocijacija ni u jednoj grupi ispitanika naše studije.

Na osnovu prethodno diskutovanih rezultata koji se odnose na asocijaciju antropometrijskih parametara, faktora rizika, parametara metabolizma glukoze i lipida, markera inflamacije, parametra OxS i enzima AOS sa genotipovima varijante G-2548A u genu za leptin može se uočiti da smo u našoj studiji pokazali postojanje asocijacije genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa antropometrijskim parametrima (telesna masa, obim struka i indeks telesne mase) i markerom inflamacije (azot



monoksid) kod kontrolnih ispitanika, kao i sa metaboličkim parametrima (LDL i apolipoprotein B) kod gojaznih ispitanika.

U zaključku, uzimajući u obzir kako literaturne podatke, tako i rezultate prikazane u okviru ove doktorske disertacije, ovo su prva istraživanja asocijacije genetičke varijante G-2548A u genu za leptin sa antropometrijskim, metaboličkim i parametrima AOS u populaciji gojaznih osoba u Srbiji. Buduće studije bi trebalo da doprinesu razjašnjenju mehanizama povezanosti antropometrijskih, metaboličkih i parametara AOS kako sa gojaznošću, tako i sa genetičkom varijantom G-2548A u genu za leptin. Imajući u vidu mali broj ispitanika koji su bili uključeni u našu studiju, neophodno je dizajnirati buduće studije sa većim brojem ispitanika srpske populacije kako bi se razjasnila uloga genetičkih varijanti u genu za leptin i rizika nastanka gojaznosti sa pratećim komorbiditetima.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih i prikazanih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Izmerene vrednosti antropometrijskih parametara kao što su: telesna masa, obim struka i indeks telesne mase bile su statistički značajno veće kod gojaznih u poređenju sa kontrolnim ispitanicima.

2. U krvi gojaznih učesnika studije zapaženo je značajno povećanje koncentracije leptina, sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, insulina i glikozilovanog hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>). Takođe je registrovan i povišen indeks rezistencije na insulin (HOMA-IR).

3. U krvi gojaznih ispitanika registrovano je značajno povećanje parametara lipidnog profila, kao što su holesterol poreklom iz LDL čestica, trigliceridi, apolipoprotein B i slobodne masne kiseline, kao i značajno smanjenje holesterola poreklom iz HDL čestica i apolipoproteina A-I.

4. U krvi gojaznih ispitanika aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze bila je značajno manja, kao i ukupni antioksidativni status, dok je marker lipidne peroksidacije (4-HNE) bio značajno povećan.

5. U krvi gojaznih ispitanika markeri inflamacije NO i CRP bili su značajno povećani.

6. Određena je distribucija alela i genotipova varijante LEP G-2548A u genu za leptin u grupi kontrolnih ispitanika u populaciji Srbije. Utvrđene su sledeće frekvencije genotipova i alela: 25,81% (GG), 54,84% (GA) i 19,35% (AA); 0,53 (alel G) i 0,47 (alel A).

7. Određena je distribucija alela i genotipova varijante LEP G-2548A u genu za leptin u grupi gojaznih ispitanika u populaciji Srbije. Utvrđene su sledeće frekvencije genotipova i alela: 32.26% (GG), 54.84% (GA) i 12.90% (AA); 0,60 (alel G) i 0,40 (alel A).

8. Kod kontrolnih ispitanika nosilaca heterozigota GA i kontrolnih ispitanika nosilaca homozigota AA genetičke varijante LEP G-2548A utvrđena je značajna asocijacija sa manjom telesnom masom, obimom struka i indeksom telesne mase u poređenju sa kontrolnim ispitanicima nosiocima homozigota GG po dominantnom modelu.

9. Kod kontrolnih ispitanika nosilaca heterozigota GA i kontrolnih ispitanika nosilaca homozigota AA genetičke varijante LEP G-2548A utvrđena je značajna asocijacija sa većom koncentracijom NO u poređenju sa kontrolnim ispitanicima nosiocima homozigota GG po dominantnom modelu.

10. Kod gojaznih ispitanika nosilaca homozigota manje učestalog alela A genetičke varijante LEP G-2548A utvrđena je značajna asocijacija sa nižim nivoom LDL u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima heterozigota GA, odnosno, gojaznim ispitanicima nosiocima homozigota GG po kodominantnom modelu i recesivnom modelu.

11. Kod gojaznih ispitanika nosilaca homozigota AA genetičke varijante LEP G-2548A utvrđena je značajna asocijacija sa manjim vrednostima ApoB u poređenju sa gojaznim ispitanicima nosiocima heterozigota GA po kodominantnom modelu.

Istraživanje u okviru studije čiji su rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji po prvi put je sprovedeno među populacijom gojaznih ispitanika u Srbiji. Tačnije, po prvi put su urađena izučavanja asocijacije genetičke varijante LEP G-2548A u genu za leptin sa promenama antropometrijskih i metaboličkih parametara, kao i aktivnosti antioksidativnih enzima kod gojaznih ispitanika u srpskoj populaciji. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da se ispitivana genetička varijanta ne može dovesti u vezu sa rizikom nastanka gojaznosti u populaciji Srbije.

## 7. LITERATURA

1. Abate, N., A. Garg, R. M. Peshock, J. Stray-Gundersen, i sar. (1995). Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest.* 96(1): 88-98.
2. Al-Gubory, K. H., P. A. Fowler and C. Garrel (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(10): 1634-1650.
3. Al-Shayji, I. A., M. J. Caslake and J. M. Gill (2012). Effects of moderate exercise on VLDL(1) and Intralipid kinetics in overweight/obese middle-aged men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302(3): E349-355.
4. Allison, D. B., M. S. Faith, M. Heo and D. P. Kotler (1997). Hypothesis concerning the U-shaped relation between body mass index and mortality. *Am J Epidemiol.* 146(4): 339-349.
5. An, P., T. Rice, J. Gagnon, I. B. Borecki, i sar. (2000). Segregation analysis of apolipoproteins A-1 and B-100 measured before and after an exercise training program: the HERITAGE Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(3): 807-814.
6. Anand, B. K. and J. R. Brobeck (1951). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 77(2): 323-324.
7. Avram, A. S., M. M. Avram and W. D. James (2005). Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol.* 53(4): 671-683.
8. Badran, M. and I. Laher (2011). Obesity in arabic-speaking countries. *J Obes.* 686430(10): 24.
9. Bahrenberg, G., I. Behrmann, A. Barthel, P. Hekerman, i sar. (2002). Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator

- of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol.* 16(4): 859-872.
10. Baldassarre, D., A. Hamsten, F. Veglia, U. de Faire, i sar. (2012). Measurements of carotid intima-media thickness and of interadventitia common carotid diameter improve prediction of cardiovascular events: results of the IMPROVE (Carotid Intima Media Thickness [IMT] and IMT-Progression as Predictors of Vascular Events in a High Risk European Population) study. *J Am Coll Cardiol.* 60(16): 1489-1499.
  11. Banks, A. S., S. M. Davis, S. H. Bates and M. G. Myers, Jr. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 275(19): 14563-14572.
  12. Barbosa, J. A., A. B. Rodrigues, C. C. Mota, M. M. Barbosa, i sar. (2011). Cardiovascular dysfunction in obesity and new diagnostic imaging techniques: the role of noninvasive image methods. *Vasc Health Risk Manag.* 7: 287-295.
  13. Bates, S. H., W. H. Stearns, T. A. Dundon, M. Schubert, i sar. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature.* 421(6925): 856-859.
  14. Baumann, H., K. K. Morella, D. W. White, M. Dembski, i sar. (1996). The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16): 8374-8378.
  15. Bazan, J. F. (1989). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 164(2): 788-795.
  16. Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(18): 6934-6938.
  17. Bedard, K. and K. H. Krause (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87(1): 245-313.
  18. Beltowski, J., G. Wojcicka, D. Gorny and A. Marciniak (2000). The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol.* 51(4 Pt 2): 883-896.

19. Ben Ali, S., A. Kallel, B. Ftouhi, Y. Sediri, i sar. (2009). Association of G-2548A LEP polymorphism with plasma leptin levels in Tunisian obese patients. *Clin Biochem.* 42(7-8): 584-588.
20. Bienertova-Vasku, J., P. Bienert, J. Tomandl, M. Forejt, i sar. (2008). No association of defined variability in leptin, leptin receptor, adiponectin, proopiomelanocortin and ghrelin gene with food preferences in the Czech population. *Nutr Neurosci.* 11(1): 2-8.
21. Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, P. Michl, R. S. Ahima, i sar. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology.* 139(8): 3485-3491.
22. Bjorbaek, C., S. Uotani, B. da Silva and J. S. Flier (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 272(51): 32686-32695.
23. Boden, G. (2011). Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 18(2): 139-143.
24. Boden, G. and X. Chen (1995). Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest.* 96(3): 1261-1268.
25. Boden, G., P. Cheung, T. P. Stein, K. Kresge, i sar. (2002). FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283(1): E12-19.
26. Bogardus, C., S. Lillioja, D. M. Mott, C. Hollenbeck, i sar. (1985). Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. *Am J Physiol.* 248(3 Pt 1): E286-291.
27. Bonadonna, R. C., L. Groop, N. Kraemer, E. Ferrannini, i sar. (1990). Obesity and insulin resistance in humans: a dose-response study. *Metabolism.* 39(5): 452-459.
28. Boudina, S., S. Sena, B. T. O'Neill, P. Tathireddy, i sar. (2005). Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation.* 112(17): 2686-2695.
29. Bougoulia, M., A. Triantos and G. Koliakos (2006). Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight

- loss. Association with cardiovascular risk factors. *Hormones (Athens)*. 5(3): 192-199.
30. Bray, G. (1979). *Obesity in America*. . NIH publication. Washington DC:USDHEW. 7: 79-359.
  31. Bray, G. A. (1989). Obesity: basic considerations and clinical approaches. *Dis Mon*. 35(7): 449-537.
  32. Bray, G. A. and D. A. York (1979). Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*. 59(3): 719-809.
  33. Brobeck, J. R. (1946). Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol Rev*. 26(4): 541-559.
  34. Brobeck, J. R., J. Tepperman and C. N. Long (1943). The Effect of Experimental Obesity upon Carbohydrate Metabolism. *Yale J Biol Med*. 15(6): 893-904.
  35. Brown, L. A., C. J. Kerr, P. Whiting, N. Finer, i sar. (2009). Oxidant stress in healthy normal-weight, overweight, and obese individuals. *Obesity (Silver Spring)*. 17(3): 460-466.
  36. Burguera, B., M. E. Couce, G. L. Curran, M. D. Jensen, i sar. (2000). Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes*. 49(7): 1219-1223.
  37. Burton, G. J. and E. Jauniaux (2011). Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 25(3): 287-299.
  38. Cadenas, S., C. Rojas, J. Mendez, A. Herrero, i sar. (1996). Vitamin E decreases urine lipid peroxidation products in young healthy human volunteers under normal conditions. *Pharmacol Toxicol*. 79(5): 247-253.
  39. Caglayan, E., F. Blaschke, Y. Takata and W. A. Hsueh (2005). Metabolic syndrome-interdependence of the cardiovascular and metabolic pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 5(2): 135-142.
  40. Calle, E. E., M. J. Thun, J. M. Petrelli, C. Rodriguez, i sar. (1999). Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 341(15): 1097-1105.

41. Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84(1): 277-359.
42. Cannon, C. P. (2008). Obesity-related cardiometabolic complications. *Clin Cornerstone.* 9(1): 11-19; discussion 20-12.
43. Castro, A. V., C. M. Kolka, S. P. Kim and R. N. Bergman (2014). Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 58(6): 600-609.
44. Chan, J. L., S. Bluher, N. Yiannakouris, M. A. Suchard, i sar. (2002). Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes.* 51(7): 2105-2112.
45. Chandel, N. S., P. T. Schumacker and R. H. Arch (2001). Reactive oxygen species are downstream products of TRAF-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 276(46): 42728-42736.
46. Choi, J. W., S. H. Pai, S. K. Kim, M. Ito, i sar. (2001). Increases in nitric oxide concentrations correlate strongly with body fat in obese humans. *Clin Chem.* 47(6): 1106-1109.
47. Chumlea, W. C. and S. S. Guo (1994). Bioelectrical impedance and body composition: present status and future directions. *Nutr Rev.* 52(4): 123-131.
48. Chung, W. K., L. Power-Kehoe, M. Chua, R. Lee, i sar. (1996). Genomic structure of the human OB receptor and identification of two novel intronic microsatellites, *Genome Res.* .
49. Cinti, S. (2002). Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest.* 25(10): 823-835.
50. Clemente, G., M. Mancini, R. Giacco, A. Tornatore, i sar. (2015). Visceral adiposity and subclinical atherosclerosis in healthy young men. *Int J Food Sci Nutr.* 66(4): 466-470.
51. Colditz, G. (1992). Economic costs of obesity. . *Am J Clin Nutr.* 55: 503-507.
52. Coleman, D. L. (1988). Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and its metabolites in obese-hyperglycemic mutant mice. *Prog Clin Biol Res.* 265: 161-175.



53. Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, i sar. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 334(5): 292-295.
54. Constantin, A., G. Costache, A. V. Sima, C. S. Glavce, i sar. (2010). Leptin G-2548A and leptin receptor Q223R gene polymorphisms are not associated with obesity in Romanian subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1): 282-286.
55. Correia, M. L. and K. Rahmouni (2006). Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 8(6): 603-610.
56. Couce, M. E., B. Burguera, J. E. Parisi, M. D. Jensen, i sar. (1997). Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology.* 66(3): 145-150.
57. Couillard, C., J. Gagnon, J. Bergeron, A. S. Leon, i sar. (2000). Contribution of body fatness and adipose tissue distribution to the age variation in plasma steroid hormone concentrations in men: the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(3): 1026-1031.
58. Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdan, i sar. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 411(6836): 480-484.
59. Cryer, A. (1981). The postnatal development of white-adipose-tissue metabolism. *Biochem Soc Trans.* 9(5): 373-375.
60. Darga, L. L., J. H. Holden, S. M. Olson and C. P. Lucas (1994). Comparison of cardiovascular risk factors in obese blacks and whites. *Obes Res.* 2(3): 239-245.
61. Deschenes, D., P. Couture, P. Dupont and A. Tchernof (2003). Subdivision of the subcutaneous adipose tissue compartment and lipid-lipoprotein levels in women. *Obes Res.* 11(3): 469-476.
62. Diano, S. (2011). New aspects of melanocortin signaling: a role for PRCP in alpha-MSH degradation. *Front Neuroendocrinol.* 32(1): 70-83.
63. Dresner, A., D. Laurent, M. Marcucci, M. E. Griffin, i sar. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 103(2): 253-259.

64. Duarte, S. F., E. A. Francischetti, V. A. Genelhu, P. H. Cabello, i sar. (2007). LEPR p.Q223R, beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. *Genet Mol Res.* 6(4): 1035-1043.
65. Duivenvoorden, R., E. de Groot, E. S. Stroes and J. J. Kastelein (2009). Surrogate markers in clinical trials--challenges and opportunities. *Atherosclerosis.* 206(1): 8-16.
66. Dullaart, R. P., W. J. Sluiter, L. D. Dikkeschei, K. Hoogenberg, i sar. (1994). Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Invest.* 24(3): 188-194.
67. Dvorak, R. V., W. F. DeNino, P. A. Ades and E. T. Poehlman (1999). Phenotypic characteristics associated with insulin resistance in metabolically obese but normal-weight young women. *Diabetes.* 48(11): 2210-2214.
68. Eckel, R. H., S. E. Kahn, E. Ferrannini, A. B. Goldfine, i sar. (2011). Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab.* 96(6): 1654-1663.
69. Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee, J. Kelly, i sar. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron.* 23(4): 775-786.
70. Epstein, F. and M. Higgins (1992). Human obesity: General aspects. . *Epidemiology of Obesity.* P. Bjorntorp and B. Brodoff: 330-342.
71. Esposito, K., M. Ciotola, B. Schisano, L. Misso, i sar. (2006). Oxidative stress in the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.* 29(9): 791-795.
72. Fain, J. N., A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema, i sar. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145(5): 2273-2282.
73. Fantuzzi, G. and R. Faggioni (2000). Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 68(4): 437-446.
74. Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, i sar. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(13): 7001-7005.

75. Fenkci, V., S. Fenkci, M. Yilmazer and M. Serteser (2003). Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril.* 80(1): 123-127.
76. Ferland, M., J. P. Despres, A. Tremblay, S. Pinault, i sar. (1989). Assessment of adipose tissue distribution by computed axial tomography in obese women: association with body density and anthropometric measurements. *Br J Nutr.* 61(2): 139-148.
77. Fernandez-Sanchez, A., E. Madrigal-Santillan, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, i sar. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 12(5): 3117-3132.
78. Figueroa-Vega, N., C. Moreno-Frias and J. M. Malacara (2015). Alterations in adhesion molecules, pro-inflammatory cytokines and cell-derived microparticles contribute to intima-media thickness and symptoms in postmenopausal women. *PLoS One.* 10(5): e0120990.
79. Flier, J. S. and E. Maratos-Flier (2010). Lasker lauds leptin. *Cell.* 143(1): 9-12.
80. Fliers, E., F. Kreier, P. J. Voshol, L. M. Havekes, i sar. (2003). White adipose tissue: getting nervous. *J Neuroendocrinol.* 15(11): 1005-1010.
81. Fonseca-Alaniz, M. H., J. Takada, M. I. Alonso-Vale and F. B. Lima (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr.* 83(5 Suppl): 8.
82. Foreyt, J. and K. Goodrick (1995). The ultimate triumph of obesity. *Lancet.* 346(8968): 134-135.
83. Franek, E., J. Nowak, K. Safranow, G. Adler, i sar. (2010). G(-2548)A leptin gene polymorphism in obese subjects is associated with serum leptin concentration and bone mass. *Pol Arch Med Wewn.* 120(5): 175-180.
84. Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, i sar. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* 1(12): 1311-1314.
85. Friedman, J. M. (2004). Modern science versus the stigma of obesity. *Nat Med.* 10(6): 563-569.

86. Friedman, J. M. (2011). Leptin and the regulation of body weigh. *Keio J Med.* 60(1): 1-9.
87. Fruhbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 393(Pt 1): 7-20.
88. Fujimoto, W. Y., R. W. Bergstrom, E. J. Boyko, K. W. Chen, i sar. (1999). Visceral adiposity and incident coronary heart disease in Japanese-American men. The 10-year follow-up results of the Seattle Japanese-American Community Diabetes Study. *Diabetes Care.* 22(11): 1808-1812.
89. Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, i sar. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114(12): 1752-1761.
90. Galic, S., J. S. Oakhill and G. R. Steinberg (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 316(2): 129-139.
91. Gast, K. B., M. den Heijer, J. W. Smit, R. L. Widya, i sar. (2015). Individual contributions of visceral fat and total body fat to subclinical atherosclerosis: The NEO study. *Atherosclerosis.* 241(2): 547-554.
92. Gertler, A., L. Niv-Spector and S. Reicher (2007). Is leptin an important physiological regulator of CRP? *Nature Medicine.* 13(1): 18-19.
93. Ghasemi, A., S. Zahediasl and F. Azizi (2013). Elevated nitric oxide metabolites are associated with obesity in women. *Arch Iran Med.* 16(9): 521-525.
94. Ghilardi, N. and R. C. Skoda (1997). The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol.* 11(4): 393-399.
95. Ghilardi, N., S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, i sar. (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(13): 6231-6235.
96. Glaum, S. R., M. Hara, V. P. Bindokas, C. C. Lee, i sar. (1996). Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol Pharmacol.* 50(2): 230-235.
97. Godfrey, K. M. and D. J. Barker (2000). Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 71(5 Suppl): 1344S-1352S.

98. Gomes, E. C., A. N. Silva and M. R. de Oliveira (2012). Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev.* 2012: 756132.
99. Gong, D. W., S. Bi, R. E. Pratley and B. D. Weintraub (1996). Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem.* 271(8): 3971-3974.
100. Goossens, G. H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav.* 94(2): 206-218.
101. Green, E. D., M. Maffei, V. V. Braden, R. Proenca, i sar. (1995). The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res.* 5(1): 5-12.
102. Grujic, V., N. Dragnic, I. Radic, S. Harhaji, i sar. (2010). Overweight and obesity among adults in Serbia: results from the National Health Survey. *Eat Weight Disord.* 15(1-2): e34-42.
103. Gustafson, B. (2010). Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 17(4): 332-341.
104. Gutierrez-Lopez, L., J. R. Garcia-Sanchez, J. Rincon-Viquez Mde, E. Lara-Padilla, i sar. (2012). Hypocaloric diet and regular moderate aerobic exercise is an effective strategy to reduce anthropometric parameters and oxidative stress in obese patients. *Obes Facts.* 5(1): 12-22.
105. Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, i sar. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269(5223): 543-546.
106. Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.* 55(1 Pt 2): S49-52.
107. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141(2): 312-322.
108. Halliwell, B. and M. Whiteman (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142(2): 231-255.

109. Harlan, S. M., D. A. Morgan, K. Agassandian, D. F. Guo, i sar. (2011). Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation. *Circ Res.* 108(7): 808-812.
110. Hauner, H. and G. Loffler (1987). Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors. Part I: Adipose tissue development and the role of precursor cells. *Klin Wochenschr.* 65(17): 803-811.
111. Havel, P. J. (2000). Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc.* 59(3): 359-371.
112. Hegyi, K., K. Fulop, K. Kovacs, S. Toth, i sar. (2004). Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int.* 28(3): 159-169.
113. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, i sar. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 374(Pt 1): 1-20.
114. Hetherington AW, R. S. (1942). The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat. *J Comp Neurol.* 76: 475.
115. Heymsfield, S. B., A. S. Greenberg, K. Fujioka, R. M. Dixon, i sar. (1999). Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA.* 282(16): 1568-1575.
116. Heyward, H. and M. Stolarczyk (1996). *Applied Body Composition Assessment.* Human Kinetics.
117. Higgins, M., W. Kannel, R. Garrison, J. Pinsky, i sar. (1988). Hazards of obesity--the Framingham experience. *Acta Med Scand Suppl.* 723: 23-36.
118. Hileman, S. M., J. Tornoe, J. S. Flier and C. Bjorbaek (2000). Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology.* 141(6): 1955-1961.
119. Hinney, A., A. Schmidt, K. Nottebom, O. Heibult, i sar. (1999). Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(4): 1483-1486.

120. Hinuy, H. M., M. H. Hirata, N. Forti, J. Diament, i sar. (2008). Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 52(4): 611-616.
121. Hirsch, J. (1984). Research on adipose tissue and the first 25 years of the *Journal of Lipid Research*. *J Lipid Res.* 25(13): 1437-1441.
122. Hoffstedt, J., P. Eriksson, S. Mottagui-Tabar and P. Arner (2002). A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res.* 34(7): 355-359.
123. Hoggard, N., P. Haggarty, L. Thomas and R. G. Lea (2001). Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 2): 57-63.
124. Hollmann, M., B. Runnebaum and I. Gerhard (1997). Impact of waist-hip-ratio and body-mass-index on hormonal and metabolic parameters in young, obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 21(6): 476-483.
125. Holm, L. and C. Sander (1996). Mapping the protein universe. *Science.* 273(5275): 595-603.
126. Hong, Y., J. P. Despres, T. Rice, A. Nadeau, i sar. (2000). Evidence of pleiotropic loci for fasting insulin, total fat mass, and abdominal visceral fat in a sedentary population: the HERITAGE family study. *Obes Res.* 8(2): 151-159.
127. Horvath, T. L., Z. B. Andrews and S. Diano (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab.* 20(2): 78-87.
128. Horvath, T. L., L. M. Garcia-Segura and F. Naftolin (1997). Control of gonadotropin feedback: the possible role of estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity. *Gynecol Endocrinol.* 11(2): 139-143.
129. Horvath, T. L., F. Naftolin, S. P. Kalra and C. Leranth (1992). Neuropeptide-Y innervation of beta-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology.* 131(5): 2461-2467.
130. Howard, J. K., B. J. Cave, L. J. Oksanen, I. Tzamelis, i sar. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of *Socs3*. *Nat Med.* 10(7): 734-738.

131. Hribal, M. L., T. V. Fiorentino and G. Sesti (2014). Role of C reactive protein (CRP) in leptin resistance. *Curr Pharm Des.* 20(4): 609-615.
132. Huang, L. and C. Li (2000). Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res.* 10(2): 81-92.
133. Huang, X. F., I. Koutcherov, S. Lin, H. Q. Wang, i sar. (1996). Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. *Neuroreport.* 7(15-17): 2635-2638.
134. Hunter, S. J. and W. T. Garvey (1998). Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 105(4): 331-345.
135. Ihle, J. N. and I. M. Kerr (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11(2): 69-74.
136. Janssen, I., P. T. Katzmarzyk and R. Ross (2004). Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr.* 79(3): 379-384.
137. Jeffcoate, S. L. (2004). Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on. *Diabet Med.* 21(7): 657-665.
138. Jiang, N., T. C. He, A. Miyajima and D. M. Wojchowski (1996). The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta-receptor chimera. *J Biol Chem.* 271(28): 16472-16476.
139. Joost, H. (2008). Pathogenesis, risk assessment and prevention of type 2 diabetes mellitus. *. Obes Facts.* 1(3): 128–137.
140. Kahn, S. E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 46(1): 3-19.
141. Kao, T. W., I. S. Lu, K. C. Liao, H. Y. Lai, i sar. (2009). Associations between body mass index and serum levels of C-reactive protein. *S Afr Med J.* 99(5): 326-330.
142. Karelis, A. D., D. H. St-Pierre, F. Conus, R. Rabasa-Lhoret, i sar. (2004). Metabolic and body composition factors in subgroups of obesity: what do we know? *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6): 2569-2575.



143. Kellerer, M., M. Koch, E. Metzinger, J. Mushack, i sar. (1997). Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia*. 40(11): 1358-1362.
144. Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(6): 2548-2556.
145. Kloek, C., A. K. Haq, S. L. Dunn, H. J. Lavery, i sar. (2002). Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem*. 277(44): 41547-41555.
146. Klop, B., J. W. Elte and M. C. Cabezas (2013). Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*. 5(4): 1218-1240.
147. Knerr, I., C. Schirl, T. Horbach, A. Stuppy, i sar. (2005). Maturation of the expression of adrenomedullin, endothelin-1 and nitric oxide synthases in adipose tissues from childhood to adulthood. *Int J Obes (Lond)*. 29(3): 275-280.
148. Knudson, J. D., U. D. Dincer, I. N. Bratz, M. Sturek, i sar. (2007). Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance. *Microcirculation*. 14(4-5): 317-338.
149. Koga, M., M. Otsuki, S. Matsumoto, H. Saito, i sar. (2007). Negative association of obesity and its related chronic inflammation with serum glycated albumin but not glycated hemoglobin levels. *Clin Chim Acta*. 378(1-2): 48-52.
150. Kolterman, O. G., R. S. Gray, J. Griffin, P. Burstein, i sar. (1981). Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 68(4): 957-969.
151. Krum, H. and W. T. Abraham (2009). Heart failure. *Lancet*. 373(9667): 941-955.
152. Kuczmarski, R. J., K. M. Flegal, S. M. Campbell and C. L. Johnson (1994). Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA*. 272(3): 205-211.
153. Kurukulasuriya, L. R., S. Stas, G. Lastra, C. Manrique, i sar. (2011). Hypertension in obesity. *Med Clin North Am*. 95(5): 903-917.
154. Kwok, S., P. McElduff and D. Ashton (2008). Indices of obesity and cardiovascular risk factors in British women. *Obes Facts*. 1: 190-195.

155. Lahlou, N., K. Clement, J. C. Carel, C. Vaisse, i sar. (2000). Soluble leptin receptor in serum of subjects with complete resistance to leptin: relation to fat mass. *Diabetes*. 49(8): 1347-1352.
156. Lavie, C. J., A. De Schutter and R. V. Milani (2015). Healthy obese versus unhealthy lean: the obesity paradox. *Nat Rev Endocrinol*. 11(1): 55-62.
157. Lavrovsky, Y., B. Chatterjee, R. A. Clark and A. K. Roy (2000). Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol*. 35(5): 521-532.
158. Le Lay, S., G. Simard, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina (2014). Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev*. 908539(10): 20.
159. Le Lay, S., G. Simard, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina (2014). Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
160. Le Stunff, C., C. Le Bihan, N. J. Schork and P. Bougneres (2000). A common promoter variant of the leptin gene is associated with changes in the relationship between serum leptin and fat mass in obese girls. *Diabetes*. 49(12): 2196-2200.
161. Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, i sar. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 379(6566): 632-635.
162. Lemieux, S., J. P. Despres, S. Moorjani, A. Nadeau, i sar. (1994). Are gender differences in cardiovascular disease risk factors explained by the level of visceral adipose tissue? *Diabetologia*. 37(8): 757-764.
163. Lemieux, S., D. Prud'homme, A. Nadeau, A. Tremblay, i sar. (1996). Seven-year changes in body fat and visceral adipose tissue in women. Association with indexes of plasma glucose-insulin homeostasis. *Diabetes Care*. 19(9): 983-991.
164. Lev-Ran, A. (2001). Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline. *Diabetes Metab Res Rev*. 17(5): 347-362.
165. Li, M. D. (2011). Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight. *Yale J Biol Med*. 84(1): 1-7.
166. Li, W. D., D. R. Reed, J. H. Lee, W. Xu, i sar. (1999). Sequence variants in the 5' flanking region of the leptin gene are associated with obesity in women. *Ann Hum Genet*. 63(Pt 3): 227-234.

167. Loffreda, S., S. Q. Yang, H. Z. Lin, C. L. Karp, i sar. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 12(1): 57-65.
168. Lollmann, B., S. Gruninger, A. Stricker-Krongrad and M. Chiesi (1997). Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 238(2): 648-652.
169. Lopes, H. F., K. L. Martin, K. Nashar, J. D. Morrow, i sar. (2003). DASH diet lowers blood pressure and lipid-induced oxidative stress in obesity. *Hypertension.* 41(3): 422-430.
170. Lopez-Jimenez, F. and M. Cortes-Bergoderi (2011). Update: systemic diseases and the cardiovascular system (i): obesity and the heart. *Rev Esp Cardiol.* 64(2): 140-149.
171. Lopez-Jimenez, F., C. O. Wu, X. Tian, C. O'Connor, i sar. (2008). Weight change after myocardial infarction--the Enhancing Recovery in Coronary Heart Disease patients (ENRICHED) experience. *Am Heart J.* 155(3): 478-484.
172. MacDougald, O. A., C. S. Hwang, H. Fan and M. D. Lane (1995). Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(20): 9034-9037.
173. Mammes, O., D. Betoulle, R. Aubert, V. Giraud, i sar. (1998). Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. *Diabetes.* 47(3): 487-489.
174. Mammes, O., D. Betoulle, R. Aubert, B. Herbeth, i sar. (2000). Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet.* 64(Pt 5): 391-394.
175. Manson, J. E., M. J. Stampfer, C. H. Hennekens and W. C. Willett (1987). Body weight and longevity. A reassessment. *JAMA.* 257(3): 353-358.
176. Manson, J. E., W. C. Willett, M. J. Stampfer, G. A. Colditz, i sar. (1995). Body weight and mortality among women. *N Engl J Med.* 333(11): 677-685.
177. Mantzoros, C. S. (1999). The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med.* 130(8): 671-680.
178. Mantzoros, C. S. and S. J. Moschos (1998). Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin Endocrinol.* 49(5): 551-567.

179. Marin, P., B. Andersson, M. Ottosson, L. Olbe, i sar. (1992). The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism*. 41(11): 1242-1248.
180. Marseglia, L., S. Manti, G. D'Angelo, A. Nicotera, i sar. (2014). Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 16(1): 378-400.
181. Martin, A. D., M. Z. Daniel, D. T. Drinkwater and J. P. Clarys (1994). Adipose tissue density, estimated adipose lipid fraction and whole body adiposity in male cadavers. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 18(2): 79-83.
182. Mathew, B., L. Francis, A. Kayalar and J. Cone (2008). Obesity: effects on cardiovascular disease and its diagnosis. *J Am Board Fam Med*. 21(6): 562-568.
183. Matsuzawa, Y. (2005). White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 19(4): 637-647.
184. Mayer, J. (1969). *Overweight, causes, cost and control*. . New York. Prentice-Hall Inc.
185. McAuley, P. A., H. Chen, D. C. Lee, E. G. Artero, i sar. (2014). Physical activity, measures of obesity, and cardiometabolic risk: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *J Phys Act Health*. 11(4): 831-837.
186. McFarlane, S. I., M. Banerji and J. R. Sowers (2001). Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(2): 713-718.
187. McGill, H. C., Jr., C. A. McMahan, E. E. Herderick, A. W. Zieske, i sar. (2002). Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*. 105(23): 2712-2718.
188. McGinnis, J. M. and P. R. Lee (1995). Healthy People 2000 at mid decade. *JAMA*. 273(14): 1123-1129.
189. McMinn, J. E., D. G. Baskin and M. W. Schwartz (2000). Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obes Rev*. 1(1): 37-46.
190. Mercer, J. G., N. Hoggard, L. M. Williams, C. B. Lawrence, i sar. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*. 387(2-3): 113-116.

191. Messerli, F. H., B. D. Nunez, H. O. Ventura and D. W. Snyder (1987). Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch Intern Med.* 147(10): 1725-1728.
192. Misra, A. and N. K. Vikram (2003). Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots. *Nutrition.* 19(5): 457-466.
193. Mittal, P. C. and R. Kant (2009). Correlation of increased oxidative stress to body weight in disease-free post menopausal women. *Clin Biochem.* 42(10-11): 1007-1011.
194. Mori, H., R. Hanada, T. Hanada, D. Aki, i sar. (2004). Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med.* 10(7): 739-743.
195. Morisco, C., G. Lembo and B. Trimarco (2006). Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends Cardiovasc Med.* 16(6): 183-188.
196. Mueller, W. M., F. M. Gregoire, K. L. Stanhope, C. V. Mobbs, i sar. (1998). Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology.* 139(2): 551-558.
197. Muradian, K. and D. O. Schachtschabel (2001). The role of apoptosis in aging and age-related disease: update. *Z Gerontol Geriatr.* 34(6): 441-446.
198. Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, i sar. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(24): 11349-11353.
199. Murakami, T., T. Yamashita, M. Iida, M. Kuwajima, i sar. (1997). A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(1): 26-29.
200. Must, A., J. Spadano, E. H. Coakley, A. E. Field, i sar. (1999). The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA.* 282(16): 1523-1529.
201. Myers, M. G., Jr. (2004). Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res.* 59: 287-304.

202. Myers, M. G., Jr., S. B. Heymsfield, C. Haft, B. B. Kahn, i sar. (2012). Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. *Cell Metab.* 15(2): 150-156.
203. Naugler, W. E. and M. Karin (2008). The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* 14(3): 109-119.
204. Nguyen, D. M. and H. B. El-Serag (2010). The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am.* 39(1): 1-7.
205. Nguyen, M. T., H. Satoh, S. Favelyukis, J. L. Babendure, i sar. (2005). JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 280(42): 35361-35371.
206. NIH (1998). National Institutes of Health. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults-The Evidence Report. . Bethesda MD: NIH publication.
207. Nikolaidis, M. G., C. M. Kerksick, M. Lamprecht and S. R. McAnulty (2012). Redox biology of exercise. *Oxid Med Cell Longev.* 2012: 407978.
208. Nikolic, D., Z. Gluvic, S. Aksam, M. Obradovic, i sar. (2011). The Role Of Antioxidative Treatment In Diabetes Mellitus. . *Medical Investigations* 45(2): 5-12.
209. Nogueiras, R., H. Wilson, F. Rohner-Jeanrenaud and M. H. Tschop (2008). Central nervous system regulation of adipocyte metabolism. *Regul Pept.* 149(1-3): 26-31.
210. Nolan, J. J., B. Ludvik, J. Baloga, D. Reichart, i sar. (1997). Mechanisms of the kinetic defect in insulin action in obesity and NIDDM. *Diabetes.* 46(6): 994-1000.
211. Olivares-Corichi, I. M., M. J. Viquez, L. Gutierrez-Lopez, G. M. Ceballos-Reyes, i sar. (2011). Oxidative stress present in the blood from obese patients modifies the structure and function of insulin. *Horm Metab Res.* 43(11): 748-753.
212. Olusi, S. O. (2002). Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26(9): 1159-1164.

213. Onat, A., G. S. Avci, M. M. Barlan, H. Uyarel, i sar. (2004). Measures of abdominal obesity assessed for visceral adiposity and relation to coronary risk. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28(8): 1018-1025.
214. Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, T. Nakamura, i sar. (2003). Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 107(5): 671-674.
215. Ozata, M., M. Mergen, C. Oktenli, A. Aydin, i sar. (2002). Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.* 35(8): 627-631.
216. Panic, A., S. Soskic and E. Isenovic (2015). LEPTIN AND ITS MECHANISM OF ACTION. *Medical Investigations.* 49(2).
217. Pantanetti, P., G. G. Garrapa, F. Mantero, M. Boscaro, i sar. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ? A review of recent data related to cardiovascular complications of endocrine dysfunctions. *Clin Exp Hypertens.* 26(4): 387-398.
218. Paracchini, V., P. Pedotti and E. Taioli (2005). Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 162(2): 101-114.
219. Peelman, F., K. Van Beneden, L. Zabeau, H. Iserentant, i sar. (2004). Mapping of the leptin binding sites and design of a leptin antagonist. *J Biol Chem.* 279(39): 41038-41046.
220. Peelman, F., L. Zabeau, K. Moharana, S. N. Savvides, i sar. (2014). 20 years of leptin: insights into signaling assemblies of the leptin receptor. *J Endocrinol.* 223(1): T9-23.
221. Pessin, J. E. and A. R. Saltiel (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106(2): 165-169.
222. Pettitt, D. J., J. R. Lisse, W. C. Knowler and P. H. Bennett (1982). Mortality as a function of obesity and diabetes mellitus. *Am J Epidemiol.* 115(3): 359-366.
223. Pi-Sunyer, F. X. (1993). Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med.* 119(7 Pt 2): 655-660.
224. Pi-Sunyer, F. X. (2000). Obesity: criteria and classification. *Proc Nutr Soc.* 59(4): 505-509.
225. Pi-Sunyer, F. X. (2004). The epidemiology of central fat distribution in relation to disease. *Nutr Rev.* 62(7 Pt 2): S120-126.

- 
226. Pinto, S., A. G. Roseberry, H. Liu, S. Diano, i sar. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. 304(5667): 110-115.
227. Poirier, P., T. D. Giles, G. A. Bray, Y. Hong, i sar. (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 113(6): 898-918.
228. Poitou, C., J. M. Lacorte, M. Coupaye, S. Bertrais, i sar. (2005). Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. *Obes Surg*. 15(1): 11-23.
229. Portoles, O., J. V. Sorli, F. Frances, O. Coltell, i sar. (2006). Effect of genetic variation in the leptin gene promoter and the leptin receptor gene on obesity risk in a population-based case-control study in Spain. *Eur J Epidemiol*. 21(8): 605-612.
230. Pou, K. M., J. M. Massaro, U. Hoffmann, R. S. Vasan, i sar. (2007). Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 116(11): 1234-1241.
231. Powers, S. K. and M. J. Jackson (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*. 88(4): 1243-1276.
232. Prentice, A. M. and S. A. Jebb (2001). Beyond body mass index. *Obes Rev*. 2(3): 141-147.
233. Rahmouni, K., W. G. Haynes, D. A. Morgan and A. L. Mark (2003). Intracellular mechanisms involved in leptin regulation of sympathetic outflow. *Hypertension*. 41(3 Pt 2): 763-767.
234. Rahmouni, K., C. D. Sigmund, W. G. Haynes and A. L. Mark (2005). Mitogen activated protein kinase: a newly discovered mediator of selective leptin actions. *Hypertension*. 46: 867.



235. Rashid, S., B. W. Patterson and G. F. Lewis (2006). Thematic review series: patient-oriented research. What have we learned about HDL metabolism from kinetics studies in humans? *J Lipid Res.* 47(8): 1631-1642.
236. Rask-Madsen, C. and G. L. King (2007). Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 3(1): 46-56.
237. Ravi, G. R., R. Pradeepa and V. Mohan (2004). Hypertriglyceridemia and coronary artery disease--an update. *Indian Heart J.* 56(1): 21-26.
238. Reaven, G. (2001). Syndrome X. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 3(4): 323-332.
239. Reaven, G. M., H. Lithell and L. Landsberg (1996). Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med.* 334(6): 374-381.
240. Riestra, P., A. Garcia-Anguita, E. Viturro, S. Schoppen, i sar. (2010). Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents. *Ann Hum Genet.* 74(4): 335-339.
241. Rizzo, M., N. Abate, M. Chandalia, A. A. Rizvi, i sar. (2015). Liraglutide reduces oxidative stress and restores heme oxygenase-1 and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes: a prospective pilot study. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(2): 603-606.
242. Romero-Corral, A., V. M. Montori, V. K. Somers, J. Korinek, i sar. (2006). Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet.* 368(9536): 666-678.
243. Roytblat, L., M. Rachinsky, A. Fisher, L. Greemberg, i sar. (2000). Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res.* 8(9): 673-675.
244. Russell, A. P., G. Gastaldi, E. Bobbioni-Harsch, P. Arboit, i sar. (2003). Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? *FEBS Lett.* 551(1-3): 104-106.
245. Rzheshesky, A. V. (2013). Fatal "triad": lipotoxicity, oxidative stress, and phenoptosis. *Biochemistry.* 78(9): 991-1000.

246. Saguy, A. C. and K. W. Riley (2005). Weighing both sides: morality, mortality, and framing contests over obesity. *J Health Polit Policy Law*. 30(5): 869-921.
247. Sahin, S., A. Rustemoglu, A. Tekcan, T. Tasliyurt, i sar. (2013). Investigation of associations between obesity and LEP G2548A and LEPR 668A/G polymorphisms in a Turkish population. *Dis Markers*. 35(6): 673-677.
248. Savini, I., M. V. Catani, D. Evangelista, V. Gasperi, i sar. (2013). Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci*. 14(5): 10497-10538.
249. Scarabin, P. Y., A. M. Vissac, J. M. Kirzin, P. Bourgeat, i sar. (1996). Population correlates of coagulation factor VII. Importance of age, sex, and menopausal status as determinants of activated factor VII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 16(9): 1170-1176.
250. Scherer, P. E. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 55(6): 1537-1545.
251. Scheuer, S. H., K. Faerch, A. Philipsen, M. E. Jorgensen, i sar. (2015). Abdominal Fat Distribution and Cardiovascular Risk in Men and Women With Different Levels of Glucose Tolerance. *J Clin Endocrinol Metab*. 100(9): 3340-3347.
252. Seidell, J. (1995). Overweight in Europe. In *International Monitor on Eating Patterns and Weight Control*. 4: 2-6.
253. Sfar, S., R. Boussoffara, M. T. Sfar and A. Kerkeni (2013). Antioxidant enzymes activities in obese Tunisian children. *Nutr J*. 12: 18.
254. Shamsuzzaman, A. S., M. Winnicki, R. Wolk, A. Svatikova, i sar. (2004). Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. *Circulation*. 109(18): 2181-2185.
255. Shelness, G. S. and J. A. Sellers (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol*. 12(2): 151-157.
256. Shimabukuro, M., K. Koyama, G. Chen, M. Y. Wang, i sar. (1997). Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(9): 4637-4641.

257. Shimamura, M., M. Matsuda, S. Kobayashi, Y. Ando, i sar. (2003). Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 301(2): 604-609.
258. Shoelson, S. E., L. Herrero and A. Naaz (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 132(6): 2169-2180.
259. Shulman, G. I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106(2): 171-176.
260. Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91(3C): 31S-38S.
261. Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82(2): 291-295.
262. Sies, H., W. Stahl and A. Sevanian (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 135(5): 969-972.
263. Simopoulos, A. P. and T. B. Van Itallie (1984). Body weight, health, and longevity. *Ann Intern Med.* 100(2): 285-295.
264. Sing, C. F., J. H. Stengard and S. L. Kardia (2003). Genes, environment, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(7): 1190-1196.
265. Singh, P., M. Hoffmann, R. Wolk, A. S. Shamsuzzaman, i sar. (2007). Leptin induces C-reactive protein expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(9): e302-307.
266. Sjostrand, M. and J. W. Eriksson (2009). Neuroendocrine mechanisms in insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 297(1-2): 104-111.
267. Sjostrom, L. (1994). The sagittal diameter is a valid marker of visceral adipose tissue. *Int J Obes (Lond).* 18: 46-52.
268. Sowers, J. R., P. S. Sowers and J. D. Peuler (1994). Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis. *J Lab Clin Med.* 123(5): 647-652.
269. Spiegelman, B. M. and J. S. Flier (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 104(4): 531-543.
270. Stapleton, P. A., M. E. James, A. G. Goodwill and J. C. Frisbee (2008). Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology.* 15(2): 79-89.

272. Stears, A., S. O'Rahilly, R. K. Semple and D. B. Savage (2012). Metabolic insights from extreme human insulin resistance phenotypes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 26(2): 145-157.
273. Stefanovic, A., J. Kotur-Stevuljevic, S. Spasic, N. Bogavac-Stanojevic, i sar. (2008). The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 79(1): 156-163.
274. Stellar, E. (1954). The physiology of motivation. *Psychol Rev.* 61(1): 5-22.
275. Stenlof, K., I. Wernstedt, T. Fjallman, V. Wallenius, i sar. (2003). Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(9): 4379-4383.
276. Stephens, T. W., M. Basinski, P. K. Bristow, J. M. Bue-Valleskey, i sar. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature.* 377(6549): 530-532.
277. Stienstra, R., C. J. Tack, T. D. Kanneganti, L. A. Joosten, i sar. (2012). The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell Metab.* 15(1): 10-18.
278. Stokic, E. (2004). *Gojaznost je bolest koja se leči.* Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
279. Stokic, E., A. Kupusinac, D. Tomic-Naglic, D. Smiljenic, i sar. (2015). Vitamin D and Dysfunctional Adipose Tissue in Obesity. *Angiology.* 66(7): 613-618.
280. Stokic, E., A. Kupusinac, D. Tomic-Naglic, B. K. Zavisic, i sar. (2014). Obesity and Vitamin D Deficiency: Trends to Promote a More Proatherogenic Cardiometabolic Risk Profile. *Angiology.*
281. Stokic, E., A. Kupusinac, D. Tomic-Naglic, B. K. Zavisic, i sar. (2015). Obesity and vitamin D deficiency: trends to promote a more proatherogenic cardiometabolic risk profile. *Angiology.* 66(3): 237-243.
282. Sudar, E., S. Zafirović, M. Obradović, Sanja Soskić, i sar. (2012). GOJAZNOST, REZISTENCIJA NA INSULIN I KARDIOVASKULARNA OBOLJENJA. *Medicinska istraživanja.* 46(2): 54-59.
283. Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. *J Biol Chem.* 272(10): 6093-6096.
284. Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, i sar. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 83(7): 1263-1271.

285. Tereshin, E. V. (2007). [A role of fatty acids in the development of oxidative stress in aging. A hypothesis]. *Adv Gerontol.* 20(1): 59-65.
286. Thompson, D. B., E. Ravussin, P. H. Bennett and C. Bogardus (1997). Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Hum Mol Genet.* 6(5): 675-679.
287. Trayhurn, P. and J. H. Beattie (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 60(3): 329-339.
288. Trayhurn, P. and C. Bing (2006). Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361(1471): 1237-1249.
289. Trayhurn, P., J. B. Douglas and M. M. McGuckin (1982). Brown adipose tissue thermogenesis is 'suppressed' during lactation in mice. *Nature.* 298(5869): 59-60.
290. Vague, J. (1947). La differenciation sexuelle. Facteur determinant des formes de lobesite. . *Presse Med.* 30: 330-340.
291. Vaisse, C., K. Clement, E. Durand, S. Hercberg, i sar. (2000). Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest.* 106(2): 253-262.
292. Vasan, R. S. (2003). Cardiac function and obesity. *Heart.* 89(10): 1127-1129.
293. Vasiljević, V., J. Jorga, J. Stokić, A. Đukić, i sar. (2002). Connection of the distribution type of fatty tissue, metabolic profile and ischemic coronary disease of obese and overweight persons who suffer from diabetes mellitus - type 2. *Medicus.* 3(2): 49-53.
294. Vazquez-Vela, M. E., N. Torres and A. R. Tovar (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 39(8): 715-728.
295. Vincent, H. K. and A. G. Taylor (2006). Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond).* 30(3): 400-418.
296. Viroonudomphol, D., P. Pongpaew, R. Tungtrongchitr, B. Phonrat, i sar. (2000). Erythrocyte antioxidant enzymes and blood pressure in relation to overweight and obese Thai in Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 31(2): 325-334.

- 
297. Wabitsch, M., P. B. Jensen, W. F. Blum, C. T. Christoffersen, i sar. (1996). Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*. 45(10): 1435-1438.
298. Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 21(6): 697-738.
299. Walldius, G. and I. Jungner (2006). The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy--a review of the evidence. *J Intern Med*. 259(5): 493-519.
300. Wang, B. and P. Trayhurn (2006). Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflugers Arch*. 452(4): 418-427.
301. Wang, H. and D. Q. Peng (2011). New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids Health Dis*. 10: 176.
302. Wang, M., B. M. Tsai, K. M. Reiger, J. W. Brown, i sar. (2006). 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 40(2): 205-212.
303. Wang, M. Y., Y. T. Zhou, C. B. Newgard and R. H. Unger (1996). A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett*. 392(2): 87-90.
304. Wang, T. N., M. C. Huang, W. T. Chang, A. M. Ko, i sar. (2006). G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines. *Obesity (Silver Spring)*. 14(2): 183-187.
305. WHO (1989). CINDI- Basic Data Documentation. Kopenhagen. ICP/NCD
306. WHO (2000). World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. . World Health Organ Tech Rep Ser. 894: 1-253.
307. WHO. (2009). "Global Health Risk: Mortality and Burden of Diseases Attributable to Selected Major Risks, WHO, Geneva, December 2009, assessed at  
at  
([http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GlobalHealthRisk\\_report\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisk_report_full.pdf)).".

308. Witteles, R. M. and M. B. Fowler (2008). Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J Am Coll Cardiol.* 51(2): 93-102.
309. Wong, C. Y., T. O'Moore-Sullivan, R. Leano, N. Byrne, i sar. (2004). Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation.* 110(19): 3081-3087.
310. Xia, E., G. Rao, H. Van Remmen, A. R. Heydari, i sar. (1995). Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr.* 125(2): 195-201.
311. Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, i sar. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 112(12): 1821-1830.
312. Yamashita, T., T. Murakami, M. Iida, M. Kuwajima, i sar. (1997). Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes.* 46(6): 1077-1080.
313. Yiannakouris, N., L. Melistas, M. Yannakoulia, K. Mungal, i sar. (2003). The-2548G/A polymorphism in the human leptin gene promoter region is associated with plasma free leptin levels; interaction with adiposity and gender in healthy subjects. *Hormones (Athens).* 2(4): 229-236.
314. Young, L. H. (2010). Diet-induced obesity obstructs insulin signaling in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 298(2): H306-307.
315. Zabeau, L., D. Lavens, F. Peelman, S. Eyckerman, i sar. (2003). The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett.* 546(1): 45-50.
316. Zelissen, P. M., K. Stenlof, M. E. Lean, J. Fogtelloo, i sar. (2005). Effect of three treatment schedules of recombinant methionyl human leptin on body weight in obese adults: a randomized, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab.* 7(6): 755-761.
317. Zhang, F., M. B. Basinski, J. M. Beals, S. L. Briggs, i sar. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature.* 387(6629): 206-209.
318. Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, i sar. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372(6505): 425-432.

# BIOGRAFIJA

Sanja S. Soskić rođena je 24.03.1972. godine u Beogradu. Osnovnu školu "Ivan Gundulić" i Devetu gimnaziju "Mihailo Petrović Alas" završila je u Novom Beogradu. Diplomirala je 30.06.2000. godine na Biološkom fakultetu na smeru Molekularna biologija i fiziologija Univerziteta u Beogradu.

Školske 2000/01. godine upisala poslediplomske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Endokrinologija. Od 2003. godine je zaposlena u Institutu za nuklearne nauke "Vinča" u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku. Magistarsku tezu pod naslovom "Asocijacija genskih polimorfizama u genima za receptore aktivirane peroksizomalnim proliferatorom (PPAR) sa faktorima rizika za nastanak insulin-nezavisnog dijabetesa u humanoj populaciji" je uradila pod rukovodstvom dr Aleksandre Stanković, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke "Vinča" i odbranila je 06.11.2008. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2010. godine je u departmentu "Molekularna endokrinologija i bolesti metabolizma" gde je angažovana na projektu: "Hormonska regulacija ekspresije i aktivnosti azot oksid sintaze i natrijum kalijumove pumpe u eksperimentalnim modelima insulinske rezistencije, dijabetesa i kardiovaskularnih poremećaja" (br. 173033), čiji je rukovodilac prof. dr Esmar Isenović, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča" i redovni profesor Univerziteta privredne akademije u Novom Sadu, Stomatološki fakultet Pančevo. Doktorska disertacija pod naslovom "Asocijacija promena antropometrijskih i metaboličkih parametara i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite sa polimorfizmom LEP G-2548A u genu za leptin kod gojaznih osoba u Srbiji" prihvaćena je na Univerzitetu u Beogradu 25.09.2014. godine.



U svom dosadašnjem radu bila je saradnik na 31 publikaciji koje su objavljene u časopisima međunarodnog i domaćeg značaja, kao i na 12 radova saopštenih na skupovima međunarodnog i domaćeg značaja. Iz objavljenih publikacija do sada ima 128 citata bez autocitata.

Glavna oblast naučno-istraživačkog rada joj je: molekularna endokrinologija, dijabetes, gojaznost i kardiovaskularne bolesti.

# PRILOZI

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сања Соскић

Број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Асоцијација промена антропометријских и метаболичких параметара и

активности ензима антиоксидативне заштите са полиморфизмом LEP G-2548A у гену за

лептин код гојазних особа у Србији"

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 27.07.2016.



# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Соскић

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада "Асоцијација промена антропометријских и метаболичких параметара и активности ензима антиоксидативне заштите са полиморфизмом LEP G-2548A у гену за лептин код гојазних особа у Србији"

Ментор

1. проф. др Есма Р. Исеновић, научни саветник Института за нуклеарне науке "Винча", редовни професор Универзитета привредна академија у Новом Саду, Стоматолошки факултет Панчево
2. проф. др Јелена Ђорђевић, редовни професор Универзитета у Београду, Биолошки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 27.07.2016.



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Асоцијација промена антропометријских и метаболичких параметара и активности ензима антиоксидативне заштите са полиморфизмом LEP G-2548A у гену за лептин код гојазних особа у Србији"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 27.07.2016.

