

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Vanja D. Vidović

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA
ZNAČAJNIH ZA DIFERENCIJACIJU I
AKTIVACIJU MRKOG MASNOSTI SA
INDEKSOM TELESNE MASE, GLIKEMIJOM I
LIPIDNIM STATUSOM ADOLESCENATA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Vanja D. Vidović

**ASSOCIATION OF GENE POLYMORPHISMS
SIGNIFICANT FOR DIFFERENTIATION AND
ACTIVATION OF BROWN ADIPOSE TISSUE
WITH BODY MASS INDEX, GLYCAEMIA AND
LIPID PROFILE OF ADOLESCENTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

MENTORI:

**dr Marina Stamenković Radak, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu- Biološki fakultet**

**dr Nela Maksimović, docent
Univerzitet u Beogradu- Medicinski fakultet**

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

1. dr Marina Stamenković Radak, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu- Biološki fakultet
2. dr Nela Maksimović, docent
Univerzitet u Beogradu- Medicinski fakultet
3. dr Tatjana Damjanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu- Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije rađeno je na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ovom prilikom zahvaljujem se prof. dr Ivani Novaković koja mi je omogućila laboratorijsko istraživanje, u ovoj eminentnoj instituciji, koje je predstavljalo prekretnicu u mom stručnom napredovanju. Posebnu i neizmernu zahvalnost dugujem svojim mentorima doc. dr Neli Maksimović i prof. dr Marini Stamenković Radak na nesebičnoj pomoći, savetima, beskrajnom strpljenju i razumevanju prilikom eksperimentalne izrade, analize rezultata, pisanja i oblikovanja doktorske disertacije.

Veliko hvala kompletnom osoblju Instituta za humanu genetiku za pomoć pri laboratorijskim analizama koji su uvek bili spremni za nesebične savete pri svakoj nedoumici.

Na kraju, ali ne i najmanje važno, želim da se zahvalim svojim roditeljima i bratu na velikoj životnoj podršci, razumevanju i strpljenju tokom svih godina mog školovanja.

Ovaj doktorat, kao krunu mog formalnog obrazovanja posvećujem suprugu Stojku i mojim anđelima Mariji, Milanu i Marku.

Povezanost polimorfizama gena značajnih za diferencijaciju i aktivaciju mrkog masnog tkiva sa indeksom telesne mase, glikemijom i lipidnim statusom adolescenata

Sažetak

Dečija i adolescentna gojaznost predstavlja sve veći problem savremenog društva, a udružena je sa brojnim poremećajima među kojima su najčešći metabolički sindrom i dijabetes tipa II. Imajući u vidu da mrko masno tkivo ima značajnu ulogu u regulaciji telesne mase, metabolizmu glukoze, lipida i energetske homeostazi, u ovom istraživanju rađena je genotipizacija pet jednonukleotidnih polimorfizama u genima značajnim za diferencijaciju i aktivaciju mrkog masnog tkiva (rs12409277 u genu za PRDM16, rs1561589 u genu za CtBP2, rs3856806 u genu za PPAR γ , rs8192678 u genu za PGC-1 α i rs 6265 u genu za BDNF). Cilj istraživanja je bio odrediti učestalosti odgovarajućih genotipova i alela, te ispitati postoji li statistički značajna povezanost između odabranih genotipova sa vrednostima indeksa telesne mase, glikemije i lipidnih parametara u ispitivanom uzorku. Istraživanje je obuhvatilo 308 adolescenata oba pola, uzrasta 15 godina koji su pregledani u okviru Jugoslovenske studije prekursora ateroskleroze kod školske dece. Uzorak je selektovan slučajnim odabirom 217 adolescenata normalnog indeksa telesne mase (ITM \leq 85. percentila) i 91. adolescenta čiji indeks telesne mase prelazi 85 percentila (preuhranjeni i gojazni). Genotipizacija polimorfizama *BDNF*, *PPARG*, i *PPARGC1A* gena rađena je PCR-RFLP metodom. Detekcija genotipova za polimorfizme *PRDM16* i *CtBP2* vršena je primenom PCR-a u realnom vremenu upotrebom TaqMan[®] SNP eseja za genotipizaciju. Rezultati ove studije ukazuju da su nosioci GG genotipa u okviru *BDNF* polimorfizma imali statistički značajno više vrednosti glikemije u odnosu na nosioce GA+AA genotipova (p=0,010). Takođe, u okviru polimorfizama *PPARG* gena uočene su više vrednosti glikemije kod devojčica nosioca CC genotipa u odnosu na nosioce CT+TT genotipa (p=0.030). Statistički značajne razlike u vrednostima lipidnih parametara u odnosu na genotipove zapažene su kod svih ispitivanih polimorfizama izuzev rs6265 polimorfizma. Nije uočena asocijacija ni jednog od analiziranih polimorfizama sa vrednostima indeksa telesne mase kako na ukupnom uzorku, tako ni u grupi normalno uhranjenih i preuhranjenih i gojaznih adolescenata.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

Ključne reči: polimorfizmi gena, *PRDM16*, *CtBP2*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *BDNF*, gojaznost, glikemija, lipidni status.

UDK broj:

Association of gene polymorphisms significant for differentiation and activation of brown adipose tissue with body mass index, glycaemia and lipid profile of adolescents

Abstract

Childhood and adolescent obesity is becoming a major health problem of modern society, and is associated with numerous disorders including metabolic syndrome and type II diabetes. Since brown adipose tissue has important role in regulation of body weight, glucose and lipid metabolism as well as in energy homeostasis, in this research we performed genotypization of five single nucleotide polymorphisms in genes significant for differentiation and activation of brown adipose tissue (rs12409277 in gene for *PRDM16*, rs1561589 in gene for *CtBP2*, rs3856806 in gene for *PPAR γ* , rs8192678 in gene for *PGC-1 α* and rs6265 in gene for *BDNF*). The aim of the study was to determine the frequency of corresponding genotypes and alleles, as well as to determine whether there is a statistically significant association between the selected genotypes and values of body mass index, glycaemia and lipid parameters in the examined sample. The study included 308 adolescents of both genders, 15 years of age who participated in Yugoslav Study of the Precursors of Atherosclerosis in School Children. Subjects were randomly selected including 217 adolescents of normal body mass index (BMI \leq 85. percentile) and 91 adolescents with BMI >91. percentile (overweight and obese). *BDNF*, *PPARG*, and *PPARGC1A* genotyping was performed by PCR-RFLP method. Genotype detection of *PRDM16* and *CtBP2* polymorphisms was examined by Real Time PCR using TaqMan[®] SNP genotyping assays. The results of this study indicate that carriers of GG genotype within the *BDNF* polymorphism had statistically significantly higher glycemic values compared to carriers of GA+AA genotypes ($p=0.010$). Also, within the *PPARG* polymorphism, higher mean values of glycemia were observed in girls carrying the CC genotype compared to carriers of the CT+TT genotypes ($p=0.030$). Statistically significant difference in values of lipid parameters depending on genotypes were observed in all examined polymorphism except in rs6265 polymorphism. No association of any analyzed polymorphisms was observed with body mass index neither in total examined sample, nor in the group of normal, overweight and obese adolescents.

Research field: Biology

Specific research field: Genetics

Key words: gene polymorphisms, *PRDM16*, *CtBP2*, *PPARG*, *PPARGC1A*, *BDNF*, obesity, glycaemia, lipid profile.

UDC number:

SADRŽAJ

I UVOD	1
1.GOJAZNOST	1
1.1.Metabolizam lipida	1
1.2.Vrste masnog tkiva	2
2.BELO MASNO TKIVO (WAT)	3
2.1.Struktura belog masnog tkiva	3
2.2.Poreklo i diferencijacija belog masnog tkiva	4
2.3.Uloga belog masnog tkiva	5
2.4.Endokrina uloga belog masnog tkiva	6
2.5.Regulacija količine belog masnog tkiva	6
3.MRKO MASNO TKIVO	7
3.1.Lokalizacija mrkog masnog tkiva	7
3.2.Struktura mrkog masnog tkiva	8
3.3.Poreklo i diferencijacija mrkog masnog tkiva	9
3.4.Uloga mrkog masnog tkiva	10
3.5.Endokrina uloga mrkog masnog tkiva	12
4.BEŽ MASNO TKIVO	13
5.GENSKI POLIMORFIZMI	13
5.1.PRDM16	14
5.1.1.Struktura gena i proteina	14
5.1.2.Funkcija PRDM16	15
5.1.3.Polimorfizmi <i>PRDM16</i> gena	16
5.2.C-TERMINUS-VEZUJUĆI PROTEIN 2 (CtBP2)	16
5.2.1.Struktura gena i proteina	16
5.2.2.Funkcija CtBP2	17
5.2.3.Polimorfizmi <i>CtBP2</i> gena	18
5.3.PEROKSIZOMNI PROLIFERATOROM AKTIVIRANI RECEPTOR GAMA (PPAR γ)	19
5.3.1.Struktura gena i proteina	19
5.3.2.Funkcija PPAR	20
5.3.3.Polimorfizmi <i>PPARG</i> gena	21
5.4.PEROKSIZOMNI PROLIFERATOROM AKTIVIRANI RECEPTOR GAMA KOAKTIVATOR-1 α (PGC-1 α)	22
5.4.1.Struktura gena i proteina	22
5.4.2.Funkcija PGC-1 α	23
5.4.3.Polimorfizmi <i>PPARGC1A</i> gena	24
5.5.MOŽDANI FAKTOR RASTA (BDNF)	25
5.5.1.Struktura gena i proteina	25
5.5.2.Funkcija BDNF-a	26
5.5.3.Polimorfizmi gena za BDNF	27
6.CILJEVI RADA	29
II MATERIJAL I METODE	30
7.UZORCI	30
8.BIOHEMIJSKE ANALIZE	30
8.1.Glikemija	31
8.2.Ukupan holesterol	31
8.3.HDL holesterol	31
8.4.LDL holesterol	31
8.5.Trigliceridi	31
9.METODE MOLEKULARNO - GENETIČKE ANALIZE	31

9.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi	31
9.2. PCR u realnom vremenu (Real Time PCR)	32
9.3. Analiza polimorfizama rs12409277 gena za PRDM16 i rs1561589 gena za CtBP2	32
9.4. PCR metoda i restrikciona digestija PCR produkata (PCR-RFLPs metoda)	33
9.5. Analiza polimorfizma 1431C>T (rs3856806) gena za PPAR γ	34
9.6. Analiza polimorfizma Gly482Ser (rs8192678) gena za PGC-1 α	35
9.7. Analiza polimorfizma G196A (rs6265) gena za BDNF	36
10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	38
III REZULTATI	39
11. Rezultati genetičkih analiza <i>PRDM16</i> genotipa (rs12409277)	42
12. Rezultati genetičkih analiza <i>CtBP2</i> genotipa (rs1561589)	45
13. Rezultati genetičkih analiza <i>PPARG</i> genotipa (rs3856806)	49
14. Rezultati genetičkih analiza <i>PPARGC1A</i> genotipa (rs8192678)	52
15. Rezultati genetičkih analiza <i>BDNF</i> genotipa (rs6265)	56
IV DISKUSIJA	60
16. ANALIZA <i>PRDM16</i> POLIMORFIZMA	61
17. ANALIZA <i>CtBP2</i> POLIMORFIZMA	63
18. ANALIZA <i>PPARG</i> POLIMORFIZMA	64
19. ANALIZA <i>PPARGC1A</i> POLIMORFIZMA	67
20. ANALIZA <i>BDNF</i> POLIMORFIZMA	71
V ZAKLJUČCI	74
VI LITERATURA	76
LISTA SKRAĆENICA	90

I UVOD

1. GOJAZNOST

Gojaznost predstavlja sve veći problem savremenog društva koji utiče na sve socio-ekonomske kategorije, nezavisno od godina, pola i nacionalnosti. Posledica je pozitivnog energetskog balansa u organizmu koji nastaje kada je produkcija energije veća od potrošnje (1). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO) gojaznost predstavlja jedan od najznačajnijih faktora koji doprinose razvoju bolesti. Procenjuje se da je oko 500 miliona ljudi širom sveta gojazno, dok je 1.4 milijarde ljudi prekomerno uhranjeno (2). Gojaznost je uzrok smanjene radne sposobnosti, kvaliteta života ljudi, kao i morbiditeta i mortaliteta. Takođe, gojaznost se dovodi u vezu sa porastom učestalosti dislipidemije, povišenog krvnog pritiska, insulinske rezistencije, dijabetesa tipa II i kardiovaskularnih bolesti. Osobe koje imaju prekomernu telesnu težinu imaju povećan rizik za oboljevanje od malignih bolesti, bolesti jetre i srca (3,4). Poseban problem predstavlja progresivna učestalost gojaznosti kod dece i omladine. Etiopatogeneza dečije i adolescentne gojaznosti je multifaktorska i rezultat je interakcije genetičkih, neuroendokrinih, metaboličkih i bihevioralnih faktora sa faktorima spoljašnje sredine. Kao i kod odraslih osoba, gojaznost kod adolescenata je udružena sa metaboličkim, kardiovaskularnim, psihološkim, ortopedskim, neurološkim, respiratornim i drugim poremećajima. Među njima najčešći su metabolički sindrom i dijabetes tipa II. Procenjuje se da je porast prevalencije gojaznosti kod dece posebno izražen u zemljama Severne Amerike i Evrope, gde iznosi od 0,5% do 1% za svaku godinu u poslednje dve decenije. Od ukupnog broja školske dece u svetu, smatra se da je oko 10% preuhranjeno, od čega je četvrtina gojazna. Epidemiološki podaci pokazuju da 4% svih adolescenata i 30% gojaznih adolescenata u SAD ima metabolički sindrom. Kod dece i adolescenata sa teškim oblikom gojaznosti prevalencija rezistencije na insulin dostiže 30-50% (5).

Univerzalno prihvaćen standard za definisanje gojaznosti i merenje stepena gojaznosti je indeks telesne mase (ITM) (6). Osobe koje su normlano uhranjene imaju vrednosti ITM u rasponu od $18,5 \text{ kg/m}^2$ - $24,9 \text{ kg/m}^2$. Vrednosti manje od $18,5 \text{ kg/m}^2$ ukazuju na pothranjenost, dok se prekomerno uhranjenjem osobama smatraju one čija je vrednost ITM od 25 kg/m^2 do $29,9 \text{ kg/m}^2$. Kada je reč o dečijoj i adolescentnoj gojaznosti, Centar za kontrolu i prevenciju bolesti SAD deklarirao je sledeće kategorije: gojazni (ITM ≥ 95 percentila), prekomerno uhranjeni (ITM ≥ 85 percentila), normalne telesne mase (ITM ≤ 85 percentila) i potranjeni (ITM < 5 percentila) (7).

1.1. Metabolizam lipida

Lipidi su mali hidrofobni molekuli koji imaju važnu ulogu u održavanju ćelijske strukture, obezbeđivanju energije i ćelijske signalizacije. Prilikom hidrolize lipidi se razlažu na masne kiseline ili kompleksne alkohole koji mogu da se kombinuju sa masnim kiselinama. Prema metaboličkim aktivnostima lipidi se dele na: holesterol i estre holesterola, trigliceride, fosfolipide i masne kiseline (8).

Holesterol je steroid koji je esencijalan u svim ćelijama u organizmu čoveka i ima veoma važnu ulogu u formiranju nervnih i moždanih ćelija. Takođe, holesterol je neophodan u stvaranju estrogena, testosterona i vitamina D (9). Holesterol se u značajnoj meri sintetise u jetri i tankom crevu, ali i sve druge ćelije su u mogućnosti da ga stvaraju izuzev eritrocita. Oko dve trećine holesterola u plazmi je estrifikovano s masnim kiselinama pri čemu nastaju estri holesterola. Iz jetre i tankog creva holesterol se transportuje u plazmu, gde se oko 75% estrifikuje, dok je preostala količina neestrifikovana (10). S obzirom da je holesterol nerastvorljiv u krvi, on se transportuje u plazmu pomoću lipoproteina. Lipoproteini plazme se sastoje od apolipoproteina i lipida, a osnovna funkcija im je transport lipida između tkiva. Transport i obrada lipida regulisani su lipoproteinskim receptorima koji se nalaze na površini ćelije. Lipoproteini su klasifikovani na osnovu odnosa lipida i apolipoproteina, dijametra, molekulske mase i gustine. S obzirom da su lipoproteini lakši od drugih serumskih proteina,

razlikujemo hilomikrone, lipoproteine veoma niske gustine (VLDL), lipoproteine intermedijarne gustine (IDL), lipoproteine niske gustine (LDL) i lipoproteine velike gustine (HDL) (11).

Hilomikroni su najlakši lipoproteini čija je gustina manja od plazme. Odgovorni su za transport masti, a sintetišu se i oslobađaju iz intestinalnih epitelijalnih ćelija. U sastav hilomikrona ulazi estrifikovani holesterol i resintetisani trigliceridi, te apoB-48 i fosfolipidi.

Lipoproteini veoma niske gustine (VLDL) se sintetišu u lumenu endoplazmatskog retikuluma hepatocita. Ovi lipoproteini transportuju endogene trigliceride i holesterol sintetisan u jetri iz ugljenih hidrata, glicerola i masnih kiselina. VLDL postoji u dve forme. VLDL₁ su veće čestice i sadrže velike količine triglicerida i VLDL₂, koje su manje i sadrže manje količine triglicerida.

Lipoproteini srednje gustine (IDL) su grupa lipoproteina koja se formira pri prelasku VLDL u IDL. IDL sadrži endogene trigliceride i holesterol, a od apolipoproteina ApoB i E. Ukoliko se uklone apolipoproteini i trigliceridi preostaje IDL (9).

Lipoproteini niske gustine (LDL) nastaju u jetri iz IDL uklanjanjem triglicerida i apolipoproteina pre nego što se izluče u plazmu. LDL sadrži visoke koncentracije holesterola, te ga i transportuje u ćelije. Katabolizam LDL-a se odigrava u jetri i perifernim tkivima.

Lipoproteini visoke gustine (HDL) su najmanje čestice lipoproteina i imaju najveću gustinu. Veoma su bogati proteinima, sadrže približno iste količine holesterola i fosfolipida i jako malo triglicerida. HDL je uključen u transport holesterola iz ćelija u jetru.

Metabolizam lipoproteina je složen proces koji se odvija u dva pravca - endogenom i egzogenom. Najznačajniji mehanizam u metabolizmu lipoproteina je interakcija između apolipoproteina na površini lipoproteina i receptora na površini različitih ćelija. Ovaj mehanizam je veoma značajan kod uklanjanja potencijalno aterogenih lipoproteina iz krvi i perifernih tkiva (10).

Trigliceridi su najznačajniji rezervni oblici energije i predstavljaju este holesterola čija se sinteza odvija u masnom tkivu i jetri. Trigliceridi koji su sintetisani u jetri transportuju se u plazmu, dok trigliceridi iz masnog tkiva ostaju u ćelijama adipocita i služe kao izvor energije ili se lipolizom prevode u masne kiseline i glicerol pre ulaska u krvotok (9,10).

1.2. Vrste masnog tkiva

Za gojaznost je karakteristična hiperplazija i/ili hipertrofija masnog tkiva. Kada su u pitanju vrste masnog tkiva kod čoveka, prema dominantnoj vrsti adipocita ona se uglavnom dele na belo, (*White adipose tissue, WAT*), mrko (*Brown adipose tissue, BAT*) i bež (*beige/brite*) masno tkivo (12). Međutim, pored ove "osnovne podele", u literaturi su takođe opisani adipociti koštane srži (*bone marrow adipose tissue, BMAT, MAT*) kao i "pink", odnosno roze adipociti (13). Belo masno tkivo je specijalizovano vezivno tkivo čija je primarna funkcija skladištenje energije u formi triglicerida. Pored ove uloge, masno tkivo ima ulogu u regulaciji inflamacije, imunog odgovora, hematopoeze i osteogeneze. Takođe, ono je i endokrini organ koji sintetiše adipokine, lipokine, inflamatorne i druge adipokine koji regulišu metabolizam i insulinsku rezistenciju. Za razliku od belog masnog tkiva, intermedijarna forma adipocita, inducibilni bež adipociti koji se nalaze unutar belog masnog tkiva imaju sličnu funkciju kao i mrko masno tkivo, odnosno učestvuju u termogenezi bez drhtanja i rasipanju energije u vidu toplote (14,15).

Kada je reč o adipocitima koji se nalaze unutar koštane srži, odnosno masnim tkivom koštane srži ono se nalazi u šupljinama koštane srži i predstavlja oko 10% ukupne masti u organizmu odrasle osobe preko 25 godina starosti (16). Kod čoveka BMAT se nalazi u rebrima, grudnoj kosti, pršljenovima i medularnim kanalima dugih kostiju (17). Pri rođenju, šupljine kostiju čoveka su predominantno popunjene crvenom koštanom srži čiji se volumen značajno smanjuje kako organizam stari, te se zamenjuje žutom koštanom srži koja zapravo predstavlja masne depoe (16). Crvena i žuta koštana srž se razlikuju u svojim histološkim i fiziološkim karakteristikama. Crvena koštana srž u kojoj su aktivni hematopoetski i metabolički procesi razvoja kostiju sadrže znatno manje adipocita (45%) u odnosu na žutu koštanu srž u kojoj su hematopoetski procesi skoro u potpunosti odsutni, gde adipociti čine skoro 90% koštane mase (17). Shodno tome, BMAT se može podeliti na konstitutivno (cMAT) i regulatorno (rMAT) masno tkivo. Dakle, regulatorni BMAT utiče na

hematopoezu, te se razvija u toku života, dok je konstitutivni BMAT značajan u ranoj fazi razvoja (18). BMAT je metabolički aktivan organ čija se uloga ogleda u prezervaciji energije, sekreciji različitih proteina uključujući adiponektin, dipeptidilnu peptidazu IV i faktor stem ćelija koji mogu da utiču na regulaciju celokupnog metabolizma (17). Porast akumulacije BMAT se dovodi u vezu sa oseporozom, starenjem, dijabetesom tipa I, deficijencijom estrogena, te brojnim drugim patološkim stanjima uključujući maligne tumore (16).

U skorije vreme, u literaturi su opisani i roze, odnosno “pink” adipociti koji su okarakterisani kao subkutani masni depoi koji nastaju tokom perioda trudnoće i laktacije. Roze adipociti su epitelijalne ćelije mlečnih žlezda čija je osnovna funkcija sekrecija mleka. Smatra se da su nastali transdiferencijacijom iz subkutanih depoa belih adipocita. U roze adipocitima se takođe eksprimira leptin, a pored sekrecije mleka pink adipociti luče i leptin (19).

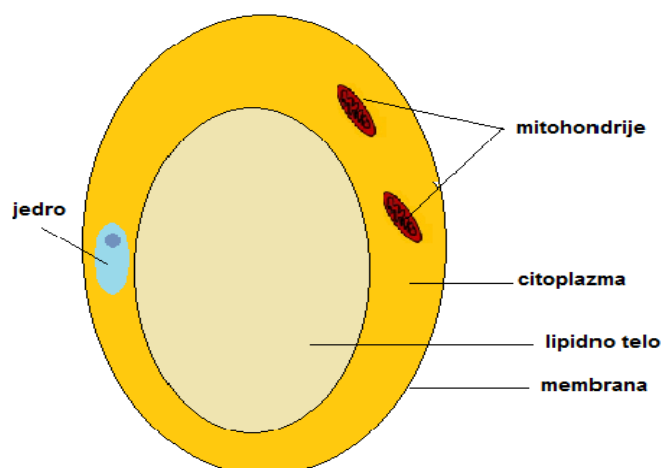
Međutim, poslednjih nekoliko godina brojna istraživanja se baziraju na pokušaju razumevanja molekularno-genetičkog mehanizma regulacije mrkog masnog tkiva za koje se smatra da ima značajnu ulogu u regulaciji telesne mase, metabolizmu glukoze i lipida i energetske homeostazi. Interesovanje za mrko masno tkivo značajno je poraslo nakon otkrića da je ovo tkivo prisutno ne samo kod novorođenčadi već i kod odraslih osoba (20). To je pokrenulo brojna pitanja o fiziologiji i funkciji mrkog masnog tkiva, njegovom mogućem uticaju na zdravlje i mogućnostima terapije gojaznosti i njenih komorbiditeta. Identifikacija gena kandidata koji imaju ulogu u razvoju gojaznosti kod dece, kao i metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa II u značajnoj meri bi mogli doprineti razumevanju mehanizma nastanka ovih oboljenja i povećati efikasnost njihove terapije.

2. BELO MASNO TKIVO (WAT)

2.1. Struktura belog masnog tkiva

Količina i lokalizacija belog masnog tkiva kod čoveka zavise od pola, starosti jedinke i načina ishrane. U organizmu čoveka opisana su dva glavna depoa belog masnog tkiva. Subkutani depoi koji čine 80% ukupnog masnog tkiva, nalaze se ispod kože u hipodermu i velikim delom obezbeđuju termičku zaštitu (21). Belo masno tkivo koje oblaže unutrašnje organe poput bubrega ili velikih krvnih sudova naziva se visceralno. Ova dva depoa masnog tkiva imaju različite molekularne, ćelijske i anatomske karakteristike (22,23). Za adipocite belog masnog tkiva karakteristično je prisustvo jednog lipidnog tela u diferenciranim funkcionalnim ćelijama, zbog čega se označavaju i kao unilocularna. Beli adipociti su uglavnom okruglaste ćelije čija veličina varira od 25 do 200 μm , a razlog njihovog uvećanja jeste akumulacija masti u ćeliji (24). Najveći deo zapremine belog adipocita zauzima “prazan” okruglast prostor. Nukleus je potisnut na periferiju ćelije, spljošten je i ima polumesečast oblik. Estri holesterola i triglicerida su smešteni u središnjem delu lipidnog tela, a na površini se nalazi fosfolipidni jednosloj čija je hidrofilna površina okrenuta ka citoplazmi. Na taj fosfolipidni sloj naležu različiti proteini koji s njim uspostavljaju vezu, a tip proteina zavisi od diferenciranosti adipocita kao i njegovog trenutnog metaboličkog stanja (21,23), (slika 1).

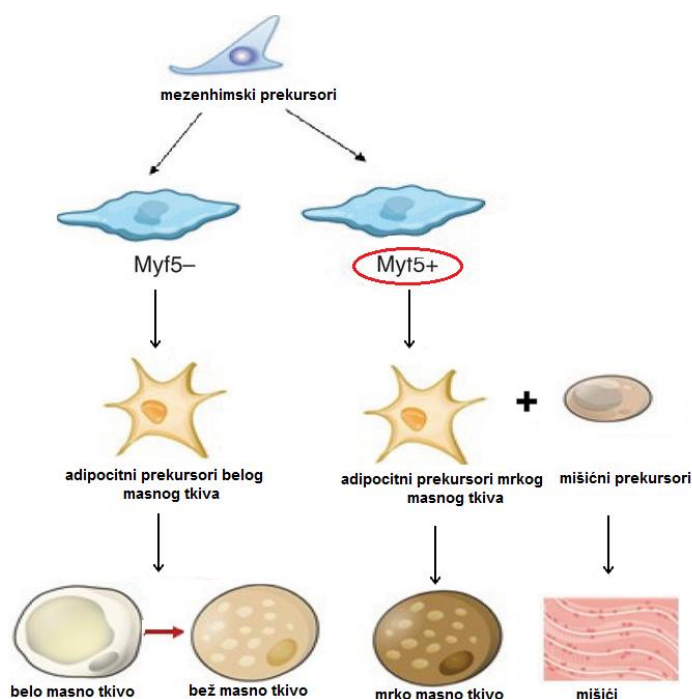
Pored adipocita, masno tkivo je građeno od ekstracelularnog matriksa, makrofaga, leukocita, fibroblasta i endotelskih ćelija koje se nazivaju stromalna vaskularna frakcija ili stroma. Stroma ima ulogu u inervaciji i vaskularizaciji masnog tkiva. Belo masno tkivo je dobro prokrvljeno i inervisano. Inervacija masnog tkiva je parasimpatička i simpatička. Parasimpatikus smanjuje lipolizu i insulinsku senzitivnost, dok simpatikus podstiče lipolizu i termogenezu (12).



Slika 1. Struktura adipocita belog masnog tkiva (25)

2.2. Poreklo i diferencijacija belog masnog tkiva

Uprkos razlikama u razvoju i fiziološkim funkcijama belih i mrkih adipocita, oba tipa ćelija imaju veoma sličan proces diferencijacije (26). Diferencijacija preadipocita u adipocite je regulisana nizom transkripcionih faktora koji koordinišu ekspresiju stotina proteina odgovornih za fenotip zrelih adipocita (27). Beli adipociti se diferenciraju iz mezenhimske, matične ćelije svih vezivnih tkiva. Od ekspresije miogenog faktora 5 (Myf5) zavisi i opredeljivanje adipocitnih prekursora. Myf5 pozitivni prekursori zajednički su za mrke adipocite i skeletne mišiće, dok su prekursori kod kojih nema ekspresije ovog antigena zajednički za lozu belih i bež adipocita (28), (slika 2).



Slika 2. Diferencijacija adipocita belog, bež i mrkog masnog tkiva (29)

Dakle, adipociti nastaju od mezenhimskih ćelija koje se diferenciraju u lipoblaste (preadipocite). Lipoblasti belog masnog tkiva su ćelije vretenaste forme u čijoj citoplazmi počinju da se nagomilavaju sve brojnija lipidna tela malog prečnika koja postepeno počinju da se sjedinjuju u

jedno lipidno telo. Pored toga, u lipoblastima dolazi do pojave brojnih enzima čija je funkcija akumulacija i razlaganje masnih kiselina. Takođe, jedro menja svoj oblik, odnosno od jajolikog ono postaje srpasto, te biva potisnuto na periferiju ćelije. Paralelno s tim, dolazi do promene oblika ćelije koja postaje loptasta (21).

Shodno tome, ove ćelije će se u toku embrionalnog razvoja diferencirati u adipocite ekspimirajući transkripcione faktore PPAR γ /RXR (peroksizomnim proliferatorom aktivirani receptor γ /retinoidni X receptor) (23). Proces adipogeneze započinje aktivacijom CCAAT/pojačivač vezujućeg proteina β (C/EBP β) koji inicira ekspresiju PPAR γ i C/EBP α vezivanjem za njihove promotore, a kompleks PPAR γ /C/EBP α pokreće kaskadnu aktivaciju velikog broja gena koji profilišu fenotip adipocita. Indukcijom ekspresije SREBP1c (engl. *steroid response element-binding protein1c*) u CD137 negativnim prekursorima aktivira se kaskada gena što rezultuje stvaranjem belih adipocita (30).

C/EBP proteini pripadaju superfamiliji transkripcionih faktora koja sadrži domen baznog leucinskog zatvarača (engl. *Basic Leucine Zipper Domain, bZIP domain*) i predstavlja najveću grupu eukariotskih transkripcionih faktora. Opisano je šest izoformi koje formiraju homo i hetero dimere koji se vezuju za konsenzus sekvence određenih gena. Uloga C/EBP nije ograničena samo na adipocite, već se uloga ovih proteina može videti i u terminalnoj fazi diferencijacije granulocita i hepatocita (31).

C/EBP α je najvažnija izoforma ovog proteina u diferencijaciji belih adipocita (27). Frytag i saradnici su pokazali da ektopična ekspresija C/EBP α u različitim ćelijskim linijama fibroblasta može indukovati adipogenezu (32). Takođe, miševi kojima je nedostajao C/EBP α umirali su brzo nakon rođenja zbog nemogućnosti proizvodnje glukoze. Dakle, pored funkcije koju C/EBP α obavlja u formiranju adipocita, C/EBP α je veoma važan u procesu glukoneogeneze koji se odvija u jetri. Inaktivacija C/EBP α u svim tkivima osim u jetri dokazuje da je C/EBP α neophodan u formiranju belih adipocita. Međutim, C/EBP α ne učestvuje u formiranju mrkog masnog tkiva. Iako PPAR γ i C/EBP α direktno utiču na diferencijaciju belih adipocita, istraživanja na fibroblastima miša pokazala su da PPAR γ može indukovati adipogenezu u odsustvu C/EBP α . Međutim, važno je napomenuti da je funkcija C/EBP α tokom terminalne faze adipogeneze veoma važna, s obzirom da nemogućnost ekspresije C/EBP α rezultira insulinskom rezistencijom kao i nemogućnošću diferencijacije belog masnog tkiva *in vivo* (27).

2.3. Uloga belog masnog tkiva

Ćelije belog masnog tkiva imaju mogućnost skladištenja energije u formi triglicerida i oslobađanja energije u formi slobodnih masnih kiselina (33). Slobodne masne kiseline ulaze u adipocite posredstvom pasivne difuzije ili aktivnog transporta. Kada je koncentracija slobodnih masnih kiselina u krvotoku visoka, one se posredstvom pasivne difuzije transportuju u adipocite, dok je aktivan transport aktuelan onda kada je koncentracija slobodnih masnih kiselina niska (34). S obzirom da slobodne masne kiseline i njihovi metabolički produkti mogu biti toksični, homeostatski mehanizam obezbeđuje balans između skladištenja i mobilizacije energije, te se samim tim sprečava akumulacija toksičnih lipida u perifernim organima (35). Ovaj mehanizam funkcioniše tako što adipociti postprandijalno preuzimaju neestriфикovane slobodne masne kiseline iz cirkulacije čime sprečavaju njihov lipotoksični efekat, a u vreme gladovanja i fizičke aktivnosti lipolizom oslobađaju slobodne masne kiseline i glicerol koje služe kao izvor energije (36).

Kada je belo masno tkivo stimulirano neuralnim ili hormonskim mehanizmima trigliceridi se razgrađuju u glicerol i slobodne masne kiseline u procesu koji se zove mobilizacija. Masne kiseline prolaze kroz membranu adipocita i ulaze u krvotok gde se vežu za albumin i na taj način transportuju do drugih ćelija koje koriste masne kiseline kao izvor energije (37). Mobilizacija masti, odnosno lipoliza je pod uticajem niza hormona. Norepinefrin, glukagon i hormoni rasta iniciraju seriju metaboličkih koraka koji utiču na aktiviranje lipaze. Suprotno od delovanja ovih kateholamina, insulin ima antilipolitički efekat. Insulin inicira skladištenje masti tako što stimuliše sintezu lipidnih enzima (acetil CoA karboksilazu, malonil CoA transacilazu i druge) i time suprimira degradaciju

lipida inhibišući delovanje hormon zavisne lipaze. Na taj način sprečava se oslobađanje masnih kiselina (23).

2.4. Endokrina uloga belog masnog tkiva

Adipociti aktivno sintetišu i luče hormone, faktore rasta i citokine. Između ostalog, adipociti luče leptin i adiponektin, peptidne hormone koji su uključeni u regulaciju energetske homeostaze (12). Leptin je hormon koji direktno utiče na suprimiranje unosa hrane i na potrošnju energije. Deficit kalorijskog unosa i mršavljenje za posledicu imaju smanjenje nivoa leptina. Takođe, osobe kod kojih postoji urođena leptinska insuficijencija su gojazne, mada se kod većine može uočiti hiperleptinemija zbog rezistencije specifičnih receptora (30,38). Glukokortikoidi, insulin, faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) i estrogeni stimulišu lučenje leptina, dok slobodne masne kiseline, β_3 adrenerička aktivacija i hormoni rasta inhibišu njegovu sekreciju (39). Leptin je veoma značajan faktor u stimulaciji oksidacije slobodnih masnih kiselina u mišićima (40,41).

Adiponektin je insulin-senzitivni hormon i jedan od najrasprostranjenijih proteina plazme. Stvara se u zrelih adipocitima, a prisustvo RNK je veće u perifernom masnom tkivu u odnosu na visceralno. Receptori adiponektina se eksprimiraju u jetri i mišićima. Uključen je u proces oksidacije masti u jetri i skeletnim mišićima, te smanjuje postprandijalnu hiperglikemiju (42).

TNF- α je proinflamatorni citokin koji se između ostalog produkuje u adipocitima. Slobodne masne kiseline stimulišu proizvodnju TNF- α u makrofagama, dok TNF- α stimuliše lipolizu u adipocitima i lipogenezu u jetri (43,44). TNF- α ispoljava svoje efekte vezujući se za dva receptora, TNFR1 i TNFR2. Receptori i gen za TNF- α su eksprimirani i modulirani u adipocitima, a neki od njihovih metaboličkih efekata rezultuju inhibicijom diferencijacije zrelih adipocita. Kao posledica javlja se insulinska rezistencija kao i povećan nivo slobodnih masnih kiselina. Na ovaj način takođe dolazi do smanjene ekspresije PPAR γ i drugih gena uključenih u utilizaciju lipida i glukoze (42,45).

Interleukin-6 (IL-6) je još jedan od adipokina koji se stvara u adipocitima, iako ga primarno produkuju T limfociti i makrofagi. Od ukupne koncentracije IL-6, 1/3 se produkuje u adipocitima. Prisustvo IL-6 je dva do tri puta veće u visceralnom masnom tkivu u odnosu na periferno. IL-6 inhibiše aktivnost lipoprotein lipaze i smanjuje diferencijaciju preadipocita u zrele adipocite (42,46). Masno tkivo luči i angiotenzinogen, rezistin, visfatin, plazminogen aktivatora inhibitor 1, adipsin, a proizvodi i steroidne hormone (testosteron, estrogen i glukokortikoide). Polni hormoni i glukokortikoidi se ne sintetišu *de novo*, već se pomoću specifičnih enzima eksprimiranih u adipocitima pretvaraju iz inaktivnih formi u aktivne (23, 47–49).

2.5. Regulacija količine belog masnog tkiva

Endokrini sistem kontroliše tkiva i organe koji učestvuju u regulaciji telesne težine i metabolizma. Međusobno povezani hormonski i nervni signali koji proističu iz masnog tkiva, digestivnog trakta i centralnog nervnog sistema kontrolišu apetit, glad i energetske homeostazu. Količina masnog tkiva regulisana je kroz dva fiziološka sistema. Prvi sistem, kratkotrajno reguliše masu te kontroliše apetit i metabolizam na dnevnom nivou. Dva peptidna hormona koja se stvaraju u gastrointestinalnom traktu: grelin - stimulator apetita i neuropeptid YY (PYY) - supresor apetita, veoma su značajni za ovu vrstu regulacije. Grelin je mali polipeptid koga sintetišu гастриčne epitelne ćelije. Iako mu je glavna uloga stimulacija apetita, on utiče i na prednji režanj hipofize kako bi se lučio hormon rasta. Kod ljudi, grelin funkcioniše preko receptora lociranih u hipotalamusu, povećavajući osećaj gladi. S druge strane, mali gastrointestinalni hormon neuropeptid YY, koji se stvara u tankom crevu ima veoma važnu ulogu u gubitku težine tako što daje osećaj sitosti neposredno posle uzimanja obroka. Takođe deluje preko receptora u hipotalamusu koji suprimiraju apetit (23,50).

Drugi sistem je povezan sa dugotrajnom regulacijom telesne težine, što znači da kontinuirano kontroliše unos hrane. Pored tiroidnih hormona i glukokortikoida, dva glavna hormona koja utiču na ovaj sistem su leptin i insulin. Leptin proizvode adipociti a koncentracija u krvotoku mu je proporcionalna ukupnoj količini masti u organizmu. Porast nivoa leptina daje informaciju da je

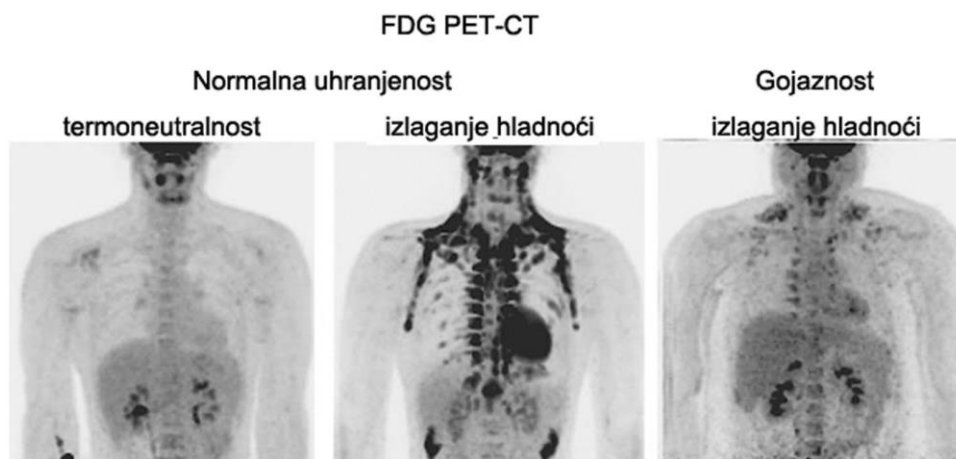
organizam sit i apetit se smanjuje, dok pad nivoa leptina stimuliše apetit. Kada u organizmu postoji nedostatak leptina ili receptora za leptin, javlja se povećana želja za unosom hrane. S druge strane, insulin, hormon pankreasa, pored uloge u regulaciji nivoa glukoze u krvi uključen je i u regulaciju metabolizma masnog tkiva (23).

3. MRKO MASNO TKIVO

3.1. Lokalizacija mrkog masnog tkiva

Za razliku od belog masnog tkiva čija je primarna uloga skladištenje energije, mrko masno tkivo ima veoma značajnu ulogu u održavanju telesne temperature, regulaciji energetskog balansa i telesne težine. Takođe, mrko masno tkivo utiče na metabolizam glukoze i lipida. Ovo tkivo je metabolički veoma aktivno, te koristi hemijsku energiju za proizvodnju toplote (51,52). Naime, kod hibernatorskih životinja i novorođenih sisara postoje dva mehanizma termogeneze. Prvi oblik, termogeneza drhtanjem, podrazumeva kontrakcije skeletnih mišića prilikom izlaganja hladnoći, dok se kod drugog oblika, termogeneze bez drhtanja, stvaranje toplote odvija u mrkom masnom tkivu (51, 53).

Ranije se smatralo da mrko masno tkivo, ukoliko je reč o ljudima, postoji samo kod fetusa i novorođenčadi, dok ga kod odraslih ljudi nema, ili ga ima u veoma malim količinama. Kod novorođenčadi mrko masno tkivo čini oko 5% ukupne telesne mase i lokalizovano je na leđima, uz gornju polovinu kičme prema ramenima (54). Količina mrkog masnog tkiva se smanjuje kako organizam raste, ali je još uvek široko rasprostranjeno u prvoj deceniji života u aksilarnim, paravertebralnim, sternalnim i abdominalnim regionima tela. Kasnije, ono nestaje iz skoro svih regiona osim u predelu oko bubrega, adrenalnih žlezda, toraksa, vrata, te velikih krvnih sudova poput aorte (23). Međutim, kliničke opservacije kod pacijenata koji su imali maligne tumore pokazale su prisutnost mrkog masnog tkiva kod odraslih. Naime, fluoro-deoksi-glukozna pozitrona emisija tomografija (FDG PET), veoma značajna metoda u dijagnostici malignih tumora, pokazala je bilateralnu apsorpciju glukoze u predelu ramena kod nekih pacijenata (slika 3). Kasnije se utvrdilo da se apsorpcija glukoze značajno povećala nakon akutne izloženosti hladnoći. Nakon izolacije tkiva iz ovih regiona tela utvrđeno je prisustvo brojnih adipocita u kojima je ekspimiran dekupljujući protein UCP1 (*uncoupling protein 1* UCP1) (20).



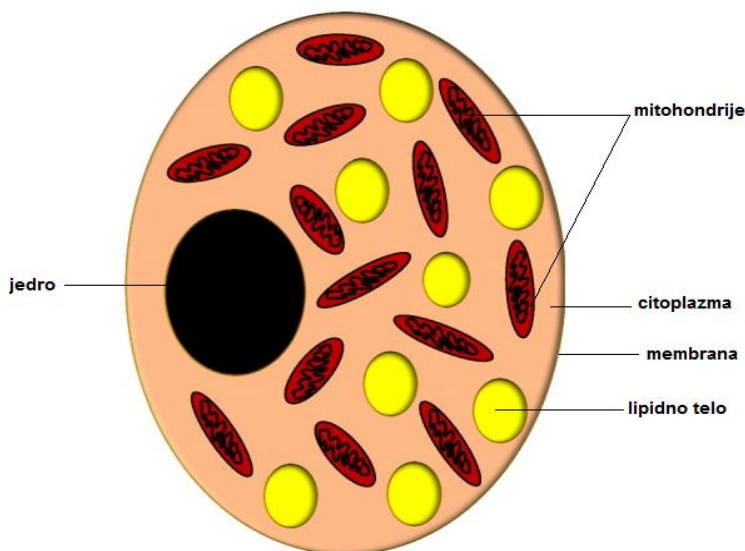
Slika 3. Detekcija mrkog masnog tkiva FDG PET-CT metodom kod gojaznih i normalno uhranjenih osoba pri termoneutralnoj temperaturi i izloženosti hladnoći (55)

Takođe, volumen i aktivnost mrkog masnog tkiva posebno rastu tokom puberteta kod adolescenata oba pola. To se može objasniti uticajem steroidnih polnih hormona kao i hormona rasta (56). Smatra se da estrogen ima značajan efekat u regulaciji potrošnje energije kod oba pola. Estrogen

moduliše ekspresiju adipogenih transkripcionih faktora, proliferaciju, diferencijaciju adipocita, te reguliše lipogeni i lipolitički put. Usled nedostatka estrogena dolazi do poremećaja termogeneze i do smanjene ekspresije UCP1 proteina (57).

3.2. Struktura mrkog masnog tkiva

Mrko masno tkivo se sastoji najvećim delom od mrkih adipocita (40%), endotelskih ćelija (50%), preadipocita (2%) i intersticijskih ćelija (1,7%). Ostatak ćelije čine mastociti, fibroblasti, Švanove ćelije i ćelije poreklom iz krvotoka (57). Oblik adipocita mrkog masnog tkiva varira od višegaonog do izduženog i zavisi od trenutnog funkcionalnog stanja samih ćelija. Veličina adipocita je nešto manja u odnosu na veličinu adipocita unilokulusnog masnog tkiva (21). U citoplazmi adipocita nalazi se veliki broj lipidnih tela različitih dimenzija, te se mrko masno tkivo naziva još i multilokulusnim masnim tkivom. Mrki adipociti poseduju brojne mitohondrije i jedan citohrom prisutan na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani koji poseduje mrku obojenost. Brzo dopremanje supstrata i kiseonika do tkiva omogućeno je prisustvom bogate vaskularne mreže koja takođe ima značajnu ulogu u transferu produkovane toplote do svih regiona organizma (23,57). Mitohondrije mrkih adipocita imaju brojne invaginacije sa unutrašnje strane u koje se ugađuje UCP1. Takođe, BAT poseduje veliki broj nervnih završetaka koji su pod kontrolom simpatičke aktivacije, te posreduju u centralnoj kontroli termogenog procesa (21), (slika 4).



Slika 4. Struktura adipocita mrkog masnog tkiva (25)

Termogena aktivnost mrkog masnog tkiva zavisi od UCP1 proteina. U citoplazmi mrkog masnog tkiva mitohondrije sadrže UCP1 protein koji može razdvojiti oksidaciju masnih kiselina od proizvodnje ATP-a (58). Zahvaljujući prisustvu ovog proteina, protoni (H^+) ispumpani u međumembranski prostor radom elektron-transportnog lanca vraćaju se u matriks mitohondrija bez prolaska kroz ATP sintezu, čime se energija nastala pri oksidaciji supstrata ne koristi za sintezu ATP-a već se rasipa u vidu toplote (59,60), (slika 6).

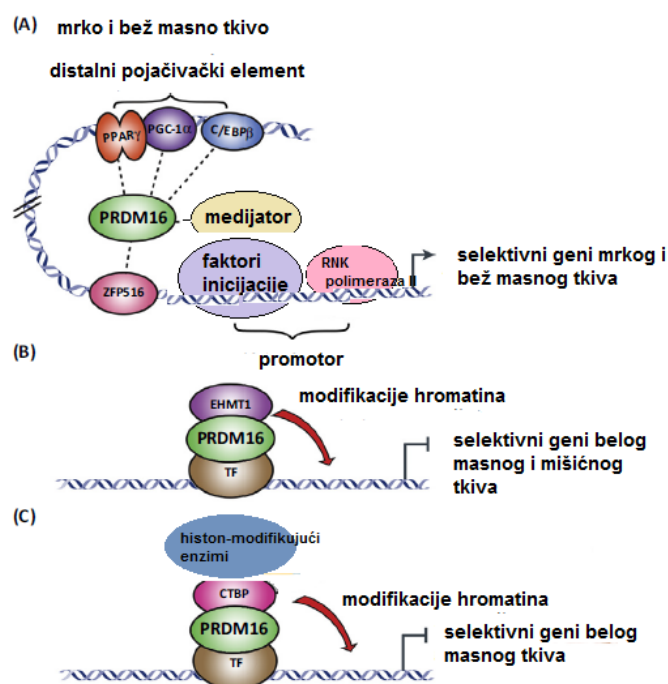
3.3. Poreklo i diferencijacija mrkog masnog tkiva

Poput belog masnog tkiva, mrko masno tkivo zajedno sa hrskavičavim, koštanim i mišićnim tkivom ima mezodermalno poreklo. Mezenhimska matična ćelija (MSC) se opredeljuje u pravcu preadipocita koji zatim proliferišu i diferenciraju se u zrele adipocite. Istraživanja su pokazala da adipociti mrkog masnog tkiva vode poreklo od Myf5⁺ mioblastnih prekursora. Miogeni faktor 5 je protein kojeg kodira *MYF5* gen. Njegova uloga je veoma važna u miogenezi, pogotovo skeletnih mišića. Geloën i saradnici su u svom istraživanju opisali četiri osnovna stadijuma u razvoju mrkih adipocita:

- **Intersticijska stem ćelija**, vretenasta ćelija koja se karakteriše visokim nukleusno-citoplazmatskim odnosom, razbacanim organelama, odsustvom lipidnih tela;
- **Protoadipocit**, za koji su karakteristična retka mala lipidna tela;
- **Preadipocit**, koji poseduje sitna lipidna tela, brojne mitohondrije i dobro razvijen glatki endoplazmatični retikulum;
- **Zreli mrki adipocit** koji se odlikuje brojnim lipidnim telima i mitohondrijama, te predstavlja zadnji stadijum diferencijacije (61).

Uprkos razlikama u razvoju i fiziološkoj funkciji mrkih i belih adipocita, oba tipa ćelija dele sličan transkripcioni put koji kontroliše proces diferencijacije masnih tkiva (62). Kao i kod belog masnog tkiva PPAR γ je neophodan u diferencijaciji ćelija mrkog masnog tkiva. Mogućnost PPAR γ da stimuliše preadipocitnu diferencijaciju bilo u bele ili mrke adipocite zavisi od njegovih koaktivatora (27). U pokušaju da se definišu koraci u terminalnoj diferencijaciji mrkih adipocita, istraživanja su pokazala da C/EBP β i C/EBP δ simultano regulišu ekspresiju PPAR γ . Tanaka i saradnici su u svom istraživanju pokazali da miševi u neonatalnom periodu koji su imali nedostatak C/EBP β i C/EBP δ nisu bili u mogućnosti da razviju masno tkivo (63). Za diferencijaciju ćelija mrkog masnog tkiva neophodno je prisustvo PPAR γ , ali ovaj faktor nije sam u mogućnosti da indukuje terminalnu diferencijaciju mrkih adipocita (26). Pored PPAR γ , peroksizomni proliferatorom aktivirani receptor α (PPAR α) je transkripcioni faktor koji stimuliše oksidaciju β masnih kiselina i mitohondrijalnu respiraciju. Aktivacijom PPAR α dolazi do konverzije belih adipocita u bež adipocite. Ovaj proces funkcioniše tako što PPAR α direktno stimuliše ekspresiju PGC1 α i PRDM16 te na taj način podstiče termogenezu mrkog i bež masnog tkiva (64,65).

Skorija istraživanja su dovela do identifikacije brojnih adipogenih faktora koji su uključeni u adipogenezu mrkih adipocita. Jedan od bitnih regulatora diferencijacije je protein PRDM16 (engl. *Positive regulatory domain containing 16*), kojeg kodira *PRDM16* gen. Kako bi se inicirao razvoj mrkog masnog tkiva neophodno je formiranje transkripcionog kompleksa PRDM16 sa CCAAT/pojačivač vezujućim proteinom, pa je u ovom slučaju potreban C/EBP β . Ovaj kompleks funkcioniše kao transkripcioni koaktivator, koji indukuje i druge transkripcione faktore i koaktivatore kao što su PPAR γ i PGC1 α , a oba su neophodna u maturaciji mrkog masnog tkiva. PGC1 α je identifikovan kod mrkog masnog tkiva i ponaša se kao koaktivator PPAR γ . PGC1 α je takođe i regulator mitohondrijalne biogeneze i oksidativnog metabolizma u većini ćelija, uključujući mrke adipocite i ćelije skeletnih mišića. Dakle, PRDM16 aktivira PPAR γ , PGC1 α i ZFP516, kroz direktno vezivanje, te stimuliše njihovu transkripcionu aktivnost. Formiranje ovog kompleksa je neophodno kako bi se inicirao kompletan program diferencijacije mrkog masnog tkiva (65, 66), (slika 5).

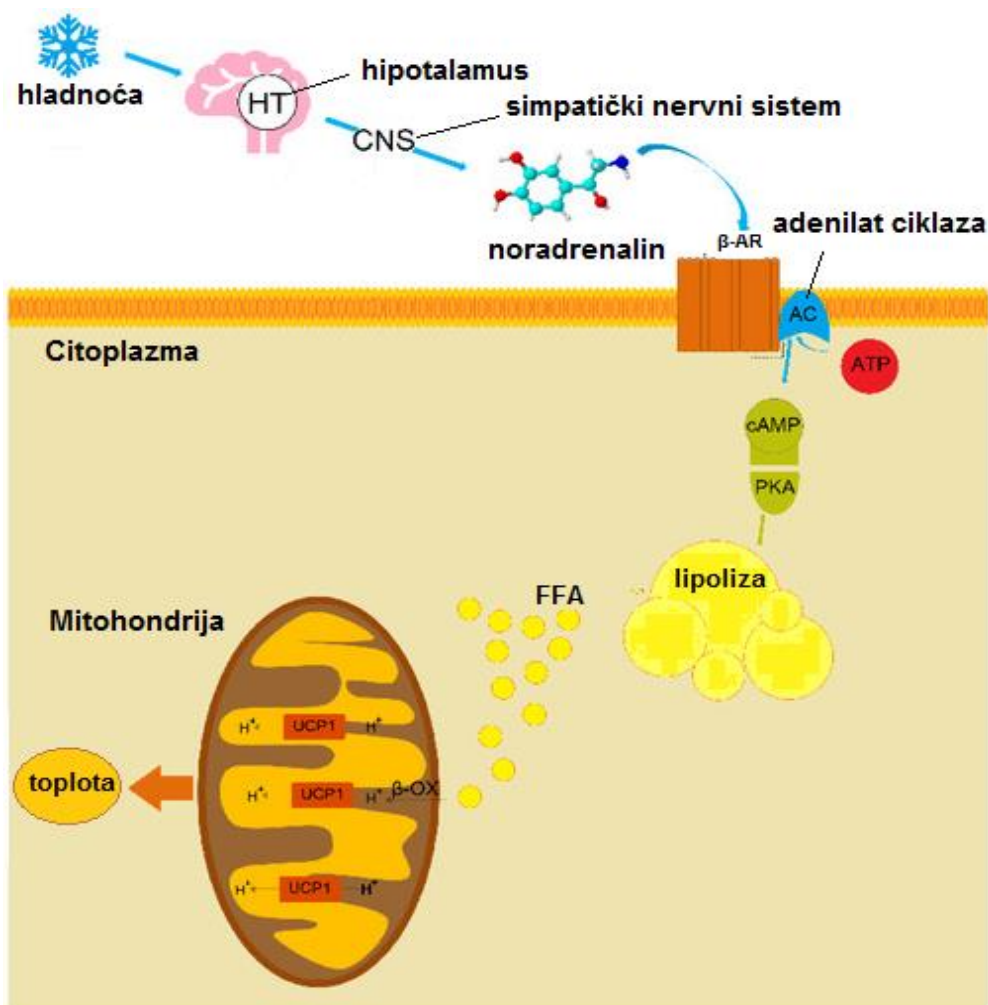


Slika 5. Diferencijacija mrkog i bež masnog tkiva (67)

Pored već navedenih faktora koji učestvuju u diferencijaciji i aktivaciji mrkog masnog tkiva, posebna pažnja se pridaje transkripcionim faktorima koji pripadaju KLF grupi (*Krüppel like Factor*). Jedan od njih je i protein u obliku cinkovog prsta Zfp423 (engl. *Zinc finger protein 423*). Zfp423 je transkripcioni faktor koji se eksprimira u adipocitnim prekursorima (68, 69). Reguliše ekspresiju PPAR γ , a takođe veže se za rani B ćelijski faktor 2 Ebf2 (engl. *Early B cell factor 2*), te inhibiše mogućnost Ebf2 da stimuliše ekspresiju PRDM16 (70). Ekspresija ovog transkripcionog faktora je veća u belom masnom tkivu u odnosu na mrko. Drugi transkripcioni faktor iz ove grupe je Zfp516 (engl. *Zinc finger protein 516*). Izlaganje hladnoći podstiče ekspresiju ovog transkripcionog faktora u BAT, te se veže za PRDM16 i stimuliše transkripciju UCP1 proteina (71). Prekomerna ekspresija Zfp516 u adipocitima povećava adipogenezu mrkog masnog tkiva kod miševa. Istraživanja na miševima pokazala su da delecija ovog transkripcionog faktora dovodi do drastičnog smanjenja mase mrkog masnog tkiva (72). Za razliku od Zfp432, Ebf2 zajedno sa PPAR γ stimuliše ekspresiju PRDM16 i UCP1 u kulturama mrkih adipocita. Ekspresija Ebf2 je veća u BAT nego u WAT, te prekomerna ekspresija u belim adipocitima promoviše adipogenezu bež masnog tkiva (70).

3.4. Uloga mrkog masnog tkiva

Termogeneza mrkog masnog tkiva je direktno regulisana simpatičkim nervima koji su široko rasprostranjeni u ovom tkivu. Izlaganje hladnoći dovodi do pretvaranja neaktivnog tkiva (sa termogenog aspekta) u aktivno termogeni organ. Hladnoćom indukovana termogeneza odlikuje se pojačanim oslobađanjem noradrenalina iz simpatičkih nervnih završetaka koji se vezuje za α i β adrenergičke receptorne izoforme (α -AR i β -AR). Na ovaj način dolazi do povećanja nivoa cikličnog adenzin monofosfata (cAMP). Ovaj molekul je odgovoran za oslobađanje katalitičke subjedinice protein kinaze A, čija je uloga fosforilacija hormon-senzitivne lipaze, ključnog enzima lipolize. Oslobodene masne kiseline aktiviraju UCP1 i oksidišu se u mitohondrijama kako bi služile kao izvor energije za termogenezu. Aktivnost, ekspresija i regulacija UCP1 zavise od trajanja stimulusa. Hronično izlaganje hladnoći regulisano je na nivou genske ekspresije, dok se akutno izlaganje hladnoći karakteriše porastom biohemijske aktivnosti UCP1 proteina (20, 59), (slika 6).



Slika 6. Termogeneza mrkog masnog tkiva (73)

Dakle, osnovni supstrat za termogenezu mrkog masnog tkiva su masne kiseline iz intraćelijskih triglicerida, kao i cirkulišuće slobodne masne kiseline (FFA, engl. *Free Fatty Acids*) i lipoproteini. Lipidi se dopremaju do mrkog masnog tkiva kao neestriфикovane masne kiseline ili kao lipoproteini bogati trigliceridima. Lipoprotein lipaza (LPL) se eksprimira i luči u BAT, a izlaganje hladnoći dodatno povećava njen nivo (74). Ovaj enzim hidrolizuje trigliceride iz lipoproteina u FFA koje pospešuju termogenezu mrkog masnog tkiva kroz različite mehanizme. Slobodne masne kiseline su neophodne kako bi se odvijala mitohondrijalna respiracija i termogeneza. Lipidi se direktno vežu za mitohondrije u mrkim adipocitima, te na taj način verovatno pospešuju dopremanje FFA do mitohondrija. Kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu do mitohondrijalnog matriksa FFA su transportovane posredstvom karnitin palmitoiltransferaze 1 i 2 (CTP1 i CTP2), gde se metabolisu kroz proces β oksidacije u cilju oslobađanja hemijske energije (15). Istraživanja na miševima pokazala su da se utišavanjem CTP2 blokira utilizacija FFA u adipocite, te ima negativan uticaj na hladnoćom indukovanu termogenezu (75). Pored toga, izlaganje hladnoći dovodi do porasta u mobilizaciji masti u belom masnom tkivu, te se oslobođene masne kiseline koriste u metabolizmu mrkog masnog tkiva kao i u mišićnim tkivima (20, 76). Skorija istraživanja su pokazala da kod ljudi aktivacija BAT izlaganjem hladnoći dovodi do porasta njegovog oksidativnog metabolizma, te dolazi do smanjenja koncentracije triglicerida, povećanja HDL holesterola te povećanje potrošnje energije. Dakle, aktivacija mrkog masnog tkiva pozitivno utiče na regulaciju dislipidemije, insulinske rezistencije i drugih metaboličkih poremećaja (12). Osim aktivacije lipolize, izlaganje hladnoći dovodi do ekspresije i aktivacije UCP1, proliferacije mrkih adipocita, mitohondriogeneze, biogeneze peroksizoma, sinteze DNK i proteina, te smanjenja nivoa ćelijske smrti (55).

Takođe, fizička aktivnost, odnosno potrošnja energije u toku adipocitne termogeneze za posledicu ima smanjenje nivoa glukoze, povećanje insulinske senzitivnosti, te deluje antiinflamatorno (77). U toku fizičke aktivnosti dolazi do aktivacije mrkih adipocita tako što se u skeletnim mišićima eksprimira transkripcioni koaktivator peroksidomni proliferatorom aktivirani receptor gama koaktivator 1 α (PGC-1 α) koji podstiče sekreciju irisina i drugih miokina koji deluju kao aktivatori UCP-1 u adipocitima (78, 79). Drugi način podsticanja termogeneze u toku fizičke aktivnosti skeletnih mišića i izlaganja hladnoći je povećanje ekspresije PGC-1 α i sintez *emeteorin-like* hormona (Metrl). Ovaj hormon povećava ekspresiju interleukina 4 (IL-4) preko eozinofilnih granulocita i promoviše polarizaciju makrofaga u masnom tkivu koji povećavaju adipocitnu termogenezu i produkciju antiinflamatornih citokina (80).

Pored hladnoćom indukovane termogeneze, na aktivaciju BAT utiču i drugi faktori. Istraživanja su pokazala da tiroidni hormoni imaju uticaj na simpatičku aktivaciju termogeneze bez drhtanja tako što stimulišu transkripciju UCP1 proteina (81). Tiroidni hormon T3 aktivno i direktno utiče na povećanu ekspresiju UCP1. T3 hormon luči štitasta žlezda, ali u adipocitima takođe može da se vrši konverzija tiroksin (T4) hormona u T3 delovanjem DIO2 (engl. *iodothyronine 5'-deiodinase II*) enzima koji se aktivira adreneričkom stimulacijom. Adipociti poseduju dve vrste nukleusnih receptora za T3; tiroidni hormonski receptor α (TR α) i TR β . Tiroidni receptor β stimuliše ekspresiju UCP1 i proporcionalan je T3 koncentraciji u masnom tkivu (82).

Takođe, dugotrajno izlaganje β -adreneričkim agonistima utiče na aktivaciju BAT (66). Istraživanja na glodarima pokazala su da dijetom-indukovana termogenezu stimuliše ekspanziju i aktivaciju BAT (83). Naime, kod dijetom-indukovane termogeneze u održavanju telesne mase značajnu ulogu ima insulin. Pokazano je da insulin stimuliše termogenezu aktivacijom simpatikusa i reguliše broj β_3 – adrenergičkih receptora (β_3 –AR) u mrkom masnom tkivu kao odgovor na status ishranjenosti. Gubitak insulinskih receptora u mrkom masnom tkivu rezultira smanjenom sekrecijom insulina iz beta pankreasnih ćelija te samim tim utiče na homeostazu glukoze (55,84). Insulinska stimulacija dovodi do aktiviranja različitih metaboličkih aktivnosti uključujući i ekspresiju UCP-1 proteina. Takođe, insulin stimuliše preuzimanje glukoze u mrko masno tkivo nezavisno od termogene aktivnosti (85). Transport glukoze vrši se posredstvom insulinom-regulisanog glukoznog transportera 1 i 4 (GLUT1) i (GLUT4) (59). Insulin reguliše funkcije ovih transportera i utiče na unos glukoze na nekoliko načina. Pokazano je da insulin utiče na stimulaciju translokacije unutarćelijskih GLUT4 na membranu ćelije, zatim modifikuje GLUT4 protein čime utiče na unos glukoze, te povećava biosintezu ili smanjuje degradaciju GLUT4 (55,86).

Genetička inaktivacija BAT i delecija UCP1 kod miševa za posledicu je imala povećanje telesne težine (87). Drugim rečima, miševi koji imaju veću količinu BAT pokazuju više senzitivnosti na insulin, manje dobiju na telesnoj težini, imaju manje koncentracije FFA u serumu, te su zaštićeni od dijabetesa i drugih metaboličkih poremećaja (66). Takođe, aktivacija BAT kod ljudi dovodi do smanjene adipoznosti i telesne težine, nižih vrednosti glukoze, ukupnog holesterola i LDL holesterola (88). Dakle, mrko masno tkivo je potrošač energije bilo termogenezom ili podsticanjem drugih organa na lipolizu i glikolizu. Iz tih razloga dolazi do sprečavanja razvoja gojaznosti, insulinske rezistencije i drugih metaboličkih poremećaja koje nastaju kao posledica gojaznosti. Transplantacija BAT i medikamentna stimulacija njegove aktivnosti su moguće metode u lečenju gojaznosti (89).

3.5. Endorkina uloga mrkog masnog tkiva

Na metabolizam čoveka mrko masno tkivo ne utiče samo sagorevanjem energije već značajnu ulogu imaju molekuli koji se luče u ovom tkivu. Kao i belo masno tkivo, BAT je takođe endokrini organ koji sintetiše različite citokine, hormone i druge faktore kao što su adiponektin i leptin (65). Pored jetre i belog masnog tkiva, BAT sintetiše fibroblastne faktore rasta (FGF2, FGF21) koji podstiču glikolizu u mnogim tkivima, uključujući i adipocite. Pored toga, FGF21 je neophodan pri adaptaciji na hladnoću i adreneričkoj stimulaciji (12). Takođe, FGF21 može direktno uticati na BAT neovisno o adreneričkoj stimulaciji (65). Adipokini i inflamatorni citokini se sintetišu u nešto manjim količinama nego u belom masnom tkivu osim IL-6 i IL-1 α , neurorelina 4 i insulinu sličnog faktora

rasta 1 (IGF-1, engl. *Insulin-like growth factor 1*). Neuroreglin 4, kao endokrini hormon suprimira lipogenezu u jetri, dok je IGF-1 uključen u smanjivanje hipergligemije kod miševa sa dijabetesom tipa 1 (15,90). IL-6 i IL-1 α pospešuju simpatičku aktivnost CNS-a, oksidaciju FFA u jetri i srcu, utiču na funkciju β -ćelija pankreasa i stimulišu lipolizu u adipocitima (91). U mrkim adipocitima se sintetise i neurotrofni faktor kao što je moždani faktor rasta (engl. *Brain-derived neurotrophic factor*). Pored neurotrofina BAT sintetise vaskularni endotelni faktor rasta (VEFG). VEFG se ekspirira u BAT i u proliferišućim zrelim mrkim adipocitima, kako bi održavao visok nivo vaskularizacije. Noradrenalin i izlaganje hladnoći indukuju povećanju ekspresiju ovog proteina u mrkom masnom tkivu (92). Endokrina uloga BAT se ogleda i u enzimskoj konverziji tiroksina u trijodtironin, a trijodtironin autokrino i preko CNS-a povratno stimuliše termogenezu u mrkim adipocitima (93).

4. BEŽ MASNO TKIVO

Bež adipociti kao i ćelije mrkog masnog tkiva sagorevaju energiju kako bi se proizvela toplota. Bež masne ćelije su definisane kao adipociti koji ekspiriraju UCP-1 protein van ćelija klasičnog masnog tkiva (83). Bež ili svetlo masno tkivo "beige-like cells" su rasprostranjeni unutar belog masnog tkiva i morfološki su veoma slični klasničnim mrkim adipocitima (94). Najčešće se nalaze subkutano i mogu poprimiti "brown-like" fenotip izlaganjem hladnoći, β -adrenergičkim agonistima, tiazolidindionima (TZD) i vežbanjem (95, 96). Bež tkivo, kao i mrko sadrži brojna lipidna tela, pa se naziva i multilokularno. Takođe, ekspirira ključne termogene gene uključujuću *UCP1*, *PPAR α* , *PPARGC1A* i *PRDM16*, te poseduje i gusto pakovane mitohondrije. Međutim, uprkos velikom broju sličnosti bež adipociti imaju različite fenotipske i funkcionalne karakteristike (53). U bazalnim okolnostima bež adipociti imaju veoma nizak nivo UCP1 proteina, ali izlaganjem stimulusima dolazi do povećanja nivoa UCP1 proteina, te do povećanje potrošnje energije (83,97). Takođe, bež adipociti vode poreklo od MYF5 negativnih mrkih prekursora, belih preadipocita ili zrelih belih adipocita (53). U skorije vreme brojna istraživanja su sprovedena u cilju definisanja da li hladnoćom-indukovani bež adipociti nastaju direktno iz zrelih belih adipocita ili su produkt *de novo* difencijacije adipocitnih prekursorskih ćelija. Nekoliko studija sugerise da je direktna indukcija belih adipocita u bež adipocite najverovatniji mehanizam "browning" efekta (98, 99). Međutim, istraživanja koja su sprovedeli Wu i saradnici pokazala su da bež adipociti ekspiriraju Cd137 i transmembranski protein 26 (Tmem26) na površini ćelija, te samo adipociti koji su se diferencirali iz bež preadipocita mogu indukovati termogeni genetički program β adreneričkom stimulacijom (100).

Brojne studije pokušale su okarakterisati BAT čoveka koristeći markere karakteristične za klasične mrke adipocite i bež adipocite miševa. Mrko masno tkivo u interskapularnom regionu koje je prisutno kod novorođenčadi pokazuje karakteristike klasičnih mrkih adipocita, dok supraklavikularni BAT prisutan kod odraslih osoba ekspirira visok nivo bež-adipocitnih gena (101). Međutim, postoje studije koje pokazuju suprotne rezultate. Naime, Jespersen i saradnici pokazali su da BAT pristuno kod odraslog čovka ekspirira gene karakteristične za klasične mrke adipocite (102). Takođe, histološke studije na uzorcima biopsija su pokazale da se bež adipociti nalaze unutar belog masnog tkiva u 24% odraslih osoba, te mogu dostići i do 50%, ukoliko se izuzmu osobe starije od 50 godina (103). Povećanje količine bež masnog tkiva moglo bi dovesti i do povećanja količine BAT, te bi se na taj način takođe povećala potrošnja energije (97).

5. GENSKI POLIMORFIZMI

Kao što je već navedeno, adolescentna gojaznost rezultat je multifaktorske interakcije genetičkih, neuroendokrinih, metaboličkih i bihevioralnih faktora sa faktorima spoljašnje sredine, a kao najčešći pratioci gojaznosti su metabolički sindrom i dijabetes tipa 2. Analiza gena važnih za ekspresiju i aktivnost mrkog masnog tkiva može nam omogućiti otkrivanje varijanti gena odgovornih za individualne varijacije u našem indeksu telesne mase, lipidnom statusu i glikemiji. Dosadašnja istraživanja identifikovala su nekoliko gena čiji proteinski produkti imaju važnu ulogu u sintezi i funkciji mrkog masnog tkiva i za koje se smatra da su povezani sa metabolizmom lipida, glukoze i

energetske homeostaze. Kako bi se utvrdila povezanost genskih polimorfizama sa određenim fenotipom ili oboljenjem pribegava se primeni studija asocijacije, čiji je primarni cilj analiza alela u okviru gena kandidata i njegova asocijacija sa određenim fenotipom. Praktičan značaj ovakvih istraživanja jeste bolje razumevanje molekularnih osnova gojaznosti i otkrivanje novih strategija za terapiju gojaznosti i njenih komorbiditeta. Ovakav pristup je od velikog značaja uzimajući u obzir povećanje broja gojazne dece u Srbiji i svetu.

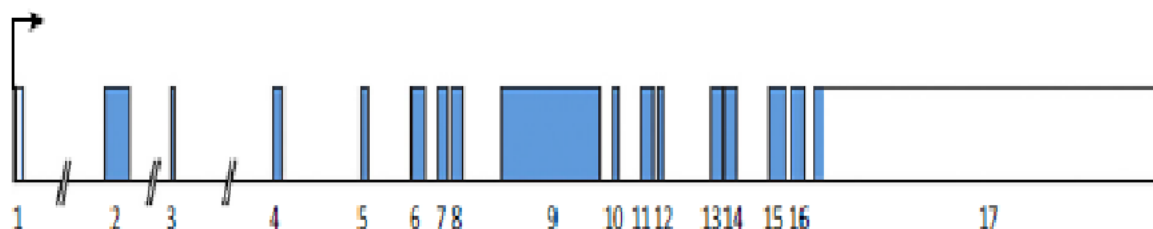
Genomska varijabilnost podrazumeva širok spektar varijacija uključujući polimorfizam pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*), inserciono delecione polimorfizme, polimorfizme broja uzastopnih ponovaka (STR ili VNTR), transpozibilne elemente, strukturne alteracije kao i varijacije u broju kopija (engl. *copy number variation, CNV*). Kada su u pitanju SNP, oni nastaju kao posledica substitucija jednog baznog para drugim, a mogu biti tranzicije ili transverzije, te predstavljaju najčešći tip polimorfizama u humanom genomu. Neki regioni genoma su bogatiji SNP-ovima od drugih, ali se smatra da oko 80% svih polimorfizama čine upravo polimorfizmi pojedinačnih baza (104). S obzirom da ovi polimorfizmi mogu dovesti do promene proteina (zavisno od tipa mutacije), a samim tim i do promene fenotipskih karakteristika, ispitivanja povezanosti određenih genskih polimorfizama sa nekim od poligenskih svojstava imaju izuzetan značaj prilikom procene uticaja samog polimorfizma na ispitivani fenotip.

Na osnovu dosadašnjih saznanja o diferencijaciji mrkog masnog tkiva i njegovoj ulozi u regulaciji telesne mase i metabolizmu glukoze i lipida, za ovo istraživanje odabrani su polimorfizmi: rs12409277 u genu za PRDM16, rs1561589 u genu za C-terminus-vezujući protein 2 (CtBP2), rs3856806 u genu za PPAR γ , rs8192678 u genu za koaktivator 1 alfa peroksizomnog proliferatorom aktiviranog receptora gama (PGC-1 α) i rs6265 u genu za moždani faktor rasta (BDNF).

5.1. PRDM16

5.1.1. Struktura gena i proteina

U naslednoj osnovi čoveka, gen za PRDM16 (engl. *PR domain containing 16*) je lokalizovan na hromozomu 1p36 (105). Gen sadrži 17 kodirajućih egzona, a dužina gena je oko 400kb. Od 17 egzona, egzon 1 i 2 sadrže mesta inicijacije transkripcije 1 i 2, dok se u okviru egzona 4 nalazi interni inicijatorni kod za translaciju kratke izoforme PRDM16 (106). Za familiju *PRDM* gena karakteristično je prisustvo višestrukih izoformi koje nastaju alternativnim splajsovanjem ili upotrebom alternativnih promotora (107), (slika 7). Izoforme koje sadrže PR domen su suprimirane u mnogim vrstama kancerogenih tumora, što sugerise da se ove izoforme ponašaju kao tumor supresori (67), (slika 7).

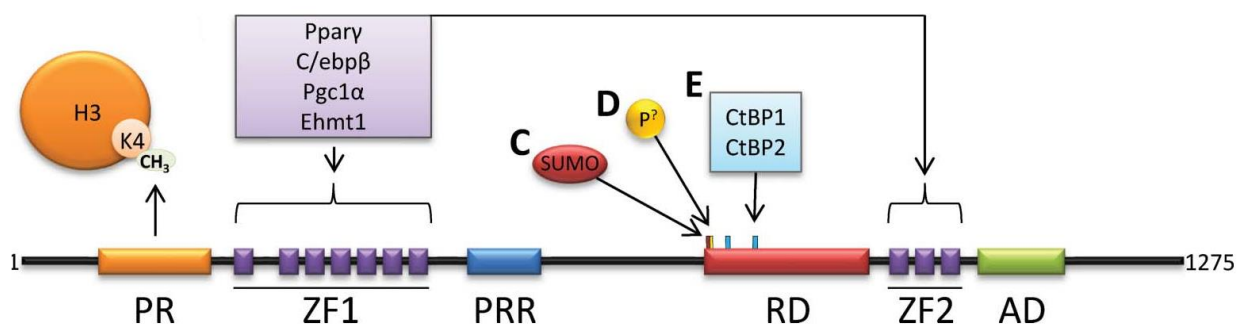


Slika 7. Struktura *PRDM16* gena. Kodirajući regioni su obojeni u plavo, dok su nekodirajući beli. Mesto inicijacije transkripcije obeleženo je strelicom (108)

Familija PRDM proteina broji 17 članova čiju strukturu čini konzervisani N-terminalni PR domen i veliki broj proteinskih struktura u obliku cinkovih prstiju. PR domen je veoma sličan SET (engl. *suppressor of variegation 3-9, enhancer of zeste, and trithorax*) domenu koji se nalazi u okviru

mnogih histon-lizin-N-metiltransferaza (HMT) koje funkcionišu kao transkripcioni regulatori modifikacije hromatina (109). PRDM proteini, uključujući i PRDM16 intereaguju sa različitim proteinima koji učestvuju u modifikaciji histona kao što su histonske deacetilaze, acetiltransferaze, te lizin metiltransferaze, kao i sa brojnim drugim aktivatorima i represorima važnim za gensku ekspresiju (107). Gen *PRDM16* nosi informaciju za četiri izoforme proteina: protein pune dužine oko 170kDa, protein u skraćenom obliku dužine 150kDa koji ne sadrži PR domen na N terminus, kao i još dve izoforme nastale alternativnim splajsovanjem koje za sada nemaju jasno opisanu biološku funkciju (67).

PRDM16 protein se može podeliti na 6 glavnih domena. Pored PR domena koji se nalazi na N-terminusu, čija je dužina oko 125 amino kiselina, ovaj protein se sastoji od dva domena C2H2 cinkovih prstiju (ZF1/ZF2), proksimalnog regulatornog regiona (PRR), represionog domena (RD) i kiselog aktivacionog domena (AD) koji se nalazi na C-terminu proteina (110), (slika 8).



Slika 8. Struktura PRDM16 proteina (110)

Između ovih regiona, čija je primarna funkcija vezivanje DNK za specifične sekvence, te brojne druge protein-protein interakcije, nalaze se nizovi od 80 do 150 aminokiselina čija uloga još uvek nije precizno razjašnjena. Međutim, esencijalni delovi PRDM16 proteina su ZF1 i ZF2 regioni, s obzirom da se preko njih odvijaju protein-protein interakcije i specifično vezivanje za DNK sekvence. Poznato je da se ovaj protein preko ZF domena vezuje za PPAR γ / α i C/EBP/ β / δ , te na taj način pojačava transkripcionu funkciju ovih faktora, kao i koaktivatora PGC1 α , što ga čini ključnom komponentnom u aktivaciji transkripcionog kompleksa termogenih gena (111). Represivna funkcija PRDM16 u mrkim adipocitima se odvija kroz RD domen koji primarno intereaguje sa C-terminus-vezujućim proteinima (CtBP). PRDM16 u belim adipocitima vrši represiju transkripcije gena specifičnih za belo masno tkivo. Takođe, kod životinja kod kojih je utišan gen za PRDM16 dolazi do represije gena specifičnih za mrko masno tkivo. Ovaj mehanizam regulacije je apsolutno zavisno od interakcija sa CtBP1 i CtBP2 proteinima. Pored toga, PRDM16 podleže sumoilaciji na N-terminalnom kraju RD domena neposredno pre prvog CtBP motiva. Sumoilacija na ovom delu proteina pospešuje interakciju PRDM16 i CtBP proteina, te je represija određenih gena onemogućena ukoliko dođe do sprečavanja sumoilacije (106, 110).

5.1.2. Funkcija PRDM16

Pored dobro opisanog transkripcionog faktora PPAR γ koji je jako bitan u diferencijaciji oba tipa masnog tkiva, PRDM16 je definisan kao ključni transkripcioni regulator mrkih adipocita. PRDM16 je veoma bitan u biologiji masnog tkiva s obzirom da je uključen u nekoliko fizioloških procesa uključujući homeostazu energije, metabolizam glukoze i lipida, kao i regulaciju telesne mase. Pokazano je da deca i adolescenti kod kojih je otkriveno prisustvo mrkog masnog tkiva imaju povećanu ekspresiju *PRDM16* gena (56). Dosadašnja istraživanja pokazuju da PRDM16 indukuje fenotip mrkog masnog tkiva iz prekursora belih adipocita ili fibroblasta koji ekspimiraju PPAR γ

(112). PRDM16 se više eksprimira u BAT nego u WAT, ali kada se ektopično eksprimira u preadipocitima belog masnog tkiva ili u mioblastima, PRDM16 indukuje kompletan genetički program mrkih adipocita, povećava potrošnju energije, te poboljšava senzitivnost na insulin (113). Indukcija genetičkog programa mrkih adipocita uključuje i mitohondrijalnu biogenezu, povećanu ćelijsku respiraciju i ekspresiju selektivnih gena za mrko masno tkivo (26). Kontinuirana ekspresija PRDM16 u adipocitima belog masnog tkiva, omogućava pojavu než adipocita koji imaju veoma slične termogene sposobnosti kao i klasično mrko masno tkivo, uključujući i ekspresiju UCP-1 proteina (67, 114). Delecija PRDM16 u svim ćelijama masnog tkiva uzrokuje tešku insulinsku rezistenciju, steatozu jetre, gubitak funkcije než masnog tkiva kao i pojavu gojaznosti (108).

Kao što je prethodno opisano PRDM16 se direktno veže za specifične DNK sekvence kroz ZF1 i ZF2 domene. Tačkaste mutacije PRDM16 u ZF DNK vezujućim motivima ne dovode do poremećaja u indukciji diferencijacije mrkog masnog tkiva (66). Dakle, PRDM16 indukuje selektivni genetički program mrkih adipocita kroz protein-protein reakcije sa različitim transkripcionim faktorima. Takođe, prethodno je opisano da proces diferencijacije mrkog masnog tkiva zahteva formiranje transkripcionog kompleksa PRDM16 sa CCAAT/ β što za rezultat ima ekspresiju drugih transkripcionih faktora, kao što su PPAR γ i PGC1 α . Pored toga, PRDM16 interaguje sa histon metiltransferazom (EHMT1), koja funkcioniše kao represor gena belog masnog tkiva i skeletnih mišića kroz epigenetičke modifikacije. Odsustvo EHMT1 enzima u masnom tkivu miša rezultira u defektnoj adaptivnoj termogenezi. Takođe, PRDM16 može formirati kompleks sa C-terminus-vezujućim proteinima 1 i 2 (CTBP1,2) kako bi suprimirali specifične gene belog masnog tkiva, kao što su rezistin i angiotenzinogen, tako što direktno utiču na njihove promotore (67), (slika 5).

5.1.3. Polimorfizmi PRDM16 gena

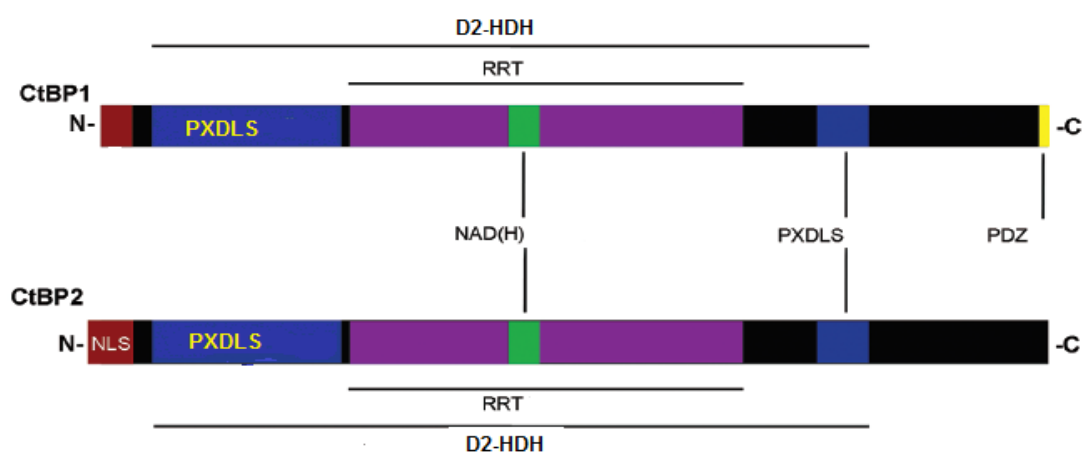
U okviru PRDM16 gena otkriveno je nekoliko polimorfizama koji su povezani sa vrednostima telesne mase i rizikom od metaboličkog sindroma. Polimorfizam rs12409277 nalazi se u okviru 5' UTR regiona PRDM16 gena i nastaje baznom substitucijom timina u citozin. Ovaj polimorfizam utiče na transkripcionu aktivnost PRDM16. Dosadašnja istraživanja pokazuju da prisustvo alela C odgovara povećanoj ekspresiji PRDM16 gena (115). Uočena je asocijacija polimorfizma ovog gena sa manjim rizikom za razvoj metaboličkog sindroma, a takođe i sa nižim indeksom telesne mase kod mlađih (20-40 godina) i starijih (50-80 godina) muškaraca (116). Pored ovog polimorfizma, u okviru PRDM16 gena analizirani su i rs2651899, rs2236518, te rs17390167 polimorfizmi koji se dovode u vezu sa povišenim vrednostima lipidnih parametara, gojaznošću te metaboličkim sindromom (116-118). Do sada, ne postoje studije koje su istraživale povezanost rs12409277 polimorfizma sa vrednostima glikemije, lipidnog statusa i indeksa telesne mase kod dece ili adolescenata.

5.2. C- TERMINUS-VEZUJUĆI PROTEIN 2 (CtBP2)

5.2.1. Struktura gena i proteina

C-terminus-vezujući protein je prvobitno identifikovan kao ćelijski protein koji interaguje sa C-terminus regionom PXDSL (engl. *Proline-Aspartate-Leucine-Serine*) proteina humanog adenovirusa E1A. U genomu kičmenjaka, pa i čoveka, postoje dva različita genska lokusa, CTBP1 i CTBP2 (119). Gen za CtBP2 je lokalizovan na hromozomu 10 u regionu q26.13. CTBP2 gen proizvodi alternativne transkripte koji kodiraju dva različita proteina. Jedan protein funkcioniše kao transkripcioni korepresor dok je druga izoforma glavna komponenta specijalizovanih sinapsi pozatih kao sinaptičke trake (RIBEYE). Kao rezultat različitog RNK splajsovanja CTBP1 lokus kodira dve proteinske izoforme CtBP1-L i CtBP1-S (120). Northern blot analize detektovale su produkt RIBEYE veličine 120-kDa koji se eksprimira isključivo u retini, dok se produkt CTBP2 veličine 50 kDa eksprimira u 24 tkiva uključujući jetru, pankreas, masno tkivo i mišiće (121).

Proteini CtBP1 i CtBP2 dele 78% redosleda amino kiselina, te sadrže konzervirani N-terminalni domen koji je odgovoran za vezivanje transkripcionih faktora u kom je lokalizovan PXDLS motiv (122). Za familju CtBP proteina PXDLS motiv je od izuzetne važnosti s obzirom da mutacije u okviru ovog motiva u CtBP proteinima ili u vezujućim motivima proteina sa kojim intereaguju negativno utiču na njihovu interakciju. Vezujući domen PXDLS je esencijalan za funkciju CtBP proteina, jer se kroz njega odvijaju interakcije sa histon-deacetilazama, histon-metiltransferazama i transkripcionim represorima koji su neophodni kako bi CtBP vršili korepresornu funkciju. Pored ovog motiva, svi članovi CtBP familije poseduju površinski žleb koji omogućava vezivanje CtBP sa RRT (Arg-Arg-Thr), vezujućim motivima. Dominantna funkcija RRT domena je regrutovanje i vezivanje za određene korepresore. Kroz ova dva vezujuća domena CtBP2 proteina se odvija većina interakcija sa korepresornim kompleksima i represornim proteinima (121). Takođe, CtBP proteini imaju homologne sekvence aminokiselina sa D-2-hidroksi-kiselina dehidrogenaza (D2-HDH) enzimom, posebno unutar RRT vezujućeg domena (slika 9).



Slika 9. Struktura CtBP1 i CtBP2 proteina (121)

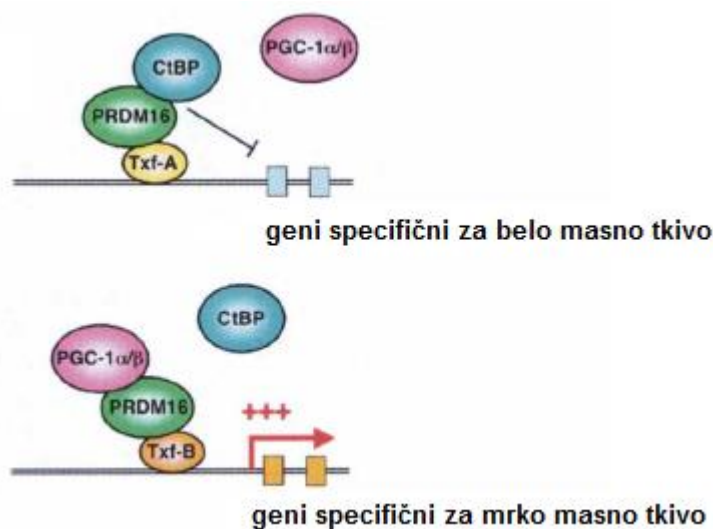
Dehidrogenazni domen sadrži dinukleotid vezujuće mesto koje omogućava vezivanje NAD^+ kao i NADH (nikotinamid adenin dinukleotid). Sposobnost vezivanja CtBP proteina sa NADH je neophodna kako bi ovi proteini međusobno mogli formirati dimere te obavljati represiju transkripcije. Sveukupno, PXDLS, RRT i dehidrogenazni domen CtBP1 i CtBP2 proteina čine najvećim delom njihove strukture, međutim neke razlike su evidentne. Na N-terminusu CtBP2 poseduje signal nukleusne lokalizacije (NLS) koji nije prisutan kod CtBP1. Ovaj region CtBP2 poseduje nekoliko lizinskih ostataka koji su acetilovani, a doprinose zadržavanju ovog proteina u jedru (123).

5.2.2. Funkcija CtBP2

CtBP2 deluje kao transkripcioni aktivator, regulator citoskeleta i kao korepresor transkripcije. Do sada je poznato više od 30 različitih transkripcionih regulatora koji intereaguju sa CtBP proteinima. Većina CtBP-zavisnih transkripcionih regulatora su proteini koji se vezuju za specifične DNK sekvence, što implicira da CtBP funkcionišu kao korepresori (119). Uloga CtBP proteina u biologiji masnog tkiva je značajna s obzirom da u interakciji sa PRDM16 suprimira ekspresiju gena specifičnih za ćelije belog masnog tkiva, što je preduslov za aktiviranje ekspresije gena specifičnih za mrko masno tkivo. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je PRDM16 koregulatorni protein čija je uloga značajna u oba tipa masnog tkiva. Međutim, postavljalo se pitanje na koji način PRDM16 simultano stimuliše aktivaciju i represiju gena (124). Kajimura i saradnici su u svom istraživanju ispitali mehanizam regulacije ovog genetičkog programa. Rezultati su pokazali da PRDM16 direktno interaguje sa CtBP1 i CtBP2 kroz PXDLS motive, te da prečišćeni PRDM16 transkripcioni

holokompleks sadrži CtBP1 i CtBP2. Ova direktna interakcija selektivno utiče na represiju gena specifičnih za belo masno tkivo. Represija gena za belo masno tkivo se događa kroz formiranje kompleksa CtBP2/PRDM16, te njihovim delovanjem na promotore rezistina, angiotensinogena i drugih gena belog masnog tkiva (125).

Ćelije belog masnog tkiva eksprimiraju gene čija je ekspresija u mrkom masnom tkivu značajno smanjena ili ne postoji. Rezultati mikroerej analiza su omogućili identifikaciju 43 gena specifična za belo masno tkivo koji su suprimirani od strane PRDM16. Međutim, PRDM16 kod koga su prisutne mutacije u vezujućim domenima pokazuju nemogućnost supresije 41 gena specifičnih za belo masno tkivo. Razlog tome je nevezivanje mutiranog PRDM16 za CtBP proteine. Primer tome je angiotensinogen čija je ekspresija suprimirana 90% sa nemutiranim PRDM16, međutim nemogućnost vezivanja mutiranog PRDM16 za CtBP2 rezultirala je drastično smanjenom represijom (slika 10). Takođe, PGC1 α i PGC1 β mogu zameniti CtBP2, te formirati kompleks sa PRDM16 kako bi došlo do aktivacije gena selektivnih za mrko masno tkivo (125).



Slika 10. Mehanizam delovanja CtBP proteina na gene masnog tkiva (125)

Pored uloge u biologiji masnog tkiva, CtBP povezuju se sa razvojem malignih tumora. Studija Zanga i saradnika ukazala je na prekomernu ekspresiju CtBP2 kod pacijenata sa karcinomom prostate, jajnika, dojke i mnogih drugih (126).

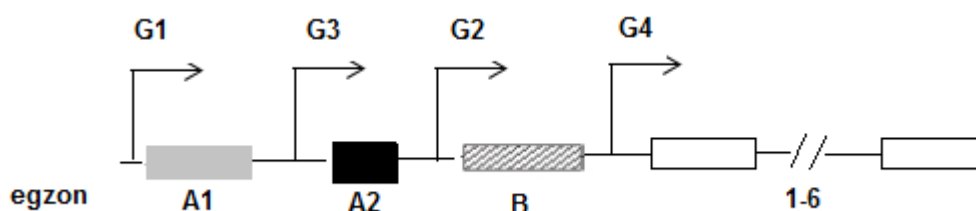
5.2.3. Polimorfozmi *CtBP2* gena

U dosadašnjim istraživanjima u okviru *CtBP2* gena pored rs1561589 polimorfizma, analizirana su još dva intronska polimorfizma rs126681170 i rs126674064 koji se dovode u vezu sa rizikom za razvoj poremećaja u ishrani kao što je *anorexia nervosa*, te povećanim vrednostima ITM primarno kod žena (127). U okviru rs1561589 polimorfizma dolazi do zamene guanina u adenin. Efekat ovog polimorfizma na ekspresiju *CtBP2* gena i funkciju proteina još uvek nije razjašnjen. Takođe, pregledom dostupne literature nisu nađeni podaci o studijama koje bi ukazale na povezanost rs1561589 sa lipidnim statusom, ITM ili glikemijom kod dece ili adolescenata.

5.3. PEROKSIZOMNI PROLIFERATOROM AKTIVIRANI RECEPTOR GAMA (PPAR γ)

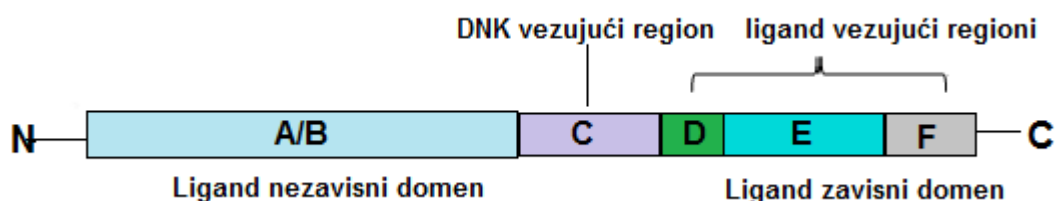
5.3.1. Struktura gena i proteina

Peroksizomni proliferatorom aktivirani receptori (PPAR) su nukleusni hormonski receptori i ligand zavisni transkripcioni faktori. Identifikovani su devedesetih godina prošlog veka, te su dobili ovakav naziv zbog svoje mogućnosti da vežu substance koje indukuju proliferaciju peroksizoma (128). Strukturno, ovi transkripcioni faktori su slični steroidnim i tiroidnim hormonskim receptorima. Do sada, kod čoveka su opisana tri pod tipa PPAR koji su kodirani različitim genima. PPAR α se nalazi na hromozomu 22 u regionu 22q12-q13.1 i najviše se eksprimira u jetri, bubrezima, srcu i mišićima. Drugi tip PPAR je PPAR δ koji se eksprimira u skoro svim tkivima, najviše u mišićima i mapiran je na hromozomu 6p21.1-p21.2. Treća varijanta je PPAR γ koji je lociran na hromozomu 3p25-p24.2, a gen se eksprimira u belom i mrkom masnom tkivu, endotelskim ćelijama gde ima veoma važnu ulogu u adipogenezi, termogenezi i skladištenju lipida (129). Gen za PPAR γ (*PPARG*) je veličine 100kb i sadrži 9 egzona od kojih nastaju 3 transkripta (γ 1, γ 2 i γ 3). Ovi transkripti nastaju alternativnim splajsovanjem ili upotrebom alternativnih ptomatora. Sva tri transkripta sadrže egzone od 1-6. Transkript PPAR γ 1 je veličine 1892 bp i ima dodatna dva egzona koji se ne prevode, te je u 97% svoje strukture sličan PPAR γ 2 koji u svom transkriptu ima i exon B koji se prevodi. Za transkript PPAR γ 3 karakteristično je prisustvo egzona A2 koji se ne prevodi, a sam transkript je nastao od novootkrivenog promotora koji se nalazi na 5' kraju egzona 2A. Njegova ekspresija je ograničena isključivo na belo masno tkivo (slika 11).



Slika 11. Struktura *PPARG* gena (130)

PPAR γ protein nalazi se u jedru ćelija, sadrži 505 aminokiselina i ima molekularnu težinu od 57,5 kDa. U okviru proteina postoje četiri domena. Domeni A i B su odgovorni za regulaciju transkripcije, domen C je značajan u vezivanju za DNK, dok su domeni D, E i F ligand vezujući regioni. Dva od ovih domena su visoko konzervisani. Domen C sastoji se od dva motiva cinkovih prstiju lokalizovanih na N-terminusu, a ovakva struktura omogućava specifične interakcije sa PPAR regulatornim elementima. Drugi konzervisani domen je ligand vezujući, a njegovu strukturu čine α heliksi i β ploče koje se nalaze na C-terminusu, a omogućavaju vezivanje prirodnih ili sintetičkih liganada za PPAR. Aktivacija receptora može biti ligand-zavisna (kroz aktivaciju AF2 domena na C-terminusu) ili ligand-nezavisna (kroz aktivaciju AF1 domena na N-terminusu), (slika 12).

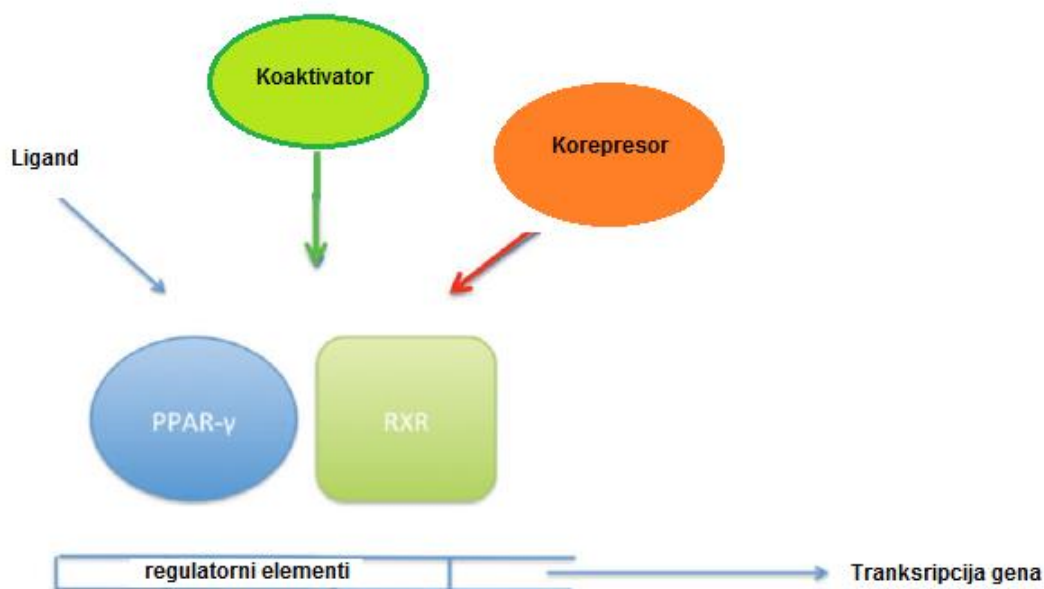


Slika 12. Struktura PPAR γ proteina (131)

PPAR γ 2 poseduje dodatnih 28 aminokiselina na svom N-terminusu, što poboljšava ligand-nezavisnu aktivaciju u odnosu na izoformu γ 1. Od transkripcije do funkcionalnog proteina, PPAR γ je odgovoran za niz kompleksnih procesa i interakcija. Na nivou transkripcije, to podrazumeva epigenetičke modifikacije kao što je metilacija promotora i acetilacija histona (132). Kada je reč o posttranslacionim modifikacijama, one uključuju fosforilaciju, acetilaciju, ubikvitaciju i sumoilaciju. Fosforilacija PPAR γ može da inhibira ili poveća transkripcionu aktivnost gena zavisno od mesta modifikacije. Ekspresija PPAR γ je regulisana brojnim faktorima uključujući insulin, glukokortikosteroide i faktore nekroze tumora (133).

5.3.2. Funkcija PPAR

Peroksizomni proliferatorom aktivirani receptori imaju veoma važnu ulogu u kontroli homeostaze masnog tkiva kroz regulaciju balansa između anaboličkog i oksidativnog procesa. PPAR α stimuliše β oksidaciju masnih kiselina i mitohondrijalnu respiraciju. Aktivacijom PPAR α dolazi do konverzije WAT u bež adipocite, kao i do termogeneze mrkog masnog tkiva. Takođe, PPAR α direktno stimuliše ekspresiju *PRDM16* i *PPARGC1A*, te na taj način utiče na termogenezu mrkog masnog tkiva (15). PPAR β/δ , takođe učestvuju u oksidaciji masnih ćelija, indukciji ekspresije UCP1 proteina što doprinosi smanjenju mase belog masnog tkiva. Takođe, je pokazan i anti-inflamatorni efekat ove izoforme. Treća izoforma PPAR-a, PPAR γ , reguliše ekspresiju gena uključenih u adipogenezu, lipogenezu, osetljivost na insulin, inflamaciju, te aterosklerozu (134). Kako bi PPAR γ postao transkripciono aktivan on se kao i većina drugih članova ove klase receptora vezuje za PPAR regulatorne elemente, te heterodimerizuje sa RXR-om kako bi se vezao za DNK i vršio transaktivaciju ili transrepresiju specifičnih gena (31). Kada dođe do vezivanja liganada, receptor prolazi kroz konformacione promene što omogućava vezivanje transkripcionih koaktivatora. U odsustvu liganada, receptor ostaje vezan za transkripcione korepresore što rezultira utišavanjem određenog gena (135), (slika 13).



Slika 13. Transkripcija gena kroz mehanizam aktivacije PPAR γ (132)

Specifični ligandi odgovorni za adipogenu aktivnost PPAR γ još uvek nisu poznati, ali potencijalni prirodni agonisti uključuju polinezasićene masne kiseline, kao što su prostanoidi. Međutim, bolje razumevanje funkcije PPAR γ zasniva se na saznanjima o efektima primene sintetičkih agonista kao što su tiazolidindioni (TZD), lekovi koji se koriste u lečenju dijabetesa tipa 2. Aktivacija PPAR γ sa TZD utiče na smanjenje periferne lipotoksičnosti i na normalizaciju lučenja adipokina. Metabolički efekti ogledaju se u nižim vrednostima triglicerida u perifernoj krvi, jetri i mišićima, kao i povećanim vrednostima triglicerida u masnom tkivu. Poznato je da PPAR γ stimuliše sintezu adiponektina u belom masnom tkivu što doprinosi daljoj stimulaciji oksidacije FFA, smanjenju koncentracije glukoze u jetri, te povećanom korišćenju glukoze u mišićima. Skorija istraživanja su pokazala da PPAR γ , aktiviran sa TZD, povećava ekspresiju fibroblasnih faktora rasta (FGF1 i FGF21) što doprinosi remodelovanju masnog tkiva i održavanju normalne energetske homeostaze (136).

PPAR γ je ključni transkripcioni faktor neophodan za diferencijaciju masnog tkiva. Mogućnost PPAR γ da stimuliše preadipocitnu diferencijaciju bilo u bele ili mrke adipocite zavisi od njegovih koaktivatora. Njegova interakcija sa PRDM16 transkripcionim faktorom dovodi do ekspresije gena specifičnih za mrko i bež masno tkivo, kao i do ekspresije UCP1 proteina. Takođe, dolazi do represije gena specifičnih za belo masno tkivo. Pored toga, Sirt1 (Sirtuin1) protein deacetiliše PPAR γ , te utiče na vezivanje PPAR γ za PRDM16 u mrkim i bež adipocitima. S druge strane, vezivanjem za TLE3 protein (engl. *Transducin-like enhancer protein 3*) PPAR γ suprimira ekspresiju mrkih i bež selektivih gena i stimuliše ekspresiju gena specifičnih za belo masno tkivo. Oba proteina, PRDM16 i TLE3 imaju tendenciju vezivanja za isti domen unutar PPAR γ (137). U odsustvu PPAR γ prekursorske ćelije nisu u mogućnosti da ekspimiraju bilo koji aspekt adipocitnog fenotipa. Studije su pokazale da je ektopična ekspresija PPAR γ u neadipogenim fibroblastima miša dovoljna da inicira kompletan adipogeni program. Takođe, istraživanja na tetraploidnim miševima pokazala su da odsustvo PPAR γ kod ovog tipa životinja rezultira u nemogućnosti formiranja masnog tkiva (31). Pored toga, istraživanja pokazuju da su miševi sa "knock-out" mutacijom PPAR γ razvili insulinsku rezistenciju i hiperlipidemiju usled poremećaja u regulaciji insulinske signaizacije, korišćenja FFA i lipolize (138).

5.3.3. Polimorfizmi *PPARG* gena

U okviru *PPARG* gena opisano je više mutacija koje se dovode u vezu sa metaboličkim poremećajima i lipodistrofijom. Klasifikovane su kao česti polimorfizmi (Pro12Ala, His477His), dominantno negativne mutacije (Val290Met, Cys162Tyr), mutacije haploinsuficijencije (Arg425Cys, Phe388Leu), mutacije dobitka funkcije (Pro115Gln) i promotorkse varijante (P2 C-689T, P4 A-14G), (tabela 1). Studije su pokazale da Pro12Ala polimorfna varijanta (rs1801282) može biti faktor rizika za povećan indeks telesne mase, kardiovaskularne bolesti i dijabetes tipa 2 (139). Takođe, retka mutacija u ligand-vezujućem domenu *PPARG* gena dovodi do delimične lipodistrofije sa teškom rezistencijom na insulin, ranom pojavom dijabetesa, dislipidemije i hipertenzije. Jedna od čestih polimorfni varijanti u ovom genu nalazi se u egzonu 6 i dovodi do zamene citozina timinom na poziciji 1431 (rs3856806). Ovaj polimorfizam je povezan sa nižim indeksom telesne mase, povoljnijim lipidnim profilom i smanjenim rizikom od koronarnih arterijskih bolesti (140, 141).

Tabela 1. Polimorfizmi *PPARG* gena koji se povezuju sa metaboličkim poremećajima (139)

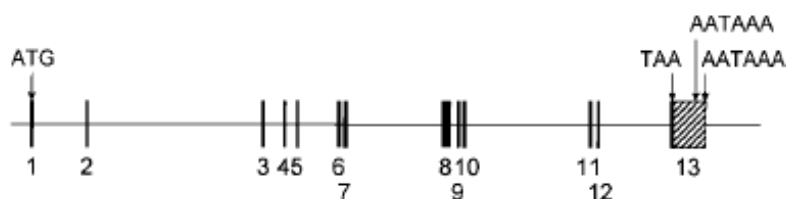
Polimorfizam	Karakteristike metabolizma
Pro12Ala	Dijabetes tipa 2 Povećan ITM
P467L, V290M	Izmenjene vrednosti insulina Insulinska rezistencija Steatoza jetre Hipertenzija Dijabetes tipa 2
rs29722164, rs11128598, rs17793951, rs1151996, rs3856806	Smanjena funkcija B ćelija
V162	Povećani nivoi ukupnog i LDL holesterola
C161T	CHD kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2
C1431T	Rizik faktor za CHD
S289C	Dislipidemija, gojaznost i hipertenzija
H449L	Insulinska rezistencija, steatoza jetre, FPLD3
c.1040>C	FPDL3, hipertenzija, dislipidemija
R1655 L339X	FPDL3 i hipertenzija

ITM-indeks telesne mase; LDL-lipoprotein niske gustine; CHD-koronarna arterijska bolest;FPLD3- familijarna parcijalna lipodistrofija 3

5.4. PEROKSIZOMNI PROLIFERATOROM AKTIVIRANI RECEPTOR GAMA KOAKTIVATOR-1 α (PGC-1 α)

5.4.1. Struktura gena i proteina

Peroksisomni proliferatorom aktivirani receptor γ koaktivator 1 α (PGC-1 α) pripada maloj familiji transkripcionih koaktivatora koja pored ovog proteina uključuje još PGC-1 β i PRC (PGC-1-related coactivator). Sva tri koaktivatora dele slične strukturne karakteristike i utiču na ekspresiju gena vezivanjem i koaktivacijom različitih transkripcionih faktora i nukleusnih receptora. *PPARGC1A* gen je mapiran na hromozomu 4p15.2. Gen je dužine ~76kb i ima 13 egzona i 12 introna. Transkripcijom nastaju 2 iRNK generisane upotrebom 2 poliadenilacijska signala (AATAAA i AATAA). Veličina egzona varira od 46 nukleotida (egzon 6) do 916 nukleotida (egzon 8). Egzon 1 sadrži kodon za inicijaciju translacije, dok su TAA stop kodon i 3' UTR region locirani u egzonu 13 (142), (slika 14).



Slika 14. Organizacija *PPARGC1A* gena (142)

Gen kodira protein (PGC-1 α) koji se sastoji od 779 aminokiselina i ima molekulska masu od 91-kDa. Protein sadrži 3 LxxLL motiva (L-leucin; x-bilo koja aminokiselina) blizu N-terminusa, serin i arginin domene (SR), RNK vezujući domen na C-terminusu kao i 3 pretpostavljena mesta fosforilacije. Između LxxLL i SR domena identifikovan je domen za koji se vezuje PPAR γ (76). PGC-1 koaktivatori imaju veoma jaku transkripcionu aktivnost kada se vežu za heterologne DNK vezujuće domene. Takođe, vezuju se za nekoliko HAT-proteina na svom N-terminalnom regionu uključujući C-vezujući protein (CBP), p300 i steroidni receptorski koaktivator 1 (SRC-1). Ovi proteini acetilišu histone i remodeluju strukturu hromatina kako bi dozvolili vezivanje drugih transkripcionih faktora neophodnih za aktivaciju gena. PGC1 α transkripcioni koaktivatorski kompleks može da zameni represorske proteine kao što su histon deacetilaze, te na taj način omogućava gensku transkripciju. Takođe, PGC-1 α intereaguje sa velikim brojem transkripcionih faktora, te na taj način utiče na aktivaciju različitih bioloških procesa u mnogim tkivima (143). Na primer, PGC-1 α može da interaguje sa većinom članova nukleusne familje receptora, vrlo često u ligand-zavisnom maniru, međutim u nekim slučajevima ligandi nisu potrebni, kao što je slučaj u interakciji sa PPAR γ proteinom. PGC-1 α takođe intereaguje sa transkripcionim faktorima koji ne pripadaju familiji nukleusnih receptora kao što je FOXO1 (engl. *Forkhead box protein O1*) (144) i mnogim drugim, što je prikazano u tabeli 2.

Tabela 2. Interakcija PGC-1 α sa različitim transkripcionim faktorima i njihova funkcija (143)

Transkripcioni faktori	PGC1 α	Funkcija
NRF-1	+	Mitohondrijalni geni
NRF-2	+	Mitohondrijalni geni
PPAR α	+	Oksidacija masnih kiselina
PPAR β/δ	+	Oksidacija masnih kiselina
PPAR γ	+	Indukcija UCP1 proteina
ERR α, β, γ	+	Sekrecija lipoproteina
LXR α, β	+	Metabolizam triglicerida
ER α, β	+	Nepoznata
PXR	+	Nepoznata
Sox9	+	Hondrogeneza
FOXO1	+	Glukoneogeneza
HNF4 α	+	Glukoneogeneza
SREBP1a, 1c, 2	-	Lipogeneza

5.4.2. Funkcija PGC-1 α

PGC-1 α je transkripcioni koaktivator uključen u regulaciju brojnih procesa poput termogeneze mrkog masnog tkiva, glukoneogeneze i insulinske osetljivosti kao i β oksidacije masnih kiselina u jetri. Takođe, za PGC-1 α se smatra da je ključni faktor biogeneze mitohondrija (145). Iako PGC-1 α nije neophodan za diferencijaciju mrkog masnog tkiva, ima veoma važnu ulogu u njegovoj aktivaciji. Tokom embrionalnog razvoja PGC-1 α i β utiču na regulaciju formiranja mrkog masnog tkiva delujući kao koaktivatori određenih transkripcionih faktora poput PPAR γ, α i δ , te nukleusnih respiratornih faktora NRF-1 i 2, koji s druge strane imaju značajnu ulogu u termogenezi i biogenezi mitohondrija (27). Genetička inaktivacija PGC1 α dovodi do smanjenog kapaciteta termogeneze *in vivo*, dok ektopična ekspresija PGC1 α u ćelijama belog masnog tkiva indukuje ekspresiju mitohondrijalnih i termogenih gena (26, 103). Takođe, dokazano je da mrki preadipociti u kulturi bez PGC-1 α i β gube mogućnost mitohondriogeneze. Ekspresija PGC-1 α je u velikoj meri indukovana hladnoćom. Istraživanja su pokazala da su miševi kod kojih postoji nedostatak PGC1- α ekstremno osetljivi na hladnoću. Razlog tome je defektna termogeneza čiji je mogući uzrok

poremećena funkcija β oksidacije masnih ćelija i elektronskog transporta u mitohondrijama, takođe praćena smanjenom indukcijom UCP1 proteina u mrkom masnom tkivu (146). Do sada je opisano nekoliko transkripcionih faktora koji utiču na razvoj i funkciju mrkog masnog tkiva kroz regulaciju transkripcione aktivnosti PGC-1 α . Tako, na primer, RIP140 (engl. *receptor-interacting protein 140*) korepresor mnogih nukleusnih receptora kroz fizičke interakcije suprimira transkripcionu aktivnost PGC-1 α . S druge strane, genetička inaktivacija RIP140 uzrokuje pojavu bež ćelija u belom masnom tkivu. Na sličan način deluju i Rb (retinoblastom) protein i p107 protein, takođe član familije Rb proteina. Adipociti nastali iz fibroblasta ili embrionalnih matičnih ćelija koje ne poseduju protein Rb pokazuju fenotip mrkog masnog tkiva sa visokim sadržajem mitohondrija, te povećanom ekspresijom UCP1 proteina, PGC-1 α i mitohondrijalnih gena. Takođe, kod miševa koji ne poseduju p107 proteina dolazi do akumulacije bež masnog tkiva unutar WAT depoa koje imaju multilokulusna lipidna tela, mnoštvo mitohondrija i visok nivo ekspresije PGC-1 α i UCP1 proteina (26).

Pored efekta na termogenezu mrkog masnog tkiva, PGC-1 α u kompleksu sa NRF 1 i 2 stimuluše ekspresiju mitohondrijalnog transkripcionog faktora A (Tfatm), proteina koji je ključan u replikaciji i transkripciji mitohondrijalne DNK. Stimulacija ekspresije mitohondrijalnih gena od strane PGC-1 α i β ima za rezultat povećanu enzimsku aktivnost vezanu za Krebsov ciklus, β oksidaciju masnih kiselina i oksidativnu fosforilaciju. Iako je ovaj transkripcioni faktor sam po sebi nezamenljiv kada je u pitanju mitohondrijalna biogeneza, on je takođe neophodan za normalnu ekspresiju brojnih mitohondrijalnih gena. Skorija istraživanja su pokazala da je inaktivacija PGC-1 α kod miševa za posledicu imala smanjen nivo iRNK mitohondrijalnih gena u svim tkivima koja su do sada ispitivana, uključujući jetru, srce, skeletne mišiće, mrko masno tkivo i mozak. Iako PGC-1 β ima sličnu strukturu i slične interakcije sa drugim genima kao PGC-1 α , nije u mogućnosti da kompenzuje ulogu PGC-1 α kada je u pitanju normalna transkripcija mitohondrijalnih gena (143). Disfunkcija mitohondrija za posledicu ima razvoj insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2, što sugerise da bi defekti u PGC-1 α imali sličan efekat. S obzirom da insulin stimuliše procese deponovanja energije, kao i da inhibira kataboličke puteve, za pretpostaviti je da se aktivnost PGC-1 α inhibira pod dejstvom insulina. Studije su pokazale da insulin može inhibirati PGC-1 α putem aktivacije Akt puta, čime se sa druge strane inhibira FoxO1, protein koji ima ulogu u vezivanju i aktiviranju PGC-1 α . Takođe, Pokazano je da PGC-1 α pospešuje transport glukoze u skeletne mišiće tako što utiče na regulaciju glukoznog transportera 4 (GLUT4). Iz ovih podataka moglo bi se zaključiti da bi smanjena aktivnost PGC-1 α mogla doprineti insulinskoj rezistenciji u mišićima. Istraživanja su pokazala da osobe sa dijabetesom imaju suprimiranu PGC-1 α ekspresiju u skeletnim mišićima (147). Međutim, doprinos PGC-1 α razvoju insulinske rezistencije i dijabetesa nije u potpunosti razjašnjen u velikoj meri zbog njegove kompleksne uloge u različitim tkivima (148).

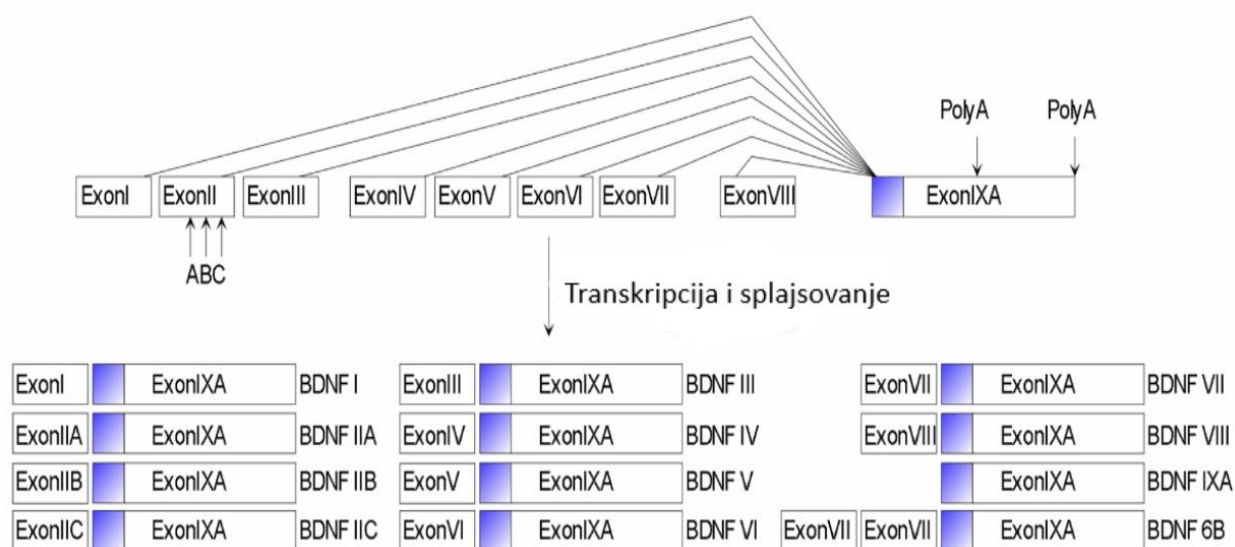
5.4.3. Polimorfizmi *PPARGC1A* gena

S obzirom da PGC-1 α ima ulogu u regulaciji brojnih metaboličkih karakteristika ne iznenađuje činjenica da je disregulacija ovog proteina povezana sa brojnim patološkim stanjima poput insulinske rezistencije, dijabetesa tipa 2 i dislipidemije. U okviru *PPARGC1A* gena opisan je polimorfizam Gly482Ser (rs8192678), u kojem dolazi do zamene glicina serinom na kodonu 482, odnosno zamene guanina adeninom (G>A). Prisustvo ovog polimorfizma utiče na efikasnost proteina, gde nosioci A alela imaju smanjenu ekspresiju proteina za 60% u odnosu na osobe GG genotipa (149). Dosadašnje studije su pokazale povezanost ovog polimorfizma sa rizikom za dobijanje dijabetesa tipa 2 i pojavom gojaznosti. Rezultati meta-analize iz 7 nezavisnih studija u populaciji kavkazoidnog stanovništva ukazuju na povezanost ovog polimorfizma sa dijabetesom tipa 2, gde nosioci AA genotipa imaju povećan rizik za nastanak dijabetesa tipa 2 u odnosu na nosice G alela (150). Takođe, rezultati nekoliko studija pokazuju povezanost rs8192678 polimorfizma sa višim koncentracijama triglicerida u serumu, kako kod dece i adolescenata, tako i kod odraslih osoba (149,151). Pored ovog polimorfizma, u okviru *PPARGC1A* gena opisano je još nekoliko polimorfizama koji se dovode u vezu sa rizikom za dobijanje dijabetesa tipa 2, a to su rs8192678G>A, rs2970847C>T, rs3736265G>A i rs3755863 C>T (150).

5.5. MOŽDANI FAKTOR RASTA (BDNF)

5.5.1. Struktura gena i proteina

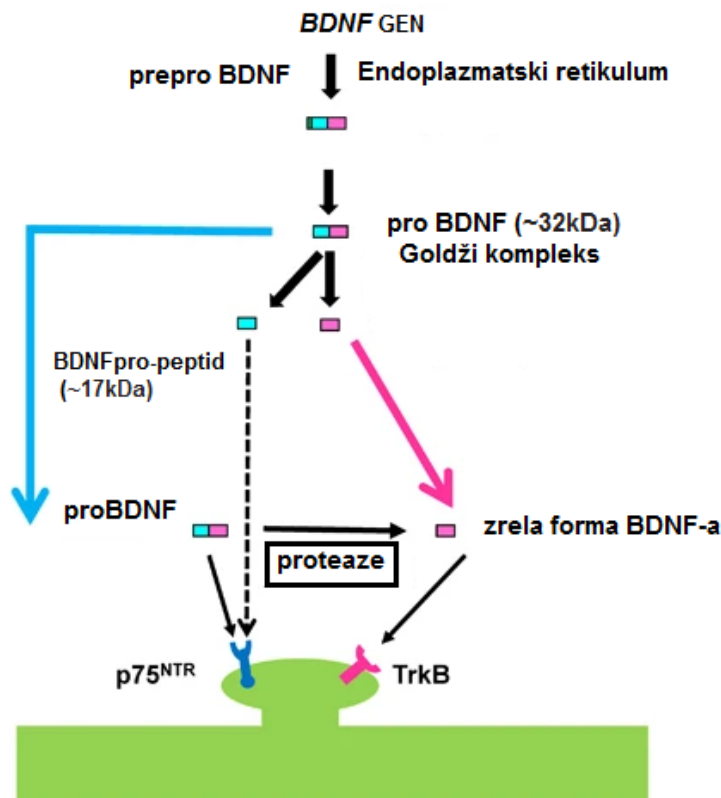
U humanom genomu gen za BDNF (engl. *Brain derived neurotrophic factor*) je lokalizovan na hromozmu 11 u regionu 11p13. Dužina gena je ~ 70 kb. BDNF i ima veoma kompleksnu strukturu s obzirom da se sastoji od 11 egzona: I-V, Vh, VI-VIII, VIIIh i IX (152). Od navedenih egzona, samo je egzon IX (koji se nalazi na 3' kraju gena) kodirajući i sastoji se od regiona a,b,c i d. Aid i saradnici su opisali 9 različitih mesta inicijacije transkripcije, što implicira da 9 različitih promotora utiče na transkripciju BDNF (153), (slika 15).



Slika 15. Struktura BDNF gena i transkripata (154)

Upotrebom alternativnih promotora i mehanizama splajsovanja, generišu se 34 različita BDNF zrele transkripta koji kodiraju 4 različita proteinska produkta. Kompleksnost strukture BDNF ogleda se i u prisustvu dva alternativna mesta završetka transkripcije unutar egzona IX koja generišu dva različita transkripta iRNK. Prva varijanta iRNK sa kratkim 3' UTR regionom (~0.35 kb) je najviše zastupljena u stomi, dok se iRNK sa dugim 3' UTR regionom (~2.85 kb) najčešće nalazi u dendritima kortikalnih neurona (155,156). Ekspresija BDNF nije ograničena samo na centralni nervni sistem. Prolaskom kroz krvno-moždanu barijeru u oba smera, BDNF cirkuliše sistemski, a eksprimira se i u drugim tkivima poput krvi, testisa, timusa, pluća i masnog tkiva (157, 158). Istraživanje koje su sprovedli Pruunsild i saradnici, pokazuje da je ekspresija alternativnih BDNF transkripata specifična za svako tkivo. Na primer, nivo ekspresije transkripata koji sadrže egzone VI i IXabcd je visoka u srcu, placenti i prostati, dok je visok nivo ekspresije onih transkripata koji sadrže egzon VI uočen u plućima (159). Iako je struktura BDNF gena izuzetno kompleksna, otkrivene su samo četiri proteinske varijante. Naime, BDNF se inicijalno sintetise na endoplazmatičnom retikulumu kao prekursorski protein (pre-pro BDNF) veličine ~ 27 kDa. Nakon sečenja signalnog peptida nastaje pro-BDNF, prekursorska forma neurotropina koja se sastoji od pro-domena dužine 129 aminokiselina i zrelog BDNF dužine približno 118 aminokiselina. Potom se pro-BDNF transportuje u Goldžijev kompleks gde se raspoređuje u konstitutivne ili regulatorne sekretorne vezikule (160). Pro-BDNF podleže inraćelijskom proteolitičkom razlaganju kako bi se generisao zreli BDNF, ili se luči u formi pro-BDNF, a zatim se na ekstracelularnom nivou razlaže kako bi se dobio zreli BDNF. Vezikularni proBDNF se konvertuje u zreli protein dejstvom endoproteaza kao što je furin ili u nezrelim sekretornim granulama proprotein konvertazama. Vezikularna sekrecija uključuje i zreli BDNF kao

i proBDNF, s tim da je nivo lučenja zrelog BDNF-a zavisan od tipa i aktivnosti konvertaza. Efikasnost razlaganja, a samim tim i odnos pro i zrelog BDNF-a se razlikuje u postnatalnom periodu. Naime, u neonatalnoj i adolescentnoj fazi života oba tipa proteina su prisutna, dok u odrasloj dobi kod čoveka dominira zreli BDNF protein (155, 161), (slika 16).



Slika 16. Obrada BDNF preproteina (162)

Na transkripciju *BDNF*-a, transport iRNK i proteina u dendrite, te sekreciju proteina značajno utiče aktivnost neurona, kao i određeni neuropeptidi i hormoni. Glutamat oslobođen iz ekscitatornih sinapsi se vezuje za receptore na sintaptičkoj membrani rezultirajući ulaskom Na^+ i Ca^{2+} kroz receptore α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (AMPA), N-metil-D-aspartat (NMDA) receptore i naponom kontrolisane kalcijumske kanale. Ca^{2+} aktivira različite proteinske kinaze koje sa druge strane indukuju transkripciju *BDNF* gena (163). BDNF je koncentrisan u vezikulama koje se transportuju do eksona, odnosno presinaptičkih terminala i dendrita iz kojih se oslobađaju u odgovoru na aktivaciju glutamatskih receptora. Produkti *BDNF* gena se vezuju za receptore visokog afiniteta-tirozin kinaze (trkB) i receptore niskog afiniteta (p75) (164). Od četiri pro-BDNF varijante, najviše je zastupljena proBDNF1. ProBDNF2 varijanta u odnosu na proBDNF1 poseduje 8 aminokiselina više na N-terminusu, dok proBDNF3 ima još 7 aminokiselina više. Za razliku od navedenih varijanti, ProBDNF4 ima deleciju 48 aminokiselina koja je posledica alternativnog splajsovanja (165).

5.5.2. Funkcija BDNF-a

BDNF pripada familiji neurotrofina koja takođe obuhvata i nervni faktor rasta (NGF), neurotrofin 3 (NT3) i neurotrofin 4/5 (NT4/5) (152). BDNF ima značajnu ulogu u preživljavanju i diferencijaciji neurona u centralnom i perifernom nervnom sistemu. Takođe, utiče na izrastanje i morfologiju aksona i dendrita. U kasnijim fazama razvoja nevnog sistema BDNF utiče na regulaciju sinaptičke

transmisije i plastičnosti (157). Najviše se eksprimira u centralnom nervnom sistemu uključujući korteks, hipokampus i limbičke strukture, te je njegova ekspresija u ovim regionima mozga povezana sa boljim kognitivnim statusom (166). Međutim, istraživanja su pokazala da funkcija BDNF-a nije ograničena samo na neurološki razvoj, sinaptičku plastičnost i ulogu u memoriji i učenju već i na ulogu koju ima u regulaciji krvnog pritiska, metabolizma glukoze i lipida, te homeostaze energije (167). Istraživanja su pokazala da je haploinsuficijencija *BDNF*-a kod miševa za posledicu imala pojavu dijabetesa, gojaznosti, te pojačan apetit. Miševi koji su imali nedostatak BDNF-a u hipokampalnim neuronima razvili su anksiozne poremećaje i gojaznost, dok je sa druge strane gladovanje imalo pozitivan efekat na bihevioralne poremećaje kao i na smanjenje telesne mase i insulinske rezistencije (164,168). Aplikacija BDNF-a u intracerebroventrikularni region miševa indukovala je supresiju apetita i smanjenje telesne mase, dok je delecija *BDNF* gena kod istih miševa povezana sa pojavom gojaznosti, povišenim serumskim nivoima leptina, insulina, holesterola i glukoze. Iako je supresija apetita jedan od načina na koji BDNF utiče na energetske homeostazu, skorija istraživanja su pokazala još direktnije mehanizme delovanja BDNF-a na organe uključene u metabolizam energije. Pokazano je da kod miševa koji imaju mutirane leptinske receptore, nezavisno od unosa hrane, prisustvo BDNF-a u CNS-u smanjuje nivo glukoze u krvi i povećava potrošnju energije. BDNF utiče na različite tipove ćelija u organizmu koje su odgovorne za metabolizam glukoze uključujući beta pankreasne ćelije, hepatocite i ćelije skeletnih mišića (169).

Tsuchida i saradnici su u svom istraživanju pokazali uticaj BDNF-a na metabolizam lipida. Naime, kod *db/db* miševa koji su tretirani subkutanom injekcijama BDNF-a u periodu od tri nedelje, dva puta sedmično, merene su koncentracije neestifikovanih slobodnih masnih kiselina, ukupnog holestrola i triglicerida. Na kraju tretmana, rezultati su pokazali značajno smanjenje koncentracija navedenih parametara u odnosu na miševе koji nisu bili tretirani (170). Takođe, neki od metaboličkih efekata BDNF-a ogledaju se kroz potrošnju energije posredstvom perifernih tkiva (164, 171, 172). Prisustvo BDNF u različitim delovima hipotalamusa, primarno u ventromedijalnom i paraventrikularnom jezgru rezultirala je indukcijom ekspresije UCP-1 proteina, te povećanjem potrošnje energije koja bi se bar delimično mogla pripisati povećanoj aktivnosti mrkog masnog tkiva (173). Takođe, prekomerna ekspresija BDNF-a u hipotalamusu kroz mehanizam aktivacije simpatičkih neurona može indukovati konverziju WAT u BAT (84, 174). S toga, endogeno prisustvo BDNF-a je neophodno u ovom procesu, a transformacija se odvija kao odgovor na eksterne stimuluse (senzorne, motoričke, kognitivne i socijalne) (103).

5.5.3. Polimorfizmi gena za BDNF

U genu za moždani faktor rasta postoji nekoliko opisanih polimorfizama od kojih je najviše proučavan polimorfizam rs6265 koji nastaje na 196-om nukleotidu substitucijom guanina (G) adeninom (A), te dovodi do zamene valina metioninom (Val66Met) na poziciji 66. Do substitucije dolazi u prodromu koji se iseca u toku nastajanja zrelog BDNF, ali se smatra značajnim regionom s obzirom da utiče na transport BDNF-a (175, 176). Zamena valina metioninom narušava intraćelijski transport, ćelijsku obradu, te sekreciju BDNF-a, što dovodi do smanjenja produkcije zrelog BDNF-a, a samim tim i do nižih koncentracija u serumu (177). Ovaj polimorfizam se dovodi u vezu sa poremećajima u ishrani kao što su anorexia i *bulimia nervosa*, te drugim neuropsihijatrijskim poremećajima. Takođe, istraživanja su pokazala uticaj Val66Met polimorfizma na regulaciju telesne mase, ITM, dijabetes tipa 2 i kardiometaboličke bolesti (178, 179). Meta-analize pokazale su da nosioci Val66Met polimorfizma imaju povećan rizik od 33% za razvoj poremećaja u ishrani (180). Kaledna i saradnici su u svom istraživanju pokazali da deca i adolescenti koji su nosioci Met alela imaju niži ITM, te je kod adolescenata uočen niži nivo glukoze u krvi (181). Međutim, rezultati drugih istraživanja pokazuju da nosioci Met alela imaju više vrednosti glukoze u krvi, te da su takve individue sklonije pojavi gojaznosti (168). U studiji Peng-a i saradnika pronađena je veza između Val66Met polimorfizma i lipidnog statusa, gde su nosioci Met varijante imali više vrednosti triglicerida ali i niže vrednosti HDL holesterola (157).

Pored ovog polimorfizma, analizirani su i drugi polimorfizmi u okviru *BDNF* gena, a koji se dovode u vezu sa gojaznošću, dislipidemijom i dijabetesom tipa 2. Na primer, Studija Mou i saradnika obuhvatila je analizu 44 polimorfizma u okviru gena za BDNF. Najznačajniji rezultati ove studije pokazuju da su nosioci ređeg C alela u polimorfizmu rs12291063 imali nižu ekspresiju BDNF-a u ventromedijanim regionima mozga, te veću adipoznost kako kod dece tako i kod odraslih (182).

6. CILJEVI RADA

Imajući u vidu porast učestalosti gojaznosti i njenih komorbiditeta kako u Srbiji tako i u svetu, istraživanje u okviru doktorske disertacije je sprovedeno u cilju ispitivanja povezanosti polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP) u genima značajnim za diferencijaciju i aktivaciju mrkog masnog tkiva sa indeksom telesne mase (ITM), glikemijom i lipidnim statusom u grupi adolescenata uzrasta 15 godina. Dosadašnji literaturni podaci ukazuju da mrko masno tkivo ima važnu ulogu u regulaciji telesne mase, metabolizmu glukoze i lipida i energetske homeostazi, posebno u periodu adolescencije kada volumen i aktivnost ovog tkiva najviše rastu. Postavljena je hipoteza koja je u osnovi ove doktorske disertacije: Polimorfne varijante gena koji imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije i aktivnosti mrkog masnog tkiva mogu uticati na individualne varijacije u indeksu telesne mase, lipidnom statusu i glikemiji adolescenata.

Praktični cilj ovog istraživanja jeste bolje razumevanje molekularnih osnova gojaznosti što bi omogućilo otkrivanje novih strategija za terapiju gojaznosti i njenih komorbiditeta.

Uzimajući u obzir da u periodu adolescencije između devojčica i dečaka postoje značajne razlike u nivou lipida analize asocijacije polimorfni varijanti vršiće se ne samo na ukupnom uzorku već i odvojeno po polovima. Takođe, imajući u vidu da preuhranjena i gojazna deca imaju značajno manje ukupnog (funkcionalnog i nefunkcionalnog) mrkog masnog tkiva u u poređenju sa decom normalne telesne mase analize će se vršiti i posebno kod adolescenata normalne telesne mase i preuhranjenih i gojaznih adolescenata.

Potvrda navedene hipoteze omogućila bi otkrivanje varijanti gena odgovornih za individualne varijacije u indeksu telesne mase, lipidnom statusu i glikemiji adolescenata i omogućila bolje razumevanje uloge mrkog masnog tkiva u regulaciji indeksa telesne mase, lipidnog statusa i glikemije adolescenata.

Naučni cilj istraživanja je postavljen na sledeći način:

1. Odrediti učestalosti genotipova i alela polimorfizama pojedinačnih nukleotida u genima za *PRDM16* (rs12409277), *CtBP2* (rs1561589), *PPAR γ* (rs385806), *PGC-1 α* (rs8192678) i *BDNF* (rs6265).
2. Ispitati da li postoji statistički značajna povezanost genotipova analiziranih polimorfizama *PRDM16*, *CtBP2*, *PPARG*, *PPARGC1A*, i *BDNF* gena sa indeksom telesne mase.
3. Ispitati da li postoji statistički značajna povezanost genotipova analiziranih polimorfizama *PRDM16*, *CtBP2*, *PPARG*, *PPARGC1A*, i *BDNF* gena i biohemijskih parametara (nivo glukoze, triglicerida, ukupnog, HDL i LDL holesterola).

II MATERIJAL I METODE

7. UZORCI

U istraživanje je uključeno 308 adolescenata oba pola, uzrasta 15 godina koji su pregledani u okviru Jugoslovenske studije prekursora ateroskleroze kod školske dece (JUSAD, 2003. godine). Uzorak je selektovan slučajnim odabirom 217 adolescenata normalnog indeksa telesne mase ($ITM \leq 85$. percentila) i 91 adolescent čiji indeks telesne mase prelazi 85 percentila (preuhranjeni i gojazni). Od ukupnog broja selektovane dece 153 odnosno 49,68% su bili dečaci, dok je devojčica bilo 155, odnosno 50,32%. Na osnovu podataka iz JUSAD studije, prekomerno uhranjeni su dečaci čiji je $ITM > 23,6 \text{ kg/m}^2$ i devojčice sa $ITM > 23,8 \text{ kg/m}^2$ dok u kategoriju gojaznih spadaju dečaci sa $ITM > 27 \text{ kg/m}^2$ i devojčice sa $ITM > 27,2 \text{ kg/m}^2$.

Tokom uzorkovanja za sve ispitanike su prikupljeni anamnestički podaci o prethodnim oboljenjima roditelja koji uključuju infarkt miokarda, hipertenziju, dijabetes i gojaznost. Takođe, prikupljeni su i podaci o prethodnim oboljenjima ispitanika koja obuhvataju: krize svesti, poremećaje srčanog ritma, infektivni miokarditis ili perikarditis, astmu, alergije i hipertireozu.

Prilikom redovnih godišnjih pregleda u 11 pedijatrijskih centara primarne zdravstvene zaštite (Čukarica, Palilula, Požarevac, Užice, Kraljevo, Knjaževac, Bor, Niš, Subotica, Arilje i Despotovac) uzete su antropometrijske mere koje uključuju visinu, težinu, godine i pol za sve ispitanike. U momentu pregleda svi ispitanici su imali normalan psihofizički rast i razvoj. Podaci su prikupljeni na osnovu standardizovanih uputnika i kliničkih pregleda. Indeks telesne mase (ITM) je izračunat na osnovu ispitanikove mase u kg podeljene sa kvadratom visine u m. Visina je merena bez obuće do najbliže 1cm. Prilikom merenja telesne mase ispitanici su nosili laganu odeću, bez obuće a korišćena je kalibrisana vaga kojom je moguće meriti do najbliže 0,1 kg.

Takođe, prikupljeni su podaci biohemijskih analiza - glikemije i vrednosti triglicerida, ukupnog holesterola, te HDL i LDL holesterola. Molekularno-genetička istraživanja sprovedena su na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Za ovo istraživanje dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Kriterijum za isključivanje iz studije je prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja:

- dijabetes tip I i II,
- sistemska (generalizovana) inflamacija,
- kardiovaskularne bolesti,
- maligne bolesti,
- genetički sindromi,
- hronična nepokretljivost ili cerebralna paraliza.

8. BIOHEMIJSKE ANALIZE

Prilikom određivanja lipidnih parametara korišćene su standardne laboratorijske enzimske metode. Lipidni parametri su održivani u serumu nakon gladovanja od 12 sati. Svi uzorci su držani u frižideru na $+4^{\circ}\text{C}$ do analiziranja.

8.1. Glikemija

Nivo šećera u krvi određivan je standardnim laboratorijskim protokolima koji se zasniva na određivanju glukoze sa heksokinazom i glukozodehidrogenazom. Pri ovoj metodi glukoza se u prisustvu ATP-a delovanjem heksokinaze i Mg^{+} fosforilira u glukoza 6-fosfat. Prilikom delovanja G-6-PD i NADP^{+} glukoza 6-fosfat oksidira u 6 fosfoglukonat. Povećanje koncentracije NADP meri se na 340 nm. Normalne vrednosti šećera u krvi su od 3,5-6,1 mmol/l.

8.2. Ukupan holesterol

Ukupan holesterol je određivan enzimskom metodom koja se zasniva na delovanju holesterol esteraze i holesterol oksidaze. Holesterol se prevodi u 4-holesten-3-on pri čemu nastaje vodonik-peroksid, koji oksiduje hromogen (fenol i 4-aminoantipirin) u crveni hinonimin pod delovanjem peroksidaze. Absorbancija hinonimina se meri na 500-540 nm i proporcionalna je koncentraciji holesterola u uzorku. Normalne vrednosti su do 5,20 mmol/L.

8.3. HDL holesterol

HDL holesterol je određivan primenom precipitirajućeg agensa, koji formira nerastvorene komplekse (lipoprotein-polianjon-divalentni katjon kompleks) sa hilomikronima, VLDL i LDL u serumu. Nakon centrifugiranja HDL holesterol se u supernatantu određuje enzimskom metodom. Optimalne vrednosti za HDL holesterol su $\geq 1,60$ mmol/L.

8.4. LDL holesterol

LDL holesterol je izračunavan preko Friedwaldove formule: $LDL - \text{holesterol (mmol/L)} = \text{ukupan holesterol} - \text{HDL holesterol} - \text{trigliceridi}/2,2$. Optimalne vrednosti za LDL-holesterol treba da iznose $<3,40$ mmol/L.

8.5. Trigliceridi

Trigliceridi su određivani enzimskom, kalorimetrijskom metodom uz korišćenje enzima lipoproteinske lipaze, glicerol kinaze, glicerol-3-fosfat oksidaze i peroksidaze i odgovarajućeg hromogena. Hinonimin, koji nastaje iz ove reakcije meri se na 500-546 nm i njegova izmerena absorbancija proporcionalna je koncentraciji triglicerida u uzorku. Normalne vrednosti triglicerida su do 1,70 mmol/L (10).

9. METODE MOLEKULARNO - GENETIČKE ANALIZE

U ovom istraživanju molekularno-genetičke metode obuhvataju izolaciju ukupne genomske DNK iz limfocita periferne krvi, detekciju polimorfizama *PRDM16* i *CtBP2* gena primenom PCR-a u realnom vremenu uz upotrebu standardizovanih TaqMan®SNP eseja za genotipizaciju i detekciju polimorfizama *PPARG*, *PPARGC1A* i *BDNF* gena primenom reakcije lančane polimerizacije (PCR) i restrikcijom produkata PCR reakcije specifičnim restrikcionim enzimima (PCR-RFLPs metoda).

9.1. Izolacija DNK iz limfocita periferne krvi

Ukupna genomska DNK izolovana je iz limfocita periferne krvi adolescenata. Izolacija DNK je vršena metodom isaljavanja („salting out“) po Milleru (1983). Metoda se zasniva na uzorkovanju 5ml venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat ili EDTA). Potom se krv pomeša sa istom količinom pufera za lizu, te se drži u frižideru na $+4^{\circ}\text{C}$ 15-20 minuta. Zatim se centrifugira 15 minuta na 2000 obrtaja, supernatant se odbaci, a talog resuspenduje u 5-10 ml fiziološkog pufera. Zatim se uzorak ponovo centrifugira 15 min na 2000 obrtaja, a postupak se ponavlja 2-3 puta dok talog ne pobeli. Nakon poslednjeg „ispiranja“ supernatant se odbaci a talogu doda 3 ml pufera A, 50 μl 10% proteinaze K i 200 μl 10% SDS (Na-dodecilsulfat). Uzorak se dobro resuspenduje i preko noći inkubira na 37°C . Sledećeg dana dodaje se 1ml 6M NaCl, te se dobro promućka i centrifugira 15 min na 3000 obrtaja. Nakon toga se supernatant prenosi u čistu epruvetu i centrifugira 15 minuta na 4000 obrtaja. Supernatant se pažljivo presipa u čistu graduisanu epruvetu, te se dodaje isti volumen izopropanola. Mućkanjem epruvete izdvaja se beličasti končić DNK. DNK se pažljivo pokupi staklenim štapićem i

potopi 30 sekundi u 70% etanol. DNK se osuši na vazduhu a potom se rastvori u 300µl redestilovane vode.

Tabela 3. Sastav pufera za izolaciju DNK

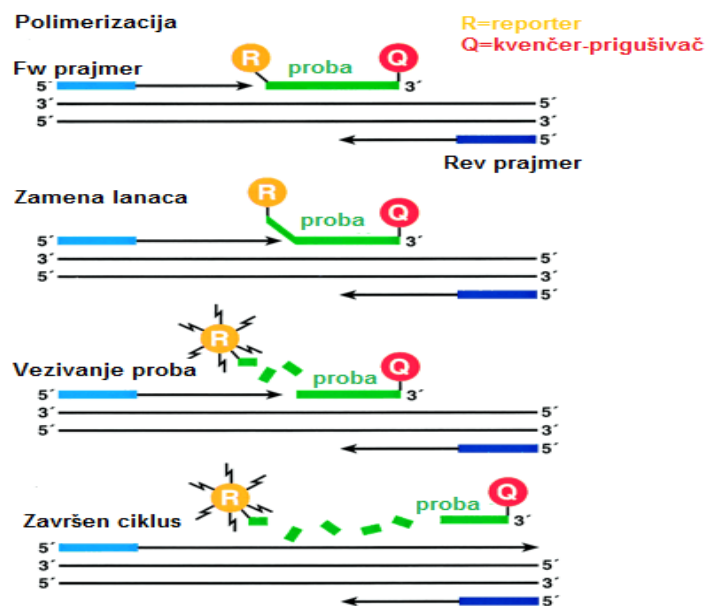
Pufer za lizu * ¹	Fiziološki pufer	Pufer A	TE pufer
0,32 M saharoza	0,075 M NaCl	10 mM TRIS HCl * ²	10 mM TRIS HCl * ²
10 mM TRIS HCl * ²	0,025 M EDTA pH 8	400 ml NaCl	1mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl ₂			

*¹ Autoklavirati i čuvati na +4C°, *² pH 7,5

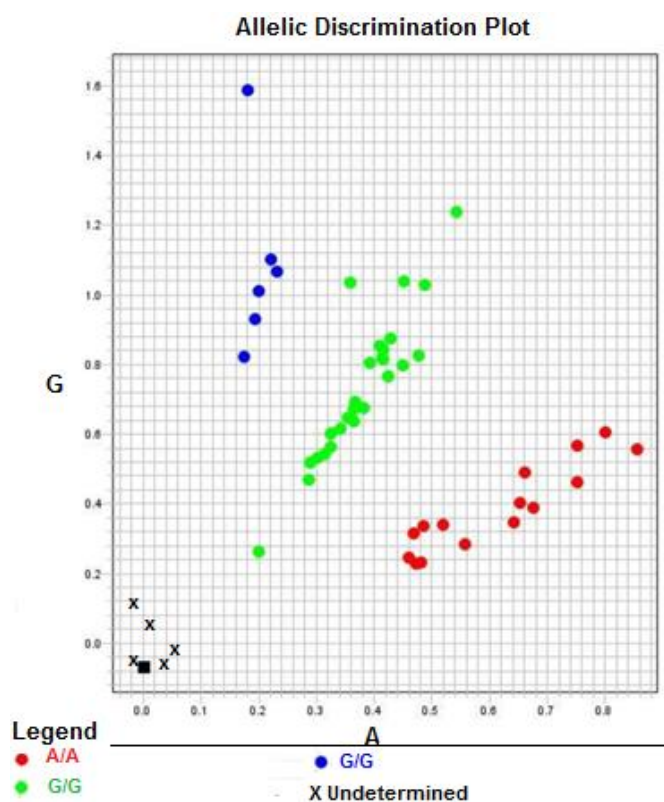
Koncentracija DNK u uzorku merena je spektrofotometrom na 260nm, a čistoća DNK određivana je na osnovu absorbance uzoraka na 260 i 280nm.

9.2. PCR u realnom vremenu (*Real Time PCR*)

Za analizu polimorfizama se pored PCR-RFLPs primenjuje i Real Time PCR, odnosno PCR u realnom vremenu. Ova metoda se zasniva na istom principu kao konvencionalan PCR. Primenom ove metodologije dinamika amplifikacije se prati u realnom vremenu posle svakog ciklusa. U slučaju TaqMan eseja za genotipizaciju pored neophodnih prajmera koriste se i alel specifične oligonukleotidne probe. Ove probe su na 5' kraju obeležene različitim fluorescentnim bojama koje služe kao reporter boje (npr. VIC i FAM), dok na 3' kraju imaju prigušivač, čija je uloga blokiranje emisije fluorescencije. Prilikom vezivanja prajmera u toku reakcije, dolazi i do vezivanja jedne od proba. Potom, kada Taq polimeraza dodaje nove nukleotide, proba se uklanja 5'-3' egzonukleaznom aktivnošću enzima. Prvo dolazi do odvajanja 5' nukleotida sa reporterom, te se samim tim udaljava od prigušivača što za rezultat daje fluorescenciju boje koju aparat registruje. Intenzitet fluorescencije raste iz ciklusa u ciklus te je moguće pratiti dinamiku PCR reakcije u realnom vremenu (slika 17). Po završetku reakcije, povećanje fluorescencije samo jedne od boja ukazuje na homozigotno stanje za dati alel, dok povećanje fluorescencije obe boje označava heterozigotno stanje za date alele (slika 18). Real Time PCR reakcije izvršene su na aparatu 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) a analizirane primenom softvera Applied Biosystems 7500 software v2.0.6.



Slika 17. Princip rada Real Time PCR metode (184)



Slika 18. Primer prikaza SNP rezultata primenom TaqMan eseja

9.3. Analiza polimorfizama rs12409277 gena za PRDM16 i rs1561589 gena za CtBP2

Prilikom analize ovog polimorfizma korišćeno je 12.5 µl reakcione smeše koja za svaki uzorak sadrži sledeće komponente:

- 6,25 µl TaqMan Universal PCR Master mix (2X)
- 0,625 µl 20X SNP Genotyping Assay
- 0,5 µl DNK (1-20ng/µl)

- H₂O- REDE ampulirane do 12,5 µl

Uslovi amplifikacije bili su:

- aktivacija AmpliTaq Gold enzima 10 minuta na 95°C
- 40 ciklusa od 2 koraka:
 1. denaturacija 15 sekundi na 92 °C
 2. vezivanje i ekstenzija prajmera, te polimerizacija DNK 1 minuta na 60°C
- završna ekstenzija 7 minuta na 72°C.

9.4. PCR metoda i restrikciona digestija PCR produkata (PCR-RFLPs metoda)

Lančana reakcija polimerizacije (PCR) je metoda kojom se umnožavaju ciljani segmenti DNK sekvence u uzorku ukupne genomske DNK ili heterogene cDNK. Poznavanje određene DNK sekvence koristi se za kreiranje dva oligonukleotidna prajmera-graničnika dužine oko 20-30 bp koji su komplementarni sa DNK nizovima koji ograničavaju ciljani segment DNK. Prvi segment PCR reakcije jeste denaturacija dvostrukog lanca DNK podizanjem temperature. Nakon denaturacije prajmeri se vezuju za komplementarne sekvence jednonančane DNK matrice i ponašaju se kao RNK početnice. U prisustvu dezoksinukleotidnih fosfata (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) termostabilna DNK polimeraza produžava nizove prajmera DNK i na taj način sintetiše komplementarne DNK sekvence. Nakon 30-40 ponovljenih ciklusa proizvešće se više od milion amplikona ciljnog DNK segmenta. Neophodni reagensi za PCR reakciju su H₂O, dezoksinukleotid trifosfati (dNTP), Mg⁺⁺, pufer 10X, Taq polimeraza i dva prajmera (Fw;Rev) (185).

Prilikom analize *PPARG*, *PPARGC1A* i *BDNF* polimorfizama u ovom radu korišćeno je 25µl smeše za PCR koja za svaki uzorak sadrži:

- 2,5 µl 10 x PCR pufera
- 1,5 µl 25 mM MgCl₂
- 0,5 µl 10 mM dNTP (smeša, 10mM svakog dNTP)
- 0,5 µl prim 1 (300 ng / µl)
- 0,5 µl prim 2 (300 ng / µl)
- 2 µl DNK (100 ng / µl)
- 0,2 µl Taq polimeraze (5U/ µl)
- H₂O (REDE ampulirane) do 25 µl.

PCR reakcija se odvijala kroz cikluse:

1. Denaturacije (na temperaturi od 95°C)
2. Vezivanja prajmera (annealing na temperaturi od 52-70°C)
3. Sinteze novih lanaca (elongacija na temperaturi od 72°C).

Kroz 35-40 uzastopno ponovljenih ciklusa dobije se 10⁵ ciljane DNK sekvence. Ugradnja nukleotida pri elongaciji se odvija brzinom od 300-100 nukleotida u sekundi. Umnoženi ciljani segment DNK se nakon PCR reakcije lako vizuelizuje kao jedna traka određene dužine nakon primene gel elektroforeze.

Sve PCR reakcije u ovom radu su izvršene na aparatu Applied Biosystems Thermal Cycler 2720. Provera ispitivanih PCR produkata vršena je na 2% agaroznom gelu. Nakon toga, primenjivani su odgovarajući restrikcioni enzimi specifični za svaki od navedenih polimorfizama koji seku DNK sekvencu na tačno određenom restrikcionom mestu, te je nakon inkubacije uzoraka provera produkata vršena na 8% poliakrilamidnom gelu (PAA). Bojenje DNK rađeno je etidijum-bromidom ili Sybr®safe DNA bojom, a gelovi su vizuelizovani osvetljavanjem na UV-transiluminatoru.

Za pripremu 2% agaroznog gela potrebno je:

1. 1 g agaroze
2. 10 ml 5X TBE pufera
3. 40 ml H₂O.

Za pripremu 8% poliakrilamidnog gela je potrebno sledeće:

1. 6 ml H₂O
2. 2 ml TBE pufera
3. 2 ml 40% akrilamida
4. 70 µl APS-a (amonijum persulfat)
5. 13 µl TEMED-a (tetrametiletildiamin).

9.5. Analiza polimorfizma 1431C>T (rs3856806) gena za PPAR γ

Prilikom analize ovog polimorfizma korišćeni su prajmeri koji ograničavaju region od 259 bp.

Sekvence prajmera su:

Fw prajmer: 5'- CAG GTT TGC TGA ATG TGA AGC-3'

Rev prajmer: 5'- TGG CTC AGG ACT CTC TGC TAG-3'

Uslovi PCR reakcije bili su:

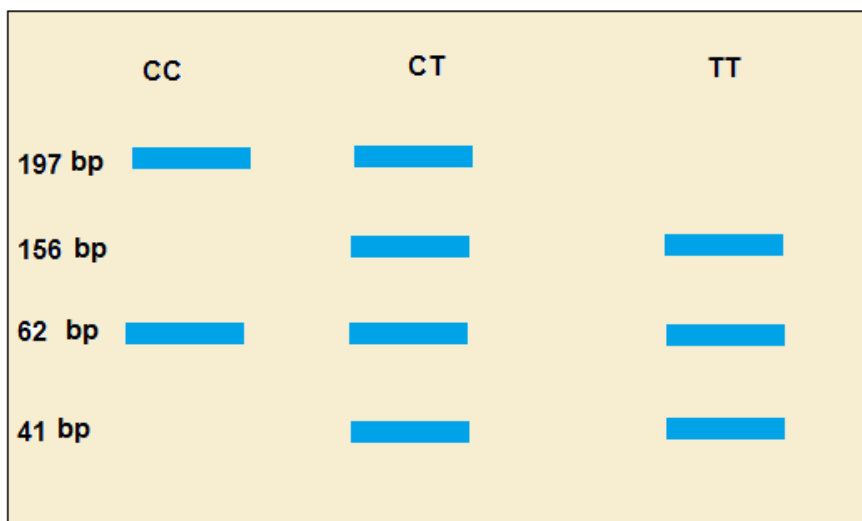
- inicijalna denaturacija 5 minuta na 94° C
- 37 ciklusa od 3 koraka
 1. denaturacija 30 sekundi na 94° C
 2. vezivanje prajmera 30 sekundi na 63 °C
 3. ekstenzija prajmera i polimerizacija na DNK 30 sekundi na 72 °C
- završna ekstenzija 7 minuta na 72° C.

Posle PCR reakcije digestija produkata vršena je NlaIII enzimom koji je izolovan iz bakterije *Neisseria lactamica*. Ovaj enzim prepoznaje niz nukleotida 5'CATG↓...3' i seče sekvencu na naznačenom mestu.

Restrikcija NlaIII enzimom se odvijala u smeši koja sadrži:

1. 6 µl PCR produkta
2. 5 U enzima (0.4 µl)
3. 1,5 µl 10 X pufera NlaIII
4. 8,2 µl H₂O.

Inkubacija uzoraka je trajala 2 sata na temperaturi od 37°C u termostatu. Posle sečenja enzimom i elektroforetskog razdvajanja u slučaju alelne varijante C očekuju se fragmenti dužina 197bp, 62bp. U slučaju alelne varijante T očekuju se fragmenti dužina 156bp, 65bp i 41bp (slika 19). Vizuelizacija restrikcionih fragmentata vršena je primenom vertikalne elektroforeze na 8% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Vertikalna elektroforeza je trajala 45 minuta i odvijala se pri konstantnoj jačini struje od 45 mA.



Slika 19. Raspored traka PCR produkta rs3856806 polimorfizma nakon digestije restrikcionim enzimom na 8% PAA gelu

Slika 19 prikazuje raspored traka dobijen nakon elektroforetskog razdvajanja restrikcionih fragmentata PCR produkta dela gena za PPAR γ nakon digestije restrikcionim enzimom NlaIII.

9.6. Analiza polimorfizma Gly482Ser (rs8192678) gena za PGC-1 α

Prilikom analize ovog polimorfizma u PCR reakciji korišćeni su sledeći prajmeri koji ograničavaju region od 500 bp:

Fw prajmer: 5'-TTT GGA GGC AAG CAA GCAG-3'

Rev prajmer: 5'-TAT TAG GGT TTT GCC AAGG-3'

Uslovi PCR amplifikacije bili su:

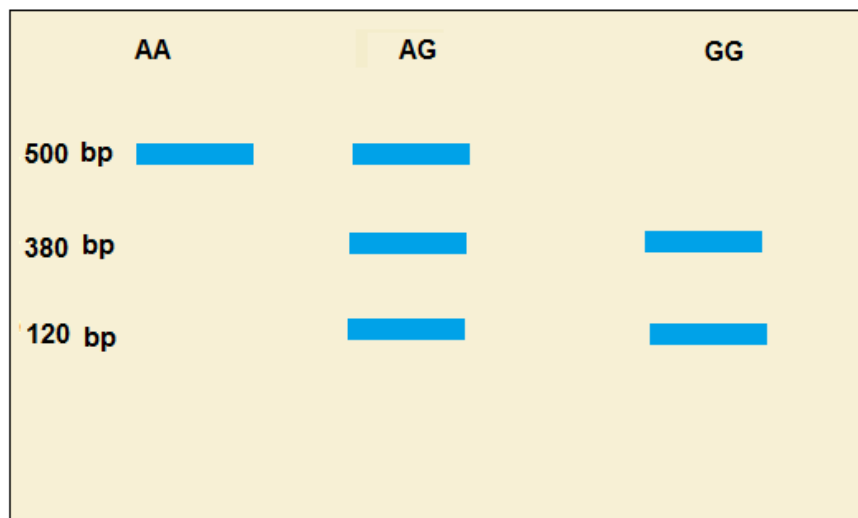
- inicijalna denaturacija 5 minuta na 94° C
- 34 ciklusa od 3 koraka
 1. denaturacija 30 sekundi na 94° C
 2. vezivanje prajmera 30 sekundi na 54 °C
 3. ekstenzija prajmera i polimerizacija na DNK 45 sekundi na 72 °C
- završna ekstenzija 7 minuta na 72° C.

Restrikciona digestija vršena je MspI enzimom koji je izolovan iz bakterija koje pripadaju rodu *Moraxella*. Ovaj enzim prepoznaje sekvencu nukleotida 5'...C↓CGG... 3' i seče niz na naznačenom mestu. Restrikcija MspI enzimom se odvijala u smeši koja sadrži:

1. 6 μ l PCR produkta
2. 5 U enzima (0.3 μ l)
3. 2,4 μ l 10 X pufera MspI
4. 6 μ l H₂O
5. 0,3 μ l BSA pufera.

Inkubacija uzoraka je trajala 2 sata na temperaturi od 37°C u termostatu. Posle elektroforetskog razdvajanja u slučaju prisustva restrikcionog mesta, odnosno alela G, očekuju se produkti veličine 380bp i 120bp, dok su fragmenti dužine 500bp prisutni u slučaju alelene varijante A (slika 20). Vizuelizacija restrikcionih fragmentata vršena je primenom vertikalne elektroforeze na

8% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Vertikalna elektroforeza je trajala 60 minuta i odvijala se pri konstantnoj jačini struje od 45 mA.



Slika 20. Raspored traka PCR produkta rs8192678 polimorfizma nakon digestije restrikcijom enzimom na 8% PAA gelu

Na slici 20 prikazan je raspored traka dobijen nakon elektroforetskog razdvajanja restrikcijom fragmentata PCR produkta dela gena za PGC-1 α nakon digestije restrikcijom enzimom MspI.

9.7. Analiza polimorfizma G196A (rs6265) gena za BDNF

Prilikom analize ovog polimorfizma u PCR reakciji korišćeni su sledeći prajmeri:

Fw prajmer: 5'- ACT CTG GAG AGC GTG AAT GG-3'

Rev prajmer: 5'- ACT ACT GAG CAT CAC CCT GGA-3'

Uslovi amplifikacije bili su:

- početna denaturacija 5 minuta na 95 °C
- 35 ciklusa od tri koraka:
 1. denaturacija 1 min na 94 °C
 2. vezivanje prajmera 30 sekundi na 55 °C
 3. ekstenzija prajmera i polimerizacija na DNK 1 minut na 72 °C
- završna ekstenzija 7 minuta na 72 °C.

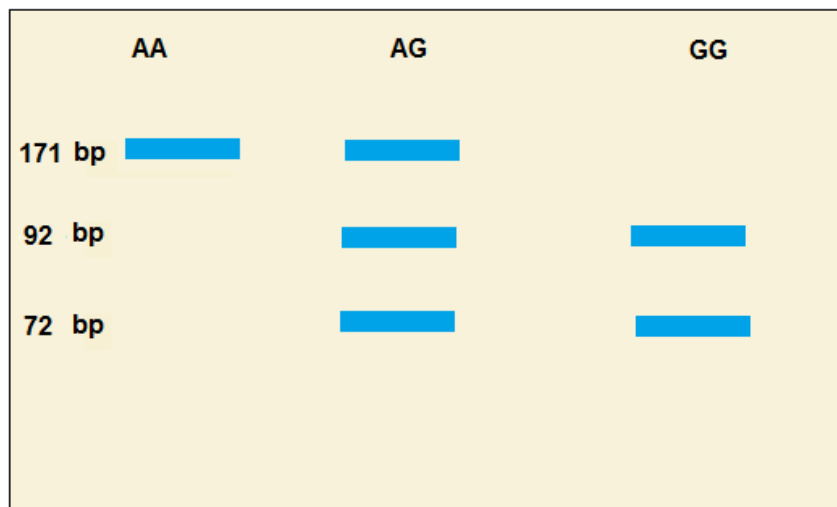
Nakon PCR reakcije restrikcijom digestija vršena je restrikcijom enzimom Eco72I koji prepoznaje restrikciono mesto 5'...CACGTG↓...3', a izolovan je iz bakterije *Escherichia Coli* RFL72. Reakcija restrikcijom digestije primenom Eco72I se odvijala u smeši koja sadrži:

1. 5 μ l PCR produkta
2. 5 U enzima (0.5 μ l)
3. 1,5 μ l 10 X pufera Eco72I
4. 8 μ l H₂O.

Inkubacija uzoraka je trajala 3 sata na temperaturi od 37 °C u termostatu.

U okviru dobijenog produkta dužine 171 bp postoji jedno restrikciono mesto ukoliko je prisutan alel G, pa se nakon restrikcijom digestije i elektroforetskog razdvajanja mogu uočiti fragmenti sledećih dužina: 92 bp i 72 bp koji odgovaraju alelnoj varijanti G, te fragmenti dužine 171 bp koji odgovaraju alelnoj varijanti A (slika 21). Vizuelizacija restrikcijom fragmentata vršena je primenom

vertikalne elektroforeze na 8% nedenaturišućem poliakrilamidnom gelu. Vertikalna elektroforeza je trajala 45 minuta i odvijala se pri konstantnoj jačini struje od 45 mA.



Slika 21. Raspored traka PCR produkta rs6265 polimorfizma nakon digestije restrikcijom enzimom na 8% PAA gelu

Na slici 21 prikazan je raspored traka dobijen nakon elektroforetskog razdvajanja restrikcijom fragmentata PCR produkta dela gena za BDNF nakon digestije restrikcijom enzimom Eco72I.

10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka vršena je primenom statističkog softvera IBM SPSS 17. Atributivne varijable su prikazane brojevima i procentima, a kvantitativne varijable srednjim vrednostima i standardnim devijacijama. Za poređenja vrednosti analiziranih varijabli (ITM, nivo glukoze i lipidni status) između grupa sa različitim genotipom korišćeni su Studentov T-test ili Fišerova parametarska analiza varijanse (ANOVA) i Kruskall-Wallis test. Nakon grupisanja genotipova korišćeni su Studentov T-test ili Mann-Whitney test u zavisnosti od distribucije varijabli. Kako bi se potvrdila asocijacija između određenih parametara i genotipova i ispitaio uticaj odgovarajućih kovarijata, primenjena je multipla linearna regresiona analiza. Statistička značajnost utvrđena je na nivou $p < 0,05$.

Završna obrada podataka rađena je primenom računarskog programa Microsoft Office Excell 2010.

III REZULTATI

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 308 (5,13%) adolescenata uzrasta 15 godina koji su selektovani slučajnim odabirom od ukupno 6000 adolescenata iz JUSAD studije. Od ukupnog broja selektovane dece 153 odnosno 49,68% su bili dečaci, dok je devojčica bilo 155, odnosno 50,32%. Prilikom pregleda za sve ispitanike su prikupljeni anamnestički podaci koji uključuju: anamnezu oba roditelja i dece, antropometrijske mere adolescenata (visinu i težinu), godine i pol. Takođe, prikupljeni su podaci biohemijskih analiza koje obuhvataju vrednosti glikemije, triglicerida, ukupnog holesterola, te HDL i LDL holesterola. Kriterijum za isključivanje iz studije je prisustvo bar jednog od navedenih poremećaja:

- dijabetes tip I i II,
- sistemska (generalizovana) inflamacija,
- kardiovaskularne bolesti,
- maligne bolesti,
- genetički sindromi,
- hronična nepokretljivost ili cerebralna paraliza.

U tabeli 4 prikazani su podaci o prethodnim oboljenjima ispitanika dobijenih uvidom u anamnestičke podatke.

Tabela 4. Učestalost prethodnih oboljenja kod ispitanika

Oboljenje	Broj ispitanika (%)
Kriza svesti	1 (0,3)
Poremećaj srčanog ritma	32 (10,4)
Infektivni miokarditis ili perikarditis	1 (0,3)
Astma	3 (1,0)
Alergije	13 (4,2)
Hipertireoza	1 (0,3)

Analizom anamneze oba roditelja ispitanika dobijeni su podaci o stepenu uhranjenosti i oboljenjima majke i oca, što se može videti u tabeli 5.

Tabela 5. Učestalost oboljenja majke i oca ispitanika

Oboljenje	Broj (%)
Majka	
infarkt miokarda	1 (0,3)
hipertenzija	23 (7,5)
dijabetes	4 (1,3)
gojaznost	85 (27,6)
Otac	
infarkt miokarda	10 (3,2)
hipertenzija	25 (8,1)
dijabetes	10 (3,2)
gojaznost	92 (29,9)

U okviru ove studije, adolescenti su grupisani na osnovu stepena uhranjenosti. U grupi dečaka kojih je ukupno 153, 26 dečaka, odnosno 17,8% je sa ITM između 85. i 95. percentila, što ih svrstava u kategoriju preuhranjenih. ITM preko 95. percentila imalo je 20 dečaka, tj. 13,7%, te su oni kategorisani kao gojazni. Od ukupnog broja devojčica, 29 (17,8%) je bilo preuhranjeno, dok je njih 17 (11,0%) bilo gojazno.

Analizirane su srednje vrednosti ITM, glikemije, triglicerida, ukupanog holesterola, HDL i LDL holesterola ukupno za 308 ispitanika, kao i u zavisnosti od pola (tabela 6).

Tabela 6. Srednje vrednosti analiziranih parametara odvojeno po polu i ukupno za sve ispitanike

Analizirani parametri	ukupno	dečaci	devojčice	p
ITM	21,99±4,30	21,64±4,26	22,34±4,32	0,088
Glikemija	4,69±0,65	4,78±0,61	4,61±0,67	0,031
Trigliceridi	0,99±0,56	1,00±0,64	0,98±0,47	0,213
Ukupni holesterol	4,34±0,86	4,17±0,75	4,50±0,94	0,001
HDL	1,41±0,41	1,38±0,42	1,45±0,39	0,171
LDL	2,44±0,84	2,33±0,74	2,54±0,91	0,033

Rezultati analize srednjih vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od pola (tabela 6) ukazuju na više vrednosti glikemije kod dečaka u odnosu na devojčice, ($p=0,031$). Dok devojčice imaju više vrednosti ukupanog holesterola kao i LDL holesterola u odnosu na dečake ($p=0,01$; $p=0,033$).

Zatim su analizirane srednje vrednosti odabranih parametara za ispitanike čiji je $ITM \leq 85$. percentila, odnosno za normalno uhranjene, kao i za adolescente čiji je $ITM > 85$. percentila, odnosno za preuhranjene i gojazne. Rezultati su prikazani u tabelama 7 i 8.

Tabela 7. Srednje vrednosti analiziranih parametara kod adolescenata sa ITM \leq 85. percentila na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Analizirani parametri	ukupno	dečaci	devojčice	p
ITM	19,60 \pm 2,04	21,64 \pm 4,26	22,34 \pm 4,32	0,154
Glikemija	4,67 \pm 0,64	4,78 \pm 0,61	4,61 \pm 0,67	0,490
Trigliceridi	0,93 \pm 0,50	1,00 \pm 0,64	0,98 \pm 0,47	0,634
Ukupni holesterol	4,34 \pm 0,86	4,17 \pm 0,75	4,50 \pm 0,94	0,002
HDL	1,46 \pm 0,42	1,38 \pm 0,42	1,45 \pm 0,39	0,301
LDL	2,43 \pm 0,83	2,33 \pm 0,74	2,54 \pm 0,91	0,057

Analizom rezultata iz tabele 7 primećuje se da su vrednosti ukupnog holesterola kod adolescenata sa ITM \leq 85. percentila bile statistički značajno više kod devojčica ($p=0,002$) u odnosu na dečake. Takođe, vrednosti LDL holesterola su na granici statističke značajnosti ($p=0,057$), gde su devojčice imale više vrednosti ovog parametra u odnosu na dečake. Razlike u srednjim vrednostima ostalih parametara nisu uočene.

Tabela 8. Srednje vrednosti analiziranih parametara kod adolescenata sa ITM $>$ 85. percentila na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Analizirani parametri	ukupno	dečaci	devojčice	p
ITM	27,05 \pm 3,26	27,06 \pm 3,06	27,04 \pm 3,46	0,968
Glikemija	4,74 \pm 0,53	4,84 \pm 0,46	4,65 \pm 0,58	0,094
Trigliceridi	1,09 \pm 0,62	1,08 \pm 0,66	1,09 \pm 0,59	0,084
Ukupni holesterol	4,39 \pm 0,86	4,24 \pm 0,75	4,54 \pm 0,97	0,107
HDL	1,31 \pm 0,35	1,23 \pm 0,32	1,38 \pm 0,36	0,041
LDL	2,59 \pm 0,92	2,55 \pm 0,92	2,64 \pm 0,93	0,659

U tabeli 8 prikazani su rezultati srednjih vrednosti analiziranih parametara kod prehranjenih i gojaznih ispitanika. Primećuje se da su srednje vrednosti HDL holesterola bile statistički značajno više kod devojčica u odnosu na dečake ($p=0,041$). Razlike u srednjim vrednostima ostalih analiziranih parametara nisu uočene.

Zatim, analizirane su razlike u srednjim vrednostima posmatranih parametara za normalno uhranjene i prehranjene i gojazne adolescente zajedno. Rezultati su prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. Srednje vrednosti analiziranih parametara kod normalno uhranjenih, te preuhranjenih i gojaznih adolescenata na ukupnom uzorku

Analizirani parametri	ITM≤85. pc	ITM>85. pc	p
Glikemija	4,67±0,53	4,76±0,64	0,311
Trigliceridi	0,94±0,51	1,10±0,62	0,027
Ukupni holesterol	4,34±0,96	4,42±0,90	0,446
HDL	1,47±0,43	1,29±0,33	0,001
LDL	2,42±0,83	2,64±0,94	0,047

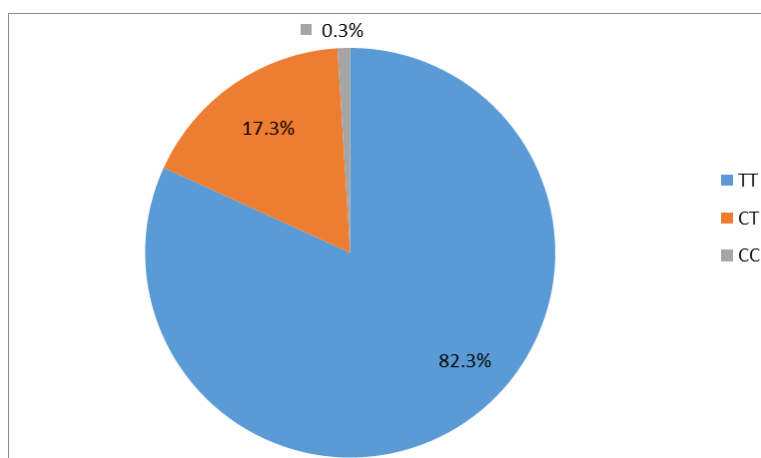
Rezultati iz tabele 9 ukazuju da su ispitanici čiji je ITM>85. percentila imali statistički značajno više vrednosti triglicerida (0,027) kao i LDL holesterola (0,047) u odnosu na normalno uhranjene adolescente. Takođe, ispitanici čiji je ITM≤85. percentila, odnosno normalno uhranjeni adolescenti su imali statistički značajno više vrednosti HDL holesterola (p=0,001) u odnosu na preuhranjene i gojazne ispitanike zajedno. Statistički značajna razlika u srednjim vrednostima nivoa glikemije nije uočena između ove dve grupe ispitanika (p=0,311).

11. Rezultati genetičkih analiza *PRDM16* genotipa (rs12409277)

Analizom je obuhvaćeno 300 ispitanika od kojih je bilo 146 (48,7%) dečaka, dok je devojčica bilo 154 (51,3%). U grupi dečaka, 26 je bilo preuhranjeno (17,8%) sa ITM preko 85. percentila, dok je njih 20 (13,7%) bilo gojazno sa ITM preko 95. percentila. U grupi devojčica, 29 (17,8%) je bilo preuhranjeno, dok je njih 17 (11,0%) bilo gojazno.

U okviru ovog polimorfizma moguća su tri genotipa; TT, CT i CC genotip. Od ukupnog broja ispitanika 247 (82,3%) je bilo homozigotno za češći alel T (genotip TT), 52 (17,3%) ispitanika su bila heterozigoti (genotip CT), dok je svega 1 ispitanik (0,3%) imao homozigotni genotip za ređi alel C (genotip CC). Učestalosti genotipova prikazane su na grafikonu 1.

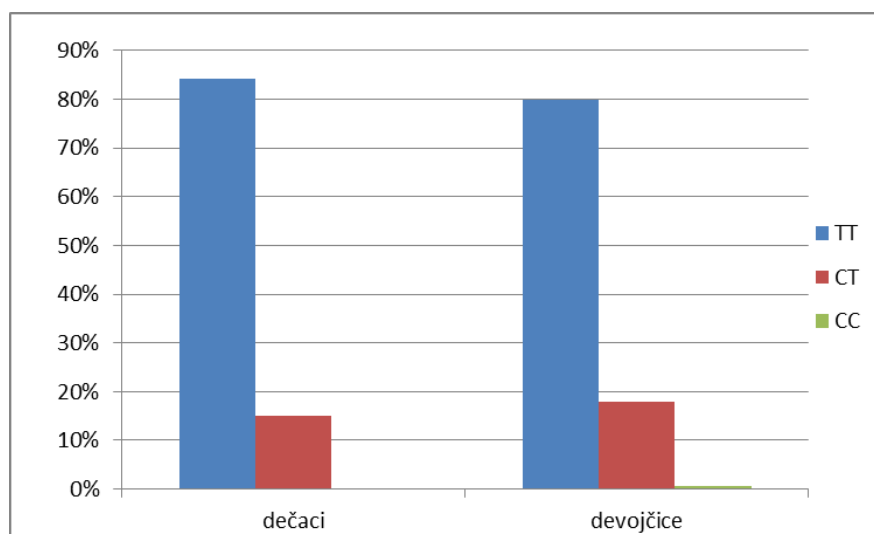
Grafikon 1. Učestalost *PRDM16* genotipova kod svih ispitanika



Takođe, izračunate su učestalosti genotipova odvojeno po polu. Kod dečaka učestalost TT genotipa je 84,2%, CT genotipa 15,8%, dok CC genotip nije imao nijedan dečak. Učestalost TT genotipa kod devojčica je 80,5%, CT genotipa 18,8%, a CC genotipa 0,7%. Fisherov test tačne

verovatnoće pokazao je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između dečaka i devojčica ($p=0,543$). Učestalost genotipova prema polu prikazana je na grafikonu 2.

Grafikon 2. Učestalost genotipova *PRDM16* odvojeno po polu



Na osnovu učestalosti genotipova, izračunate su učestalosti alela za sve ispitanike, ali i odvojeno po polu. Učestalost alela T na ukupnom uzorku je 91,1%, a alela C 9%. Učestalost alela T kod dečaka je 92,9%, dok je kod devojčica 89,9%. Učestalost alela C kod dečaka je 7,9%, a kod devojčica 10,1%. Analiza χ^2 testa pokazala je da ne postoje statistički značajne razlike u učestalosti genotipova između grupe dečaka i devojčica ($p=0,532$).

Takođe, analizirane su srednje vrednosti parametara u zavisnosti od genotipa. S obzirom da je u okviru ovog polimorfizma samo jedan ispitanik imao genotip CC primenjen je dominantni model (TT/CT+CC). Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 10.

Tabela 10. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PRDM16* genotipa na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	Ukupno	p	Dečaci	P	Devojčice	p
ITM	TT	21,99±4,30	0,327	21,74±4,22	0,474	22,21±4,39	0,434
	CT+CC	22,54±4,38		22,47±4,92		22,45±3,96	
Glikemija mmol/l	TT	4,72±0,60	0,790	4,79±0,52	0,919	4,65±0,67	0,793
	CT+CC	4,70±0,48		4,79±0,52		4,59±0,40	
Trigliceridi mmol/l	TT	1,00±0,58	0,442	0,99±0,66	0,555	1,02±0,49	0,229
	CT+CC	0,92±0,38		0,99±0,46		0,90±0,38	
Ukupni holesterol mmol/l	TT	4,40±0,87	0,067	4,21±0,79	0,739	4,57±0,92	0,037
	CT+CC	4,20±0,84		4,17±0,81		4,21±0,86	
HDL-C mmol/l	TT	1,42±0,42	0,930	1,40±0,44	0,328	1,43±0,39	0,340
	CT+CC	1,41±0,36		1,30±0,36		1,51±0,34	
LDL-C mmol/l	TT	2,51±0,88	0,170	2,39±0,85	0,828	2,61±0,90	0,054
	CT+CC	2,36±0,82		2,41±0,80		2,29±0,85	

Statistička analiza primenom Student-ovog t-testa i Mann-Whitney-evog testa je pokazala (tabela 10) da u grupi devojčica postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima ukupnog holesterola ($p=0,037$) i i granična značajnost u razlici srednjih vrednosti LDL holesterola ($p=0,054$) u zavisnosti od *PRDM16* genotipa. Devojčice nosioci TT genotipa imale su statistički više vrednosti ukupnog i LDL holesterola. Međutim, multipla linearna regresiona analiza nije potvrdila ove rezultate. Kao kovarijante korišćeni su ITM ($\beta=0,120$, $p=0,052$), glikemija ($\beta=0,121$, $p=0,045$). Statistički značajne razlike u vrednostima ostalih analiziranih parametara nisu uočene.

Zatim su ispitanici podeljeni u 2. grupe u zavisnosti od ITM. Prvu grupu čine adolescenti sa $ITM \leq 85$. percentila, odnosno normalno uhranjeni, a u drugoj grupi su adolescenti sa $ITM > 85$. percentila, odnosno preuhranjeni i gojazni. Analizirana je povezanost TT/CT+CC genotipova sa odabranim parametrima za sve ispitanike i odvojeno po polu. Rezultati su prikazani u tabelama 11 i 12.

Tabela 11. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PRDM16* genotipa kod svih adolescenata sa $ITM \leq 85$. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM \leq 85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
Glikemija mmol/l	TT	4,70 \pm 0,61	0,799	4,76 \pm 0,53	0,908	4,64 \pm 0,68	0,691
	CT+CC	4,67 \pm 0,52		4,77 \pm 0,59		4,57 \pm 0,42	
Trigliceridi mmol/l	TT	0,95 \pm 0,53	0,542	0,93 \pm 0,64	0,979	0,95 \pm 0,38	0,422
	CT+CC	0,87 \pm 0,36		0,84 \pm 0,28		0,91 \pm 0,43	
Ukupni holesterol mmol/l	TT	4,42 \pm 0,87	0,015	4,22 \pm 0,81	0,553	4,62 \pm 0,89	0,005
	CT+CC	4,04 \pm 0,73		4,09 \pm 0,77		3,98 \pm 0,70	
HDL-C mmol/l	TT	1,47 \pm 0,44	0,746	1,45 \pm 0,47	0,675	1,48 \pm 0,40	0,925
	CT+CC	1,44 \pm 0,33		1,40 \pm 0,34		1,49 \pm 0,32	
LDL-C mmol/l	TT	2,49 \pm 0,85	0,043	2,36 \pm 0,79	0,738	2,64 \pm 0,88	0,001
	CT+CC	2,18 \pm 0,66		2,29 \pm 0,74		2,06 \pm 0,56	

Analiza rezultata (tabela 11) je pokazala da kod adolescenata sa $ITM \leq 85$. postoji statistički značajna razlika na ukupnom uzorku u vrednostima ukupnog i LDL holesterola u odnosu na genotip. Nosioci TT genotipa su imali statistički značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola ($p=0,015$; $p=0,043$) u odnosu na nosioce CT+CC genotipa. Multipla linearna regresiona analiza je potvrdila ove rezultate. Kao kovarijate korišćeni su pol, ITM i glikemija. Dobijeni rezultati za ukupni holesterol su $\beta=-0,159$, $p=0,021$, a za ITM su $\beta=0,200$, $p=0,004$. Rezultati za LDL holesterol su $\beta=-0,136$, $p=0,049$, za glikemiju $\beta=0,164$, $p=0,019$, a za pol $\beta=0,149$, $p=0,033$. Prilikom analize parametara odvojeno po polu, došli smo do zaključka da razlike u srednjim vrednostima potiču od devojčica. Devojčice nosioci TT genotipa imale su značajno više vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na devojčice nosioce CT ili CC genotipa ($p=0,005$). Takođe, primećeno je da su devojčice nosioci TT genotipa imale statistički više vrednosti LDL holesterola u odnosu na devojčice nosioce CT ili CC genotipa ($p=0,001$). Rezultati multiple linearne regresione analize za ukupni holesterol su $\beta=-0,260$, $p=0,008$, a za LDL-C $\beta=-0,241$, $p=0,013$. Kao kovarijate korišćeni su ITM i glikemija.

Tabela 12. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PRDM16* genotipa kod svih adolescenata sa ITM>85. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM>85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
Glikemija mmol/l	TT	4,76±0,57	0,768	4,84±0,49	0,463	4,68±0,63	0,910
	CT+CC	4,79±0,35		5,00±0,19		4,65±0,37	
Trigliceridi mmol/l	TT	1,12±0,66	0,483	1,08±0,69	0,434	1,18±0,66	0,199
	CT+CC	1,00±0,41		1,18±0,51		0,89±0,31	
Ukupni holesterol mmol/l	TT	4,35±0,88	0,330	4,22±0,73	0,559	4,47±1,01	0,516
	CT+CC	4,59±0,92		4,41±0,94		4,70±0,94	
HDL-C mmol/l	TT	1,27±0,30	0,633	1,28±0,32	0,042	1,30±0,35	0,095
	CT+CC	1,33±0,42		0,99±0,20		1,53±0,39	
LDL-C mmol/l	TT	2,57±0,93	0,344	2,50±0,95	0,355	2,58±0,92	0,515
	CT+CC	2,83±0,94		2,89±0,75		2,79±1,00	

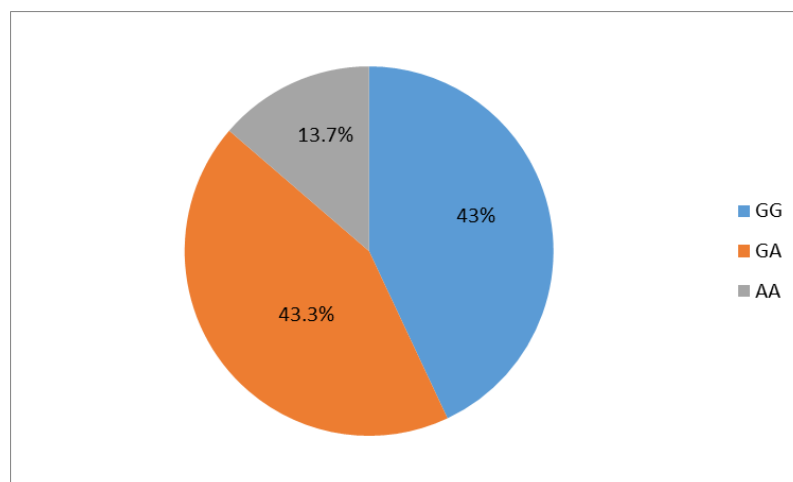
Analiza rezultata (tabela 12) je pokazala da u grupi dečaka sa ITM>85. percentila postoji statistički značajna razlika u nivou HDL holesterola u zavisnosti od genotipa ($p=0,042$). Odnosno, dečaci nosioci TT genotipa imali su statistički značajno više vrednosti HDL holesterola u odnosu na nosioce CT+CC genotipa. Međutim, multipla linearna regresiona analiza nije potvrdila ove rezultate ($\beta=-0,222$, $p=0,174$), a kao kovarijate korišćeni su nivo glikemije i ITM. Statističke značajnosti nisu uočene prilikom analize ostalih parametara.

12. Rezultati genetičkih analiza *CtBP2* genotipa (rs1561589)

Prilikom analize ovog polimorfizma kao i kod polimorfizma *PRDM16* (rs12409277) ispitivan je genotip 300 ispitanika. Od tog broja, takođe je bilo 146 dečaka, odnosno 48,7%, dok je devojčica bilo 154 (51,3%). U obe analizirane grupe, dečaka i devojčica, parametri uhranjenosti (ITM) bili su isti kao kod prethodno analiziranog *PRDM16* polimorfizma.

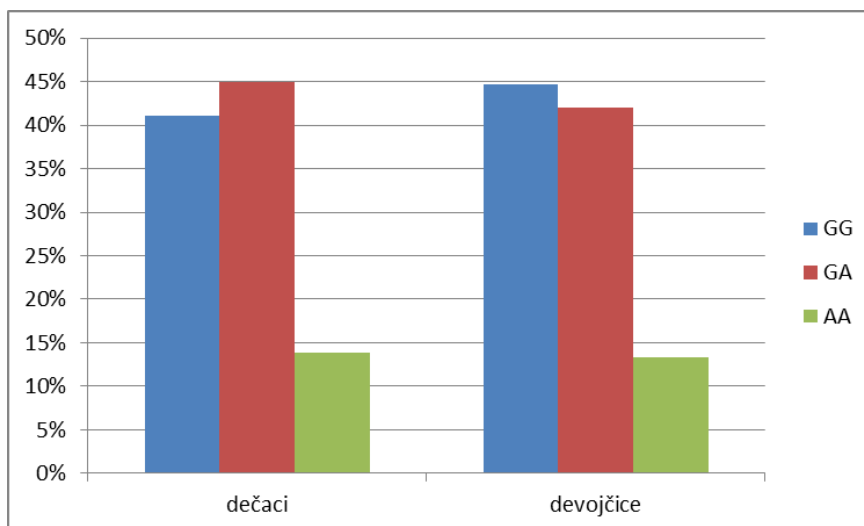
U okviru rs1561589 polimorfizma prisutna su tri moguća genotipa: GG, GA i AA genotip. Od ukupnog broja ispitanika, 129 (43,0%) je bilo homozigot za česći alel G (GG genotip), 130 (43,3%) ispitanika su bili heterozigoti (GA genotip), dok je homozigota za ređi alel A (AA genotip) bilo 41, odnosno 13,7%. Ukupne učestalosti genotipova prikazane su na grafikonu 3.

Grafikon 3. Ukupna učestalost *CtBP2* genotipova kod svih ispitanika



Pored učestalosti genotipova za sve ispitanike, izračunate su učestalosti genotipova odvojeno po polu. Kod dečaka učestalost GG genotipa bila je 41,1%, GA genotipa 45,0%, dok je AA genotip imalo 13,9% dečaka. Kod devojčica učestalost GG genotipa je 44,7%, GA genotipa 42,0%, dok je AA genotip imalo 13,3% devojčica. Učestalost genotipova u odnosu na pol prikazana je na grafikonu 4.

Grafikon 4. Učestalost genotipova *CtBP2* odvojeno po polu



Iz učestalosti genotipova izračunate su i učestalosti alela na ukupnom broju ispitanika i odvojeno po polu. Učestalost G alela na ukupnom broju ispitanika je 65,0%, dok je učestalost A alela 35,0%. Kod dečaka učestalost G alela je 64%, dok je učestalost A alela 36,0%. Kod devojčica učestalost G alela je 66,8%, a učestalost alela A je 33,2%. Distribucija genotipova analiziranih polimorfizama je u Hardy-Weinberg–ovom ekvilibrijumu. Nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova između grupe dečaka i devojčica ($\chi^2=0,41$, $p=0,8146$).

Zatim su analizirane srednje vrednosti parametara u zavisnosti od genotipa kako na ukupnom uzorku, tako i odvojeno po polu. Rezultati su prikazani u tabeli 13.

Tabela 13. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *CtBP2* genotipa na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	Ukupno	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	GG	21,90±3,89	0,897	21,58±3,78	0,928	22,19±4,00	0,516
	GA	22,15±4,79		22,13±4,86		22,18±4,74	
	AA	22,26±4,20		21,38±4,10		23,22±4,20	
Glikemija mmol/l	GG	4,69±0,57	0,259	4,80±0,55	0,153	4,59±0,57	0,578
	GA	4,76±0,61		4,80±0,52		4,71±0,70	
	AA	4,58±0,77		4,52±0,93		4,64±0,56	
Trigliceridi mmol/l	GG	0,93±0,39	0,397	0,88±0,37	0,564	0,97±0,40	0,703
	GA	1,06±0,66		1,10±0,84		1,01±0,40	
	AA	1,01±0,62		0,93±0,33		1,10±0,82	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,32±0,91	0,164	4,17±0,77	0,625	4,47±1,00	0,191
	GA	4,45±0,86		4,28±0,84		4,64±0,85	
	AA	4,17±0,78		4,13±0,62		4,21±0,93	
HDL-C mmol/l	GG	1,42±0,36	0,743	1,38±0,35	0,993	1,46±0,37	0,511
	GA	1,41±0,46		1,37±0,51		1,45±0,40	
	AA	1,37±0,35		1,38±0,36		1,35±0,34	
LDL-C mmol/l	GG	2,46±0,82	0,293	2,39±0,71	0,634	2,52±0,91	0,445
	GA	2,55±0,96		2,46±1,00		2,64±0,91	
	AA	2,31±0,76		2,26±0,66		2,35±0,86	

Rezultati dobijeni primenom ANOVA ili Kruskal-Wallis testa su pokazali (tabela 13) da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima analiziranih parametara u zavisnosti od genotipa kako na ukupnom uzorku, tako i odvojeno po polu.

Takođe, analiziran je uticaj ovog polimorfizma na odabrane parametre u grupi normalno uhranjenih ispitanika sa $ITM \leq 85$. percentila, kao i kod ispitanika čiji je $ITM > 85$. percentila, odnosno ispitanika koji su preuhranjeni i gojazni. Analizirani su odabrani parametri u zavisnosti od genotipa GG/GA+AA, kako na ukupnom uzorku tako i odvojeno po polu. Rezultati su prikazani u tabelama 14 i 15.

Tabela 14. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti of *CtBP2* genotipa kod svih adolescenata sa ITM \leq 85. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM \leq 85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
Glikemija mmol/l	GG	4,65 \pm 0,57	0,390	4,74 \pm 0,58	0,883	4,57 \pm 0,57	0,209
	GA+AA	4,72 \pm 0,69		4,72 \pm 0,69		4,73 \pm 0,70	
Trigliceridi mmol/l	GG	0,89 \pm 0,36	0,382	0,83 \pm 0,36	0,204	0,95 \pm 0,37	0,859
	GA+AA	0,98 \pm 0,60		0,98 \pm 0,70		0,96 \pm 0,42	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,38 \pm 0,90	0,681	4,18 \pm 0,78	0,765	4,58 \pm 1,00	0,521
	GA+AA	4,33 \pm 0,82		4,23 \pm 0,81		4,46 \pm 0,84	
HDL-C mmol/l	GG	1,46 \pm 0,36	0,929	1,41 \pm 0,33	0,611	1,48 \pm 0,38	0,798
	GA+AA	1,46 \pm 0,46		1,46 \pm 0,52		1,46 \pm 0,39	
LDL-C mmol/l	GG	2,49 \pm 0,82	0,380	2,38 \pm 0,69	0,785	2,64 \pm 0,93	0,309
	GA+AA	2,39 \pm 0,84		2,34 \pm 0,85		2,45 \pm 0,85	

Analiza rezultata (tabela 14) je pokazala da kod ispitanika čiji je indeks telesne mase manji od 85.og percentila ne postoji statistička značajnost između *CtBP2* genotipova i analiziranih parametara.

Tabela 15. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti of *CtBP2* genotipa kod svih adolescenata sa ITM $>$ 85. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM $>$ 85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
Glikemija mmol/l	GG	4,81 \pm 0,54	0,497	4,92 \pm 0,50	0,391	4,69 \pm 0,56	0,866
	GA+AA	4,72 \pm 0,69		4,79 \pm 0,47		4,66 \pm 0,61	
Trigliceridi mmol/l	GG	1,00 \pm 0,41	0,222	1,00 \pm 0,33	0,770	1,00 \pm 0,48	0,151
	GA+AA	1,17 \pm 0,72		1,13 \pm 0,77		1,20 \pm 0,69	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,20 \pm 0,87	0,096	4,23 \pm 0,73	0,795	4,18 \pm 1,00	0,050
	GA+AA	4,52 \pm 0,88		4,29 \pm 0,78		4,76 \pm 0,92	
HDL-C mmol/l	GG	1,31 \pm 0,33	0,441	1,21 \pm 0,25	0,768	1,40 \pm 0,37	0,531
	GA+AA	1,25 \pm 0,33		1,19 \pm 0,26		1,32 \pm 0,37	
LDL-C mmol/l	GG	2,40 \pm 0,77	0,075	2,60 \pm 0,61	0,911	2,24 \pm 0,87	0,020
	GA+AA	2,77 \pm 1,00		2,63 \pm 1,07		2,90 \pm 0,92	

Analiza je pokazala (tabela 15) da u grupi preuhranjenih i gojaznih devojčica postoji statistički značajna razlika u nivou ukupnog holesterola i LDL holesterola između nosioca GG genotipa i GA+AA genotipa. Primećuje se da preuhranjene i gojazne devojčice koje su imale GA+AA genotip imaju statistički značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na nosioce GG genotipa ($p=0,050$; $p=0,020$). Takođe, multipla linearna regresiona analiza je potvrdila ove rezultate. Dobijeni rezultati za ukupni holesterol su $\beta=0,338$, $p=0,036$, a za LDL holesterol su $\beta=0,356$, $p=0,030$. Kao kovarijate korišćeni su ITM i vrednosti glikemije. Kod preuhranjenih i gojaznih dečaka, kao i na ukupnom uzorku nisu uočene statističke značajnosti između *CtBP2* genotipova i analiziranih parametara.

Zatim je za 295 adolescenata analiziran aditivni efekat *PRDM16* (rs12409277) i *CtBP2* (rs1561589) genotipova na odabrane parametre. Ispitanici su razvrstani u 4 grupe u zavisnosti od genotipova ova dva polimorfizma. U prvoj grupi analizirani su TT+GG genotipovi, u drugoj TC+GG genotipovi, u trećoj TT+GA/AA, te u četvrtoj grupi TC+GA/AA genotipovi. Kombinacija CC+GA

genotipova uočena je kod jednog ispitanika, dok druge kombinacije genotipova nisu bile prisutne u ovom istraživanju. Rezultati su prikazani u tabeli 16.

Tabela 16. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PRDM16* i *CtBP2* genotipova

Genotipovi	n (%)	ITM	Glikemija mmol/l	Trigliceridi mmol/l	Ukupni holesterol mmol/l	HDL-C mmol/l	LDL-C mmol/l
TT+GG	101 (34,35)	21,86±3,94	4,70±0,59	0,94±0,40	4,47±0,92	1,43±0,37	2,58±0,83
TC+GG	27 (9,18)	22,01±3,82	4,67±0,48	0,86±0,34	3,81±0,57	1,40±0,36	2,04±0,58
TT+GA/AA	141 (47,96)	22,12±4,62	4,75±0,61	1,06±0,69	4,35±0,85	1,40±0,45	2,46±0,92
TC+GA/AA	25 (8,51)	23,01±5,00	4,71±0,50	0,96±0,41	4,53±0,88	1,45±0,37	2,62±0,88
p		0,805	0,897	0,458	0,005	0,897	0,032

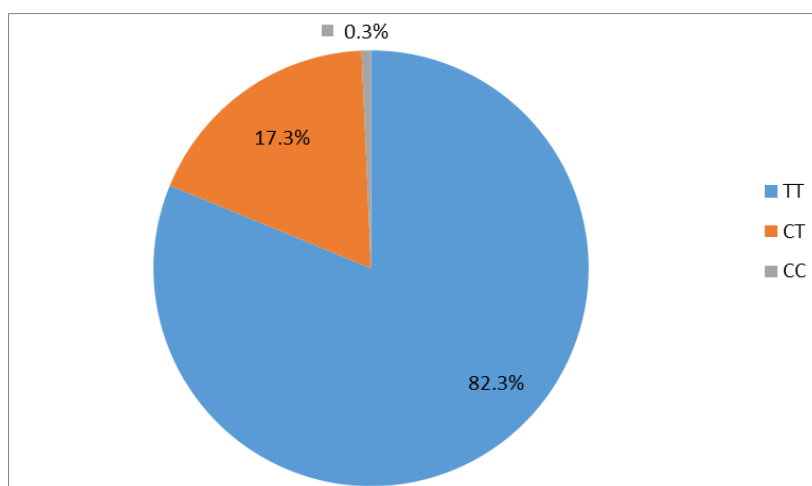
ANOVA je pokazala (tabela 16) da nosioci TC+GG genotipa imaju statistički značajno niže vrednosti ukupnog holesterola ($p=0,005$), kao i LDL holesterola ($p=0,032$) u poređenju sa svim drugim grupama. Ovi rezultati su potvrđeni multiplom linearnom regresionom analizom kako za ukupni holesterol ($\beta=-0,198$, $p=0,001$), tako i za LDL holesterol ($\beta=-0,159$, $p=0,008$). Kao kovarijate korišćeni su pol, ITM i vrednosti glikemije.

13. Rezultati genetičkih analiza *PPARG* genotipa (rs3856806)

U okviru ovog polimorfizma analizirano je 287 ispitanika od kojih su 143 bili dečaci (49,8%), dok je devojčica bilo 144, odnosno (50,2%). Od ukupnog broja dečaka 24 je bilo preuhranjeno (16,8%), dok je njih 18 (12,6%) bilo gojazno. Kod devojčica, njih 29 (20,1%) je bilo preuhranjeno, dok je 16 (11,1%) bilo gojazno.

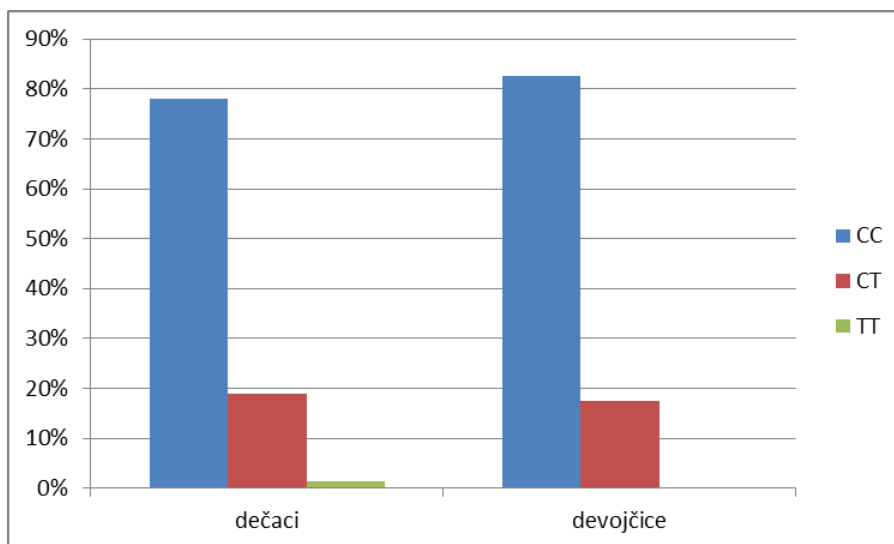
Od ukupnog broja ispitanika, utvrđeno je da je njih 233 (81,2%) bilo homozigot za češći alel C, odnosno da su imali CC genotip, heterozigota (CT genotip) je bilo 52 (18,1%), dok je 2 ispitanika (0,7%) imalo genotip TT. Učestalosti genotipova za sve ispitanike prikazane su na grafikonu 5.

Grafikon 5. Ukupna učestalost *PPARG* genotipova kod svih ispitanika



Takođe, izračunate su učestalosti genotipova odvojeno po polu. Učestalost CC genotipa kod dečaka je 79,7%, CT genotipa 18,9%, dok je TT genotip imalo 1,4% dečaka. Kod devojčica učestalost CC genotipa je 82,6%, CT genotipa 17,4%, a TT genotip nije imala nijedna devojčica. Učestalosti genotipova u odnosu na pol prikazani su na grafikonu 6.

Grafikon 6. Učestalost *PPARG* genotipova odvojeno po polu



Zatim su na osnovu učestalosti genotipova izračunate učestalosti alela. Učestalost alela C na ukupnom uzorku je 90,1%, dok je učestalost alela T 9,9%. Kod dečaka, učestalost alela C je 89,2%, a alela T 10,8%. Kod devojčica, učestalost alela C je 91%, dok je alel T bio prisutan kod 9% devojčica. Analiza χ^2 testa pokazala je da ne postoje statistički značajne razlike u učestalosti genotipova između grupe dečaka i devojčica ($\chi^2=0,40$, $p=0,527$).

Potom su analizirane srednje vrednosti odabranih parametara u zavisnosti od genotipa kako na ukupnom uzorku, tako i odvojeno po polu. U okviru ovog polimorfizma 2 ispitanika su imala TT genotip, te je s toga primenjen dominantni model (CC/CT+TT). Rezultati su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PPARG* genotipa na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	Ukupno	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	CC	21,98±4,20	0,716	21,50±4,00	0,810	22,46±4,36	0,426
	CT+TT	22,01±4,73		22,19±5,20		21,80±4,18	
Glikemija mmol/l	CC	4,73±0,65	0,054	4,79±0,64	0,689	4,67±0,66	0,013
	CT+TT	4,54±0,62		4,74±0,50		4,30±0,67	
Trigliceridi mmol/l	CC	1,00±0,59	0,968	1,01±0,68	0,583	0,98±0,49	0,617
	CT+TT	0,94±0,41		0,99±0,44		0,97±0,37	
Ukupni holesterol mmol/l	CC	4,33±0,86	0,796	4,15±0,77	0,535	4,50±0,92	0,987
	CT+TT	4,36±0,87		4,25±0,68		4,50±1,06	
HDL-C mmol/l	CC	1,43±0,41	0,111	1,40±0,44	0,214	1,46±0,39	0,364
	CT+TT	1,33±0,38		1,29±0,37		1,38±0,39	
LDL-C mmol/l	CC	2,41±0,85	0,198	2,29±0,76	0,179	2,52±0,92	0,498
	CT+TT	2,57±0,76		2,50±0,66		2,66±0,87	

Rezultati (tabela 17) pokazuju da na ukupnom uzorku postoji razlika u nivou glikemije u zavisnosti od genotipa na granici statističke značajnosti ($p=0,054$), ali posmatrano odvojeno po polu statistička značajnost se uočava u grupi devojčica, gde je $p=0,013$, što dovodi do zaključka da su devojčice nosioci CC genotipa imale statistički više vrednosti glikemije u odnosu na devojčice nosioce CT+TT genotipa. Kako bi se potvrdili ovi rezultati rađena je multipla linearna regresiona analiza, gde je kao kovarijata korišćen pol. Dobijena vrednost na ukupnom uzorku je bila $p=0,07$. Analiza je pokazala da pol utiče na nivo glikemije ($p=0,025$). Statistička značajnost se uočava u grupi devojčica ($p=0,033$), ali nije uočena povezanost u grupi dečaka. Takođe, nije dobijena statistička značajnost za ostale analizirane parametre.

Nakon toga, ispitanici su podeljeni u 2 grupe u zavisnosti od ITM. Prvu grupu čine ispitanici sa $ITM \leq 85$. percentila, dok su u drugu grupu svrstani ispitanici sa $ITM > 85$. percentila, odnosno preuhranjeni i gojazni. Analizirane su vrednosti parametara u zavisnosti od CC/CT+TT genotipova. Rezultati su prikazani u tabelama 18 i 19.

Tabela 18. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PPARG* genotipa kod svih adolescenata sa $ITM \leq 85$. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM \leq 85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
Glikemija mmol/l	CC	4,72 \pm 0,69	0,294	4,75 \pm 0,69	0,848	4,68 \pm 0,69	0,204
	CT+TT	4,59 \pm 0,53		4,72 \pm 0,49		4,45 \pm 0,57	
Trigliceridi mmol/l	CC	0,96 \pm 0,55	0,537	0,97 \pm 0,65	0,211	0,92 \pm 0,38	0,467
	CT+TT	0,87 \pm 0,36		0,79 \pm 0,33		0,97 \pm 0,37	
Ukupni holesterol mmol/l	CC	4,31 \pm 0,86	0,471	4,17 \pm 0,81	0,737	4,48 \pm 0,90	0,595
	CT+TT	4,42 \pm 0,83		4,24 \pm 0,72		4,61 \pm 0,93	
HDL-C mmol/l	CC	1,47 \pm 0,43	0,455	1,46 \pm 0,47	0,149	1,49 \pm 0,40	0,970
	CT+TT	1,42 \pm 0,40		1,29 \pm 0,46		1,48 \pm 0,41	
LDL-C mmol/l	CC	2,37 \pm 0,85	0,197	2,28 \pm 0,78	0,248	2,49 \pm 0,91	0,470
	CT+TT	2,57 \pm 0,70		2,51 \pm 0,68		2,66 \pm 0,74	

Prilikom analize srednjih vrednosti odabranih parametara u zavisnosti od *PPARG* genotipa (tabela 18) kod normalno uhranjenih ispitanika nije dobijena statistička značajnost ni za jedan od analiziranih parametara kako na ukupnom uzorku, tako i u grupi dečaka i devojčica.

Tabela 19. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PPARG* genotipa kod svih adolescenata sa ITM>85. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM>85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
Glikemija mmol/l	CC	4,80±0,51	0,104	4,90±0,44	0,446	4,73±0,55	0,030
	CT+TT	4,55±0,60		4,77±0,54		4,18±0,49	
Trigliceridi mmol/l	CC	1,11±0,67	0,164	1,12±0,74	0,538	1,12±0,65	0,561
	CT+TT	1,15±0,45		1,15±0,51		1,04±0,40	
Ukupni holesterol mmol/l	CC	4,41±0,86	0,796	4,11±0,66	0,492	4,61±0,95	0,419
	CT+TT	4,24±1,01		4,27±0,63		4,24±1,50	
HDL-C mmol/l	CC	1,33±0,35	0,052	1,22±0,28	0,620	1,41±0,38	0,000
	CT+TT	1,14±0,25		1,29±0,46		1,08±0,11	
LDL-C (Friedwald)	CC	2,54±0,84	0,847	2,31±0,70	0,512	2,65±0,94	0,964
	CT+TT	2,58±0,93		2,47±0,65		2,67±1,34	

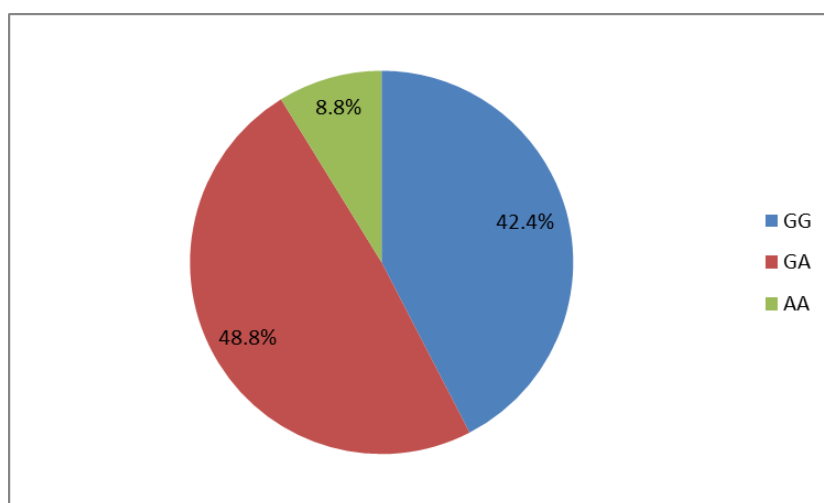
U tabeli 19 prikazani su rezultati srednjih vrednosti analiziranih parametara kod preuhranjenih i gojaznih ispitanika u odnosu na CC/CT+TT genotip. ANOVA je pokazala da u grupi ispitanika sa ITM>85. percentila nosioci CC genotipa imaju više vrednosti HDL holesterola u odnosu na nosioce CT+TT genotipa. Razlika u srednjim vrednostima HDL holesterola je na granici statističke značajnosti ($p=0,052$). Međutim, multipla linearna regresiona analiza nije potvrdila ove rezultate ($\beta=-0,125$, $p=0,315$). Kao kovarijate korišćeni su pol, ITM i glikemija. Takođe, u grupi devojčica nosioci CC genotipa imale su više vrednosti glikemije i HDL holesterola u odnosu na nosioce CT+TT genotipa ($p=0,030$; $p=0,000$). Multipla linearna regresiona analiza nije potvrdila ovaj rezultat kada je u pitanju HDL holesterol ($\beta=-0,297$, $p=0,108$), ali za nivo glikemije dobijen je rezultat koji je na granici statističke značajnosti ($\beta=-0,302$, $p=0,051$). Takođe, kao kovarijate su korišćeni ITM i glikemija. Statistički značajne razlike u vrednostima ostalih parametara nisu uočene.

14. Rezultati genetičkih analiza *PPARGC1A* genotipa (rs8192678)

Analiza je obuhvatila 297 ispitanika. Od tog broja 147 (49,5%) su bili dečaci, a devojčica je bilo 150 (50,5%). Od ukupnog broja dečaka, njih 26 je bilo preuhranjeno (17,7%) dok je njih 20 (13,7%) bilo gojazno. Od ukupnog broja devojčica, 26 (17,3%) je bilo preuhranjeno, dok je njih 17 (11,3%) bilo gojazno.

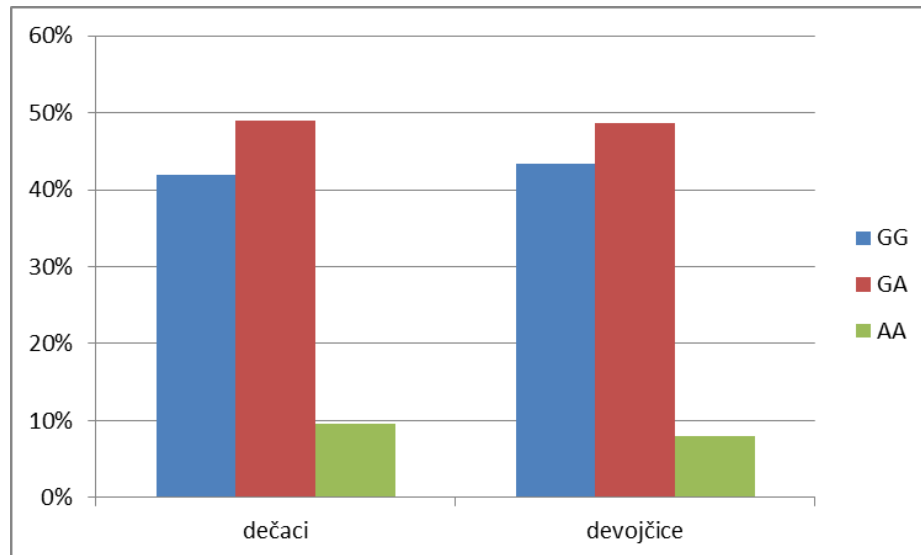
Od ukupnog broja ispitanika, utvrđeno je da je njih 126 (42,4%) bilo homozigot za češći alel G, odnosno da su imali GG genotip, heterozigota (GA genotip) je bilo 145 (48,8%), dok je 26 ispitanika (8,8%) imalo genotip AA. Učestalosti genotipova za sve ispitanike prikazane su na grafikonu 7.

Grafikon 7. Ukupna učestalost *PPARGC1A* genotipova kod svih ispitanika



Pored učestalosti genotipova za sve ispitanike, izračunate su i učestalosti genotipova odvojeno po polu. Učestalost GG genotipa kod dečaka je 41,5%, GA genotipa 49%, dok je AA genotip imalo 9,5% dečaka. Kod devojčica učestalost GG genotipa je 43,3%, GA genotipa 48,7%, a AA genotipa 8%. Učestalosti genotipova u odnosu na pol prikazani su na grafikonu 8.

Grafikon 8. Učestalost *PPARGC1A* genotipova odvojeno po polu



Izračunate su i učestalosti alela, kako za sve ispitanike, tako i odvojeno po polu. Učestalost G alela na ukupnom uzorku je 65,1%, dok je učestalost A alela 34,9%. Kod dečaka, učestalost G alela je 64,4%, a učestalost A alela je 35,6%. Kod devojčica, učestalost G alela je 65,8%, dok je učestalost A alela 34,2%. Analiza χ^2 testom pokazala je da ne postoje statistički značajne razlike u učestalosti genotipova između grupe dečaka i devojčica ($\chi^2=0,26$, $p=0,8781$). Takođe, izračunate su srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od genotipa za sve ispitanike i odvojeno po polu. Rezultati su prikazani u tabeli 20.

Tabela 20. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PPARGC1A* genotipa na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	Ukupno	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	GG	21,82±4,86	0,483	21,20±4,44	0,161	22,43±5,21	0,836
	GA	22,33±3,97		22,55±4,26		22,11±3,67	
	AA	21,43±3,6		21,20±3,49		21,70±3,79	
Glikemija mmol/l	GG	4,64±0,55	0,305	4,71±0,55	0,461	4,58±0,55	0,617
	GA	4,75±0,72		4,83±0,68		4,66±0,75	
	AA	4,58±0,61		4,67±0,50		4,47±0,72	
Trigliceridi mmol/l	GG	0,96±0,40	0,497	0,97±0,45	0,446	0,94±0,35	0,529
	GA	1,00±0,57		0,97±0,56		1,04±0,58	
	AA	1,09±0,96		1,20±1,28		0,97±0,34	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,46±0,82	0,181	4,36±0,74	0,100	4,56±0,88	0,721
	GA	4,31±0,89		4,08±0,73		4,53±0,99	
	AA	4,16±1,03		4,03±1,06		4,32±1,02	
HDL-C mmol/l	GG	1,42±0,39	0,592	1,42±0,45	0,333	1,42±0,32	0,821
	GA	1,39±0,38		1,33±0,31		1,46±0,43	
	AA	1,78±0,60		1,47±0,75		1,48±0,39	
LDL-C mmol/l	GG	2,56±0,86	0,385	2,44±0,89	0,692	2,66±0,83	0,821
	GA	2,42±0,92		2,32±0,83		2,52±1,00	
	AA	2,38±0,74		2,41±0,68		2,35±0,84	

Statistička analiza je pokazala (tabela 20) da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima analiziranih parametara u zavisnosti od genotipa kako na ukupnom uzorku, tako i odvojeno po polu.

Potom je analiziran uticaj genotipova po dominantnom modelu na vrednosti odabranih parametara za sve ispitanike i odvojeno po polu. Rezultati su prikazani u tabeli 21.

Tabela 21. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od grupisanih *PPARGC1A* genotipa na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	Ukupno	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	GG	21,82±4,86	0,473	21,20±4,44	0,114	22,43±5,21	0,619
	GA+AA	22,19±3,91		22,33±4,16		22,05±3,66	
Glikemija mmol/l	GG	4,64±0,55	0,323	4,71±0,55	0,374	4,58±0,55	0,653
	GA+AA	4,72±0,70		4,80±0,66		4,63±0,74	
Trigliceridi mmol/l	GG	0,96±0,40	0,324	0,97±0,45	0,721	0,94±0,35	0,273
	GA+AA	1,02±0,64		1,01±0,72		1,03±0,55	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,46±0,82	0,092	4,36±0,74	0,033	4,56±0,88	0,712
	GA+AA	4,28±0,92		4,08±0,78		4,50±0,99	
HDL-C mmol/l	GG	1,42±0,39	0,746	1,42±0,45	0,349	1,42±0,32	0,556
	GA+AA	1,41±0,42		1,35±0,41		1,46±0,42	
LDL-C mmol/l	GG	2,56±0,86	0,172	2,44±0,89	0,436	2,66±0,83	0,276
	GA+AA	2,41±0,89		2,33±0,80		2,49±0,98	

Analiza rezultata (tabela 21) pokazala je da postoji statistički značajna razlika u grupi dečaka u vrednostima ukupnog holesterola u zavisnosti od genotipa, po dominantnom modelu, Nosioci GG genotipa imaju statistički značajno više vrednosti ukupnog holesterola ($p=0,033$). Ovaj rezultat je potvrđen multiplom linearnom regresionom analizom ($\beta=-0,105$, $p=0,032$). Kao kovarijate korišćeni su pol, nivo glikemije i ITM. Statistička značajnost nije dobijena za ostale analizirane parametre.

Takođe, analizirana je povezanost GG/GA+AA genotipova sa odabranim parametrima u zavisnosti od stepena uhranjenosti. Ispitanici su podeljeni u dvije grupe u zavisnosti od ITM. U prvu grupu svrstani su oni adolescenti čiji je $ITM \leq 85$. percentila, odnosno normalno uhranjeni. Drugu grupu čine adolescenti čiji je $ITM > 85$. percentila, odnosno preuhranjeni i gojazni. Analizirane su vrednosti odabranih parametara u zavisnosti od genotipa GG/GG+AA kako na ukupnom uzorku tako i odvojeno po polu. Rezultati su prikazani u tabelama 22 i 23.

Tabela 22. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PPARGC1A* genotipa kod svih adolescenata sa $ITM \leq 85$. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM \leq 85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	GG	19,50 \pm 2,29	0,139	19,37 \pm 2,13	0,620	19,55 \pm 2,42	0,198
	GA+AA	19,90 \pm 1,94		19,50 \pm 1,71		20,14 \pm 2,01	
Glikemija mmol/l	GG	4,65 \pm 0,53	0,476	4,70 \pm 0,58	0,656	4,58 \pm 0,46	0,492
	GA+AA	4,71 \pm 0,74		4,76 \pm 0,73		4,67 \pm 0,76	
Trigliceridi mmol/l	GG	0,93 \pm 0,42	0,612	0,92 \pm 0,43	0,726	0,91 \pm 0,34	0,332
	GA+AA	1,13 \pm 0,75		0,96 \pm 0,73		0,98 \pm 0,43	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,38 \pm 0,75	0,583	4,33 \pm 0,72	0,022	4,42 \pm 0,80	0,307
	GA+AA	4,31 \pm 0,96		3,99 \pm 0,82		4,61 \pm 0,99	
HDL-C mmol/l	GG	1,46 \pm 0,40	0,932	1,47 \pm 0,47	0,516	1,46 \pm 0,30	0,696
	GA+AA	1,47 \pm 0,46		1,41 \pm 0,45		1,49 \pm 0,45	
LDL-C mmol/l	GG	2,43 \pm 0,78	0,820	2,38 \pm 0,86	0,349	2,51 \pm 0,70	0,636
	GA+AA	2,41 \pm 0,90		2,23 \pm 0,72		2,59 \pm 1,01	

Analiza rezultata prikazanih u tabeli 22 je pokazala da kod adolescenata koji su normalno uhranjeni, na ukupnom uzorku ne postoji statistički značajna povezanost između *PPARGC1A* genotipova i vrednosti analiziranih parametara. Međutim, u grupi dečaka uočava se povezanost GG genotipa sa višim vrednostima ukupnog holesterola. Dečaci nosioci GG genotipa su imali statistički značajno više vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na dečake nosioce GA+AA genotipa ($p=0,002$). Rezultati multiple linearne regresione analize su potvrdili ovaj rezultat. Dobijene vrednosti su $\beta=-0,231$, $p=0,022$. Kao kovarijate korišćeni su pol, ITM i glikemija. Kada je reč o devojčicama sa $ITM < 85$. percentila, nije uočena asocijacija genotipova sa srednjim vrednostima analiziranih parametara.

Tabela 23. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PPARGC1A* genotipa kod svih adolescenata sa ITM>85. percnetila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM>85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	GG	28,24±4,30	0,303	27,94±4,26	0,724	28,20±4,43	0,317
	GA+AA	26,94±2,40		26,89±2,56		26,74±2,31	
Glikemija mmol/l	GG	4,70±0,55	0,440	4,77±0,43	0,473	4,69±0,62	0,932
	GA+AA	4,80±0,54		4,89±0,49		4,67±0,56	
Trigliceridi mmol/l	GG	1,04±0,35	0,830	1,16±0,51	0,743	1,05±0,38	0,537
	GA+AA	1,13±0,75		1,08±0,72		1,16±0,78	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,72±0,97	0,019	4,37±0,85	0,529	4,90±0,99	0,045
	GA+AA	4,28±0,83		4,22±0,71		4,28±0,98	
HDL-C mmol/l	GG	1,32±0,36	0,450	1,23±0,34	0,924	1,36±0,37	0,876
	GA+AA	1,27±0,29		1,24±0,32		1,37±0,34	
LDL-C mmol/l	GG	2,96±0,95	0,019	2,66±0,99	0,621	3,06±0,93	0,007
	GA+AA	2,45±0,89		2,51±0,92		2,28±0,86	

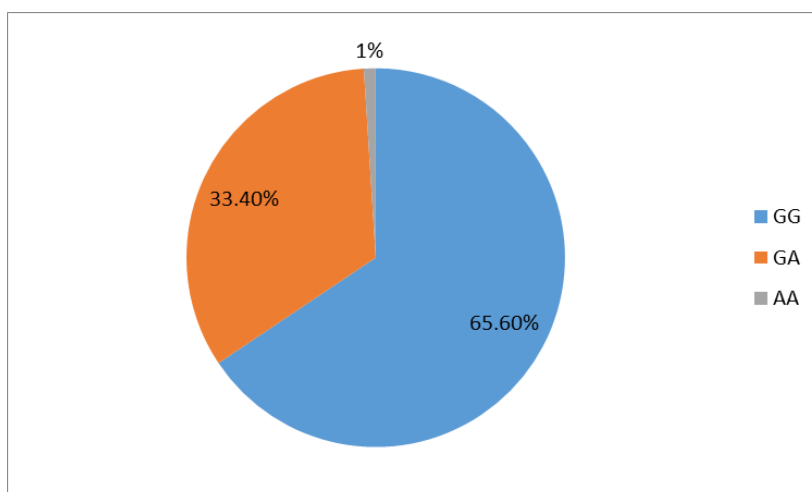
Iz tabele 23 može se zaključiti da ispitanici čiji je ITM>85. percnetila, a koji su nosioci GG genotipa imaju statistički značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na nosioce GA+AA genotipa ($p=0,019$; $p=0,019$). Rezultati multiple linearne regresione analize potvrđuju ove rezultate. Kao kovarijate korišćeni su pol, ITM i glikemija. Dobijeni rezultati multiple linearne regresione analize za ukupni holesterol su $\beta=-0,242$, $p=0,039$, a za LDL holesterol su $\beta=-0,283$, $p=0,021$. Povezanost *PPARGC1A* genotipova sa ostalim analiziranim parametrima na ukupnom uzorku nije uočena. Takođe, analiza rezultata odvojeno po polu ukazala je da su devojčice nosioci GG genotipa imale više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na devojčice nosioce GA+AA genotipa ($p=0,045$; $p=0,007$). Multipla linearna regresiona analiza je potvrdila ove rezultate. Dobijene vrednosti za ukupni holesterol su $\beta=-0,352$, $p=0,033$, a za LDL holesterol su $\beta=-0,451$, $p=0,007$. Kao kovarijate korišćeni su pol, ITM i glikemija. Kod dečaka sa ITM>85. percentila nije uočena povezanost *PPARGC1A* genotiova sa vrednostima analiziranih parametara.

15. Rezultati genetičkih analiza *BDNF* genotipa (rs6265)

U okviru ispitivanja ovog polimorfizma analizirano je 308 ispitanika. Od toga, 153 (49,7%) su bili dečaci, a devojčica je bilo 155 (50,3%). Od ukupnog broja dečaka, njih 26 je bilo preuhranjeno (17,8%) sa ITM preko 85. percentila, dok je njih 20 (13,7%) bilo gojazno sa ITM preko 95. percentila. Od ukupnog broja devojčica, 29 (17,8%) je bilo preuhranjeno, dok je njih 17 (11,0%) bilo gojazno.

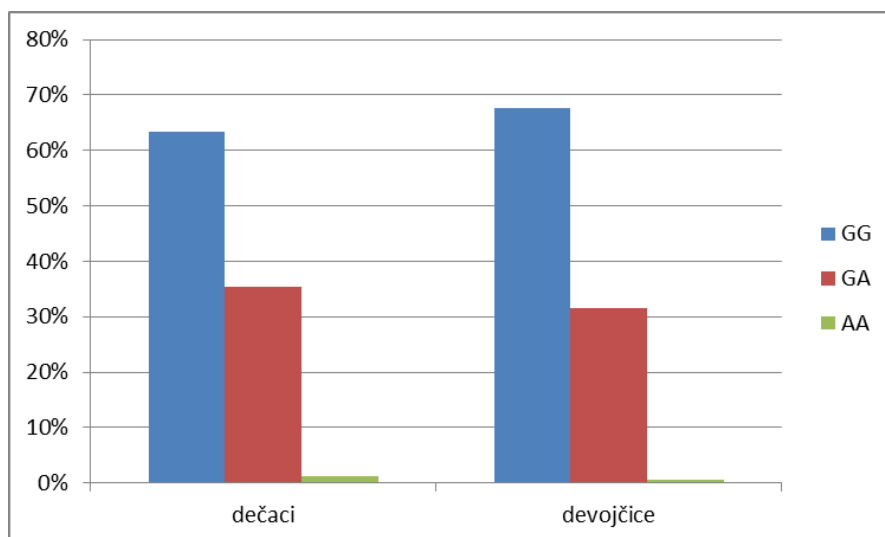
Od ukupnog broja ispitanika, utvrđeno je da je njih 202 (65,6%) bilo homozigot za češći alel G, odnosno da su imali GG genotip, heterozigota (GA genotip) je bilo 103 (33,4%), dok je 3 ispitanika (1%) imalo genotip AA. Učestalosti genotipova za sve ispitanike prikazane su na grafikonu 9.

Grafikon 9. Ukupna učestalost *BDNF* genotipova kod svih ispitanika



Zatim su izračunate i učestalosti genotipova odvojeno po polu. Učestalost GG genotipa kod dečaka je 63,4%, GA genotipa 35,3%, dok je AA genotip imalo 1,3% dečaka. Kod devojčica učestalost GG genotipa je 67,7%, GA genotipa 31,6%, a AA genotipa 0,6%. Učestalosti genotipova u odnosu na pol prikazani su na grafikonu 10.

Grafikon 10. Učestalost *BDNF* genotipova odvojeno po polu



Iz učestalosti genotipova izračunate su i učestalosti alela za sve ispitanike i odvojeno po polu. Učestalost G alela za sve ispitanike je 82,0%, dok je učestalost A alela 18%. U grupi dečaka, učestalost G alela je 79,6%, a učestalost A alela je 20,4%. Kod devojčica, učestalost G alela je 82,3%, a učestalost A alela je 17,7%. Rezultati χ^2 testa pokazalisu da ne postoje statistički značajne razlike u učestalosti genotipova između grupe dečaka i devojčica ($\chi^2=0,64$, $p=0,4237$).

U analizi srednjih vrednosti parametara u zavisnosti od genotipa primenjen je dominantni model s obzirom da su samo 3 ispitanika imala genotip AA. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 24.

Tabela 24. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *BDNF* genotipa na ukupnom uzorku i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	Ukupno	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	GG	22,17±4,37	0,378	21,79±4,14	0,715	22,54±4,57	0,367
	GA+AA	21,76±3,82		21,74±4,40		22,05±3,66	
Glikemija mmol/l	GG	4,74±0,66	0,010	4,79±0,62	0,302	4,70±0,70	0,023
	GA+AA	4,56±0,56		4,68±0,55		4,43±0,55	
Trigliceridi mmol/l	GG	0,99±0,52	0,599	0,96±0,54	0,679	1,02±0,52	0,624
	GA+AA	0,97±0,59		0,99±0,75		0,95±0,36	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,36±0,86	0,931	4,18±0,74	0,848	4,53±0,93	0,756
	GA+AA	4,34±0,88		4,20±0,82		4,48±0,94	
HDL-C mmol/l	GG	1,42±0,42	0,484	1,34±0,34	0,580	1,45±0,41	0,659
	GA+AA	1,44±0,44		1,42±0,53		1,48±0,33	
LDL-C mmol/l	GG	2,47±0,87	0,911	2,38±0,85	0,879	2,55±0,93	0,873
	GA+AA	2,48±0,84		2,40±0,80		2,57±0,84	

Analiza rezultata (tabela 24) je pokazala da su srednje vrednosti u nivou glikemije značajno više kod nosioca GG genotipa u poređenju sa nosiocima GA i AA genotipa, kako na ukupnom uzorku ($p=0,010$), tako i u grupi devojčica ($p=0,023$). Da bi se potvrdili ovi rezultati rađena je multipla linearna regresiona analiza. Kao kovarijate korišćeni su pol i ITM. Nosioci GG genotipa imali su statistički značajno više vrednosti glikemije ($\beta=-0,152$, $p=0,02$). Takođe, uočena je statistički značajna povezanost između ITM i nivoa glikemije ($\beta=0,124$, $p=0,033$). Nije uočena statistički značajna povezanost između rs6265 genotipa i srednjih vrednosti ostalih analiziranih parametara.

Potom su adolescenti podeljeni u dve grupe u zavisnosti od ITM. U prvu grupu svrstani su oni adolescenti čiji je ITM<85. percentila. Drugu grupu čine adolescenti čiji je ITM>85. percentila. Analizirani su odabrani parametri u zavisnosti od genotipa GG/GA+AA, kako na ukupnom uzorku tako i odvojeno po polu. Rezultati su prikazani u tabelama 25 i 26.

Tabela 25. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *BDNF* genotipa kod svih adolescenata sa ITM≤85. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM≤85. pc	p	Dečaci	p	Devojčice	p
ITM	GG	19,91±2,17	0,198	19,60±1,98	0,286	20,06±2,25	0,647
	GA+AA	19,58±2,04		19,23±2,03		19,95±2,02	
Glikemija mmol/l	GG	4,75±0,66	0,020	4,72±0,67	0,707	4,76±0,67	0,004
	GA+AA	4,53±0,57		4,67±0,58		4,37±0,53	
Trigliceridi mmol/l	GG	0,93±0,42	0,535	0,88±0,39	0,843	0,98±0,40	0,333
	GA+AA	0,94±0,64		0,98±0,83		0,90±0,36	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,36±0,82	0,577	4,15±0,71	0,941	4,57±0,88	0,478
	GA+AA	4,29±0,92		4,14±0,88		4,44±0,94	
HDL-C mmol/l	GG	1,45±0,39	0,696	1,39±0,32	0,277	1,50±0,43	0,650
	GA+AA	1,48±0,47		1,49±0,59		1,47±0,31	
LDL-C mmol/l	GG	2,41±0,80	0,953	2,33±0,69	0,906	2,54±0,89	0,983
	GA+AA	2,42±0,85		2,31±0,87		2,54±0,83	

Analiza rezultata (tabela 25) je pokazala da u grupi dečaka sa indeksom telesne mase ispod 85.og percentila nosioci GG genotipa imaju statistički značajno više vrednosti glikemije u odnosu na nosioce GG+AA genotipa ($p=0,020$). Takođe, u grupi devojčica, nosioci GG genotipa su imale značajno više vrednosti glikemije u odnosu na nosioce GG+AA ($p=0,004$). Statističke značajnosti nisu uočene za srednje vrednosti ostalih analiziranih parametara.

Tabela 26. Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *BDNF* genotipa kod svih adolescenata sa ITM>85. percentila i odvojeno po polu

Parametar	Genotip	ITM>85. pc	p	Dečaci	P	Devojčice	P
ITM	GG	27,32±3,70	0,234	26,82±3,37	0,148	27,42±3,98	0,433
	GA+AA	27,29±2,09		27,49±2,48		27,04±1,50	
Glikemija mmol/l	GG	4,80±0,54	0,261	4,98±0,46	0,133	4,71±0,57	0,561
	GA+AA	4,66±0,51		4,70±0,45		4,59±0,59	
Trigliceridi mmol/l	GG	1,13±0,70	0,876	1,13±0,74	0,649	1,13±0,69	0,798
	GA+AA	1,03±0,43		1,00±0,51		1,06±0,31	
Ukupni holesterol mmol/l	GG	4,40±0,96	0,874	4,20±0,81	0,616	4,54±1,04	0,873
	GA+AA	4,44±0,79		4,32±0,65		4,59±0,95	
HDL-C mmol/l	GG	1,25±0,33	0,230	1,22±0,36	0,813	1,32±0,36	0,207
	GA+AA	1,34±0,33		1,25±0,26		1,48±0,38	
LDL-C mmol/l	GG	2,64±1,00	0,981	2,51±1,03	0,715	2,65±1,00	0,977
	GA+AA	2,63±0,79		2,62±0,75		2,66±0,88	

Analiza rezultata (tabela 26) je pokazala da u grupi preuhranjenih i gojaznih adolescenata nema statistički značajnih razlika u zavisnosti od stepena uhranjenosti i *BDNF* genotipa u odnosu na srednje vrednosti analiziranih parametara kako na ukupnom uzorku, tako i odvojeno po polu.

IV DISKUSIJA

Dečiju i adolescentnu gojaznost karakteriše prekomerna telesna težina koja nastaje kao posledica kalorijskog suficita tokom dužeg vremenskog perioda, a kojeg ne prati adekvatan utrošak energije. Pored toga, uzroci adolescentne gojaznosti su multifaktorski i predstavljaju zbirni uticaj genetičkih, neuroendokrinih, metaboličkih i biheviornalnih faktora sa faktorima spoljašnje sredine. Smatra se da svako povećanje telesne težine preko 10% od normalne (od 5. do 85. percentila) predstavlja gojaznost (186). Adolescentna gojaznost postaje sve veći izazov 21. veka dostižući epidemijske razmere. Problem gojaznosti nije samo prekomerna telesna težina, već i komorbiditeti koji prate ovaj poremećaj kao što su insulinska rezistencija, dijabetes tipa II, metaboličke, kardiovaskularne i druge bolesti. Takođe, gojaznost ima negativne posledice i na psihosocijalni status dece i adolescenata. Istraživanja su pokazala da gojazna deca i adolescenti imaju smanjen nivo socijalnih sposobnosti i nivoa samopouzdanja u poređenju sa normalno uhranjenom decom (187). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije broj gojazne dece širom sveta je sa 11 miliona od 1975. do 2016. godine narastao na 124 miliona, a procenjuje se da je još 216 miliona dece i adolescenata preuhranjeno (188).

Poslednjih godina, brojna istraživanja se baziraju na molekularno-genetičkim uzrocima gojaznosti i njenih komorbiditeta. Pored već poznatih uzročnika, sve više pažnje pridaje se istraživanjima gena značajnih za diferencijaciju i aktivaciju mrkog masnog tkiva, za koje se smatra da ima važnu ulogu u metabolizmu lipida, glukoze, energetske homeostaze i regulacije telesne težine. Činjenica da je ova vrsta masnog tkiva prisutna ne samo kod novorođenčadi, već i kod odraslih osoba pokrenula je brojna pitanja o njegovoj fiziologiji, aktivaciji i mogućem terapeuskom potencijalu lečenja gojaznosti i pratećih komplikacija. Pored primarne uloge koje mrko masno tkivo ima u rasipanju energije u vidu toplote, ono je veoma značajno u determinaciji telesne težine kod dece i adolescenata (189,190). Aktivnost i volumen mrkog masnog tkiva umnogome zavise od starosne dobi, stepena uhranjenosti, pola i temperature (26). Istraživanja su pokazala da se aktivnost i volumen mrkog masnog tkiva povećava tokom puberteta, što se može pripisati uticaju polnih i steroidnih hormona (191,192). Istraživanja u kojima je primenjena magnetna rezonanca pružila su dokaz da preuhranjena i gojazna deca imaju značajno manje ukupnog (funkcionalnog i nefunkcionalnog) mrkog masnog tkiva u supraklavikularnom regionu u poređenju sa mršavom decom (193). U proseku, povećanje težine i potkožnih masti bilo je tri puta, a visceralnih masti šest puta veće kod dece kod koje nije uočena aktivnost mrkog masnog tkiva u poređenju sa decom kod koje je prisutno metabolički aktivno mrko masno tkivo (103,190,194). Kod odraslih osoba, aktivnost mrkog masnog tkiva dovodi se u vezu sa metabolizmom glukoze, procentom telesnih masti i ITM. Kod zdravih odraslih osoba kod kojih je prisutna aktivnost mrkog masnog tkiva uočene su niže vrednosti glukoze kao i ukupnog i LDL holesterola u poređenju sa osobama kod kojih nije uočena aktivnost mrkog masnog tkiva (195,196). Takođe, smatra se da njegova aktivnost značajno utiče na povećanje lipolize, oksidaciju triglicerida i slobodnih masnih kiselina kao i na povećanje insulinske sensitivnosti (197).

Ovo istraživanje predstavlja populaciono-genetičku studiju sprovedenu na populaciji adolescenata uzrasta 15 godina sa ciljem ispitivanja povezanosti polimorfizama gena značajnih za diferencijaciju i aktivaciju mrkog masnog tkiva sa ITM, lipidnim statusom i nivoom glikemije. Veličina uzorka i način njegovog selektovanja u značajnoj meri doprinose kvalitetu populaciono-genetičkih studija. U okviru ovog istraživanja obuhvaćeno je 308 dece iz različitih delova Srbije: Arilje, Beograd, Bor, Despotovac, Kraljevo, Knjaževac, Niš, Požarevac, Subotica i Užice. Imajući u vidu da je obuhvaćen značajan broj regiona Srbije, može se smatrati da odabrani uzorak umnogome odgovara genetičkoj strukturi populacije Srbije. Svi ispitanici su istog starosnog uzrasta, odnosno imaju podjednak stepen rizika za razvoj gojaznosti i metaboličkih poremećaja uslovljen dobi, te se stoga dob može isključiti kao varirajući faktor rizika u ispitivanoj populaciji.

U okviru ove doktorske disertacije ispitivani uzorak činilo je 153 dečaka odnosno 49,68%, dok je devojčica bilo 155, odnosno 50,32%. Od ukupnog broja ispitanika 217 je bilo normalno uhranjeno, odnosno sa ITM manjim od 85. percentila, dok je njih 91 bilo preuhranjeno i gojazno sa ITM>85. percentila. U grupi dečaka, njih 26 je bilo preuhranjeno odnosno 17,8%, dok je 20 dečaka,

tj. 13,7% bilo gojazno. Od ukupnog broja devojčica 29 (17,8%) je bilo preuhranjeno, dok je njih 17 (11,0%) bilo gojazno. Podaci od prethodnim oboljenima ispitanika dobijenim uvidom u anamnestičke podatke ukazuju na nizak stepen učestalosti prethodnih oboljenja koja mogu biti povezana sa gojaznošću, dislipidemijom ili poremećajem u nivou glikemije. Od ukunog broja analiziranih prethodnih oboljenja ispitanika, značajnija učestalost zapažena je kod poremećaja srčanog ritma u 10,4% ispitanika, dok su alergijske manifestacije imale učestalost od 4,2%. Takođe, analizirane su učestalosti oboljenja kod majki i očeva ispitanika. Značajna učestalost gojaznosti uočava se kod oba roditelja, gde su majke bile gojazne u 27,6% , dok je učestalost gojaznosti kod očeva iznosila 29,9%.

Srednje vrednosti ITM, glikemije, triglicerida, ukupnog holesterola, HDL i LDL holesterola analizirane su na ukupnom uzorku kao i odvojeno po polu. Statistički značajno više vrednosti glikemije primećene su kod dečaka u odnosu na devojčice. Takođe, više vrednosti ukupnog holesterola i HDL holesterola su imale devojčice u odnosu na dečake. Pored toga, analizirane su srednje vrednosti odabranih parametara na ukupnom uzorku za normalno uhranjenje ispitanike, kao i za preuhranjenje i gojazne adolescente. Rezultati su pokazali da su adolescenti čiji je ITM>85. percentila imali statistički značajno više vrednosti triglicerida i LDL holesterola u odnosu na normalno uhranjene adolescente, odnosno one sa ITM≤85. percentila. Takođe, normalno uhranjeni adolescenti su imali statistički značajno više srednje vrednosti HDL holesterola u odnosu na preuhranjene i gojazne adolescente. Iako su ispitanici u ovoj studiji iste starosne dobi, te nemaju pridruženih oboljenja, razlike u srednjim vrednostima analiziranih parametara mogle bi se pripisati razlikama u rastu, uticaju polnih hormona, hormona rasta kao i navikama u ishrani, te fizičkoj aktivnosti. S obzirom da u periodu puberteta dolazi do povećane sekrecije testosterona kod dečaka, bazalni metabolizam dečaka se povećava za 10%. Estrogen ima tri puta manji efekat na bazalni metabolizam nego testosteron (198). Testosteron takođe ima uticaj na lipaznu aktivnost jetre, te dolazi do smanjenja nivoa lipidnih parametara posebno HDL holesterola. Kada je reč o ženskim polnim hormonima, primarno estrogenu, zbog povećanog lučenja ovog polnog hormona u toku puberteta kod devojčica dolazi do povećanih vrednosti ITM kao i subkutane adipoznosti (199). Shodno navedenom, delimično bi se mogle pojasniti više vrednosti lipidnih parametara kod devojčica u odnosu na dečake. Kada su u pitanju niže vrednosti glikemije kod devojčica u odnosu na dečake, jedno od logičnih objašnjenja bi se moglo ogledati u fiziološkoj insulinskoj rezistenciji koja se događa u toku puberteta. Naime, insulinska rezistencija u toku puberteta dovodi se u vezu sa povećanom sekrecijom hormona rasta, na koji između ostalog deluje i testosteron. Imajući u vidu da hormon rasta dostiže maksimum sekrecije oko 14-te godine kod dečaka, a kod devojčica u 12. godini za očekivati je da dečaci razviju povećanu rezistenciju na insulin, a samim tim i više vrednosti glikemije u odnosu na devojčice (198,200). Takođe, podaci o ispitanicima koji su učestvovali u ovoj studiji, ne uključuju informacije o načinu ishrane i fizičkoj aktivnosti koji su važni parametri prilikom procene lipidnih parametara, kao i nivoa glukoze u krvi. S druge strane, analizirajući podatke o ITM, nivou triglicerida i LDL holesterola, statistički značajne razlike u srednjim vrednostima nisu uočene ni za jedan od navedenih parametara.

16. ANALIZA *PRDM16* POLIMORFIZMA

PRDM16 pripada familiji *PRDM* proteina, te predstavlja ključnu komponentu za diferencijaciju i aktivaciju mrkog masnog tkiva (26). *PRDM16* ima ulogu u aktivaciji odgovarajuće genske ekspresije u ćelijama mrkog masnog tkiva kroz interakciju sa *PPARγ*, *PGC-1α*, *PGC1β*, *C/EBPβ* и *ZFP516* proteinima. Takođe, *PRDM16* kroz interakcije sa *CtBP1* and *CtBP2* korepresorima ima ulogu u supresiji gena odgovornih za nastanak belih adipocita (67). S obzirom da je *PRDM16* uključen u brojne fiziološke procese poput energetske homeostaze, metabolizma glukoze i lipida, kao i regulacije telesne težine, smatra se veoma važnim koregulatornim proteinom u biologiji mrkog masnog tkiva. Dosadašnja istraživanja ukazuju na povećanu ekspresiju *PRDM16* gena kod dece i adolescenata kod kojih je uočena prisutnost mrkog masnog tkiva (194).

Polimorfizam rs12409277 u genu za *PRDM16* dovodi do bazne substitucije timina u citozin čime utiče na transkripcionu aktivnost *PRDM16* gena. Literaturni podaci ukazuju na povezanost

prisustva C alela sa povećanom ekspresionom aktivnošću, te povećanim volumenom i aktivnošću mrkog i bež masnog tkiva (115).

Učestalost C alela u evropskim populacijama je 0,179, a učestalost T alela 0,821. U našem istraživanju koje je obuhvatilo 300 ispitanika učestalost C alela je 0,090, a učestalost T alela 0,910. Učestalost TT genotipa u našem ispitivanju je 82,3%, CT genotipa 17,3%, dok je učestalost CC genotipa 0,3%. Dobijene učestalosti alela i genotipova približno su iste kao u drugim populacijama sveta, izuzev Azije, gdje je skoro podjednako zastupljena učestalost T i C alela (201), što se može videti u tabeli 27. Rezultati analize učestalosti genotipova odvojeno po polu, odnosno između grupe dečaka i devojčica ne pokazuju statističku značajnost ($p=0,532$).

Tabela 27. Učestalost T/C alela rs12409277 polimorfizma u različitim svetskim populacijama (201)

Populacija	T	C
Srbija- adolescenti	0,910	0,090
Evropske populacije	0,821	0,179
Amerika	0,760	0,240
Afrika	0,861	0,139
Azija	0,556	0,444

Koliko je nama poznato, za sada ne postoje studije koje su istraživale povezanost rs12409277 polimorfizma sa vrednostima glikemije, lipidnog statusa i indeksa telesne mase kod dece ili adolescenata. Međutim, istraživanja sprovedena na uzorku od 1081 žene u postmenopauzi pokazuje da je prisustvo CC ili CT genotipa povezano sa višim vrednostima telesne mase bez masti nego kod žena koji su nosioci T alela (115). Yue i saradnici istraživali su i vezu između rs2236518 polimorfizma lociranog takođe na 5' UTR regionu *PRDM16* gena sa ITM kod mlađih muškaraca (od 20-40 godina) i starijih muškaraca (50-80 godina). Rezultati studije pokazuju niže vrednosti ITM u obe grupe. Takođe, ista grupa saradnika pronašla je asocijaciju između rs2236518 polimorfizma i smanjenog rizika za razvoj metaboličkog sindroma na uzorku od 1399 kineskih muškaraca (116). Pored toga, AlAmran i sar. ispitivali su povezanost rs2651899 polimorfizma sa indeksom telesne mase i lipidnim statusom na odrasloj populaciji Saudijske Arabije. Uočeno je da nosioci mutiranog genotipa imaju statistički značajno veći rizik od gojaznosti u odnosu na nosioce TT genotipa. Takođe, u istom istraživanju zapaženo je da nosioci TT genotipa imaju statistički značajno više vrednosti HDL i LDL holesterola, ali niže vrednosti triglicerida u odnosu na nosioce CC genotipa (117). U istraživanju Park i sar. ispitivana je povezanost *PRDM16* rs17390167 polimorfizma sa metaboličkim sindromom, gde je uočen povećan trend za rizik od razvoja metaboličkog sindroma, ali rezultati nisu dostigli statističku značajnost (118).

Rezultati naših analiza pokazuju da u grupi devojčica (normalno uhranjenih, preuhranjenih i gojaznih zajedno) postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima ukupnog holesterola ($p=0,037$) dok je razlika u vrednostima LDL holesterola na granici statističke značajnosti ($p=0,054$) u zavisnosti od *PRDM16* genotipa. Devojčice nosioci TT genotipa imale su statistički više vrednosti ukupnog i LDL holesterola. Međutim, multipla linearna regresiona analiza nije potvrdila ove rezultate. Takođe, statistički značajne razlike u vrednostima ostalih analiziranih parametara u zavisnosti od genotipova nisu uočene. Međutim, naši rezultati su pokazali da ispitanici koji su normalno uhranjeni, odnosno imaju $ITM < 85$, a koji su nosioci TT genotipa, imaju statistički značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na nosioce CT+CC genotipa. Prilikom analize parametara odvojeno po polu, došli smo do zaključka da su razlike u srednjim vrednostima izraženije kod devojčica. Devojčice nosioci TT genotipa imale su značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na devojčice nosioce CT+CC genotipa. Rezultati su pokazali i da dečaci čiji je

ITM>85, a koji su nocioci TT genotipa, imaju statistički značajno više vrednosti HDL holesterola u odnosu na nosioce CT+CC genotipova, ali multipla linearna regresiona analiza nije potvrdila ove rezultate. Nismo dobili statističke značajnosti u pogledu analize ostalih parametara kod prehranjenih i gojaznih ispitanika.

S obzirom da u pubertetu dolazi do povećane sekrecije hormona rasta, faktora rasta, gonadotropina i polnih steroidnih hormona za koje se smatra da utiču na aktivnost mrkog masnog tkiva, moguće objašnjenje za dobijene razlike u vrednostima analiziranih parametara u odnosu na pol, proizilazi iz razlika u rastu, polnoj zrelosti kao i zrelosti organa koji luče navedene hormone između dečaka i devojčica ovog uzrasta (56).

17. ANALIZA *CtBP2* POLIMORFIZMA

C-terminus vezujući protein 2 se eksprimira u mnogim tkivima uključujući i masno tkivo. *CtBP2* deluje kao korepresor transkripcije, aktivator transkripcije i regulator citoskeleta (119). Kada je reč o mrkom masnom tkivu, *CtBP2* u interakciji sa *PRDM16* suprimira ekspresiju gena specifičnih za ćelije belog masnog tkiva, čime se stvara preduslov za aktivaciju ekspresije gena specifičnih za mrko masno tkivo. Direktno vezivanje *PRDM16* sa *CtBP1* i *CtBP2* kroz *PXDLS* motive omogućava represiju na promotoru gena za rezistin, angiotensinogen, te drugih gena značajnih za belo masno tkivo (125).

U okviru gena za *CtBP2* identifikovano je nekoliko intronskih polimorfizama među kojima je i *rs1561589* koji dovodi do zamene guanina adeninom. Efekat ovog polimorfizma na samu ekspresiju gena i funkciju proteina još uvek nije dovoljno razjašnjen. Takođe, pregledom dostupne literature nisu nađeni podaci koji bi ukazivali na povezanost *rs1561589* sa lipidnim statusom, ITM ili glikemijom kod dece ili adolescenata.

Rezultati naše studije koja je obuhvatila 300 ispitanika pokazuju da je učestalost GG genotipa bila 43,0%, odnosno 129 ispitanika je bilo homozigot za češći alel G. Heterozigota je bilo 130 (43,3%), dok je učestalost AA genotipa bila 13,7%, odnosno 41 ispitanik je bio homozigot za ređi alel A. Takođe, učestalost G alela na ukupnom broju ispitanika je 65%, dok je učestalost A alela 35%, što je u saglasnostima sa učestalostima rezultata objavljenih za različite populacije sveta, tabela 28. Primećuje se da je učestalost alela G niža u populaciji Afrike u odnosu na ostale populacije u svetu, kao i da se učestalost alela A značajno razlikuje u ovoj populaciji u odnosu na sve druge.

Tabela 28. Učestalost G/A alela *rs1561589* polimorfizma u različitim svetskim populacijama (201)

Populacija	G	A
Srbija- adolescenti	0,650	0,350
Evropske populacije	0,636	0,364
Amerika	0,610	0,390
Afrika	0,390	0,610
Azija	0,697	0,303

Analizom rezultata u ovoj studiji nismo uočili statistički značajnu povezanost između indeksa telesne mase i ostalih analiziranih parametara i *rs1561589* polimorfizma kako na ukupnom broju ispitanika, tako i u grupi dečaka i devojčica. Međutim, Hinneyi saradnici su u GWAS (engl. genome wide association study) studiji pokazali povezanost ovog polimorfizma sa povećanim indeksom telesne mase kod žena. Ista studija analizirala je još dva intronska polimorfizma u okviru ovog gena *rs126681170* i *rs126674064* koja se dovode u vezu sa povećanim ITM dominantno kod žena, te

povećanom mogućnošću za razvoj poremećaja u ishrani, primarno anoreksije (127). Nadalje, studija Bradfield i saradnika analizirala je ovaj polimorfizam kao i rs126681170 i rs126674064 u EGG (eng. Early Growth Genetics Consortium) studiji koja je obuhvatala samo decu i adolescente. Takođe, nisu uočeni značajni rezultati u pogledu povezanosti ovog polimorfizma sa indeksom telesne mase, što je u saglasnosti sa našim rezultatima (202).

Prilikom analize povezanosti ovog polimorfizma sa odabranim parametrima u grupi ispitanika sa $ITM \leq 85$ (normalno uhranjeni) i sa $ITM > 85$ (preuhranjeni i gojazni) dobili smo statistički značajnu razliku u vrednostima ukupnog holesterola i LDL holesterola kod preuhranjenih i gojaznih devojčica. Naime, devojčice nosioci GA+AA imale su značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na devojčice nosioce GG genotipa. U grupi normalno uhranjenih i preuhranjenih i gojaznih dečaka nije dobijena statistička značajnost u pogledu analiziranih parametara u odnosu na genotip.

S obzirom na već prethodno opisanu interakciju između CtBP2 i PRDM16 proteina, u ovoj studiji ispitivali smo aditivni efekat rs12409277 (*PRDM16*) i rs1561589 (*CtBP2*) polimorfizama na analizirane parametre. Rezultati su pokazali da su nosioci CT genotipa za *PRDM16* gen (rs12409277) i GG genotipa za *CtBP2* gen (rs1561589) imali značajno niže vrednosti ukupnog i LDL holesterola u poređenju sa svim drugim kombinacijama genotipova. Prisustvo ređeg C alela utiče na povećanu ekspresiju *PRDM16* gena, dok efekat instronskog polimorfizma u *CtBP2* genu još uvek nije dovoljno razjašnjen. Međutim, prema trenutno poznatim podacima, moguće je da prisustvo ređeg A alela u okviru *CtBP2* polimorfizma smanjuje njegovu ekspresiju ili aktivnost bilo direktno ili kroz neravnotežu vezanosti gena sa drugim, još uvek nepoznatim funkcionalnim polimorfizmom. S toga, moguće je da nosioci CT+GG genotipova imaju povećanu ekspresiju PRDM16 i CtBP2 proteina a da za posledicu toga imaju manje belog, a više mrkog masnog tkiva.

18. ANALIZA *PPARG* POLIMORFIZMA

$PPAR\gamma$ je hormonski receptor i ligand aktivirajući transkripcioni faktor koji se primarno eksprimira u masnom tkivu, a čija je ključna uloga kontrola diferencijacije adipocita i regulacija ekspresije brojnih gena čiji produkti učestvuju u procesima energetske homeostaze, inflamacije, angiogeneze i ateroskleroze (128,134). Iako je $PPAR\gamma$ ključni transkripcioni faktor za diferencijaciju masnog tkiva, on sam nije dovoljan za aktivaciju programa diferencijacije mrkog masnog tkiva. Njegova interakcija sa PRDM16 transkripcionim faktorom ima veoma važnu ulogu u regulaciji ekspresije proteina karakterističnih za mrke adipocite kao što je UCP1 (137). Kod čoveka, gojaznost dovodi do smanjene ekspresije *PPARG* što za posledicu ima povećan stepen inflamacije, angiogeneze i fibroze u belom masnom tkivu. U skladu sa ovim činjenicama, osobe koje imaju mutacije u *PPARG* genu sklonije su insulinskoj rezistenciji i lipodistrofiji. S druge strane, povećanja ekspresija *PPARG* utiče na poboljšanu osetljivost na insulin (136).

U okviru *PPARG* gena do sada je opisano nekoliko polimorfizama od kojih je najčešći Pro12Ala (rs1801282) koji se nalazi u egzonu B, a čija je učestalost varira između 2% i 23% u različitim etničkim grupama (203). Dosadašnja istraživanja povezuju Pro alel sa povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2, metaboličkog sindroma i gojaznosti (204). Pored ovog polimorfizma, česta polimorfna varijanta u okviru ovog gena nalazi se u egzonu 6 i dovodi do zamene citozina sa timinom na poziciji 1431C>T (rs3856806). Iako se ovaj polimorfizam dovodi u vezu sa nižim indeksom telesne mase, povoljnijim lipidnim profilom i smanjenim rizikom od koronarnih bolesti (205,206), rezultati istraživanja su još uvek kontradiktorni.

Učestalost 1431C>T polimorfizma varira u različitim populacijama sveta (tabela 29). U našem istraživanju, učestalost alela C na ukupnom uzorku je 90,1%, dok je učestalost alela T 9,9%. Takođe, učestalost CC genotipa na ukupnom uzorku je 81,2%, CT genotip je imalo 18,1% ispitanika, dok je TT genotip zabeležen kod 0,7% ispitanika.

Tabela 29. Učestalost C/T alela rs3856806 polimorfizma u različitim svetskim populacijama (201)

Populacija	C	T
Srbija- adolescenti	0,900	0,099
Evropske populacije	0,900	0,100
Amerika	0,915	0,085
Afrika	0,936	0,064
Azija	0,754	0,246

Učestalosti alela u našem istraživanju odgovaraju učestalostima alela u različitim populacijama sveta (tabela 29), s tim što je učestalost alela T nešto viša u populacijama Azije u odnosu na sve druge. Takođe, pregledom dostupne literature, odnosno istraživanja sprovedenih u zemljama našeg okruženja, podaci ukazuju da je u bosansko-hercegovačkoj populaciji učestalost T alela 0,14, dok je učestalost A alela 0,86, što odgovara našim rezultatima (205).

Kao i kod većine drugih polimorfizama koji su ispitivani u ovoj studiji, istraživanja povezanosti rs3856806 polimorfizma sa vrednostima ITM, lipidnog statusa i nivoa glikemije kod dece i adolescenata su usvetu još uvek retki. Analiza dobijenih rezultata u našoj studiji nije pokazala statistički značajnu povezanost rs3856806 polimorfizma sa ITM. Kada su u pitanju istraživanja sprovedena u dečijoj i adolescentnoj populaciji, rezultati dostupnih studija odgovaraju rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Naime, Leon-Mimila i sar. u meksičkoj studiji koja je obuhvatila 3 grupe ispitanika između kojih i 1218 zdrave dece uzrasta 6-18 godina nije uočila povezanost rs3856806 polimorfizma sa vrednostima ITM kod dece (207), što je u saglasnosti sa rezultatima naše studije. Wenshu i sar. u svojoj studiji nisu ukazali na povezanost ovog polimorfizma sa povišenim vrednostima ITM (208), što odgovara i rezultatima Parra i sar. (209). Još jedno istraživanje koje je sprovedeno u dečijoj populaciji u Koreji, analiziralo je 68 polimorfizama u 32 gena između kojih i rs3856806 i njihovu asocijaciju sa gojaznošću. Rezultati ovog istraživanja takođe ne ukazuju na vezu između rs3856806 polimorfizma i gojaznosti (140). Međutim, prethodne studije sprovedene u različitim populacijama i grupama odraslih ispitanika ukazale su povezanost T alela sa gojaznošću. Na primer, istraživanje Valve i sar. je pokazalo povezanost T alela sa ekstremnom gojaznošću i povećanim procentom telesnih masti kod gojaznih žena (210). Rezultati studije Doney i sar. 2002. godine i Tai ES i sar. iz 2004. godine ukazuju da su zdravi ispitanici koji su bili nosioci ređeg, T alela imali više vrednosti ITM u odnosu na nosioce CC genotipa (204,211). Nadalje, rezultati istraživanja Zhou i sar., 2012. ukazuju na povećan indeks telesne mase kod nosilaca T alela na uzorku od 1008 zdravih ispitanika u kineskoj populaciji (212). Takođe, studija Dongxia i sar. ispitivala je povezanost rs3856806 polimorfizma sa metaboličkim sindromom u kineskoj populaciji. Rezultati njihove studije odgovaraju prethodno navedenim rezultatima, odnosno osobe nosioci T alela imale su više vrednosti ITM u odnosu na nosioce CC genotipa (213). S druge strane, postoje i rezultati studija sa drugačijim zaključcima. Meta-analiza koja je obuhvatila ispitanike različitog etničkog porekla nije uočila asocijaciju između rs3856806 polimorfizma i gojaznosti (141). S druge strane, u studiji Butt i sar. 2014. godine primećena je asocijacija T alela sa nižim vrednostima ITM, u odnosu na nosioce CC genotipa (214). Nadalje, istraživanje Dujić i sar. sprovedenom u bosansko-hercegovačkoj populaciji na uzorku od 43 ispitanika sa metaboličkim sindromom i isto toliko zdravih ispitanika, ukazalo je na niže vrednosti ITM u kontrolnoj grupi kod nosilaca CT+TT genotipa u odnosu na nosioce CC genotipa (205).

Analizirajući rezultate dobijene u ovoj studiji u pogledu vrednosti lipidnih parametara, došli smo do zaključka da su u grupi preuhranjenih i gojaznih ispitanika nosioci CC genotipa imali više vrednosti HDL holesterola u odnosu na nosioce CT+TT genotipa. Dobijeni rezultat je na granici

statističke značajnosti, a rezultat multiple linerane regresione analize nije povrdio statističku značajnost. Međutim, u grupi preuhranjenih i gojaznih devojčica, odnosno devojčica sa ITM>85. percentila, takođe smo dobili statistički značajnu razliku u vrednostima HDL holesterola u odnosu na *PPARG* genotip. Devojčice nosioci CC genotipa su imale više vrednosti HDL holesterola u odnosu na nosioce CT+TT genotipa. Multipla linearna regresiona analiza je potvrdila ovaj rezultat, a kao kovarijate korišćeni su ITM i nivo glikemije. Statistički značajna povezanost između ostalih analiziranih lipidnih parametara poput ukupnog, LDL holesterola, te nivoa triglicerida i *PPARG* genotipa nije uočena kako na ukupnom broju ispitanika, tako i u grupi preuhranjenih i gojaznih adolescenata. Za sada, koliko je nama poznato ne postoje objavljene studije koje su se bavile istraživanjem povezanosti ovog polimorfizma sa metaboličkim parametrima u populaciji dece i adolescenata. Međutim, rezultati prethodnih studija sprovedenih na odraslim ispitanicima iz različitih svetskih populacija ukazuju na povoljniji lipidni status kod ispitanika koji su bili nosioci ove polimorfne varijante. Naime, istraživanje Wei-min Wei i saradnika iz 2016. godine je ispitalo povezanost rs3856806 sa ishemijskim moždanim udarom kao i sa lipidnim statusom kod pacijenata koji su imali ovo obolenje kao i kod zdravih ispitanika. Rezultati su pokazali da su u obe grupe ispitanika nosioci CC genotipa imali signifikantno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na nosioce CT+TT genotipa, dok asocijacija između ovog polimorfizma i vrednosti triglicerida kao i HDL holesterola nije uočena (215). Slični rezultati su objavljeni u istraživanju Huma But i sar. 2016. godine, gde su uočene više vrednosti LDL holesterola kod nosilaca CC genotipa u odnosu na nosioce CT i TT genotipa. U istom istraživanju asocijacija ovog polimorfizma sa vrednostima triglicerida, HDL i ukupnog holesterola nije uočena (214). Nasuprot tome, neke studije su ukazale na vezu između rs3856806 polimorfizma i dislipidemije. Primer tome je studija Gu i sar. iz 2014. godine koji su ispitali povezanost nekoliko polimorfizama u okviru *PPARG* gena sa dislipidemijom u kineskoj populaciji na ukupno 820 zdravih odraslih ispitanika. Rezultati njihove studije ukazuju na povezanost rs385806 i rs1805192 sa dislipidemijom. Takođe, analiza haplotipova ova dva polimorfizma ukazala je na asocijaciju sa dislipidemijom, ukupnim holesterolom i nivoom triglicerida. Ala/T haplotip se dovodi u vezu sa povišenim nivoom ukupnog holesterola, a Pro/T, Ala/C i Ala/T haplotipovi su asociirani sa povišenim nivoom triglicerida (216). Takođe, istraživanje, Zhou i sar. je pokazalo asocijaciju rs3856806 polimorfizma sa povišenim nivoom HDL holesterola kod pacijenata sa arterijskom koronarnom bolešću (212). Studija Yilmaz-Aydogan i sar. je pokazala da kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 i koronarnom arterijskom bolešću, nosioci CT genotipa imaju povišene vrednosti triglicerida u serumu i VLDL holesterola u odnosu na nosioce CC genotipa (217). Još jedna studija ukazala je na povezanost CT/TT genotipa sa višim vrednostima LDL holesterola u odnosu na nosioce CC genotipa (218). Nasuprot tome, u studiji Djuć i sar. nije uočena asocijacija između ovog polimorfizma i parametara lipidnog statusa kako kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, tako i u grupi zdravih kontrolnih ispitanika (205). Međutim, grupa istih autora je u drugoj studiji sprovedenoj na 70 pacijenata sa metaboličkim sindromom uočila više vrednosti ukupnog i HDL holesterola kod pacijenata koji su bili nosioci CT genotipa u odnosu na pacijente nosioce CC genotipa (219).

Kada je u pitanju asocijacija rs3856806 polimorfizma sa vrednostima glikemije, na ukupnom uzorku devojčice nosioci T alela imale su statistički niže vrednosti glikemije u odnosu na devojčice nosioce CC genotipa. Takođe, u grupi adolescenata čiji je ITM>85. percentila primećene su više vrednosti glikemije kod devojčica nosioca CC genotipa u odnosu na nosioce CT+TT genotipa. Pregledom dosadašnjih dostupnih studija primećuju se različiti rezultati. Istraživanje Zhou i saradnika je ukazalo na povezanost ovog polimorfizma sa nižim vrednostima glukoze u krvi kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću, ali ne i kod zdravih ispitanika (212). Takođe, studija Vergotine i saradnika iz 2014. godine je u preseku studije na afričkoj populaciji različitog porekla na upukno 820 ispitanika došla do zaključka da su nosioci T alela imali za 44% smanjen rizik za nastanak dijabetesa tipa 2 u odnosu na nosioce CC genotipa. Ista studija je objavila rezultate gde je uočena povezanost alela T sa nižim vrednostima glukoze u krvi, ali rezultati nisu dostigli statističku značajnost (220). Nadalje, Butt i saradnici su u svom istraživanju uočili niže vrednosti glikemije kod nosilaca CC genotipa u odnosu na nosioce CT/TT genotipa (214). Rezultati studije u Poljskoj kod žena u menopauzi ukazuju na niže vrednosti glikemije kod normalno uhranjenih žena koje su nosioci CC

genotipa (221). Istraživanja (211,222) su ukazala na povišen rizik od nastanka dijabetesa tipa 2 kod nosioca T alela u odnosu na nosioce CC genotipa. S druge strane, Parra i sar. su ispitivali povezanost 11 polimorfizama različitih gena uključujući i rs385806 sa dijabetesom tipa 2 i indeksom telesne mase u populaciji Latinoamerikanaca starosti između 20 i 70 godina. Rezultati njihove studije ukazali su na povezanost nosioca T alela sa dijabetesom tipa 2, ali prilikom analize haplotipova sa drugim polimorfizmima u okviru ovog gena nije uočena statistički značajna povezanost (209). Međtim, u istraživanju Dujuć i sar. asocijacija između nosioca 1431C>T polimorfizma sa vrednostima glikemije kako kod pacijenata sa metaboličkim sindromom, tako i u zdravoj, kontrolnoj grupi nije uočena (205).

Uzimajući u obzir dosadašnje podatke koji ukazuju na povezanost rs3856806 polimorfizma sa vrednostima lipidnih parametara, kao i sa vrednostima glikemije, može se zaključiti da ovaj polimorfizam ima veoma važnu ulogu u metabolizmu lipida i patogeneze dijabetesa tipa 2 kao i metaboličkog sindroma. Iako rezultati studija nisu u potpunosti usaglašeni, bilo bi od izuzetne važnosti sprovesti istraživanja sa većim brojem ispitanika, posebno u populacijama dece i adolescenata, s ciljem što boljeg razumevanja mehanizma nastanka gojaznosti kao i pratećih komorbiditeta.

19. ANALIZA *PPARGC1A* POLIMORFIZMA

Peroksizomni proliferatorom aktivirani receptor gama koaktivator 1 α (*PPARGC1A*) je gen čiji je produkt PGC-1 α protein koji pripada familiji transkripcionih koaktivatora, a čija se funkcija vezuje za koaktivaciju različitih transkripcionih faktora i nukleusnih receptora (223). Uloga ovog proteina ogleda se u održavanju normalne mitohondrijalne biogeneze, oksidacije glukoze i lipida, te transportu glukoze u skeletne mišiće (224). Pored toga, PGC-1 α je veoma značajan protein u biologiji mrkog masnog tkiva, s obzirom da učestvuje u regulaciji formiranja mrkog masnog tkiva delujući kao transkripcioni koaktivator PPAR γ , α i δ , te mnogih drugih nukleusnih faktora (27). Pokazano je da se PGC-1 α eksprimira u tkivima koja imaju visoku metaboličku aktivnost kao što su mozak, srce, bubrezi, mrko i belo masno tkivo (225). Takođe, izlaganje hladnoći, fizička aktivnost i smanjen unos hrane utiče na povećanu ekspresiju *PPARGC1A* gena koja se dovodi u vezu sa pozitivnim kardiovaskularnim i metaboličkim parametrima (224). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je u skeletnim mišićima kod ljudi koji imaju dijabetes tipa 2, ekspresija ovog gena znatno niža u odnosu na ljude koji imaju normalnu toleranciju na glukozu (225). Uloga ovog proteina je takođe značajna u patogenezi gojaznosti imajući u vidu da PGC-1 α stimuliše diferencijaciju preadipocita u zrele adipocite, te utiče na regulaciju energetskog balansa (226).

Do sada je istraživano nekoliko polimorfizama pojedinačnih nukleotida u okviru *PPARGC1A* gena kod kojih se uočava povezanost sa razvojem dijabetesa tipa 2, insulinskom rezistencijom, gojaznosti i dislipidemijom (227). Pored rs8192678G>A, rs2970847C>T, rs3736265G>A i rs3755863 C>T polimorfizama *PPARGC1A* gena čiji su efekti na metaboličke procese istraživani, Gly482Ser (rs8192678) je najčešće proučavan polimorfizam u okviru ovog gena (150). Nosioci 482Ser varijante imaju do 60% smanjenu ekspresiju ovog gena u odnosu na osobe koje nemaju ovu alelnu varijantu (149). Dosadašnje studije ukazuju na povezanost ovog polimorfizma sa dijabetesom tipa 2, gojznošću i dislipidemijom kako kod odraslih osoba, tako i kod dece i adolescenata (151,228). Međtim, rezultati istraživanja nisu u potpunosti usaglašeni. Naime, rezultati studija sprovedenim u različitim populacijama, nisu pokazali povezanost između ovog polimorfizma i navedenih parametara (229–231).

Kada je u pitanju učestalost ovog polimorfizma u različitim populacijama sveta, ona varira u zavisnosti od etničke pripadnosti kao i porekla. Međtim, rezultati iz tabele 30 ukazuju da su učestalosti u različitim svestskim populacijama vrlo slični učestalostima dobijenim u našoj studiji, uz određene varijacije.

Tabela 30. Učestalost G/A alela rs8192678 polimorfizma u različitim svetskim populacijama (201)

Populacija	G	A
Srbija- adolescenti	0,651	0,349
Evropske populacije	0,657	0,342
Amerika	0,700	0,300
Afrika	0,885	0,114
Azija	0,562	0,438

Analiza rezultata dobijenih u ovoj studiji je pokazala da je ukupna učestalost alela G 65,1%, dok je učestalost A alela 34,9%, što približno odgovara učestalostima u ostalim analiziranim populacijama. Međutim, posmatrajući učestalosti G/A alela u populaciji Afrike, u različitim etničkim grupama, učestalost alela G varira od 70-100%, dok učestalost alela A varira od 0-6,7%, što je i ujedino najniža učestalost (201). Razlog za tako niske učestalosti alela A bi se mogao pripisati veoma malom broju analiziranih uzoraka u populaciji Afrike. Takođe, važno je napomenuti da se uticaj i učestalosti rs8192678 polimorfizma na metaboličke parametre razlikuje u različitim populacijama kako zbog različitog etničkog porekla, pola, tako i zbog uticaja životnih navika, poput fizičke aktivnosti i načina ishrane (232). Kada su u pitanju zemlje našeg okruženja, ispitivanje koje je sprovedeno u Rumuniji ukazuje da je kod zdravih ispitanika (N=166) učestalost G alela je 71,68%, dok je učestalost alela A 28,31%, što približno odgovara učestalostima dobijenim u ovom istraživanju (233).

Cilj naše studije je bio da se ispita povezanost rs8192678 polimorfizma sa ITM, nivoom glikemije, te vrednostima lipidnih parametara kod adolescenata. Dosadašnja istraživanja uglavnom su se bavila ispitivanjem veze između ovog polimorfizma i navedenih parametara na populacijama odraslih ljudi, dok je vrlo mali broj studija sproveden u dečijoj i adolescentnoj populaciji. Kada je u pitanju ITM, rezultati naše studije ne ukazuju na statistički značajnu povezanost rs8192678 polimorfizma sa vrednostima indeksa telesne mase kako na ukupnom uzorku, tako i u grupi preuhranjenih i gojaznih dečaka i devojčica. Rezultati studije Brito i saradnika koja je sprovedena u danskoj i estonskoj populaciji zdrave dece i adolescenata na uzorku 1255 dece i 855 adolescenata uzrasta od 8-18 godina, takođe ne ukazuju na povezanost ovog polimorfizma sa vrednostima ITM u obe ispitivane grupe (224). Slični podaci objavljeni su u istraživanju Queiroz i saradnika iz 2015. godine koje se bavilo asocijacijom između pet različitih polimorfizama pojedinačnih nukleotida (među kojima je i rs8192678 polimorfizam) sa gojaznošću dece u Brazilu. Njihova studija obuhvatila je 403 dece i adolescenata uzrasta 7-14 godina, a statistički značajna povezanost sa gojaznošću nije uočena (151). Nadalje, rezultati istraživanja sprovedenog u Koreji na uzorku od 286 dece uzrasta 10-12 godina, su u saglasnosti sa rezultatima prethodno navedenih studija (234). Iako u prethodno navedenoj studiji nije pokazana asocijacija između ovog polimorfizma i ITM, statistički značajna povezanost uočena je sa povećanim procentom telesnih masti (234). S druge strane, jedina dostupna studija koja je obuhvatila populaciju dece i adolescenata, a koja je sprovedena Portugalu na uzorku od 730 dece uzrasta 6-12 godina, uočila je povezanost alela A sa povećanim vrednostima ITM, ali i ovaj rezultat je bio na granici statističke značajnosti (235). Međutim, imajući u vidu da rs8192678 polimorfizam ima negativan uticaj na fiziologiju masnog tkiva, u smislu povećanog rizika za nastanak gojaznosti i pratećih komorbiditeta, sprovodi se sve veći broj studija asocijacije ovog polimorfizma sa metaboličkim parametrima, ali u najvećem broju slučajeva na populaciji odraslih ljudi. Naime, asocijacija ovog polimorfizma sa povećanim ITM, obimom struka, kukova, ukupnom telesnom, te potkožnom i abdominalnom visceralnom mašću je uočena kod sredovečnih žena u austrijskoj populaciji, ali ne i kod muškaraca (236). Rezultati studije Ridderstråle i saradnika su pokazali da su

muškarci koji su stariji od 50 godina, fizički neaktivni, a koji su nosioci A alelne varijante imali povećan rizik za nastanak gojaznosti u poređenju sa nosiocima GG genotipa. Međutim, povezanost ovog polimorfizma sa gojaznošću nije uočena kod muškaraca koji su fizički aktivni, ili žena nezavisno od starosne dobi ili fizičke aktivnosti (232). Nadalje, povećanje ukupne telesne masti, obima kukova i ITM uočeno je kod gojaznih ispitanika u meksičkoj populaciji, a koji su bili nosioci AA genotipa u odnosu na nosioce GG ili GA genotipa. Takođe, muškarci sa dijabetesom tipa 2 koji su bili pod intenzivnom antidiabetičkom terapijom, a koji su nosioci A alela imali su znatno povećan ITM u odnosu na nosioce G alela. U istoj studiji povezanost Gly482Ser polimorfizma sa gojaznošću kod žena nije dokazana (237). U populaciji Tonga (Polinezija), koja je obuhvatila 183 ispitanika, pokazalo se da je A alel signifikantno povezan sa povećanim ITM, bilo u dominantnom ili kodimantnom modelu (149). S druge strane, brojne studije prijavile su suprotne rezultate. U rumunskoj populaciji istraživanje koje je obuhvatilo 296 pacijenata sa metaboličkim sindromom i 166 zdravih kontrola, povezanost Gly482Ser polimorfizma sa ITM nije uočena ni u jednoj grupi ispitanika (233). Nadalje, u studiji (238) takođe nije dobijena statistički značajna povezanost Gly482Ser polimorfizma sa gojaznošću, kao ni u studiji sprovedenoj u populaciji danskog kavkazoidnog stanovništva (239).

Analizom vrednosti lipidnih parametara u zavisnosti od rs8192678 genotipa u našoj studiji, došli smo da zaključka da su na ukupnom uzorku, dečaci nosioci GG genotipa imali statistički značajno više vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na dečake nosioce GA+AA genotipa. Takođe, u grupi dečaka sa ITM \leq 85. percentila, odnosno normalno uhrnjeni dečaci koji su nosioci GG genotipa imali su više vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na dečake nosioce GA+AA genotipa. Nadalje, analizirajući povezanost ovog polimorfizma sa vrednostima ukupnog holesterola u grupi preuhranjenih i gojaznih ispitanika, rezultati su pokazali statistički značajno više vrednosti ukupnog holesterola kod nosioca GG genotipa u odnosu na nosioce GA+AA genotipa. U istoj analiziranoj grupi, odvojeno po polu, više vrednosti ukupnog holesterola uočene su kod devojčica nosioca GG genotipa u odnosu na devojčice nosioce GA+AA genotipa. Razlike u vrednostima ukupnog holesterola u odnosu na Gly482Ser genotipove u grupi dečaka nisu dobijene. Kada su u pitanju ostali lipidi parametri, statistički značajnu razliku u vrednostima LDL holesterola dobili smo na ukupnom uzorku ispitanika sa ITM $>$ 85. percentila. Naime, nosioci GG genotipa imali su više vrednosti LDL holesterola u odnosu na nosioce GA+AA genotipa. Međutim, analiza rezultata odvojeno po polu u grupi preuhranjenih i gojaznih adolescentata je pokazala da su devojčice nosioci GG genotipa imale više vrednosti LDL holesterola u odnosu na devojčice nosioce GA+AA genotipa. Statistička značajna razlika u vrednostima LDL holesterola u grupi dečaka nije uočena. Razlike u srednjim vrednostima triglicerida i HDL holesterola u odnosu na rs8192678 genotip nisu uočene kako u grupi normalno uhranjenih, tako i u grupi preuhranjenih i gojaznih dečaka i devojčica. Pregledom dostupne literature, odnosno istraživanja koja su rađena u populaciji dece i adolescenata, iako ne u velikom broju, uočavaju se rezultati koji su vrlo slični rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Primer tome je studija sprovedena u dečijoj populaciji u Brazilu na uzorku od 192 gojazne i 211 normalno uhranjene dece, a koja je pokazala statistički značajnu povezanost ređeg alela A, odnosno nosioca GA+AA genotipa sa višim vrednostima triglicerida kod gojazne dece. Međutim, u istoj studiji nije pronađena veza između ovog polimorfizma sa vrednostima ostalih lipidnih parametara kako u grupi normalno uhranjenih, tako i u grupi gojaznih ispitanika (151). U korejskoj populaciji dece i adolescenata povezanost rs8192678 polimorfizma sa vrednostima ukupnog holesterola, triglicerida, te HDL holesterola nije uočena, što je u saglasnosti sa našim rezultatima (234). Vrlo slične rezultate dobili su Brito i sar. u svojoj studiji koja je obuhvatila decu i adolescente iz Estonije i Danske. U njihovoj studiji nisu uočene razlike u vrednostima lipidnih parametara u odnosu na Gly482Ser genotip (224).

Kada su u pitanju studije sprovedene u populaciji odraslih ljudi, rezultati nisu usaglašeni. Meksičko istraživanje u koje je bilo uključeno 375 ispitanika, različitih vrednosti ITM, pokazalo je da preuhranjene i gojazne osobe nosioci GG genotipa imaju više vrednosti triglicerida u odnosu na nosioce GA i AA genotipa. U istoj studiji povezanost ovog polimorfizma sa vrednostima ukupnog, HDL i LDL holesterola nije zapažena (226). Podaci iz istraživanja Mirzaei i sar. ukazali su na više vrednosti ukupnog i LDL holesterola kod nosioca GG genotipa u odnosu na nosioce GA ili AA

genotipa, ali statistička značajnost za nivo triglicerida i HDL holesterola nije uočena, što je takođe vrlo slično rezultatima ove studije (240). Esterbauer i sar. su utvrdili da žene srednje životne dobi, a koje su heterozigoti za ovaj polimorfizam, imaju više vrednosti HDL holesterola u poređenju sa nosiocima AA genotipa (236). Takođe, niži nivoi HDL holesterola u plazmi zabeleženi su kod Kanađana francuskog porekla a koji su nosioci GG genotipa u odnosu na nosioce GA ili AA genotipa, bez obzira na starosnu dob, ITM i pol (241). Franks i sar. su u svojoj studiji koja je obuhvatila 691 ispitanika srednje životne dobi, ustanovila da osobe koje su nosioci alela A, imaju značajno smanjen nivo klirensa nestrifikovanih slobodnih masnih kiselina (225). Nasuprot ovim rezultatima, u studijama Fanelli i sar., 2005., Zhang i sar., 2007., Nikitin i sar., 2010., te Csép i sar., 2017 statistički značajna povezanost između rs8192678 genotipova i vrednosti lipidnih parametara nije zapažena (147,233,242,243).

Još jedan od ciljeva naše studije bio je da se ispita povezanost rs8192678 polimorfizma sa srednjim vrednostima glikemije kod adolescenata. Iako brojne studije dovode u vezu Gly482Ser polimorfizam sa rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2, rezultati naše studije nisu ukazali na statistički značajne razlike u vrednostima glikemije u odnosu na rs8192678 genotip ni u jednoj ispitivanoj grupi. Međutim, rezultati ispitivanja koja su sprovedena u dečijoj i adolescentnoj populaciji takođe ne ukazuju na vezu između ovog polimorfizma i srednjih vrednosti glikemije. U prilog tome govori studija Brito i sar., 2009 u kojoj je učestvovalo 1255 dece i 855 adolescenata uzrasta od 8-18 godina. Rezultati njihove studije su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u našem istraživanju, odnosno nije uočena asocijacija između rs8192678 polimorfizma i nivoa glikemije (224). Pored toga, Chang-Duk Ha i sar. u istraživanju sprovedenom u zdravoj populaciji dece u Koreji nisu pronašli vezu između srednjih vrednosti glikemije u odnosu na Gly482Ser genotip, kao ni Queiroz i sar., 2015 u studiji sprovedenoj u dečijoj populaciji Brazila (151,234). Međutim, kada su u pitanju ispitivanja sprovedena u populaciji odraslih ljudi, rezultati su oprečni. Na primer, studija koja je obuhvatila 12404 ispitanika u kojoj je analizirana povezanost 353 polimorfizma sa vrednostima glikemije, prijavila je asocijaciju alela A sa nižim vrednostima glukoze, ali kod ispitanika sa normalnim indeksom telesne mase. Osobe koje su imale prisutan A alel u genotipu, a čiji je ITM > 28 kgm⁻², imale su više vrednosti glukoze u krvi (244). S druge strane Vázquez-Del Mercado i sar. su uočili više vrednosti glukoze u krvi kod ispitanika sa normalnim vrednostima ITM, a koji su bili nosioci GA ili AA genotipa u odnosu na nosioce GG genotipa. Međutim, statistički značajne razlike u vrednostima glikemije u odnosu na genotip nisu uočene kod preuhranjenih i gojaznih ispitanika (226). Sličan rezultat objavili su Proença da Fonseca i sar. gde su više vrednosti glikemije zabeležene kod osoba nosioca A alela (238). Takođe, meta-analiza Xia i sar. koja je obuhvatila 20 studija u kojoj je učestvovalo 16182 ispitanika pokazala je asocijaciju alela A, posebno nosioca AA genotipa sa povećanim rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 naročito u populaciji kavkazoidnog i indijskog porekla (150). Iako brojne studije ukazuju na povezanost ovog polimorfizma sa vrednostima glikemije i dijabetesom tipa 2, postoje i rezultati israživanja sa suprotnim zaključcima. Shodno tome, u meta-analizi koja je obuhvatila 4486 ispitanika sa normalnim vrednostima glikemije, statistički značajna povezanost nije uočena između Gly482Ser polimorfizma i nivoa glikemije (245). Fanelli i saradici u istraživanju iz 2005. godine nisu uočili povezanost ovog polimorfizma sa vrednostima glikemije, ali su u istoj studiji došli do zaključka da gojazne osobe koje su nosioci GA ili AA genotipa imaju smanjenu senzitivnost na insulin u odnosu na nosioce GG genotipa (147). U još nekoliko studija objavljeni su podaci koji ne ukazuju na asocijaciju rs8192678 polimorfizma i srednjih vrednosti glikemije (223,230,232,233,246).

Iako postoje podaci koji ukazuju na razlike u metaboličkim parametrima u zavisnosti od pola, vrlo je malo dostupnih studija koje bi mogle da objasne ovu pojavu. Naime, skorija istraživanja sprovedena na jetri i mozgu miševa pokazala su da je ekspresija PGC-1 α proteina regulisana signalizacijom polnih hormona, na način da se PGC-1 α direktno vezuje za receptore polnih hormona, te poboljšava njihovu ekspresiju. Mozak ženki miševa sadrži niže nivoe markera hipotalamusne inflamacije, što se dovodi u vezu sa antiinflamatornim svojstvima PGC-1 α proteina (247). U prilog tome govori studija Vandenbeek i sar., iz 2018. godine koja je pokazala da estrogen kod ženki miševa utiče na povećanu ekspresiju PGC-1 α u hepatocitima, te na taj način ima posebno

povoljan uticaj na detoksikaciju od radikalskih čestica kiseonika kao i na zaštitu od nealkoholnog steatohepatitisa. Imajući u vidu značaj ovog proteina na protektivne efekte estogena u jetri, pokazano je da su ženke miševa podložnije gojaznosti koja je izazvana oksidativnim stresom ukoliko je smanjena aktivnost PGC-1 α proteina (228).

20. ANALIZA BDNF POLIMORFIZMA

BDNF, odnosno moždani faktor rasta pripada familiji neurotropina koje pored ovog proteina obuhvata još nervni faktor rasta (NGF), neurotrofin 3 (NT3) i neurotrofin 4/5 (NT4/5) (152). Pored već dobro poznate uloge BDNF-a u centralnom nervnom sistemu koja obuhvata diferencijaciju i preživljavanje neruona, izrastanje aksona i dendrita, te regulacije sinaptičke transmisije i plastičnosti, BDNF ima veoma važnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska, metabolizma glukoze i lipida, te homeostaze energije (167). BDNF se primarno eksprimira u centralnom nervnom sistemu, ali može proći kroz moždno-krvnu barijeru u oba smera, pa je njegovo prisutvo zabeleženo u mnogim drugim tkivima i organima (157,158). Kroz centralne mehanizme uključene u regulaciju apetita i potrošnju energije, BDNF suprimira unos hrane, pospešuje unos glukoze u mozak, te smanjuje stvaranje glukoze u jetri (157). Takođe, prekomerna ekspresija BDNF-a u hipotalamusu može indukovati transformaciju belog masnog tkiva u mrko posredstvom simpatičke inervacije (84,174).

U genu za BDNF do sada je opisano nekoliko polimorfizama od kojih je najviše ispitan polimorfizam rs6265 koji nastaje na 196-om nukleotidu substitucijom guanina (G) adeninom (A), te dovodi do zamene valina metioninom (Val66Met) na poziciji 66 (175,176). Val66Met polimorfizam narušava intracelularni transport i sekreciju BDNF-a, pa se dovodi u vezu sa niskim nivoom ovog proteina u plazmi. Studije na ljudima su pokazale asocijaciju BDNF-a sa kontrolom telesne mase, energetsom homeostazom, i dijabetesom tipa 2.(178,179). Naime, Krabbe i sar. su u svom istraživanju pokazali da gojazne osobe sa dijabetesom tipa 2 imaju nizak nivo cirkulušućeg BDNF-a, kao i povećan ITM kod dece i adolescenata (248). Međutim, kod ljudi sa dijabetesom tipa 2 nivo BDNF-a u plazmi je smanjen nezavisno od gojaznosti, što implicira da BDNF utiče na insulinsku rezistenciju i gojaznost kroz različite mehanizme. U studiji Lang i saradnika uočena je smanjena koncentracija BDNF-a u serumu kod zdravih ispitanika koji su imali GG genotip, u poređenju sa osobama koje su nosioci GA genotipa (249). Studije asocijacije BDNF rs6265 polimorfizma i indeksa telesne mase kod zdrave dece i adolescenta pokazuju kontradiktorne rezultate (181,250,251). Takođe, istraživanja povezanosti ovog polimorfizma sa nivoom glikemije i lipidnim statusom kod dece i adolescenata su još uvek retke (181).

Učestalost G i A alela se razlikuju u različitim populacijama sveta, što umnogome zavisi od porekla i etničke pripadnosti. Na primer, u pojedinim populacijama Afrike učestalost A (Met) alela varira od 0 do 1,5%, što je ujedino i najniža učestalost A alela u svetskoj populaciji, dok je učestalost A alela u Sjedinjenim Američkim Državama približno 15%. U tabeli 31 prikazane su prosečne učestalosti G i A alela u različitim populacijama sveta (201).

Tabela 31. Učestalost G/A alela rs6265 polimorfizma u različitim svetskim populacijama (201)

Populacija	Val (G)	Met (A)
Srbija- adolescenti	0,820	0,180
Evropske populacije	0,806	0,194
Amerika	0,850	0,150
Afrika	0,989	0,011
Azija	0,705	0,295

U našem istraživanju učestalost G alela je 82%, dok je učestalost A alela 18%, što je u saglasnosti sa ostalim objavljenim učestalostima u različitim evropskim populacijama. Takođe, učestalost GG genotipa u ovoj studiji iznosi 65,6%, GA 33,4%, dok je učestalost AA genotipa 1%.

Prethodna istraživanja koja su se bavila gojaznošću i metaboličkim sindromom kod dece i adolescenata pronašli su značajnu povezanost između Val/Met polimorfizma i navedenih karakteristika (250,252,253).

S obzirom da rezultati nekih studija ukazuju da BDNF ima pozitivan efekat na insulinsku rezistenciju, homeostazu glukoze, te da suprimira unos hrane (157,254), cilj naše studije je bio da se ispita povezanost rs6265 polimorfizma sa indeksom telesne mase, lipidnim statusom i nivoom glikemije kod adolescenata. Rezultati naše studije nisu ukazali na povezanost ovog polimorfizma sa ITM. Studija Friedel i saradnika koja je sprovedena u grupi adolescenata, a koji su bili nosioci Met varijante nije dokazala značajnu asocijaciju između analiziranog polimorfizma i gojaznosti (255). Takođe, istraživanje sprovedeno u Kini na dečijoj populaciji povezuje Val alel kao alel rizika za povećanje indeksa telesne mase i gojaznosti kod dece (256). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u istraživanju u grupi od 2131 deteta uzrasta 6-18 godina, koji ukazuju da nosioci Met alela imaju signifikantno niži indeks telesne mase (181). Još jedna studija sprovedena u populaciji zdravih Kavkazoida pokazala je da Met/Met genotip ima protektivan efekat u pogledu gojaznosti (178). S druge strane, postoje studije sa suprotnim rezultatima. Istraživanje koje je sprovedeno u Hrvatskoj u grupi zdrave dece i adolescenata pokazalo je da nosioci jednog ili oba Met alela imaju tendenciju ka povećanom indeksu telesne mase i sklonost ka gojaznosti (250). Nadalje, Meksička studija sprovedena u pedijatrijskoj populaciji dobila je rezultate koji ukazuju na značajnu asocijaciju između Met/Met genotipa i gojaznosti dece (251).

Kada je reč o lipidnom statusu adolescenata u našoj studiji, nismo dobili statistički značajnu povezanost između nivoa ukupnog, HDL, LDL holesterola, triglicerida i Val/Met polimorfizma. Takođe, studija Kalenda i sar. sprovedena u grupi dece i adolescenata nije prijavila statistički značajnu povezanost između ovog polimorfizma i lipidnih parametara (181). Međutim, u studiji Peng i sar. primećena je korelacija između Val66Met polimorfizma i lipidnog statusa kod satrijih osoba (60-90 godina), gde se Met alel dovodi u vezu povišenim vrednostima triglicerida, ali nižim vrednostima HDL holesterola (157).

Značajni rezultati dobijeni u ovom istraživanju ogledaju se u vrednostima nivoa glikemije u odnosu na genotip. Statistička analiza je pokazala da na ukupnom uzorku, odnosno kod normalno uhranjenih, prehranjenih i gojaznih ispitanika nosioci Val/Val genotipa imaju statistički više vrednosti glukoze u krvi u poređenju sa Val/Met ili Met/Met genotipovima. Takođe, u grupi ispitanika sa $ITM \leq 85$ uočeno je da nosioci Val/Val genotipa imaju više vrednosti glikemije, kako na ukupnom uzorku, tako i u grupi devojčica. Međutim, u grupi ispitanika čiji je $ITM > 85$, nije uočena statistička značajnost u pogledu ovog parametra, kako kod svih ispitanika, tako i u grupi dečaka i devojčica.

Rezultati Kalende i sar. pokazali su da nivo glikemije u krvi nije asociiran sa Val66Met genotipom, ali rezultati njihove studije ukazuju na niži postprandijalni nivo glukoze u krvi kod dece u postpubertetskom uzrastu koji su bili nosioci Met alela (181). Dosadašnje studije ukazale su na korelaciju nivoa BDNF-a sa koncentracijom glukoze (248). Osobe srednje životne dobi koje imaju normalnu telesnu težinu, redovne fizičke aktivnosti, koje nisu pušači, te nisu izložene stresu, a nosioci su Val/Met i Met/Met genotipova imaju znatno manje predispozicije za razvoj intolerancije na glukozu i dijabetesa tipa 2. (257). Pored toga, neke studije sprovedene na zdravim ispitanicima pronašle su vezu između Val/Val genotipa i nižih vrednosti BDNF-a u serumu (249,258), što bi moglo objasniti povezanost Val/Val genotipa i više vrednosti glukoze koje su uočene u našoj studiji. Međutim, druge studije nisu potvrdile ove rezultate. Nije pronađena korelacija Val66Met genotipa sa nivoom BDNF-a u plazmi ili serumu kod dece ili adolescenata (181,259,260). Ovi kontradiktroni rezultati u pogledu asocijacije Val66Met polimorfizma i perifernog nivoa BDNF-a mogli bi se objasniti kompleksnim mehanizmom regulacije nivoa BDNF-a, koji zavisi od brojnih faktora kao što je pol, starosna dob, hormonski status, način ishrane, fizička aktivnost, broj trombocita i mnogi drugi (181,261,262). S obzirom da su rezultati istraživanja još uvek kontradiktroni, bilo bi od izuzetne

važnosti sprovesti istraživanje na većem broju ispitanika, te uključiti i druge polimorfizme u okviru *BDNF* gena.

Ograničenja ove studije ogledaju se u nedostatku podataka o negenetičkim faktorima koji utiču na vrednosti ITM, glikemije i lipidnog profila adolescenata kao što su način života, prehrambene navike, fizička aktivnost ili korišćenje određenih lekova. Studije Bergier i sar. i Junger i saradnika su pokazale da su dečaci više fizički aktivni u odnosu na devojčice, dok devojčice iako u malom procentu ispunjavaju preporučene kriterijume za nivo fizičke aktivnosti imaju bolje nutritivne navike u odnosu na dečake (263,264).

Takođe, povezanost genotipova sa vrednostima glikemije i holesterola uočena je samo u populaciji zdravih adolescenata, gde dugoročni uticaj ove povezanosti na zdravlje još uvek nije sasvim jasan. Rezultati istraživanja koja su se bavila praćenjem promena u lipidnom statusu od perioda adolescencije pa sve do odraslog životnog doba ukazuju na važnost praćenja lipidnih parametara tokom perioda adolescencije kako bi se na vreme identifikovale osobe koje imaju visok rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (265,266). Međutim, još uvek nema dovoljan broj studija i podataka koje bi potkrepile značaj ranog praćenja lipidnih parametara kod dece i adolescenata (267).

Da bi se došlo do boljeg razumevanja povezanosti analiziranih polimorfizama sa lipidnim statusom adolescenata ili odraslih osoba, bilo bi od velikog značaja sprovesti studiju sa većim brojem ispitanika uzimajući u obzir i negenetičke faktore.

V ZAKLJUČCI

U ispitivanom uzorku od 308 adolescenata uzrasta 15 godina, oba pola, zaključili smo da postoji statistički značajna razlika u vrednostima analiziranih parametara u odnosu na pol. Pokazano je da su dečaci imali statistički više srednje vrednosti glikemije u odnosu na devojčice. Takođe, rezultati su pokazali da su devojčice imale više srednje vrednosti ukupnog holesterola kao i LDL holesterola u odnosu na dečake. Analizirajući rezultate u grupi normalno uhranjenih ispitanika došli smo do zaključka da su devojčice imale statistički više srednje vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na dečake. Kada su u pitanju preuhranjeni i gojazni adolescenti, rezultati su pokazali da su devojčice imale statistički značajno više srednje vrednosti HDL holesterola u odnosu na dečake.

Analiza *PRDM16* rs12409277 polimorfizma pokazala je:

- da je učestalost TT genotipa 82,3%, CT genotipa 17,3%, a CC genotipa 0,3%, a učestalost alela T 91%, dok je učestalost alela C 9%,
- da devojčice nosioci TT genotipa imaju statistički više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na devojčice nosioce CT+CC genotipa,
- da normalno uhranjeni adolescenti, nosioci TT genotipa, imaju više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na nosioce CT+CC genotipa.

Analiza *CtBP2* rs1561589 polimorfizma pokazala je:

- da je učestalost GG genotipa 43%, GA genotipa 43,3%, a AA genotipa 43,3%, a učestalost alela G 65%, dok je učestalost alela A 35%,
- da preuhranjene i gojazne devojčice nosioci GA ili AA genotipa imaju statistički značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na devojčice nosioce GG genotipa.

Analiza udruženih genotipova *PRDM16* rs12409277 i *CtBP2* rs1561589 polimorfizama pokazala je:

- da nosioci TC i GG genotipa imaju statistički značajno niže vrednosti ukupnog holesterola, kao i LDL holesterola u poređenju sa svim drugim grupama genotipova ova dva polimorfizma.

Analiza *PPARG* rs3856806 polimorfizma pokazala je:

- da je učestalost CC genotipa 81,2%, CT genotipa 18,1%, a TT genotipa 0,7%, a učestalost alela C 90,1%, dok je učestalost alela T 9,9%,
- da devojčice nosioci CC genotipa imaju statistički više vrednosti glikemije u odnosu na devojčice nosioce CT ili TT genotipa.

Analiza *PPARGCA1* rs8192678 polimorfizma pokazala je:

- da je učestalost GG genotipa 42,4%, GA genotipa 48,8%, a AA genotipa 8,8%, a učestalost alela G 65,1%, dok je učestalost alela A 34,9%,
- da dečaci nosioci GG genotipa imaju statistički značajno više vrednosti ukupnog holesterola u odnosu na nosioce GA ili AA genotipa,
- da preuhranjeni i gojazni adolescenti nosioci GG genotipa imaju statistički značajno više vrednosti ukupnog i LDL holesterola u odnosu na nosioce GA ili AA genotipa.

Analiza *BDNF* r26265 polimorfizma pokazala je:

- da je na ukupnom uzorku učestalost GG genotipa 65,6%, GA genotipa 33,4%, a AA genotipa 1%, a učestalost alela G 82%, dok je učestalost alela A 18%,
- da nosioci GG genotipa imaju statistički više vrednosti glikemije u odnosu na nosioce GA ili AA genotipa.

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da polimorfizmi u genima čiji proteinski produkti imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije i aktivnosti mrkog masnog tkiva mogu uticati na nivo glukoze i lipidni status adolescenata.

Ovakvi rezultati doprinose rasvetljavanju funkcije mrkog masnog tkiva kod adolescenata, te pomažu u otkrivanju potencijalnih ciljnih molekula u terapiji poremećaja metabolizma glukoze ili lipida. Takođe, mogu usmeriti dalja istraživanja u pravcu ispitivanja većeg broja polimorfizama u ispitivanim genima kao i ispitivanja polimorfizama u drugim genima važnim za metabolizam mrkog masnog tkiva kako kod adolescenata tako i u adultnoj populaciji.

VI LITERATURA

1. Zanquetta MM, Corrêa-Giannella ML, Monteiro MB, Villares SMF. Body weight, metabolism, and clock genes. *Sleep, Circadian Rhythm Metab Rhythm Life*. 2014;53–73.
2. Venkatesan R, Mohan V. Obesity – Are we continuing to play the genetic “blame game”? *Adv Genomics Genet*. 2016;6:11–23.
3. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Al E. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009;88(9).
4. Vucenik I SJ. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;(1271):37–43.
5. Zdravković D, Baničević M, Bogdanović R, Crnčević N, Radlović N. Prevencija i lečenje gojaznosti kod dece i adolescenata u Srbiji. Institut za štitastu žlezdu i metabolizam, Zlatibor, Udruženje pedijataru Srbije 2007;4-13.
6. Schuna JM, Peterson CM, Thomas DM, Heo M, Hong S, Choi W, et al. Scaling of adult regional body mass and body composition as a whole to height: Relevance to body shape and body mass index. *Am J Hum Biol*. 2015;27(3):372–9.
7. Gandhi PK, Revicki DA, Huang IC. Adolescent body weight and health-related quality of life rated by adolescents and parents: The issue of measurement bias Energy balance-related behaviors. *BMC Public Health*. 2015;15(1):1–10.
8. Huang C, Freter C. Lipid Metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2015;16:924–49.
9. Landeka I, Teparić R, Perica T, Đikić D, Rogić D. Effects of Dietary Lipids on Lipoprotein Profile. *Croat J Food Technol Biotechnol Nutr*. 2010;5(3–4):114–26.
10. Majkic-Singh N, Ilic M, Jankovic O, Ignjatovic S, Obradovic I. Trendovi u nalazima lipidnih frakcija u JUSAD studiji. In: Nedeljkovic S, Simeunovic S, Vukotic M, editors. Jugoslovenska studija prekursora ateroskleroze kod skolske dece. Belgrade: Faculty of Medicine, Belgrade University; 2006. p. 529.
11. Wang H, Eckel R. What are lipoproteins doing in the brain? *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(1):8–14.
12. Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:1–15.
13. Suchacki KJ, Cawthorn WP, Rosen CJ. Bone marrow adipose tissue: Formation, function and regulation. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;28:50–6.
14. Cascio G, Schiera G, Di Liegro I. Dietary Fatty Acids in Metabolic Syndrome, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Curr Diabetes Rev*. 2012;8(1):2–17.
15. Liangyou Rui. Brown and Beige Adipose Tissues in Health and. *Compr Physiol*. 2018;7(4):1281–306.
16. Wang H, Leng Y, Gong Y. Bone Marrow Fat and Hematopoiesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:1–9.
17. Li Q, Wu Y, Kang N. Marrow adipose tissue: Its origin, function, and regulation in bone remodeling and regeneration. *Stem Cells Int*. 2018;110:134–40.
18. Bukowska J, Frazier T, Smith S, Brown T. Bone Marrow Adipocyte Developmental Origin and Biology. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(3):312–9.
19. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):157–71.
20. Saito M. Human brown adipose tissue: Regulation and anti-obesity potential. *Endocr J*. 2014;61(5):409–16.
21. Šerban N. Čelija-strukture i oblici. Beograd. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2005. 1–40 p.
22. Montague C, Prins J, Sanders L, Digby J, Rahilly S. “Depot- and sex-specific differences in

- human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution.” *Diabetes*. 1997;46(3):342–7.
23. Ross M, Pawlina W. *Histology: A text and atlas:with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2011.
 24. Mattson M. “Perspective: does brown fat protect against diseases of aging?” *Ageing Res Rev*. 2010;9(1):69–76.
 25. Fitzgerald S, Janorkar A, Barnes A, Maranon R. A new approach to study the sex differences in adipose tissue. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):89.
 26. Kajimura S, Seale P. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab*. 2010;11(4):257–62.
 27. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263–73.
 28. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104:4401–6.
 29. Pervin S, Singh V, Tucker A, Collazo J, Singh R. Modulation of transforming growth factor- β /follistatin signaling and white adipose browning: Therapeutic implications for obesity related disorders. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2017;31(2):20170036.
 30. Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685–95.
 31. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman B. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14:1293–307.
 32. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev*. 1994;8:1654–63.
 33. Smorlesi A, Frontini A, Giordano A, Cinti S. The adipose organ: white brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev*. 2012;13(2):83–96.
 34. Vegiopoulos A, Rohm M, Herzig S. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J*. 2017;36(14):1999–2017.
 35. Lee YH, Mottillo EP, Granneman JG. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2014;1842(3):358–69.
 36. Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*. 2009;48:275–97.
 37. Khor V, Shen W, Kraemer F. Lipid droplet metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16:632–7.
 38. Bjorbaek C, Kahn B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:305–31.
 39. Chen H, Charlat O, Tartaglia L, Woolf E, Weng X, Ellis S. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptors: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996;84:491–5.
 40. Scott MM, Williams K V, Rossi J, Lee CE, Elmquist JK. Leptin receptor expression in hindbrain Glp-1 neurons regulates food intake and energy balance in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2413–21.
 41. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med*. 2010;152:93–100.
 42. Paniagua JA. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes*. 2016;7(19):483.
 43. Wang Y, Wang XH, Li RX. Interaction between peroxisome proliferator- Activated receptor gamma polymorphism and overweight on diabetic retinopathy in a Chinese case-control study. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(11):21647–52.
 44. Feingold KR, Grunfeld C. Tumor necrosis factor- α stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J Clin Invest*. 1987;80:184–90.
 45. Ruan H, Hacohen N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumornecrosis factor-alpha

- suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes*. 2002;51:1319–36.
46. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 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*. 2004;145(5):2273–82.
 47. Christou GA, Kiortsis DN. Adiponectin and lipoprotein metabolism. *Obes Rev*. 2013;14:939–49.
 48. Mertens I, van Gaal LF. Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obese Rev*. 2002;3:80–101.
 49. Achari AE, Jain SK. L-cysteine supplementation increases adiponectin synthesis and secretion, and GLUT4 and glucose utilization by upregulating disulfide bond A-like protein expression mediated by MCP-1 inhibition in 3T3-L1 adipocytes exposed to high glucose. *Mol Cell Biochem*. 2016;414:105–13.
 50. Heindel JJ, Blumberg B, Cave M, Machtiger R, Mantovani A, Mendez MA, et al. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod Toxicol*. 2017;68:3–33.
 51. Lowell BB, Susulic VS, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen BB, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*. 1993;366(6457):740–2.
 52. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocyte. *J Biol Chem*. 2010;285:7153–7164.
 53. Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(11):691–702.
 54. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009;58(7):1526–31.
 55. Markelić M. Molekulski mehanizmi strukturnog remodeliranja mrkog masnog tkiva pacova indukovano insulinom. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2012.
 56. Gilsanz V, Smith ML, Goodarjian F, Kim M, Wren T, Hu HH. Changes in brown adipose tissue in boys and girls during childhood and puberty. *J Pediatr*. 2012;160:604–9.
 57. Veličković K. Transkripciona regulacija razvoja i hiperplazije mrkog masnog tkiva. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2012.
 58. Symonds ME. Brown Adipose Tissue Growth and Development. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:1–14.
 59. Inokuma KI, Ogura-Okamatsu Y, Toda C, Kimura K, Yamashita H, Saito M. Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes*. 2005;54(5):1385–91.
 60. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Front Endocrinol*. 2012;85(2).
 61. Géloën A, Collet AJ, Guay G, Bukowiecki LJ. In vivo differentiation of brown adipocytes in adult mice: An electron microscopic study. *Am J Anat*. 1990;188(4):366–72.
 62. Billon N, Monteiro MC, Dani C. Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. *Biol Cell*. 2008;100(10):563–75.
 63. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPβ and/or C/EBPδ gene. *EMBO J*. 1997;16(24):7432–43.
 64. Barquissau V, Beuzelin D, Pisani DF, Beranger GE, Mairal A, Montagner A, et al. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab*. 2016;5(5):352–65.

65. Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, et al. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem*. 2011;286(15):12983–90.
66. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab*. 2007;6(1):38–54.
67. Chi J, Cohen P. The multifaceted roles of PRDM16: Adipose biology and beyond. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(1):11–23.
68. Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, et al. Role of krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280(13):12867–75.
69. Shao M, Ishibashi J, Kusminski CM, Wang QA, Hepler C, Vishvanath L, et al. Zfp423 Maintains White Adipocyte Identity through Suppression of the Beige Cell Thermogenic Gene Program. *Cell Metab*. 2016;23(6):1167–84.
70. Rajakumari S, Wu J, Ishibashi J, Lim HW, Giang AH, Won KJ, et al. EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell Metab*. 2013;17(4):562–74.
71. Sambeat A, Gulyaeva O, Dempersmier J, Tharp KM, Stahl A, Paul SM, et al. LSD1 Interacts with Zfp516 to Promote UCP1 Transcription and Brown Fat Program. *Cell Rep*. 2016;15(11):2536–49.
72. Dempersmier J, Sambeat A, Gulyaeva O, Paul SM, Hudak CSS, Raposo HF, et al. Cold-inducible Zfp516 activates UCP1 transcription to promote browning of white fat and development of brown fat. *Mol Cell*. 2015;57(2):235–46.
73. Nikanorova AA, Barashkov AN, Nakhodkin SS, Pshennikova GV, Solovyev, V. A, Romanov, P. G, et al. The Role of Leptin Levels in Adaptation to Cold Climates. *Int J Environ Res Public Heal — Open Access J*. 2020;17(6):1–13.
74. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011;17:200–5.
75. Lee J, Ellis JM, Wolfgang MJ. Adipose fatty acid oxidation is required for thermogenesis and potentiates oxidative stress-induced inflammation. *Cell Rep*. 2015;10(2):266–79.
76. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829–39.
77. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:607–15.
78. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463–8.
79. Zhang Y, Li R, Meng Y, Li S, Donelan W, Zhao Y, et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes*. 2014;63(2):514–25.
80. Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*. 2014;157(6):1279–91.
81. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, et al. Thyroid hormone–sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform–specific. *J Clin Invest*. 2001;108(1):97–105.
82. Montanari T, Pošćić N, Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Physiology*. 2017;18(5):495–513.
83. Harms M, Seale P, Hildebrand S, Stümer J, Pfeifer A, Butz AM, et al. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19:1252–63.
84. Schulz TJ, Tseng YH. Systemic control of brown fat thermogenesis: Integration of peripheral and central signals. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1302(1):35–41.
85. Carpentier AC, Blondin DP, Virtanen KA, Richard D, Haman F, Turcotte ÉE. Brown adipose

- tissue energy metabolism in humans. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:1–21.
86. Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, et al. AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Mol Cell*. 2013;49(6):1167–75.
 87. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. *Cell Metab*. 2009;9(2):203–9.
 88. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3404–8.
 89. Popović Đ. Značaj adiponektina u proceni kardiometaboličkog profila i rizika za razvoj tipa 2 šećerne bolesti kod gojaznih osoba. Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; 2016.
 90. Gunawardana SC, Piston DW. Insulin-independent reversal of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice with brown adipose tissue transplant. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2015;308(12):E1043–55.
 91. Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2013;305(5):567–72.
 92. Tonello C, Giordano A, Cozzi V, Cinti S, Stock MJ, Carruba MO, et al. Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Lett*. 1999;442(2–3):167–72.
 93. De Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*. 2001;108(9):1379–85.
 94. Hildebrand S, Stümer J, Pfeifer A. PVAT and its relation to brown, beige, and white adipose tissue in development and function. *Front Physiol*. 2018;9(70):1–10.
 95. Chen Y, Pan R, Pfeifer A. Fat tissues, the brite and the dark sides. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2016;468:1803–1807.
 96. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Penicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: Molecular and morphological characterization. *J Cell Sci*. 1992;103(4):931–42.
 97. Kim SH, Plutzky J. Brown fat and browning for the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Diabetes Metab J*. 2016;40:12–21.
 98. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res*. 2012;53(4):619–629.
 99. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2010;298(6):E1244–53.
 100. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366–76.
 101. Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, Heglind M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med*. 2013;19(5):631–4.
 102. Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dugaard S, Homøe P, Loft A, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab*. 2013;17(5):798–805.
 103. Cao L, Choi EY, Liu X, Martin A, Wang C, Xu X, et al. White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metab*. 2011;14(3):324–38.
 104. Teama S. DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. In: *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. InTech; 2018.
 105. Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, Tanaka H, Taniwaki M, Yokota J, et al. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVII gene and is

- transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*. 2000;96(9):3209–14.
106. Nishikata I, Nakahata S, Saito Y, Kaneda K, Ichihara E, Yamakawa N, et al. Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene*. 2011;30(40):4194–207.
 107. Fog CK, Galli GG, Lund AH. PRDM proteins: important players in differentiation and disease. *BioEssays*. 2012;34(1):50–60.
 108. Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell*. 2014;156(1–2):304–16.
 109. Hohenauer T, Moore AW. The Prdm family: Expanding roles in stem cells and development. *Dev*. 2012;139(13):2267–82.
 110. Ishibashi J, Seale P. Functions of Prdm16 in thermogenic fat cells. *Temperature*. 2015;2(1):65–72.
 111. Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni J V., Gygi SP, et al. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- β transcriptional complex. *Nature*. 2009;460(7259):1154–8.
 112. Seale P. Transcriptional regulatory circuits controlling brown fat development and activation. *Diabetes*. 2015;64(7):2369–75.
 113. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1–2):20–44.
 114. Feng B, Zhang T, Xu H. Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281(1):160–77.
 115. Urano T, Shiraki M, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S. Large-scale analysis reveals a functional single-nucleotide polymorphism in the 5'-flanking region of PRDM16 gene associated with lean body mass. *Aging Cell*. 2014;13(4):739–43.
 116. Yue H, He JW, Ke YH, Zhang H, Wang C, Hu WW, et al. Association of single nucleotide polymorphism Rs2236518 in PRDM16 gene with BMI in Chinese males. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(5):710–6.
 117. AlAmrani A, AbdelKarim M, AlZoghaibi M. PRDM16 Gene Polymorphism Is Associated with Obesity and Blood Lipids Profiles in Saudi Population. *J Clin Med*. 2018;7(6):141.
 118. Park Y-M, Province MA, Gao X, Feitosa M, Wu J, Ma D, et al. Longitudinal trends in the association of metabolic syndrome with 550 k single-nucleotide polymorphisms in the Framingham Heart Study. *BMC Proc*. 2009;3(Suppl 7):S116.
 119. Chinnadurai G. CtBP family proteins: More than transcriptional corepressors. *BioEssays*. 2003;25(1):9–12.
 120. Bergman LM, Morris L, Darley M, Mirnezami AH, Gunatilake SC, Blaydes JP. Role of the unique N-terminal domain of CtBP2 in determining the subcellular localisation of CtBP family proteins. *BMC Cell Biol*. 2006;7(35):1–10.
 121. Stankiewicz TR, Gray JJ, Winter AN, Linseman DA. C-terminal binding proteins: Central players in development and disease. *Biomol Concepts*. 2014;5(6):489–511.
 122. Kuppuswamy M, Vijayalingam S, Zhao L-J, Zhou Y, Subramanian T, Ryerse J, et al. Role of the PLDLS-Binding Cleft Region of CtBP1 in Recruitment of Core and Auxiliary Components of the Corepressor Complex. *Mol Cell Biol*. 2008;28(1):269–81.
 123. Zhao LJ, Subramanian T, Zhou Y, Chinnadurai G. Acetylation by p300 regulates nuclear localization and function of the transcriptional corepressor CtBP2. *J Biol Chem*. 2006;281(17):4183–9.
 124. Chinnadurai G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(9):1593–607.
 125. Kajimura S, Seale P, Tomaru T, Erdjument-Bromage H, Cooper MP, Ruas JL, et al. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*. 2008;22(10):1397–409.

126. Zhang C, Gao C, Xu Y, Zhang Z. CtBP2 could promote prostate cancer cell proliferation through c-Myc signaling. *Gene*. 2014;546(1):73–9.
127. Hinney A, Kesselmeier M, Jall S, Volckmar AL, Föcker M, Antel J, et al. Evidence for three genetic loci involved in both anorexia nervosa risk and variation of body mass index. *Mol Psychiatry*. 2017;22(2):192–201.
128. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355–61.
129. Skogsberg J, Kannisto K, Roshani L, Gagne E, Hamsten A, Larsson C, et al. Characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor delta gene and its expression. *Int J Mol Med*. 2000;6(1):73–81.
130. Minge CE, Robker RL, Norman RJ. PPAR gamma: Coordinating metabolic and immune contributions to female fertility. *PPAR Res*. 2008;2008:243791.
131. Han SW. Anticancer actions of PPAR γ ligands: Current state and future perspectives in human lung cancer. *World J Biol Chem*. 2010;1(3):31.
132. Platt C, Coward RJ. Peroxisome proliferator activating receptor- γ and the podocyte. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(3):423–33.
133. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5):557–66.
134. Rocha RM, Barra GB, Rosa ÉCCC, Garcia ÉC, Amato AA, Azevedo MF. Prevalence of the rs1801282 single nucleotide polymorphism of the PPAR γ gene in patients with metabolic syndrome. *Arch Endocrinol Metab*. 2015;59(4):297–302.
135. Tyagi S, Gupta P, Saini A, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236–240.
136. Corrales P, Vidal-Puig A, Medina-Gómez G. PPARs and metabolic disorders associated with challenged adipose tissue plasticity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2124.
137. Villanueva CJ, Vergnes L, Wang J, Drew BG, Hong C, Tu Y, et al. Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPAR γ specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab*. 2013;17(3):423–35.
138. Gray SL, Dalla Nora E, Grosse J, Manieri M, Stoeger T, Medina-Gomez G, et al. Leptin deficiency unmasks the deleterious effects of impaired peroxisome proliferator-activated receptor γ function (P465L PPAR γ) in mice. *Diabetes*. 2006;55(10):2669–77.
139. Pap A, Cuaranta-Monroy I, Peloquin M, Nagy L. Is the mouse a good model of human PPAR γ -related metabolic diseases? *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1–22.
140. Kim HJ, Lee SY, Kim CM. Association between gene polymorphisms and obesity and physical fitness in Korean children. *Biol Sport*. 2018;35(1):21–7.
141. Tan LJ, Zhu H, He H, Wu KH, Li J, Chen XD, et al. Replication of 6 obesity genes in a meta-analysis of genome-wide association studies from diverse ancestries. *PLoS One*. 2014;9(5):e96149.
142. Esterbauer H, Oberkofler H, Krempler F, Patsch W. Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*. 1999;62(1):98–102.
143. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005;1(6):361–70.
144. Guan HP, Ishizuka T, Chui PC, Lehrke M, Lazar MA. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPAR γ in adipocytes. *Genes Dev*. 2005;19(4):453–61.
145. Wu HH, Liu NJ, Yang Z, Tao XM, Du YP, Wang XC, et al. Association and interaction analysis of PPARGC1A and serum uric acid on type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):107.
146. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*. 2006;3(5):333–41.

147. Fanelli M, Filippi E, Sentinelli F, Romeo S, Fallarino M, Buzzetti R, et al. The Gly482Ser missense mutation of the Peroxisome Proliferator - Activated receptor γ coactivator - 1 α (PGC - 1 α) gene associates with reduced insulin sensitivity in normal and glucose-intolerant obese subjects. *Dis Markers*. 2005;21(4):175–80.
148. Rowe GC, Arany Z. Genetic models of PGC-1 and glucose metabolism and homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(1):21–9.
149. Myles S, Lea RA, Ohashi J, Chambers GK, Weiss JG, Hardouin E, et al. Testing the thrifty gene hypothesis: The Gly482Ser variant in PPARGC1A is associated with BMI in Tongans. *BMC Med Genet*. 2011;12(1):1–10.
150. Xia W, Chen N, Peng W, Jia X, Yu Y, Wu X, et al. Systematic Meta-analysis Revealed an Association of PGC-1 α rs8192678 Polymorphism in Type 2 Diabetes Mellitus. *Dis Markers*. 2019;(5):1–10.
151. Queiroz EM, Cândido APC, Castro IM, Bastos AQA, Machado-Coelho GLL, Freitas RN. IGF2, LEPR, POMC, PPARG, and PPARGC1 gene variants are associated with obesity-related risk phenotypes in Brazilian children and adolescents. *Brazilian J Med Biol Res*. 2015;48(7):595–602.
152. Rosas-Vargas H, Martínez-Ezquerro JD, Bienvenu T. Brain-Derived Neurotrophic Factor, Food Intake Regulation, and Obesity. *Arch Med Res*. 2011;42(6):482–94.
153. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007;85(3):525–35.
154. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 2010;3(1):1–14.
155. Cattaneo A, Cattane N, Begni V, Pariante CM, Riva MA. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. *Transl Psychiatry*. 2016;6(11):e958.
156. Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2012;4(4):188–200.
157. Peng JH, Liu CW, Pan SL, Wu HY, Liang QH, Gan RJ, et al. Potential unfavorable impacts of BDNF Val66Met polymorphisms on metabolic risks in average population in a longevous area. *BMC Geriatr*. 2017;17(1):1–12.
158. Golden E, Emiliano A, Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, Egan JM, et al. Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: Data from the baltimore longitudinal study of aging. *PLoS One*. 2010;5(4).
159. Pruunsild P, Kazantseval A, Aid T, Palm K, Timmusk T. Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics*. 2007;90(3):397–406.
160. Leßmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neurosci Res*. 2009;65(1):11–22.
161. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, et al. Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12660–6.
162. Yang B, Ren Q, Zhang JC, Chen QX, Hashimoto K. Altered expression of BDNF, BDNF propeptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: Rethinking the brain-liver axis. *Transl Psychiatry*. 2017;17(5):e1128.
163. Dean C, Liu H, Staudt T, Stahlberg MA, Vingill S, Bückers J, et al. Distinct subsets of syt-IV/BDNF vesicles are sorted to axons versus dendrites and recruited to synapses by activity. *J Neurosci*. 2012;32(16):5398–413.
164. Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(2):89–98.
165. Maksimović N. Analiza polimorfizama gena za APOE, BDNF, BCHE i KIBRA i njihova korelacija sa memorijskim sposobnostima u populaciji studenata. Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2014.

166. Shimada H, Makizako H, Doi T, Yoshida D, Tsutsumimoto K, Anan Y, et al. A large, cross-sectional observational study of serum BDNF, cognitive function, and mild cognitive impairment in the elderly. *Front Aging Neurosci.* 2014;6(69):1–9.
167. Boyuk B, Degirmencioglu S, Atalay H, Guzel S, Acar A, Celebi A, et al. Relationship between levels of brain-derived neurotrophic factor and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2014;2014:978143.
168. Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Mattson MP. Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology.* 2003;144(6):2446–53.
169. Rios M, Guoping FAN, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, et al. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol.* 2001;15(10):1748–57.
170. Tsuchida A, Nonomura T, Nakagawa T, Itakura Y, Ono-Kishino M, Yamanaka M, et al. Brain-derived neurotrophic factor ameliorates lipid metabolism in diabetic mice. *Diabetes, Obes Metab.* 2002;4(4):262–9.
171. Tsuchida A, Nakagawa T, Itakura Y, Ichihara J, Ogawa W, Kasuga M, et al. The effects of brain-derived neurotrophic factor on insulin signal transduction in the liver of diabetic mice. *Diabetologia.* 2001;44(5):555–66.
172. Yamanaka M, Itakura Y, Inoue T, Tsuchida A, Nakagawa T, Noguchi H, et al. Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on pancreatic islets in obese diabetic mice. *Metabolism.* 2006;55(10):1286–92.
173. Wang CF, Bomberg E, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Res.* 2010;1336:66–77.
174. Sornelli F, Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. Adipose tissue-derived nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Results from experimental stress and diabetes. *Gen Physiol Biophys.* 2009;28(Spec No):179–83.
175. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF Val66Met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell.* 2003;112(2):257–69.
176. Chen ZY, Patel PD, Sant G, Meng CX, Teng KK, Hempstead BL, et al. Variant Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Met66) Alters the Intracellular Trafficking and Activity-Dependent Secretion of Wild-Type BDNF in Neurosecretory Cells and Cortical Neurons. *J Neurosci.* 2004;24(18):4401–11.
177. Akkermann K, Hiio K, Villa I, Harro J. Food restriction leads to binge eating dependent upon the effect of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism. *Psychiatry Res.* 2011;185(1–2):39–43.
178. Sustar A, Nikolac Perkovic M, Nedic Erjavec G, Svob Strac D, Pivac N. A protective effect of the BDNF Met/Met genotype in obesity in healthy Caucasian subjects but not in patients with coronary heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20:3417–26.
179. Wang Y, Zhang H, Li Y, Wang Z, Fan Q, Yu S, et al. BDNF Val66Met polymorphism and plasma levels in Chinese Han population with obsessive-compulsive disorder and generalized anxiety disorder. *J Affect Disord.* 2015;(186):7–12.
180. Gratacòs M, González JR, Mercader JM, de Cid R, Urretavizcaya M, Estivill X. Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met and Psychiatric Disorders: Meta-Analysis of Case-Control Studies Confirm Association to Substance-Related Disorders, Eating Disorders, and Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2007;61(7):911–22.
181. Kalenda A, Landgraf K, Löffler D, Kovacs P, Kiess W, Körner A. The BDNF Val66Met polymorphism is associated with lower BMI, lower postprandial glucose levels and elevated carbohydrate intake in children and adolescents. *Pediatr Obes.* 2018;13(3):159–67.
182. Mou Z, Hyde TM, Lipska BK, Martinowich K, Wei P, Ong CJ, et al. Human Obesity Associated with an Intronic SNP in the Brain-Derived Neurotrophic Factor Locus. *Cell Rep.*

- 2015;13(6):1073–80.
183. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
 184. Yuan CC, Peterson RJ, Wang CD, Goodsaid F, Waters DJ. 5' Nuclease assays for the loci CCR5-+/Delta32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A related to pathogenesis of AIDS. *Clin Chem.* 2000;46(1):24–30.
 185. Turnpenny P, Ellard S. Emery's elements of medical genetics. 13th ed. Churchill Livingstone: Elsevier; 2007.
 186. Vlajković V, Macanović G, Arsić J, Jocić I, Milovanović D, Arsić D. Gojaznost kod školske dece kao faktor rizika po zdravlje. *PONS Med Č.* 2015;12(1):9–14.
 187. Rojnić Putarek N. Pretilost u dječjoj dobi. *Medicus.* 2018;27(1):63–9.
 188. New global estimates of child and adolescent obesity released on World Obesity Day [Internet]. Commission on Ending Childhood Obesity. 2017. Available from: <https://www.who.int/end-childhood-obesity/news/new-estimate-child-adolescent-obesity/en/>
 189. Garcia CA, Van Nostrand D, Atkins F, Acio E, Butler C, Esposito G, et al. Reduction of brown fat 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose uptake by controlling environmental temperature prior to positron emission tomography scan. *Mol Imaging Biol.* 2006;8(1):24–9.
 190. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e49452.
 191. Hioki C, Yoshida T, Kogure A, Takakura Y, Umekawa T, Yoshioka K, et al. Effects of growth hormone (GH) on mRNA levels of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in brown and white adipose tissues and skeletal muscle in obese mice. *Horm Metab Res.* 2004;36(9):607–13.
 192. Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Frontera M, Gianotti M, Proenza AM, Roca P. Sex steroid receptor expression profile in brown adipose tissue. Effects of hormonal status. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(6):877–86.
 193. Gilsanz V, Hu HH, Kajimura S. Relevance of brown adipose tissue in infancy and adolescence. *Pediatric research* 2013; 73:3-9.
 194. Rockstroh D, Landgraf K, Wagner IV, Gesing J, Tauscher R, Lakowa N, et al. Direct evidence of brown adipocytes in different fat depots in children. *PLoS One.* 2015;10(2):1–17.
 195. Matsushita M, Yoneshiro T, Aita S, Kameya T, Sugie H, Saito M. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes.* 2014;38(6):812–7.
 196. Ozguven S, Ones T, Yilmaz Y, Turoglu HT, Imeryuz N. The role of active brown adipose tissue in human metabolism. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2016;43(2):355–61.
 197. Chondronikola M, Volpi E, Børshiem E, Porter C, Saraf MK, Annamalai P, et al. Brown Adipose Tissue Activation Is Linked to Distinct Systemic Effects on Lipid Metabolism in Humans. *Cell Metab.* 2016;23(6):1200–6.
 198. Arandelović D, Marjanović B, Bokonjić J, Grujić-Ilić G. Uticaj fizičke aktivnosti na profil lipida seruma i glikemije i rizik za razvoj ateroskleroze u adolescenata. *Sport Med.* 2004;4(1):4–11.
 199. Burt Solorzano CM, McCartney CR. Obesity and the pubertal transition in girls and boys. *Reproduction.* 2010;140(3):399–410.
 200. Bandesh K, Jha P, Giri AK, Marwaha RK, Scaria V, Tandon N, et al. Normative range of blood biochemical parameters in urban Indian school-going adolescents. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213255.
 201. The allele frequency database. resource of gene frequency data on human populations supported by the U. S. National Science Foundation. U. S. National Science Foundation.
 202. Bradfield JP, Taal HR, Timpson NJ, Scherag A, Lecoeur C, Warrington NM, et al. A genome-wide association meta-analysis identifies new childhood obesity loci. *Nat Genet.* 2012;44(5):526–31.
 203. Stumvoll M, Häring H. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes.* 2002;51(8):2341–7.

204. Doney A, Fischer B, Frew D, Cumming A, Flavell DM, World M, et al. Haplotype analysis of the PPAR γ Prol 12Ala and C1431T variants reveals opposing associations with body weight. *BMC Genet.* 2002;3(21):1–8.
205. Dujic T, Bego T, Mlinar B, Semiz S, Malenica M, Prnjavorac B, et al. Effects of the PPARG gene polymorphisms on markers of obesity and the metabolic syndrome in Bosnian subjects. *J Med Biochem.* 2014;33(4):323–32.
206. Aguilera CM, Olza J, Gil Á. Genetic susceptibility to obesity and metabolic syndrome in childhood. *Nutr Hosp.* 2013;28(5):44–55.
207. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, et al. Contribution of Common Genetic Variants to Obesity and Obesity-Related Traits in Mexican Children and Adults. *PLoS One.* 2013;8(8):e70640.
208. Luo W, Guo Z, Wu M, Hao C, Hu X, Zhou Z, et al. Association of peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha/\delta/\gamma$ with obesity, and gene-gene interaction, in the chinese han population. *J Epidemiol.* 2013;23(3):187–94.
209. Parra EJ, Hoggart CJ, Bonilla C, Dios S, Norris JM, Marshall JA, et al. Relation of type 2 diabetes to individual admixture and candidate gene polymorphisms in the Hispanic American population of San Luis Valley, Colorado. *J Med Genet.* 2004;41(11):e116.
210. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamäki J, Rissanen A, Deeb SS, et al. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3708–12.
211. Tai ES, Corella D, Deurenberg-Yap M, Adiconis X, Chew SK, Tan CE, et al. Differential effects of the C1431T and Pro12Ala PPAR γ gene variants on plasma lipids and diabetes risk in an Asian population. *J Lipid Res.* 2004;45(4):674–85.
212. Zhou X, Chen J, Xu W. Association between C1431T polymorphism in peroxisome proliferator- activated receptor- γ gene and coronary artery disease in Chinese Han population. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):1863–8.
213. Dongxia L, Qi H, Lisong L, Jincheng G. Association of peroxisome proliferator-activated receptor γ gene Pro12Ala and C161T polymorphisms with metabolic syndrome. *Circ J.* 2008;72(4):551–7.
214. Butt H, Shabana, Hasnain S. The C1431T polymorphism of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) is associated with low risk of diabetes in a Pakistani cohort. *Diabetol Metab Syndr.* 2016;8(1):4–9.
215. We WM, Wu XY, Li ST, Shen Q. PPARG gene C161T CT/TT associated with lower blood lipid levels and ischemic stroke from large-artery atherosclerosis in a Han population in Guangdong. *Neurol Res.* 2016;38(7):620–4.
216. Gu SJ, Guo ZR, Zhou ZY, Hu XS, Wu M. PPAR α and PPAR γ Polymorphisms as risk factors for Dyslipidemia in a Chinese han population. *Lipids Health Dis.* 2014;13(1):1–8.
217. Yilmaz-Aydogan H, Kurnaz O, Kurt O, Akadam-Teker B, Kucukhuseyin O, Tekeli A, et al. Effects of the PPARG P12A and C161T gene variants on serum lipids in coronary heart disease patients with and without Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2011;358(1–2):355–63.
218. Fan W, Shen C, Wu M, Zhou ZY, Guo ZR. Association and Interaction of PPAR α , δ , and γ Gene Polymorphisms with Low-Density Lipoprotein-Cholesterol in a Chinese Han Population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015;19(7):379–86.
219. Bego T, Dujic T, Mlinar B, Semiz S, Malenica M, Prnjavorac B, et al. Association of PPARG and LPIN1 gene polymorphisms with metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Med Glas.* 2011;8(1):76–83.
220. Vergotine Z, Kengne AP, Erasmus RT, Yako YY, Matsha TE. Rare mutations of peroxisome proliferator-activated receptor gamma: Frequencies and relationship with insulin resistance and diabetes risk in the mixed ancestry population from South Africa. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:187985.
221. Grygiel-Górniak B, Kaczmarek E, Mosor M, Przystański J, Bogacz A. Genetic Background, Adipocytokines, and Metabolic Disorders in Postmenopausal Overweight and Obese Women.

- Biochem Genet. 2016;54(5):636–52.
222. Lv X, Zhang L, Sun J, Cai Z, Gu Q, Zhang R, et al. Interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma polymorphism and obesity on type 2 diabetes in a Chinese Han population. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9(1):1–6.
 223. Cheema AK, Li T, Liuzzi JP, Zarini GG, Dorak MT, Huffman FG. Genetic associations of PPARGC1A with type 2 diabetes: Differences among populations with African origins. *J Diabetes Res*. 2015;2015:921274.
 224. Brito EC, Vimalaswaran KS, Brage S, Andersen LB, Sardinha LB, Wareham NJ, et al. PPARGC1A sequence variation and cardiovascular risk-factor levels: A study of the main genetic effects and gene × environment interactions in children from the European Youth Heart Study. *Diabetologia*. 2009;52(4):609–13.
 225. Franks PW, Ekelund U, Brage S, Luan J, Schafer AJ, O’Rahilly S, et al. PPARGC1A coding variation may initiate impaired NEFA clearance during glucose challenge. *Diabetologia*. 2007;50(3):569–73.
 226. Vázquez-Del Mercado M, Guzmán-Ornelas MO, Meraz FIC, Ríos-Ibarra CP, Reyes-Serratos EA, Castro-Albarran J, et al. The 482Ser of PPARGC1A and 12Pro of PPARG2 Alleles Are Associated with Reduction of Metabolic Risk Factors even Obesity in a Mexican-Mestizo Population. *Biomed Res Int*. 2015;2015:285491.
 227. Bhatta P. An investigation of genetic polymorphism in association with Type 2 diabetes and metabolic syndrome. Robert Gordon University Aberdeen; 2018.
 228. Vandenbeek R, Khan NP, Estall JL. Linking metabolic disease With the PGC-1 α Gly482Ser polymorphism. *Endocrinology*. 2018;159(2):853–65.
 229. Lacquemant C, Chikri M, Boutin P, Samson C, Froguel P, Ek J, et al. No association between the G482S polymorphism of the proliferator activated receptor- γ coactivator-1 (PGC- 1) gene and type II diabetes in French Caucasians [4] (multiple letters). *Diabetologia*. 2002;45(4):602–3.
 230. Nelson TL, Fingerlin TE, Moss L, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha gene (PGC-1 α) is not associated with type 2 diabetes mellitus or body mass index among hispanic and non hispanic whites from Colorado. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115(4):268–75.
 231. Vimalaswaran KS, Radha V, Anjana M, Deepa R, Ghosh S, Majumder PP, et al. Effect of polymorphisms in the PPARGC1A gene on body fat in Asian Indians. *Int J Obes*. 2006;30(6):884–91.
 232. Ridderstråle M, Johansson LE, Rastam L, Lindblad U. Increased risk of obesity associated with the variant allele of the PPARGC1A Gly482Ser polymorphism in physically inactive elderly men. *Diabetologia*. 2006;49(3):496–500.
 233. Csépi K, Szigeti E, Vitai M, Korányi L. The ppargc1a - Gly482Ser polymorphism (RS8192678) and the metabolic syndrome in a central romanian population. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 2017;13(2):161–7.
 234. Ha CD, Cho JK, Han T, Lee SH, Kang HS. Relationship of PGC-1 α gene polymorphism with insulin resistance syndrome in Korean children. *Asia-Pacific J Public Heal*. 2015;27(2):544–51.
 235. Albuquerque D, Nóbrega C, Rodríguez-López R, Manco L. Association study of common polymorphisms in MSRA, TFAP2B, MC4R, NRXN3, PPARGC1A, TMEM18, SEC16B, HOXB5 and OLFM4 genes with obesity-related traits among Portuguese children. *J Hum Genet*. 2014;59(6):307–13.
 236. Esterbauer H, Oberkofler H, Linnemayr V, Iglseder B, Hedegger M, Wolfsgruber P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 gene locus: Associations with obesity indices in middle-aged women. *Diabetes*. 2002;51(4):1281–6.
 237. Deeb SS, Brunzell JD. The role of the PGC1 α Gly482Ser polymorphism in weight gain due to intensive diabetes therapy. *PPAR Res*. 2009;2009:649286.
 238. Da Fonseca ACP, Da Fonseca GP, Marchesini B, Voigt DD, Campos Junior M, Zembrzuski

- VM, et al. Genetic Variants in the Activation of the Brown-Like Adipocyte Pathway and the Risk for Severe Obesity. *Obes Facts*. 2020;13(2):130–43.
239. Ambye L, Rasmussen S, Fenger M, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, et al. Studies of the Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene in Danish subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;67(2):175–9.
240. Mirzaei K, Hossein-Nezhad A, Emamgholipour S, Ansar H, Khosrofar M, Tootee A, et al. An exonic peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α variation may mediate the resting energy expenditure through a potential regulatory role on important gene expression in this pathway. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2012;5(2):59–71.
241. Vohl MC, Houde A, Lebel S, Hould FS, Marceau P. Effects of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 Gly482Ser variant on features of the metabolic syndrome. *Mol Genet Metab*. 2005;86(1–2):300–6.
242. Zhang SL, Lu WS, Yan L, Wu MC, Xu MT, Chen LH, et al. Association between peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α gene polymorphisms and type 2 diabetes in southern Chinese population: Role of altered interaction with myocyte enhancer factor 2C. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(21):1878–85.
243. Nikitin AG, Chistiakov DA, Minushkina LO, Zateyshchikov DA, Nosikov V V. Association of the CYBA, PPARGC1A, PPARG3, and PPARD gene variants with coronary artery disease and metabolic risk factors of coronary atherosclerosis in a Russian population. *Heart Vessels*. 2010;25(3):229–236.
244. Povel CM, Feskens EJM, Imholz S, Blaak EE, Boer JMA, Dollé MET. Glucose levels and genetic variants across transcriptional pathways: Interaction effects with BMI. *Int J Obes*. 2010;34(5):840–5.
245. Barroso I, Luan J, Sandhu MS, Franks PW, Crowley V, Schafer AJ, et al. Meta-analysis of the Gly482Ser variant in PPARGC1A in type 2 diabetes and related phenotypes. *Diabetologia*. 2006;49(3):501–5.
246. Rai E, Sharma S, Koul A, Bhat AK, Bhanwer AJS, Bamezai RNK. Interaction between the UCP2-866G/A, mtDNA 10398G/A and PGC1 α p.Thr394Thr and p.Gly482Ser polymorphisms in type 2 diabetes susceptibility in North Indian population. *Hum Genet*. 2007;122(5):535–40.
247. Morselli E, Fuente-Martin E, Finan B, Kim M, Frank A, Garcia-Caceres C, et al. Hypothalamic PGC-1 α protects against high-fat diet exposure by regulating ER α . *Cell Rep*. 2014;9(2):633–45.
248. Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50(2):431–8.
249. Lang UE, Hellweg R, Sander T, Gallinat J. The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Mol Psychiatry*. 2009;14(2):120–2.
250. Skledar M, Nikolac M, Dodig-Curkovic K, Curkovic M, Borovecki F, Pivac N. Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met and obesity in children and adolescents. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2012;36(1):136–40.
251. Martínez-Ezquerro JD, Rendón-Macías ME, Zamora-Mendoza G, Serrano-Meneses J, Rosales-Rodríguez B, Escalante-Bautista D, et al. Association Between the Brain-derived Neurotrophic Factor Val66Met Polymorphism and Overweight/Obesity in Pediatric Population. *Arch Med Res*. 2017;48(7):599–608.
252. Bonaccorso S, Sodhi M, Li J, Bobo W V., Chen Y, Tumuklu M, et al. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism is associated with increased body mass index and insulin resistance measures in bipolar disorder and schizophrenia. *Bipolar Disord*. 2015;17(5):528–35.
253. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*.

- 2003;6(7):736–42.
254. Beckers S, Peeters A, Zegers D, Mertens I, Gaal L Van, Van Hul W. Association of the BDNF Val66Met variation with obesity in women. *Mol Genet Metab.* 2008;95(1–2):110–2.
 255. Friedel S, Horro FF, Wermter A, Geller F, Dempfle A, Reichwald K. Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): Identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;132B(1):96–9.
 256. Zhang M, Zhao X, Xi B, Shen Y, Wu L, Cheng H, et al. Impact of obesity-related gene polymorphism on risk of obesity and metabolic disorder in childhood. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2014;48(9):776–83.
 257. Daily JW, Park S. Interaction of BDNF rs6265 variants and energy and protein intake in the risk for glucose intolerance and type 2 diabetes in middle-aged adults. *Nutrition.* 2017;33:187–94.
 258. Minelli A, Zanardini R, Bonvicini C, Sartori R, Pedrini L, Gennarelli M, et al. BDNF serum levels, but not BDNF Val66Met genotype, are correlated with personality traits in healthy subjects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2011;261(5):323–9.
 259. Terracciano A, Piras MG, Lobina M, Mulas A, Meirelles O, Sutin AR, et al. Genetics of serum BDNF: Meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study. *World J Biol Psychiatry.* 2013;14(8):583–9.
 260. Luykx JJ, Boks MPM, Breetvelt EJ, Aukes MF, Strengman E, da Pozzo E, et al. BDNF Val66Met homozygosity does not influence plasma BDNF levels in healthy human subjects. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2013;43:185–7.
 261. de Azevedo KPM, de Oliveira Segundo VH, de Medeiros GCBS. Effects of exercise on the levels of BDNF and executive function in adolescents: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Med.* 2019;98(28):e16445.
 262. Iughetti L, Casarosa E, Predieri B, Patianna V, Luisi S. Plasma brain-derived neurotrophic factor concentrations in children and adolescents. *Neuropeptides.* 2011;45(3):205–11.
 263. Bergier J, Niżnikowska E, Bergier B, Acs P, Salonna F, Junger J. Differences in Physical Activity, Nutritional Behaviours, and Body Silhouette Concern among Boys and Girls from Selected European Countries. *Hum Mov.* 2017;18(1):19–28.
 264. Junger J, Kačúr P, Tlučáková L, Čech P, Bečáková V. Physical Activity of Female Students in Secondary Schools in the Context of Physical Activity Recommendations Fulfilment. *Hum Mov.* 2017;18(3):67–73.
 265. Lee JH, Kim HC, Kang DR, Suh I. The 23-year tracking of blood lipids from adolescence to adulthood in Korea: The Kangwha study. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):221.
 266. Adams C, Burke V, Beilin LJ. Cholesterol tracking from childhood to adult mid-life in children from the Busselton study. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2005;94(3):275–80.
 267. US Preventive Services Task Force. Screening for Lipid Disorders in Children and Adolescents: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA.* 2016;316(6):625–633.

LISTA SKRAĆENICA

- ANOVA- analiza varijanse
- ATP- adenzin trifosfat
- AR- α - alfa adrenerički receptori
- AR- β - beta adrenerički receptori
- BAT- mrko masno tkivo
- BMAT- adipociti koštane srži
- BDNF- moždani faktor rasta
- CTP1 i CTP2- karnitin palmitoiltransferaze 1 i 2
- cMAT- konstitutivno masno tkivo koštane srži
- C/EBP β - CCAAT/pojačivač vezujućeg proteina β
- C/EBP α - CCAAT/pojačivač vezujućeg proteina α
- cAMP- ciklični adenzin monofosfat
- CtBP2- C-terminus vezujući protein 2
- CNS- centralni nervni sistem
- DNK- dezoksiribonukleinska kiselina
- Ebf2- rani B ćelijski faktor
- FDG PET- fluoro-deoksi-glukozna pozitrona emisiona tomografija
- FFA- slobodne masne kiseline
- FGF- fibroblastni faktor rasta
- GLUT4- insulin-regulisani glukozni transporter 4
- HDL- lipoproteine velike gustine
- ITM- Indeks telesne mase
- IDL- lipoproteini intermedijarne gustine
- IL-6- interleukin 6
- IGF-1- insulinu sličan faktor rasta 1
- LDL- lipoproteine niske gustine
- LPL- lipoprotein lipaza
- Myf5- miogeni faktor 5
- MSC- mezenhimska matična ćelija
- PCR- lančana reakcija polimeraze
- PPAR α - peroksizomni proliferatorom aktivirani receptor α
- PPAR γ - peroksizomni proliferatorom aktivirani receptor γ
- PPAR γ - peroksizomni proliferatorom aktivirani receptor γ
- PRDM16- protein u obliku cinskog prsta (Positive regulatory domain containing 16)
- PARGC1A- - peroksizomni proliferatorom aktivirani receptor gama koaktivator 1 α
- PGC-1 α - peroksizomni proliferatorom aktivirani receptor gama koaktivator 1 α
- PYY- stimulator apetita iuropeptid YY
- RNK- ribonukleinska kiselina
- rMAT- regulatorno masno tkivo koštane srži
- RFLP- restrikciona digestija PCR produkata
- RTPCR- lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
- SNP- polimorfizam pojedinačnih nukleotida
- TNF- α - faktor nekroze tumora alfa
- TZD- tiazolidindioni
- UCP1- dekuplujući protein
- VLDL- lipoproteini veoma niske gustine
- VEGF- endotelni faktor rasta
- Zfp423- protein u obliku cinskog prsta 423
- WAT- belo masno tkivo

BIOGRAFIJA

Vanja Vidović rođena je 14.8.1990. godine u Banjoj Luci gde je završila osnovnu i srednju Medicinsku školu. Godine 2008. upisala je Austin Peay State University u Sjedinjenim Američkim Državama gde je diplomirala 2012. godine prirodne nauke, smer biologija. Iste godine upisala je master studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, a master rad je odbranila 2013. godine pod naslovom " Vrste i zastupljenost numeričkih hromozomskih aberacija u nalazima kariotipa fetusa čoveka na području Republike Srpske u periodu od 2009. do 2013. godine" sa ocenom 10. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2013/2014. godine, studijski program Biologija, modul Genetika.

Od 2014. godine radi kao asistent na Pedagoškom fakultetu Univerziteta u Istočnom Sarajevu, a od 2016. godine zaposlena je u zvanju višeg asistenta na Katedri za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci. Autor je nekoliko naučnih radova objavljenim u domaćim i međunarodnim časopisima kao i brojnih saopštenja na skupovima od međunarodnog zanačaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Вања Д. Видовић

број индекса Б3040/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Повезаност полиморфизама гена значајних за диференцијацију и активацију мрког масног ткива са индексом телесне масе, гликемијом и липидним статусом адолесцената

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Вања Д. Видовић

Број индекса Б3040/2013

Студијски програм Виологија

Наслов рада Повезаност полиморфизама гена значајних за диференцијацију и активацију мрког масног ткива са индексом телесне масе, гликемијом и липидним статусом адолесцената

Ментор доц. др Нела Максимовић и проф. др Марина Стаменковић Радак

Потписани/а Вања Д. Видовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Повезаност полиморфизама гена значајних за диференцијацију и активацију мрког масног ткива са индексом телесне масе, гликемијом и липидним статусом адолесцената

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.