**Sveučilište u Zagrebu**

**Medicinski fakultet**

**Mislav Jelaković i Vanja Ivković**

**PROCJENA RIZIKA POLIMORFIZAMA -11377C>G I -11391G>A GENA *ADIPOQ***

**ZA POJAVU INZULINSKE REZISTENCIJE KOD OSOBA S NISKIM KARDIOVASKULARNIM RIZIKOM**

**Zagreb, 2013.**

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za nefrologiju, hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Klinike za unutrašnje bolesti i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc. Nade Čikeš u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta “Endemska nefropatija u Hrvatskoj: epidemiologija, dijagnostika i etiopatogeneza”, broj 108-0000000-0329, voditelj Bojan Jelaković i i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012/2013.

**POPIS KRATICA**

ACR omjer albumina i kreatinina u mokraći (engl. albumin/creatinin ratio)

Alfa1CR omjer alfa-1 mikroglobulina i kreatinina u mokraći

ADIPOQ gen za adiponektin

eGFR procijenjena glomerularna filtracija

EH-UH Epidemiologija hipertenzije u Hrvatskoj, istraživanje

HDL lipoprotein velike gustoće (prema engl. high density lipoprotein)

HOMA-IR Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. Homeostasis Model Assessment)

ITM indeks tjelesne mase (engl. BMI, body mass index)

LDL lipoprotein male gustoće (prema engl. low density lipoprotein)

MDRD Modificirana prehrana u renalnoj bolesti (engl. Modified Diet in Renal Disease)

OS opseg struka

RRD dijastolički arterijski tlak

RRS sistolički arterijski tlak

SNP Single Nucleotid Polymorphism

TM tjelesna masa

TV tjelesna visina

**SADRŽAJ**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1. U v o d | | 1 |
| 2. **2.** | Inzulinska rezistencija  Adiponektin  *ADIPOQ* gen |  |
| 2. H i p o t e z a | | 7 |
| 3. O p ć i i s p e c i f i č n i c i l j e v i r a d a | | 7 |
| 4. I s p i t a n i c i i m e t o d e | | 8 |
| 5. R e z u l t a t i | | 14 |
| 6. R a s p r a v a | | 21 |
| 7. Z a k l j u č c i | | 25 |
| 8. Z a h v a l a | | 27 |
| 9. P o p i s l i t e r a t u r e | | 28 |
| 10. S a ž e t a k | | 29 |
| 11. Summary | | 30 |

1. **UVOD**

Prevalencije kompleksnih kroničnih bolesti i poremećaja, u koje ubrajamo pretilost, šećernu bolest tipa 2 i arterijsku hipertenziju u dramatičnom su porastu u cijelom svijetu. Spomenuta epidemiološka tranzicija osobito je zahvatila ekonomski razvijene zemlje i odraslu populaciju, međutim zabrinjavajuća je sve češća pojavnost bolesti kod mlađih dobnih skupina i djece ([1](#_ENREF_1)). Kako pojavnost navedenih bolesti globalno poprima epidemijske razmjere nametnula se potreba za znanstvenim istraživanjima kojima bi se njihova patofiziologija preciznije razjasnila i kvantificirala što bi predstavljalo temelj razvoja učinkovitih modela prevencije u budućnosti. Porast morbiditeta i mortaliteta od kroničnih kompleksnih bolesti je objašnjiv ako detaljno razmotrimo evolucijske i selekcijske mehanizme koji su bili prisutni u prošlosti i životne potrebe modernog čovjeka. Primjerice, često spominjana inzulinska rezistencija u ljudskoj je prošlosti predstavljala koristan adaptivni mehanizam koji je osiguravao selekcijsku prednost svojim nositeljima, međutim zbog sjedilačkog načina života danas predstavlja nepoželjno svojstvo i neizostavni etiološki čimbenik za sve tri ranije spomenute kompleksne kronične bolesti. Postoje brojni mehanizmi kojima se nastoji objasniti nastanak inzulinske rezistencije od kojih ćemo nabrojiti samo neke. Tako se primjerice u literaturi najčešće spominje nemogućnost diferencijacije velikih i inzulin rezistentnih adipocita visceralnog masnog tkiva koji izlučuju cijeli niz proupalnih i proaterogenih adipokina, te u hipertoničara podjednako važan i zanimljiv smanjen broj arteriola u skeletenoj muskulaturi (1, 2). Adiponektin, odnosno njegova snižena koncentracija u krvi, jedan je od mogućih čimbenika koji se u posljednje vrijeme sve više istražuje jer je izgledno da bi taj čimbenik mogao predstavljati jednu od brojnih poveznica između pretilosti i inzulinske rezistencije i posljedičnog nastanka šećerne bolesti tip 2 i hipertenzije ([2](#_ENREF_2))**.** Danas je genetska podloga razine adiponektina u krvi djelomično objašnjena jer su genetičko-epidemiološka istraživanja utvrdila asocijaciju između pojedinih polimorfizama ADIPOQ gena i plazmatska koncentracija adiponektina, međutim na razinu adiponektina i inzulisku rezistenciju nesumljivo djeluju brojni prepoznati i neprepoznati čimbenici od kojih su neki prikazani shematski na slici 1.

|  |
| --- |
|  |
| Slika 1. Polimorfizmi *ADIPOQ* gena i plazmatska koncentracija adiponektina u nastanku inzulinske rezistencije.  Beta-R - beta adrenergički receptori, ADIPOQ – gen za adiponektin, OS – opseg struka, RRS – sistolički arterijski tlak |

* 1. **Inzulinska rezistencija**

Prema definiciji inzulinska rezistencija je stanje kod kojega tkiva pokazuju odgovor na inzulin koji je manji od očekivanoga što dovodi do hiperglikemije i sekundarno povišenoga lučenja inzulina (3). Inzulinska rezistencija smatra se “kompenziranim predstadijem” šećerne bolesti tip 2 koja u konačnici postaje klinički vidljiva kada gušterača više nije u mogućnosti djelovati kompenzatorno zbog smanjene sposobnosti lučenja inzulina ([3](#_ENREF_3)). Česta je u osoba koje su visceralno pretile, imaju slabu toleranciju glukoze, povišen arterijski tlak i dislipidemiju, a osobito je izražena u nekim tkivima, primjerice skeletnim mišićima, visceralnom masnom tkivu i jetri ([4](#_ENREF_4), 5).

Prema nekim studijama inzulinska rezistencija i hiperinzulinemija glavni su čimbenici rizika za razvoj koronarne srčane bolesti i hipertenzije ([6](#_ENREF_5)), ([7](#_ENREF_6)). Procjenjuje se da je oko 40% osoba s esencijalnom hipertenzijom inzulin rezistentno ([8](#_ENREF_7)). Osim što hipertenzija zbog periferne vaskularne rezistencije i smanjenja broja arteriola u skeletnoj muskulaturi može uzrokovati inzulinsku rezistenciju i *vice versa*, hiperinzulinemija može dovesti do porasta arterijskog tlaka i hipertenzije. Do sada je opisano nekoliko mehanizama kojima hiperinzulinemija, kao posljedica inzulinske rezistencije može utjecati na povišenje arterijskoga tlaka: 1) stimulacija simpatikusa i sustava renin-angiotenzin, 2) retencija natrija u renalnim tubulima, 3) poticanje proliferacije stanica zbog povećanog unutarstaničnog pH i slobodnih kalcijskih iona, i 4) aterogeni efekt koji je posljedica djelovanja inzulina na receptore za inzulinu nalik čimbenik rasta (engl. *insulin-like growth factor)* ([9](#_ENREF_8)).

Usprkos relativnom napretku u razjašnjenu mehanizama za nastanak hiperinzulinemije, mehanizam nastanka inzulinske rezistencije još uvijek nije razjašnjen. Cijeli niz godina masno tkivo smatrano je pasivnim tkivom kojem je jedina svrha čuvanje energetskih rezervi. Današnja poimanja i spoznaje o masnom tkivu značajno se razlikuju od ranijih, pa sada znamo da masno tkivo izlučuje brojne biološki aktivne molekule koje se nazivaju adipocitokini ili adipokini ([9](#_ENREF_8)). Upravo je adiponektin jedan od takvih citokina koji bi mogao biti poveznica između inzulinske rezistencije i visceralnog masnog tkiva i stoga ćemo ga detaljnije opisati ([10](#_ENREF_9)).

* 1. **Adiponektin**

Adiponektin je protein građen od 244 aminokiseline koji u cijelosti sintetiziraju adipociti (10). U cirkulaciji ga nalazimo u obliku multimera niske, srednje i velike molekularne mase ([11](#_ENREF_10)). Sačinjava 0,01% svih proteina plazme, a njegova prosječna koncetracija u organizmu je relativno visoka i kreće se u rasponu od 3 do 30 µg/ml ([12](#_ENREF_11)). Razlike u koncentraciji adiponektina djelomično su pripisive biološkoj varijabilnosti, tako je primjerice zamijećena razlika u koncetraciji adiponektina po spolu - u žena je nešto viša nego u muškaraca (13). Općenito razlikujemo primarnu hipoadiponektinemiju uzrokovanu genskim poremećajem i sekundarnu koja ima razne uzroke. Snižena koncentracija adipokina zamijećena je u pretilih osoba (10, 13, [14](#_ENREF_12), 15), osoba koje boluju od šećerne bolesti tipa 2 i koronarne bolesti te osoba s povišenim i granično povišenim arterijskim tlakom (11, [16](#_ENREF_13)). Ta opažanja nije moguće u cijelosti objasniti jer uloga adipokina u organizmu nije u potpunosti razjašnjena ali pripisuju mu se inzulin-senzibilizirajuća, protuupalna i anti-aterogena svojstva (11, 17, [18](#_ENREF_15)). U kliničkim studijama HMW multimer adiponektina pokazao je najjaču povezanost s tolerancijom glukoze i inzulinskom rezistencijom (površina pod krivuljom - engl. *area under curve* – AUC HMW multimera vs. AUC ukupnog adiponektina - 0.713 [95% CI 0.620–0.805] vs. 0.615 [0.522–0.708], *p* = 0.0160) ([19](#_ENREF_16)). Kod studija na miševima utvrđeno je da adiponektin snižava razinu glukoze u krvi neovisno o vrijednostima inzulina (20). Pretpostavlja se da adiponektin povećava osjetljivost na inzulin stimulacijom potrošnje glukoze u skeletnim mišićima i jetri, stimulacijom oksidacije slobodnih masnih kiselina također u skeletnim mišićima i jetri, i supresijom glukoneogeneze u jetri (11). Točan mehanizam i naročito mogući utjecaji na vrijednosti arterijskog tlaka i inzulinsku rezistenciju u ranim fazama hipertenzije još su tema rasprava budući da u literaturi postoje konfliktni podaci (11, 13, 21).

* + 1. **Gen za adiponektin *(ADIPOQ* gen)**

Adiponektin kodira *ADIPOQ* gen (ranije poznat po kraticama ACDC; ADPN; APM1; APM-1; GBP28; ACRP30; ADIPQTL1) službeno se naziva naziva *adiponectin, C1Q and collagen domain containing* i smješten je u 3q27 regiji genoma. Alternativni simboli i imena koja se koriste za ovaj gen u literaturi ili drugim bazama podataka su ACRP30, adiponectin, "adiponectin precursor", AdipoQ, "adipose most abundant gene transcript 1", apM1, GBP28 . Ovaj gen je isključivo izražen u masnom tkivu i kodira protein sičan kolagenu VIII i X i faktoru komplementa C1q, gen veličine je 16 kb i sadrži 3 egzona (22). Egzoni 1 i 2 su veličine 76 odnosno 222 bp a između njih se nalazi intron veličine 10,3 kb, dok je egzon 3 veličine 4,28 kb. Translacija najčešće započinje na egzonu 2 i završava na egzonu 3 te ne zahvaća egzon 1 i dio egzona 3 ([23](#_ENREF_20)). U pretilih osoba njegova ekspresija je reducirana te posljedično nastaje hipoadiponektinemija (24). Regija 3q27 povezuje se s razvojem šećerne bolesti tipa 2 i metaboličkog sindroma (25), 26). Također, neke studije povezuju tu regiju s koncentracijom LDL kolesterola i s razvojem koronarne bolesti (28), (29). Asocijacijska studija cijeloga genoma (engl. *Genome wide association study, GWAS*) je utvrdila povezanost između razine adiponektina i *ADIPOQ* gena (29, 30). Taj gen sadrži više SNP-ova od kojih su -11377 C>G i -11391 G>A, na promotorskoj regij, najčešće u fokusu istraživanja, a predmet su i ovog rada. Vasseur i suradnici su utvrdili da je alel -11391 G>A povezan s višim razinama adiponektina dok je -11377 C>G povezan s nižim (14). Tzv. minor alel SNP-a 11391G>A, alel A, je ujedno i najjače pozitivno povezan s koncentracijom adiponektina u krvi. Izračunato je da svaki minor alel A povisuje razinu adiponektina u krvi za 1,63 µg/mL a da svaki µg/mL adiponektina smanjuje rizik od razvoja šećerne bolesti tip 2 za čak 8,1% (19). Jednaki rezultati su proizašli iz *The Framingham Offspring Study* u koju je bilo uključeno 2543 ispitanika (22). Mehanizam kojim taj alel povećava koncentraciju adiponektina je povećana aktivnost promotora gena *ADIPOQ* (31). Kod SNP-a -11377 C>G minor alel G ima potpuno suprotno djelovanje. On smanjuje afinitet transkripcijskog faktora Sp1 za njegovo vezanje unutar *ADIPOQ* promotora što vodi smanjenoj aktivnosti promotora gena, a time i smanjenoj koncentraciji adiponektina (32). Iako brojna istraživanja ukazuju na povezanost između *ADIPOQ* gena i određenih polimorfizama s navedenim bolestima, ta povezanost još nije nedvosmisleno utvrđena, a rezultati studija su neusklađeni. Prospektivna studija koju su proveli Gable i sur nije uspjela pronaći povezanost između najučestalijih varijacija gena za adiponektin i kardiovaskularnog rizika u europskoj populaciji (33). Meta-analiza koju su 2011.godine proveli Han i suradnici uključila je 33 studije. Prema njihovim rezultatima samo je -11377C>G povezan s rizikom za razvoj šećerne bolesti tip 2 dok je -11391 G>A povezan sa šećernom bolesti tip 2 samo u osoba s pozitivnom obiteljskom anamnezom za tu bolest. Sukladno tim rezultatima zaključili su kako bi jedino -11377C>G mogao igrati ulogu u razvoju šećerne bolesti tip 2 (34). Finska studija za prevenciju dijabetesa pruža kontradiktorne rezultate prema kojima je -1377C>G povezan s manjim rizikom razvoja šećerne bolesti tipa 2 (35).

Navedene studije ukazuju kako su promotorske varijante gena za adiponektin povezane ponajprije s koncentracijom adiponektina ta posljedično s inzulinskom rezsitencijom, metaboličkim sindromom, šećernom bolesti tip 2 i kardiovaskularnim bolestima.

Budući da je važno što ranije započeti s mjerama prevencije kod osoba s prisutnim rizičnim čimbenicima i terapijom, danas se nameće potreba što ranije identifikacije tih osoba. Kako bi terapija bila usmjerena i prilagođena nastoje se registrirati mogući biljezi i objasniti mehanizmi nastanka.

U ovom radu cilj nam je bio analizirati ulogu adiponektina i polimorfizama *ADIPOQ* gena u osoba s niskim kardiovaskularnim rizikom, tj. u onih u početnoj fazi kardiovaskularnog ili kardiometaboličkog kontinuuma.

**HIPOTEZA**

Polimorfizmi jednoga nukleotida (engl. *single-nucleotide polymorphism*, SNP), rs266729

(-11377C>G) i rs17300539 (-11391G>A) gena *ADIPOQ* utječu na rizik pojave inzulinske rezistencije u osoba s niskim kardiovaskularnim rizikom.

**OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Opći cilj rada je analizirati povezanost polimorfizama -11377C>G i -11319G>A s inzulinskom rezistencijom u promatranoj populaciji.

Specifični ciljevi rada:

1. Analizirati povezanost polimorfizma -11377C>G s inzulinskom rezistencijom.
2. Analizirati povezanost polimorfizma -11391G>A s inzulinskom rezistencijom.
3. Analizirati moguća međudjelovanja tih dvaju polimorfizama na rizik razvoja inzulinske rezistencije.
4. Analizirati koncentraciju adiponektina u ispitanika s različitim genotipovima.
5. Izraditi statistički model predikcije inzulinske rezistencije.

**ISPITANICI I METODE**

**Ispitanici**

Ispitanici koji sudjeluju u ovom istraživanju dio su skupine od 2487 ispitanika koji su uključeni u epidemiološko istraživanje u kontinentalnom ruralnom dijelu Hrvatske.

U ovo presječno istraživanje uključen je uzorak 214 odraslih osoba (140 žena i 74 muškaraca) koji nisu bili liječeni zbog arterijske hipertenzije, šećerne bolesti tip 2, drugih kardioloških poremećaja ili bolesti i nisu uzimali drugu kroničnu terapiju. Isključujući kriteriji bili su: liječena arterijska hipertenzija, šećerna bolest, preboljeli moždani udar, infarkt miokarda, srčano zatajenje, kronična bubrežna bolest, trudnoća, terminalno bolesne osobe, osobe s teškim invaliditetom, jednim ili više amputiranih udova, nepokretni te osobe koje boluju od demencije ili psihičke bolesti. Zbog utjecaja bubrežnog oštećenja na vrijednosti adiponektina isključene su sve osobe s procijenjenom glomerularnom filtracijom manjom od 60 mL/min/1.73 m2.

Istraživanje su odobrila etičkih povjerenstava Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici su upoznati s ciljevima istraživanja i svaki ispitanik je potpisao informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

**Metode**

**a) Antropometrijski i klinički podaci**

Tjelesna visina ispitanicima je izmjerena u stojećem položaju bez obuće, a tjelesna masa bez teških odjevnih predmeta. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je kao masa ispitanika u kilogramima, podijeljena s kvadratom visine u metrima. Opseg struka mjeren je mjernom vrpcom u tri navrata pri čemu je za daljnje analize primjenjena aritmetička sredina tih mjerenja. Kao mjerilo centralne pretilosti uzet je opseg struka veći od 102 cm za muškarce i veći od 88 cm za žene (36).

Podaci o dosadašnjim bolestima i terapiji prikupljeni su standardiziranim upitnikom i pregledom medicinske dokumentacije liječnika obiteljske medicine.

Arterijski tlak mjeren je tijekom dviju posjeta, a svaki put je mjeren po tri puta na desnoj ruci u sjedećem položaju nakon barem 5 minuta odmora, što je sukladno preporukama ESH/ECS (37) pomoću digitalnog tlakomjera *Omron M-6* koji mjeri arterijski tlak i srčanu frekvenciju. Ovisno o potrebi, tj. obujmu nadlaktice korištene su dvije vrste orukvica, standardna i velika. Za ovo istraživanje koristili smo srednju vrijednost drugih dvaju mjerenja. Kao kriterij za hipertenziju korištene su vrijednosti arterijskoga tlaka > 140/90 mmHg i/ili uzimanje antihipertenzivne terapije (37).

**b) Laboratorijski podaci**

Svi uzorci krvi i urina su nakon uzorkovanja bili centrifugirani i pohranjeni na +4°C. Analiza svih uzoraka je obavljena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za određivanje kreatinina u serumu korišten je uređaj *Olympus AU 2700*, kontinuiranom fotometrijskom metodom s alkalnim pikratom (*Olympus*, Tokyo, Japan). Albumin u urinu određen je s uređajem *Siemens Dade Behring BN II Nephelometer* (*Siemens*, SR Njemačka). Glomerularna filtracija je izračunata tzv. skraćenom MDRD formulom: eGFR=32788 x [Kreatinin u serumu]-1,154 x Dob-0,203 x (0,742 za žene). Kao pokazatelj inzulinske rezistencije korišten je indeks HOMA koji se računa prema formuli: HOMA-IR=[Inzulin (µIU/mL)] x [Glukoza](mmol/L)/22,5. Kriterij inzulinske rezistencije bio je HOMA indeks veći od 3. Koncentraciija adiponektina i leptina određene su enzimimunokemijskom metodom (*Behring Gmbh*, Njemačka). C-reaktivni protein (CRP) određen je imunoturbidimetrijskom metodom na česticama lateksa, koncentracije inzulina imunokemijskom detekcijom uz pomoć elektrokemiluminiscencije, a koncentracije glukoze mjerene su na tašte i određene su fotometrijom s heksokinazom ili glukoza oksidazom (*Olympus System Reagent Kit* na *Olympus AU2700,* Tokyo, Japan). Lipoprotein velike gustoće (HDL) određen je homogenom enzimimunoinhibicijskom metodom, lipoprotein male gustoće (LDL) računskom metodom prema Friedwaldu, a koncentracije triacilglicerola (triglicerida) i kolesterola fotometrijskom metodom s glicerofosfat-oksidazom (GPO-PAP), odnosno kolesterol-oksidazom (sve na *Olympus AU2700*, Tokyo, Japan).

c**) Genotipizacija polimorfizama jednoga nukleotida C-11377G (SNP 1) i G-11391A (SNP 2) gena ADIPOQ**

Za izdvajanje DNA korištena je puna krv s antikoagulansom (EDTA) (epruveta za 9 mL svježe krvi). Izdvajanje genomske DNA provedeno je prema metodi Millera i suradnika (38). Metoda se temelji na izdvajanju limfocita iz uzoraka periferne krvi, lizi stanica te enzimskoj i kemijskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula, nakon čega slijedi taloženje DNA u apsolutnom etanolu. Genotipizacija se provodi umnažanjem DNA fragmenata od interesa lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*), te njezinom detekcijom po principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET) (engl. *fluorescence resonance energy transfer*). PCR reakcija izodi se u LightCycler kapilarama u ukupnom volumenu od 20 µL. Reakcijska smjesa sadrži: 1) Master miks koji sadrži LightCycler Fast-Start enzim, 10x konc. i LightCycler Fast-Start reakcijsku smjesu 10x konc.; 2) MgCl2 (Roche®); 3) sterilnu destiliranu vodu; 4) početnice: uzvodna 5'- ACT TGC CCT GCC TCT GTC TG -3' (*ADIPOQ* F, engl. *forward* ); nizvodna 5'- GCC TGG AGA ACT GGA AGC TG -3' (*ADIPOQ* R, engl *reverse*); 5) hibridizacijske probe: A) za polimorfizam -11377 G>C: ADIPOQ-FL 5'- GCA GGA TCT GAG CCG GTT CT –FL-3' (FL: fluorescein); ADIPOQ-LC 5'-LC Red640- GCA AGC CAC ACA TTC TGA TGA ATT AAA TTA CGA CCC –PH-3' (LC: LightCycler Red 640; PH: -3'- fosfat); B) za polimorfizam -11391G>A: ADIPOQ-FL 5'- CTC AGA TCC TGC CCT TCA AAA AC –FL (FL: fluorescein); ADIPOQ-LC 5'-LC Red640- ACA TGA GCG TGC CAA GAA AGT CCA AGG TGT TG –PH-3' (LC: LightCycler Red 640; PH: -3'- fosfat). Sastojci su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Sastojci reakcijske smjese PCR SNP 1 i SNP 2

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| LC-kapilara | Volumen (µL) | Koncentracija u reakcijskoj smjesi |
| Sterilna destilirana voda | 11,2 |  |
| MgCl2 (25 mM) | 3,0 | 3,75 mM |
| Master miks | 2,0 |  |
| ADIPOQ1/2\*-LC (2 µM) | 0,4 | 0,04 µM |
| ADIPOQ1/2\*-FL (2 µM) | 0,4 | 0,04 µM |
| ACR1 F (5 µM) | 0,5 | 0,125 µM |
| ACR1 R (5 µM) | 0,5 | 0,125 µM |
| DNA | 2,0 | 100 ng |

\* Za SNP 11377C>G korišten je ADIPOQ1, a za SNP 11971G>A ADIPOQ2

PCR je učinjen pod sljedećim uvjetima: 1) denaturacija - 1 ciklus, 60 sec, 95°C; 2) amplifikacija - 25 ciklusa; 1 sec na 95°C, 14 sec na 58°C, 10 sec na 72°C; 3) analiza krivulje taljenja - 1 ciklus; 30 sec na 95°C, 30 sec na 40°C i 0 sec na 80°C ; 4) hlađenje - 1 ciklus, 30 sec na 40°C

Na temelju temperature taljenja moguće je ciljano otkrivanje promjena u slijedu nukleotida u DNA, uključujući i promjene u samo jednom nukleotidu - SNP. Genotipizacija se provodi tako da rezultati analize u obliku krivulja temperature taljenja, u kompjutorskom programu preračunavaju u prve negativne derivacije promjene florescencije s temperaturom iz čijih se vršnih vrijednosti zatim analizira genotip analiziranog uzorka. (Slika 2, Tablica 2.)

|  |
| --- |
| a) |
| H:\PROJEKT\Vanja i Mislav\SNP 1.jpg  G/A  C/C  G/G |
| b)  G/G  A/A |
| H:\PROJEKT\Vanja i Mislav\SNP 10.jpg  G/A |
| Slika 2. Krivulje taljenja: a) kod polimorfizma -11377C>G, b) kod polimorfizma -11391G>A. Temperature – temperatura u °C, Fluorescence - fluorescencija |

Tablica 2. Genotipizacija na temelju temperature taljenja (Tm)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Genotip | Tm |  | Genotip | Tm |
| -11377C>G | CC | 65°C | 11391G>A | GG | 67°C |
|  | CG | 59°C/65°C |  | GA | 60°C/67°C |
|  | GG | 59°C |  | AA | 60°C |

Tm – temperature taljenja

**d) Statistička analiza**

U statističkoj analizi korištene su deskriptine i analitičke statističke metode. Prikazani su postoci za kategorijske varijable, srednja vrijednost i standardna devijacija za kontinuirane varijable, ili pak medijan i interkvartilni raspon (25. i 75. percentil), ako distribucija nije bila normalna. Pravilnost raspodjele numeričke varijabli testirana je D'Agostino-Pearsonovim testom, te su naknadno primjenjeni paramatrijski i neparametrijski statistički testovi. Razlike u razdiobi kategoričkih varijabli i proporcija između skupina testirane su χ2-testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Za testiranje razlika između dviju nezavisnih skupina primjenjen je Studentov t-test ili Mann-Whitney U-test. U usporedbi više od dvije skupine korištena je ANOVA i Turkey ili Hochberg test za post hoc analizu za pravilno raspodjeljene varijable, a za post hoc analizu nepravilno raspodjeljenih varijabli korišten je Kruskal-Wallis test. Primjenjene su multivarijatne metode analize, multipla linearna regresija i logistička regresija. Za analizu korelacije korišten je Pearsonov test.

U svim testovima p-vrijednost<0,05 (dvostrani test) predtavljala je razinu statističke značajnosti. Metodama izračuna veličine uzorka izračunali smo kao potreban najmanji uzorak populacije od 150 ispitanika (α=0,05; β=0,20).

Statistička obrada podataka učinjena je u programu SPSS verzija 17 (IBM Inc., SAD)

**Rezultati**

1. **Testiranje podudarnosti učestalosti alela u uzorku s Hardy-Wenibergovom ravnotežom i neravnotežom povezanosti (LD)**

Istraživani polimorfizmi jednoga nukleotida (SNP) testirani su na odstupanje od Hardy-Wenibergove ravnoteže (HWR) usporedbom opaženih i očekivanih frekvencija genotipova χ2 testom temeljem jednadžbe

http://support.sas.com/documentation/cdl/en/geneug/59659/HTML/default/images/geneug_allele0050.png

Oba istraživana polimorfizma ne odstupaju statistički značajno od HWR, rs266729 (11377C>G) (p=0,78) i rs17300539 (11391G>A) (p=0,60) što upućuje na činjenicu da istraživanoj populacija nisu zamjetni učinci selekcije, genetskog pomaka, mutacije, protoka gena, migracije te da je odabir partnera slučajan (Tablica 3).

Tablica 3. Prikaz izračuna Hardy-Weinbergove ravnoteže za promatrane polimorfizme

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ID broj** | **Položaj** | **Kromosomski položaj** | **HWR χ2 test – p vrijednost** | **Varijanta** | **Minor alel** | **Frekvencija minor alela** |
| **rs266729** | -11377 | 188,042,168 | 0,78 | C 🡪 G | G | 0,30 |
| **rs17300539** | -11391 | 188,042,154 | 0,60 | G 🡪 A | A | 0,04 |

rs266729 = -11377C>G; rs17300539 = -11391G>A; HWR = Hardy-Weinbergova ravnoteža

Između dva polimorfizma postoji značajna neravnoteža povezanosti (engl. *linkage disequlibrium* (LD) (D=0,159, p=0,002).

1. **Usporedba inzulin osjetljivih i inzulin rezistentnih ispitanika s obzirom na temeljna klinička i biokemijska obilježja**

U tablici 4 prikazani su osnovne klinički pokazatelji ispitanika prema inzulinskoj reazistenciji. Ispitanici su podijeljni u dvije skupine inzulin osjetljivi (non-IR) i inzulin rezistentni (IR).

Tablica 4. Osnovni klinički pokazatelji ispitanika razvrstanih prema inzulinskoj rezistenciji

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Pokazatelj** | **Cijela skupina** | **non-IR** | **IR** | **p\*** |
| **N** | 214 | 153 | 61 |  |
| **m/ž** | 74/140 | 99/54 | 41/20 | 0,73 |
| **Dob (godine)** | 44,5 (31,0-54,5) | 41,0 (29,0-50,0) | 53,5 (45,0-63,5) | <0,0001 |
| **ITM (kg/m2)** | 27,0 (23,5-30,4) | 25,9 (22,5-29,0) | 30,4 (28,3-34,5) | <0,0001 |
| **ITM > 25 (%)** | 65 | 57 | 88 | <0,0001 |
| **OS (cm)** | 90,0 (81,0-99,0) | 86,0 (77,0-95,0) | 98,0 (92,0-109,3) | <0,0001 |
| **OS>102 M, >88 cm Ž (%)** | 44 | 32 | 77 | <0,0001 |
| **RRS (mmHg)** | 123,5 (113,5-135,0) | 120,0 (111,0-128,1) | 132,0 (121,0-148,1) | <0,0001 |
| **RRD (mmHg)** | 79,0 (72,5-85,5) | 77,0 (71,4-85,0) | 83,0 (75,4-90,6) | 0,0004 |
| **Srčana frekencija (udar/min)** | 77,0 (70,0-85,0) | 75,5 (68,4-84,6) | 78,0 (72,5-85,4) | 0,06 |

\*p-vrijednost dobivena je usporedbom non-IR vs. IR

Inzulin rezistentni ispitanici bili su stariji, imali su viši ITM, veće vrijednosti opsega struka, viši sistolički i dijastolički arterijski tlak te granično višu srčanu frekvenciju.

Inzulin rezistentni i inzulin nerezistentni ispitanici uspoređeni su s obzirom na vrijednosti biokemijskih parametara, kolesterola, glukoze, inzulina i dr.

Tablica 5. Osnovni biokemijski pokazatelji ispitanika razvrstanih prema inzulinskoj rezistenciji

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Pokazatelj** | **Cijela skupina** | **non-IR** | **IR** | **p\*** |
| **Ukupni kolesterol (mmol/L)** | 5,6  (4,8-6,9) | 5,5  (4,7-6,1) | 6,0  (5,0-6,8) | 0,009 |
| **LDL-kolesterol(mmol/L)** | 3,3  (2,7-4,0) | 3,3  (2,7-3,8) | 3,5  (3,0-4,3) | 0,02 |
| **HDL-kolesterol(mmo/L)** | 1,5  (1,3-1,8) | 1,6  (1,3-1,8) | 1,4  (1,3-1,7) | 0,07 |
| **Trigliceridi (mmol/L)** | 1,2  (0,9-1,9) | 1,0  (0,8-1,6) | 1,8  (1,2-2,3) | <0,0001 |
| **Glukoza (mmol/L)** | 5,2  (4,8-5,7) | 5,1  (4,8-5,4) | 5,9  (5,4-6,5) | <0,0001 |
| **Inzulin (µU/mL)** | 8,7  (5,9-12,8) | 6,8  (5,3-9,1) | 16,1  (13,7-23,1) | <0,0001 |
| **HOMA-IR** | 1,9  (1,8-3,1) | 1,6  (1,2-2,1) | 4,4  (3,6-6,5) | <0,0001 |
| **eGFR (mL/min)** | 126,5  (88,2-148,3) | 129,4  (89,3-151,6) | 120,9  (78,5-139,3) | 0,08 |
| **ACR (mg/g)** | 3,9  (2,7-6,5) | 3,5  (2,6-6,1) | 4,8  (3,1-10,2) | 0,007 |
| **Adiponektin (mg/L)** | 9,3  (5,5-13,5) | 9,7  (5,5-14,4) | 8,2  (5,9-12,1) | 0,001 |
| **Leptin (µg/L)** | 8,9  (4,0-15,4) | 7,6  (3,5-13,9) | 12,1  (6,2-18,0) | 0,001 |
| **Adiponektin/leptin (g/mg)** | 1,0  (0,6-2,6) | 1,4  (1,0-1,8) | 0,7  (0,4-1,1) | 0,0001 |
| **CRP (mg/L)** | 1,7  (0,7-3,3) | 1,2  (0,6-2,2) | 2,3  (1,6-4,3) | 0,0004 |

\*p-vrijednost dobivena je usporedbom non-IR vs. IR

Kao što se vidi iz tablice 5 inzulin rezistentni ispitanici su imali više vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida, glukoze u krvi, inzulina, HOMA-IR, ACR, CRP i leptina, a niže vrijednosti adiponektina i omjera adiponektin/leptin. Nismo našli razlike u koncentraciji HDL-kolesterola i eGFR.

1. **Usporedba distribucije genotipova s obzirom na antropometrijske, kliničke i biokemijske parametre**

Kada smo promatrali učestalost genotipova utvrdili smo da je kod polimorfizma -11377C>G najčešći genotip C/C (N=103; 50%), zatim C/G (N=84; 41%) te G/G (N=19; 9%), dok je raspodjela frekvencija genotipa u polimorfizmu -11391G>A: G/G (N=182; 89%), a G/A (N=22; 11%), a genotip A/A nije bio prisutan ni u jednog ispitanika. Učestalosti pojedinih genotipova su kod žena bile: C/C (N=68; 51%), zatim C/G (N=55; 41%) te G/G (N=11; 8%) za polimorfizam -11377C>G te G/G (N=114; 86%) i G/A (N=18; 14%) za polimorfizam -11391G>A. Kod muškaraca je raspodjela bila sljedeća: C/C (N=34; 49%), C/G (N=28; 40%) te G/G (N=8; 11%), za polimorfizam -11377C>G dok je raspodjela frekvencija genotipa u polimorfizmu -11391G>A: G/G (N=66; 94%) i G/A (N=4; 6%). Među spolovima nisu postojale statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova obaju polimorfizama (p>0,05).

Nismo našli razlike u raspodjeli genotipova polimorfizama u skupinama ispitanika razvrstanim ovisno o arterijskom tlaku (normotenzivni vs. visokonormalni vs. neliječeni hipertenzivni), inzulinskoj osjetljivosti (inzulin osjetljivi vs. rezistentni), pretilosti (ITM ≤ 25 vs. > 2) i opsegu struka (normalan vs. patološki) (p>0,05). Jedina značajna razlika bila je u raspodjeli -11377C>G na način da je genotip C/G bio statistički značajno češći u inzulin rezistentnih (p=0,04). Također nije bilo razlika niti u osnovnim kliničkim i laboratorijskim pokazateljima između različitih genotipova oba polimorfizma, osim u genotipu G/A polimorfizma -11391G>A koji je imao značajno više vrijednosti plazmatskog adiponektina u odnosu na genotip G/G istog polimorfizma (14,2; iqr: 11,0-22,2 vs. 10,3; iqr: 6,3-14,8, p=0,04) (Slika 3.).

|  |  |
| --- | --- |
| p=0,20 | p=0,04 |
| Slika 2. Usporedba koncentracije adiponektina i genotipa pojedinog SNP.  Lijevo – ADIPOQ SNP -11377C>G. Desno – ADIPOQ SNP -11391G>A. | |

1. **Multivarijatna analiza podataka**

Multiplom regresijom pokušali smo istodobno procijeniti djelovanje prediktora i proučiti njihov utjecaj na zavisnu varijablu - visinu HOMA-IR(Tablica 6)**.** Prediktori koji su statistički značajno i pozitivno povezani s ishodom su sistolički arterijski tlak (p<0,0001), opseg struka (p=0,0006) i leptin (p=0,02), dok je koncentracija plazmatskog adiponektina negativno i statistički značajno (p=0,04) povezana s visinom HOMA-IR. Jednadžba regresije glasi:

HOMA-IR = – 4,92 + 0,039 x RRS + 0,030 x OS – 0,030 x Adipo + 0,028 x Lept

Tablica 6. Multipla regresijska analiza za inzulinsku rezistenciju (HOMA-IR)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nezavisne varijable | Koeficijent regresije (β) | Standardna pogreška | p |
| (Konstanta) | -4,92 |  |  |
| Sistolički tlak  (RRS) | 0,039 | 0,007 | <0,0001 |
| Opseg struka  (OS) | 0,030 | 0,009 | 0,0006 |
| Adiponektin  (Adipo) | -0,030 | 0,015 | 0,04 |
| Leptin  (Lept) | 0,028 | 0,012 | 0,02 |

Logističkom regresijom testiran je utjecaj genotipova promatranih polimorfizama na rizik za razvoj inzulinske rezistencije. Utvrdili smo da genotip C/G polimorfizma -11377C>G u skupini inzulin rezistentnih ima omjer šansi (engl. *odds ratio*, OR) za nastanak inzulinske rezistencije 2,05 (95% interval pouzdanosti (engl. *confidence interval,* CI) 1,08-3,9; p=0,03) u odnosu na najčešći genotip istog polimorfizma C/C (Tablica 7.). Niti jedan genotip polimorfizma -11391G>A nije pokazivao statistički značajan omjer šansi za razvoj inzulinske rezistencije (p>0,05).

Tablica 7. Logistička regresija za inzulinsku rezistencije i SNP -11377C>G

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Inzulin rezistentni |  | Stand. pogreška | Wald | d.f. | p | OR | 95 % CI za OR  Donja Gornja | |
| Odsječak | -1,234 | ,237 | 27,124 | 1 | 0,0 |  |  |  |
| G/G | -0,440 | ,672 | ,428 | 1 | 0,51 | 0,644 | 0,172 | 2,405 |
| C/G | 0,717 | ,328 | 4,773 | 1 | 0,03 | 2,048 | 1,076 | 3,895 |
| C/C | 0c | . | . | 0 | . | . |  |  |

β – koeficijent regresije; Wald – Waldov test; d.f. stupnjevi slobode (engl. *degrees of freedom*)

Osim različitih genotipova promatranih polimorfizama, proučavali smo i pojedine diplotipove, odnosno kombinacije genotipova oba SNP-a zajedno u istog ispitanika. Kod ispitanika su registrirani sljedećih 5 diplotipova (prvo je naveden genotip SNP -11377C>G, a zatim genotip SNP -11391G>A): 1. C/C-G/G (N=82; 42%), 2. C/C-G/A (N=16; 8%), 3. C/G-G/G (N=74; 37%), 4. C/G-G/A (N=6; 3%), 5. G/G-G/G (N=19; 10%). Nije postojala razlika u raspodijeljenosti različitih diplotipova po spolovima (p>0,05). Logističkom regresijom utvrdili smo da diplotip C/G-G/G ima omjer šansi za nastanak inzulinske rezistencije 2,66 (95% CI 1,30-5,46; p=0,008) u odnosu na najčešći diplotip C/C-G/G (Tablica 8.). Takvu statistički značajnu povezanost nismo našli niti za jedan diplotip kada smo promatrali ITM > 25, arterijski tlak > 130/85 mmHg i patološki opseg struka (p>0,05).

Tablica 8. Logistička regresija za inzulinsku rezistenciju i diplotipove -11377C>G i -11391G>A

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Inzulin rezistentni | β | Stand. pogreška | Wald | d.f. | p | OR | 95 % CI za OR  Donja Gornja | |
| Odsječak | -1,417 | 0,279 | 25,860 | 1 | 0,00 |  |  |  |
| C/C-G/A | 0,906 | 0,587 | 2,385 | 1 | 0,12 | 2,475 | 0,784 | 7,817 |
| C/G-G/G | 0,978 | 0,367 | 7,115 | 1 | 0,008 | 2,658 | 1,296 | 5,453 |
| C/G-G/A | 0,724 | 0,910 | 0,633 | 1 | 0,43 | 2,062 | 0,347 | 12,268 |
| G/G-G/G | -0,257 | 0,688 | 0,139 | 1 | 0,71 | 0,773 | 0,201 | 2,979 |
| C/C-G/G | 0b | . | . | 0 | . | . | . | . |

β – koeficijent regresije; Wald – Waldov test; d.f. stupnjevi slobode (engl. *degrees of freedom*)

**RASPRAVA**

Pretilost i inzulinska rezistencija prepoznati su kao bitni čimbenici rizika za nastanak metaboličkog sindroma, šećerne bolesti tip 2 i arterijske hipertenzije. Unatoč brojnim istraživanjima točan molekularni mehanizam inzulinske rezistencije još nije posve razjašnjen. Jedan od čimbenika koji je u fokusu naročito zadnjih godina jest adiponektin, tj. njegova koncentracija u krvi. Ona je ovisna o brojnim čimbenicima, a jedno od važnijih objašnjenja se nalazi u genskoj podlozi. Analizirana je povezanost između raznih polimorfizama *ADIPOQ* gena i koncetracije adiponektina s inzulinskom rezistencijom (22, 39). Ta istraživanja su često kontradiktorna i razlikuju se ovisno o karakteristikama ispitivane populacije. U našoj populaciji srednje vrijednosti adiponektina iznosile su 9,3 mg/L što je sukladno podacima dobivenim u Framinghamskoj studiji gdje su također analizirane vrijednosti u općoj populaciji i bile su 10 mg/L (22). Nasuprot tim rezultatima, studija koju su proveli von Eynatten i suradnici u populaciji osoba s koronarnom srčanom bolesti pokazala je da su među tim bolesnicima razine adiponektina znatno niže i iznose 4,8 mg/L (40). Također su Hotta K i suradnici registrirali niže razine u populaciji oboljelih od šećerne bolesti tipa 2 - 6,6 mg/L, dok je Iwashima Y sa suradnicima odredio niske koncetracije adiponektina od 5,2 mg/L u populaciji hipertoničara (21), (13).

Naša skupina ispitanika razlikuje se od većine ostalih ispitivanja po mlađoj dobi (45 godina; iqr: 31-55), izostanku kardiovaskularnih komplikacija, nižim vrijednostima sistoličkog i dijastoličkog arterijskog tlaka (124/79 mmHg) i višoj procjenjenoj glomerularnoj filtraciji (eGFR < 60 mL/min/1,73 m2 je bio isključujući čimbenik). Naši ispitanici su osobe s normalnim arterijskim tlakom ili novootkrivenom hipertenzijom što govori u prilog tomu da se nalaze na početku kardiometaboličkog kontinuuma. U našoj skupini osobe s inzulinskom rezistencijom imale su sva obilježja metaboličkog sindroma kao što je prikazano u tablicama 4 i 5. Kod njih su vrijednosti adiponektina i omjera adiponektin/leptin bile značajno više od inzulin osjetljivih ispitanika (p<0,001).

U ovom radu odabrali smo dva polimorfizma promotorske regije tog gena, -11377C>G i -11391G>A koji su dosadašnjim istraživanjima pobudili najviše interesa. Izračunom smo dobili da su oba polimorfizma u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (p=0,78 za -11377C>G i p=0,60 za -11319G>A) te da među njima postoji značajna neravnoteža vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD) (p=0,002). Time smo, uz fenotipski dobro određenu skupinu osigurali validnost rezultata.

U *The Framingham Offspring Study* u kojoj je bilo uključeno 2543 ispitanika analizirana je povezanost varijanti *ADIPOQ* gena s razinama adiponektina i razvojem šećerne bolesti tip 2. Između ostalih, analizirali su i polimorfizme koji su predmet našeg istraživanja. Prema njihovim rezultatima minor alel A polimorfizma -11391G>A značajno je povezan s visokim razinama adiponektina dok za -11377C>G nisu uspjeli pronaći takvu povezanost. Smatraju da je mehanizam kojim minor alel A dovodi do povećane koncentracije adiponektina poticanje transkripcije (22). Njihovi rezultati su sukladni sa zaključkom meta-analize koju su proveli Menzaghi i suradnici (41). Naši rezultati sukladni su ovim rezultatima i zaključcima što govori dodatno u prilog takvom učinku alela A. U našoj skupini su osobe s G/A genotipom polimorfizma -11391G>A imale značajno više vrijednosti plazmatskog adiponektina u odnosu na osobe s G/G genotipom. Što se tiče polimorfizma -11377C>G, nismo uspjeli pronaći nikakvu povezanost s koncentracijama adiponektina. To je u suprotnosti s rezultatima Vasseura i suradnika prema kojima je taj polimorfizam povezan s nižim razinama adiponektina što se može objasniti obilježjima promatranih populacija (14). Naime, našu skupinu ispitanika činile su osobe s malim kardiovaskularnim rizikom i eGFR > 60 ml/min/1,73m2 za razliku od Vasseura i sur. koji su analizirali pretile osobe oboljele od šećerne bolesti tipa 2. Međutim, pronašli smo da se genotip C/G polimorfizma -11377C>G pojavljuje statistički značajno češće u inzulin rezistentnih (OR = 2,05). Slično se pokazalo u opsežnoj meta analizi koju su proveli Han L.Y. i suradnici prema kojoj osobe s tim genotipom imaju za 12% veći rizik razvoja šećerne bolesti tip 2 (OR=1,12) (34).

U ovom radu logističkom regresijom smo dakle dokazali da je rizik razvoja inzulinske rezistencije 2,05 puta (za 105%) veći u osoba s genotipom C/G polimorfizma 11377C>G, nego u osoba s najčešćim genotipom toga polimorfizma C/C što je u skladu s rezultatima iz literature (34). Kada smo dodatno promatrali oba polimorfizma dokazali smo da osobe s genotipom C/G polimorfizma -11377C>G koje uz to još imaju i genotip G/G polimorfizma -11391G>A imaju još veći rizik koji iznosi 2,66 puta (za 166%) više u usporedbi s najčešćim diplotipom, a to je C/C-G/G. Takav rizik veći je od pojedinačnog rizika bilo kojeg od ta dva genotipa, a genotip G/G polimorfizma -11391G>A u našoj skupini čak sam i ne utječe značajno na rizik razvoja inzulinske rezistencije. Slične podatke nismo našli u nama dostupnoj literaturi, a ovi rezultati ukazuju na potrebu promatranja međudjelovanja više različitih polimorfizama u iste osobe. Zbog kompleksnosti mehanizama uključenih u nastanak inzulinske rezistencije, metaboličkog sindroma, šećerne bolesti tip 2 i arterijske hipertenzije nužno je uvijek analizirati polimorfizme više gena uključenih u pojedine mehanizme. Tome u prilog govori upravo i ovaj amplificirajući učinak koji smo opazili analizirajući samo dva polimorfizma tj. SNP-a gena za adiponektin. Također je važno znati i navoditi u kojoj populaciji, tj. u kojoj fazi kardiovaskularnog kontinuuma se određeni polimorfizmi analiziraju, a dobiveni rezultati ne bi se smjeli ekstrapolirati na druge skupine ispitanika i bolesnike. Kao svako presječno istraživanje i ovo naše presječno istraživanje je ograničeno samim dizajnom budući da ne možemo znati učinak koji će u ovom slučaju određeni polimorfizam *ADIPOQ* gena imati na klinički tijek te konačne posljedice inzulinske rezistencije. No budući da postoje podaci svih ispitanika bit će moguće pratiti klinički tijek većine ispitanika te će rezultati ovog istraživanja biti dobra početna točka. Sljedeći nedostatak ovog rada je manji broj ispitanika, ali broj ispitanika niti u većine drugih radova s kojima smo uspoređivali naše podatke nije bio bitnije drugačiji, nego čak u velikom broju istraživanja i manji od našega.

**ZAKLJUČCI**

1. Osobe s niskim kardiovaskularnim rizikom i genotipom C/G polimorfizma -11377C>C (rs266729) imaju 2,05 puta veći rizik za razvoj inzulinske rezistencije u usporedbi s osobama s najčešćim genotipom istog polimorfizma C/C.

2. Polimorfizam -11391G>A (rs17300539) u osoba s niskim kardiovaskularnim rizikom ne utječe na rizik razvoja inzulinske rezistencije.

3. U osoba koje imaju genotip C/G polimorfizma -11377C>G, a uz to i genotip G/G polimorfizma -11377G>A (diplotip C/G-G/G) rizik razvoja inzulinske rezistencije je povećan 2,66 puta više nego u osoba s najčešćim diplotipom C/C-G/G. Polimorfizam -11391G>A sam ne utječe na rizik razvoja inzulinske rezistencije, ali u međudjelovanju s -11377C>G značajno povisuje rizik što ukazuje na potrebu promatranja međudjelovanja različitih polimorfizama.

4. Osobe s genotipom G/A imaju statistički značajno više vrijednosti plazmatske koncentracije adiponektina nego osobe s genotipom G/G polimorfizma -11391G>A.

5. Sistolički arterijski tlak, opseg struka i koncentracija leptina su pozitivni, a koncentracija adiponektina je negativni prediktori nastanka inzulinske rezistencije su osoba s niskim kardiovaskularnim rizikom i urednom bubrežnom funkcijom.

**ZAHVALA**

Zahvaljujemo mentorici prof.dr.sc. Nadi Čikeš, ing. Karolini Petrović, prof.dr.sc. Nadi Božini, doc.dr.sc. Zrinki Biloglav i dipl. ing. Tamari Božini na pomoći u izradi ovoga rada.

**POPIS LITERATURE**

1. Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. Diabetes Care. 1999;22(2):345-54.

2. Gavrila A, Chan JL, Yiannakouris N i sur. Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. J Clin Endocrinol Metabol 2003;88(10):4823-31.

3. Beck-Nielsen H, Hother-Nielsen O, Vaag A, Alford F. Pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the role of skeletal muscle glucose uptake and hepatic glucose production in the development of hyperglycaemia. A critical comment. Diabetologia. 1994;37(2):217-21.

4. Goldstein BJ. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol. 2002;90(5A):3G-10G.

5. Laakso M, Edelman SV, Olefsky JM, Brechtel G, Wallace P, Baron AD. Kinetics of in vivo muscle insulin-mediated glucose uptake in human obesity. Diabetes. 1990;39(8):965-74.

6. Tsuchihashi K, Hikita N, Hase M, Agata J, Saitoh S, Nakata T, et al. Role of hyperinsulinemia in atherosclerotic coronary arterial disease: studies of semi-quantitative coronary angiography. Intern Med. 1999;38(9):691-7.

7. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, et al. Insulin resistance in essential hypertension.New Engl J Med. 1987;317(6):350-7.

8. Iimura O. Insulin resistance and hypertension in Japanese. Hypertens Res 1996;19 Suppl 1:S1-8.

9. Murakami H, Ura N, Furuhashi M, Higashiura K, Miura T, Shimamoto K. Role of adiponectin in insulin-resistant hypertension and atherosclerosis. Hypertens Res. 2003;26(9):705-10.

10. Hopkins TA, Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Adiponectin actions in the cardiovascular system. Cardio Vasc Res. 2007;74(1):11-8.

11. Wiecek A, Adamczak M, Chudek J. Adiponectin--an adipokine with unique metabolic properties. Nephrol Dial Transplant. 2007;22(4):981-8.

12. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999;257(1):79-83.

13. Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K, et al. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. Hypertension. 2004;43(6):1318-23.

14. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. Hum Molecul Genet. 2002;11(21):2607-14.

15. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. Diabetologia. 2003;46(4):459-69.

16. Papadopoulos DP, Makris TK, Krespi PG, Poulakou M, Stavroulakis G, Hatzizacharias AN, et al. Adiponectin and resistin plasma levels in healthy individuals with prehypertension. J Clin Hypertens (Greenwich). 2005;7(12):729-33.

17. Snijder MB, Heine RJ, Seidell JC, Bouter LM, Stehouwer CD, Nijpels G, et al. Associations of adiponectin levels with incident impaired glucose metabolism and type 2 diabetes in older men and women: the hoorn study. Diabetes Care. 2006;29(11):2498-503.

18. Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. Clin Chim Acta. 2007;380(1-2):24-30.

19. Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. Diabetes Care. 2006;29(6):1357-62.

20. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. J Biol Chem. 2006;281(5):2654-60.

21. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(6):1595-9.

22. Hivert MF, Manning AK, McAteer JB, Florez JC, Dupuis J, Fox CS, et al. Common variants in the adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits: the Framingham Offspring Study. Diabetes. 2008;57(12):3353-9.

23. Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, et al. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin.Int J Obes Relat Metab Disord 2000;24(7):861-8. Epub 2000/08/05.

24. Vasseur F, Lepretre F, Lacquemant C, Froguel P. The genetics of adiponectin.Curr Diab Rep. 2003;3(2):151-8.

25. Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K, James RG, et al. Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome.Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(26):14478-83.

26. Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24.Am J Hum Genet. 2000;67(6):1470-80.

27. Rainwater DL, Almasy L, Blangero J, Cole SA, VandeBerg JL, MacCluer JW, et al. A genome search identifies major quantitative trait loci on human chromosomes 3 and 4 that influence cholesterol concentrations in small LDL particles.Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(3):777-83.

28. Chiodini BD, Lewis CM. Meta-analysis of 4 coronary heart disease genome-wide linkage studies confirms a susceptibility locus on chromosome 3q.Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(10):1863-8.

29. Ling H, Waterworth DM, Stirnadel HA, Pollin TI, Barter PJ, Kesaniemi YA, et al. Genome-wide linkage and association analyses to identify genes influencing adiponectin levels: the GEMS Study. Obesity (Silver Spring). 2009;17(4):737-44.

30. Heid IM, Henneman P, Hicks A, Coassin S, Winkler T, Aulchenko YS, et al. Clear detection of ADIPOQ locus as the major gene for plasma adiponectin: results of genome-wide association analyses including 4659 European individuals. Atherosclerosis. 2010;208(2):412-20.

31. Bouatia-Naji N, Meyre D, Lobbens S, Seron K, Fumeron F, Balkau B, et al. ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity. Diabetes. 2006;55(2):545-50.

32. Gu HF. Biomarkers of adiponectin: plasma protein variation and genomic DNA polymorphisms. Biomarker insights. 2009;4:123-33.

33. Gable DR, Matin J, Whittall R, Cakmak H, Li KW, Cooper J, et al. Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. Ann Hum Genet. 2007;71(Pt 4):453-66.

34. Han LY, Wu QH, Jiao ML, Hao YH, Liang LB, Gao LJ, et al. Associations between single-nucleotide polymorphisms (+45T>G, +276G>T, -11377C>G, -11391G>A) of adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetologia. 2011;54(9):2303-14.

35. Siitonen N, Pulkkinen L, Lindstrom J, Kolehmainen M, Eriksson JG, Venojarvi M, et al. Association of ADIPOQ gene variants with body weight, type 2 diabetes and serum adiponectin concentrations: the Finnish Diabetes Prevention Study.BMC Med Genet. 2011;12:5.

36. Lean ME, Han TS, Morrison CE. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. BMJ. 1995;311(6998):158-61.

37. Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ, et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. Blood Press. 2009;18(6):308-47.

38. S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16 (1988) 1215.

39. Lu JY, Huang KC, Chang LC, Huang YS, Chi YC, Su TC, et al. Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond.J Biomed Sci. 2008;15(5):565-76.

40. von Eynatten M, Schneider JG, Humpert PM, Kreuzer J, Kuecherer H, Katus HA, et al. Serum adiponectin levels are an independent predictor of the extent of coronary artery disease in men.J Am Coll Cardiol. 2006;47(10):2124-6.

41. Menzaghi C, Trischitta V, Doria A. Genetic influences of adiponectin on insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. Diabetes. 2007;56(5):1198-209.

**SAŽETAK**

Mislav Jelaković, Vanja Ivković

**PROCJENA RIZIKA POLIMORFIZAMA -11377C>G I -11391G>A GENA *ADIPOQ***

**ZA POJAVU INZULINSKE REZISTENCIJE KOD OSOBA S NISKIM KARDIOVASKULARNIM RIZIKOM**

Polimorfizmi *ADIPOQ* gena -11377C>G i -11391G>A povezani su s koncentracijom adiponektina te posljedično s inzulinskom rezistencijom (IR), metaboličkim sindromom, šećernom bolesti tip 2 i kardiovaskularnim bolestima. Naš cilj bio je analizirati povezanost ovih polimorifzama s vrijednostima adiponektina i IR u osoba s niskim kardiovaskularnim rizikom.

U istraživanje su uključene 214 odrasle osobe bez pozitivne anameze za kardiovaskularnu, šećernu i bubrežnu bolest te nisu bili liječeni zbog hipertenzije.

Klinički i laboratoroijski podaci dobiveni su rutinskim postupcima i metodama, a polimorfizam gena određen je PCR metodom.

Genotip C/G (-11377C>G) povezan je s 2,05 puta većim rizikom za nastanak IR. Nismo uočili povezanost polimorfizma -11391G>A s IR. Kod osoba s diplotipom C/G-G/G rizik razvoja IR 2,66 puta je veći nego u osoba s najčešćim diplotipom C/C-G/G. Sistolički arterijski tlak, opseg struka i koncentracija leptina su pozitivni, a koncentracija adiponektina je negativni prediktor nastanka IR u osoba s niskim kardiovaskularnim rizikom i urednom bubrežnom funkcijom. Naši rezultati ukazuju kako polimorfizmi *ADIPOQ* gena utječu na koncentraciju adiponektina i IR u osoba s niskim kardiovaskularnim rizikom.

Ključne riječi: adiponektin, *ADIPOQ*, inzulinska rezsitencija, kardiovaskularni rizik

**SUMMARY**

Mislav Jelaković, Vanja Ivković

**ASSESSMENT OF RISK FOR INSULIN RESISTANCE FOR *ADIPOQ* GENE POLYMORPHISMS -11377C>G AND -11391G>A IN PERSONS WITH LOW CARDIOVASCULAR RISK**

Polymorphisms -11377C>G and -11391G>A of *ADIPOQ* gene are related to adiponectin concentrations and insulin resistance (IR), metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2 and cardiovascular diseases. Our goal was to analyze relationship of these polymorphisms with adiponectin values and IR in persons with low cardiovascular risk.

We included 214 adults with negative history for cardiovascular disease, diabetes and kidney disease and untreated hypertensives.

Clinical and laboratory data was obtained by routine methods and polymorphism was obtained with PCR.

Genotype C/C (-11377C>G) was reated with 2,05 times greater risk for developing IR. No relationship was noted between -11391G>A and IR. In persons with diplotype C/G-G/G risk for developing IR was 2,66 times greater than in persons with most common diplotype C/C-G/G. Systolic blood pressure, waist circumference and leptin concentrations were positive, and adiponectin concentrations were negative predictor of IR development in persons with low cardiovascular risk and normal kidney function. Our results show that *ADIPOQ* gene polymorphisms are related to adiponectin concentrations and IR in persons with low cardiovascular risk.

Key words: adiponectin, ADIPOQ, insulin resistance; cardiovascular risk