

Usporedba pokazatelja metaboličkog sindroma : uloga oksidativnog oštećenja deoksiribonukleinske kiseline

Rogulj, Dinko

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:848709>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Dinko Rogulj

**USPOREDBA POKAZATELJA METABOLIČKOG
SINDROMA: ULOGA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA
DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE**

Doktorska disertacija

Split, 2012.

Ovaj rad je izrađen u Poliklinici „Sunce“ i Institutu za medicinska istraživanja u Zagrebu.

Voditelj rada: prim. dr. sc. Spomenka Ljubić, viši znanstveni suradnik.

Zahvaljujem mentorici, prim. dr. sc. Spomenki Ljubić za pomoć u izradi ove disertacije.

Mnogo ljudi mi je pomoglo na različite načine: prije svega moji prijatelji, doc. dr. sc. Ana-Marija Domijan, koja je organizirala laboratorijske pretrage, dr. sc. Paško Konjevoda, koji je izvršio statističku obradu rezultata i prof. Žarko Gazzari, koji je lektorirao tekst.

Također zahvaljujem znanstvenicima koji su mi poslali kopije svojih članaka i dali vrijedne sugestije, kolegama i laboratorijskom osoblju Poliklinike „Sunce“ u Zagrebu te ispitanicima koji su dragovoljno sudjelovali u ovom istraživanju.

I prof. dr. sc. Mladen Petrovečki je zaslužan za realizaciju ovoga djela.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Metabolički sindrom.....	1
1.1.1	Definicija metaboličkog sindroma.....	1
1.1.2	Kriteriji za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma.....	1
1.1.3.	Inzulinska rezistencija.....	2
1.1.3.1.	Definicija inzulinske rezistencije.....	2
1.1.3.2.	Prijenos inzulinskog signala.....	2
1.1.3.3.	Uzroci i mehanizmi nastanka inzulinske rezistencije.....	4
1.1.4.	Abdominalna pretilost i patološko nakupljanje masnoća.....	5
1.1.4.1	Nakupljanje masnoća u metaboličkom sindromu.....	5
1.1.4.2.	Karakteristike masnoga tkiva u metaboličkom sindromu.....	6
1.1.4.3	Potkožno masno tkivo i metabolički sindrom.....	7
1.1.4.4	Ektopično odlaganje masnoća.....	7
1.1.4.5	Metode mjerenja masnoga tkiva.....	8
1.1.5.	Kronična upala u metaboličkom sindromu.....	9
1.1.5.1.	Povijesni pregled povezanosti upale i metaboličkog sindroma.....	9
1.1.5.2	Mehanizmi aktivacije kronične upale u metaboličkom sindromu.....	9
1.1.5.3	Proizvodi ciljnih gena NFκB.....	13
1.2.	Oksidativni stres.....	16
1.2.1.	Molekularni kisik i oksidativna fosforilacija.....	16
1.2.2.	Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi.....	16
1.2.3.	Mjesta i mehanizmi stvaranja reaktivnih spojeva.....	17
1.2.3.1.	Mitohondriji.....	17
1.2.3.2.	Nikotin adenin dinukleotid fosfat oksidaza.....	18
1.2.3.3.	Mijeloperoksidaza.....	18
1.2.3.4.	Ksantin oksidoreduktaza.....	19
1.2.3.5	Sintaze dušikova oksida.....	19
1.2.3.6.	Endoplazmatska mrežica.....	20
1.2.3.7.	Ostali izvori reaktivnih spojeva u stanici.....	20
1.2.4.	Funkcijski učinci reaktivnih spojeva.....	21
1.2.5.	Mehanizmi zaštite od štetnih učinaka reaktivnih spojeva.....	21
1.2.6	Oksidativni stres.....	22
1.2.7..	Stanična oštećenja izazvana reaktivnim spojevima.....	23
1.2.7.1.	Oksidativno oštećenje lipida.....	23
1.2.7.2.	Oksidativno oštećenje proteina.....	24
1.2.7.3.	Oksidativno oštećenje DNA.....	24
1.2.7.4.	Mutacije genoma.....	27
1.2.8.	Stanična senescencija i adaptivni odgovor na oštećenje DNA.....	27
1.2.9.	Stanična apoptoza.....	29

1.3.	Povezanost metaboličkog sindroma i oksidativnog stresa.....	29
1.4.	Bolesti povezane s metaboličkim sindromom.....	31
1.4.1.	Arterijska hipertenzija.....	31
1.4.2.	Zatajivanje srca.....	31
1.4.3.	Koronarna bolest.....	32
1.4.4.	Šećerna bolest tipa II.....	32
1.4.5.	Neurodegenerativne bolesti.....	34
1.4.6.	Metabolički sindrom i karcinogeneza.....	34
1.5.	Nealkoholna masna jetra.....	38
1.6.	Skeletni mišići i metabolički sindrom.....	41
1.6.1.	Inzulinska rezistencija u skeletnim mišićima.....	41
1.6.2.	Upala i oksidativni stres u skeletnim mišićima.....	42
1.6.3.	Miokini.....	42
1.6.4.	Povoljan učinak mišićne aktivnosti na inzulinsku rezistenciju i metabolički sindrom....	44
1.6.5.	Povezanost mišićne mase s metaboličkim sindromom.....	44
1.6.6.	Miosteatoza.....	45
1.7.	Zbirni prikaz međusobnog utjecaja organa i tkiva te upale, oksidativnog stresa i inzulinske rezistencije u metaboličkom sindromu.....	45
2.	CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	47
2.1	Cilj istraživanja.....	47
2.2	Hipoteza istraživanja.....	48
3.	ISPITANICI I POSTUPCI.....	49
3.1.	Ispitanici.....	49
3.2.	Postupci.....	49
3.2.1.	Hematološke i biokemijske pretrage.....	50
3.2.2.	Malondialdehid i glutation.....	50
3.2.3.	Opće i oksidativno oštećenje jezgrene DNA.....	50
3.2.4.	Antropometrijska mjerenja, indeks masne jetre.....	52
3.3	Statistička analiza.....	53
4.	REZULTATI.....	54
4.1.	Deskriptivna statistika i multivarijantni permutacijski test za dvije skupine.....	55
4.2.	Multivarijantna analiza.....	71
4.3.	ROC analiza.....	73

5.	RASPRAVA	77
5.1.	Oksidativno oštećenje jezgrene DNA.....	78
5.2.	Laboratorijski pokazatelji oksidativnog stresa i metaboličkog sindroma.....	81
5.3.	Antropometrijski pokazatelji masnoga tkiva.....	85
5.4.	Indeks masne jetre.....	85
5.5.	Udio mišićne mase.....	88
5.6.	Osobine oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja makromolekula u našem istraživanju.....	89
5.7.	Ograničenja istraživanja.....	92
5.8.	Mogući ciljevi budućih istraživanja	92
6.	ZAKLJUČAK	94
7.	LITERATURA	95
8.	SAŽETAK	110
9.	SUMMARY	111
10.	ŽIVOTOPIS	112

Popis oznaka i kratica:

ADP	- adenozin difosfat
ATP	- adenozin trifosfat
AGE	- uznapredovali proizvodi glikacije (engl. <i>advanced glycation products</i>)
AHA	- <i>American Heart Association</i>
AMPK	- adenozin monofosfat protein kinaza
ALT	- alanin transaminaza
BER	- popravak ekscizijom baza (engl. <i>base excision repair</i>)
BDNF	- <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BMI	- indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i>)
CAP	- <i>c-Cbl-associated protein</i>
CRP	- C-reaktivni protein
DDR	- odgovor DNA na oštećenje (<i>DNA damage response</i>)
DNA	- deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGIR	- Europska skupina za istraživanje inzulinske rezistencije (engl. <i>European Group for the Study of insulin Resistance</i>)
ERK	- <i>extracellular signal-related kinase</i>
FADH ₂	- flavin adenin dinukleotid
FLI	- indeks masne jetre (engl. <i>fatty liver index</i>)
GGT	- gama-glutamil-transferaza
GSH	- reducirani oblik glutationa
GSSH	- oksidirani oblik glutationa (engl. <i>glutathione disulfide</i>)
HDL	- lipoprotein visoke gustoće (engl. <i>high density lipoprotein</i>)
hOGG1	- hidroksigvanin glikozilaza 1 ljudskoga podrijetla (engl. <i>human hydroxyguanine glycosylase 1</i>)
HPLC	- tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography, HPLC</i>)
IDF	- <i>International Diabetes Federation</i>
IGF	- <i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	- <i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IKK	- IκB kinaza
IL	- interleukin
IRS	- supstrat inzulinskog receptora (engl. <i>insulin receptor substrate</i>)
JNK	- <i>Jun N-terminal kinase</i>
LCFA-CoA	- <i>long-chain fatty acyl- CoAs</i>
MAPK	- mitogenima aktivirane proteinske kinaze (engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)

MCP-1	- <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDA	- malondialdehid
MS	- metabolički sindrom
mtDNA	- mitohondrijska DNA
mTOR	- <i>mammalian target of rapamycin</i>
NADH	- nikotin adenin dinukleotid
NADPH	- nikotin adenin dinukleotid fosfat
NAFLD	- nealkoholna masna jetra (engl. <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NASH	- nealkoholni steatohepatitis (engl. <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>)
NCEP-ATP III	- <i>National Cholesterol Education Program- Adult Treatment Panel III</i>
nDNA	- jezgrena DNA (engl. <i>nuclear DNA</i>)
NER	- <i>nucleotide excision repair</i>
NFκB	- nuklearni čimbenik κB (engl. <i>nuclear factor κB</i>)
NHEJ	- nehomogeno spajanje krajeva (engl. <i>non-homogenous end-joining</i>)
NK cells	- stanice prirodne ubojice (engl. <i>natural killer cells</i>)
NKT cells	- T-stanice prirodne ubojice (engl. <i>natural killer T- cells</i>)
PAI-1	- inhibitor aktivatora plazminogena (engl. <i>plasminogen activator inhibitor</i>)
PDK	- <i>1- phosphoinositol-dependent kinase-1</i>
PIP ₂	- fosfatidil inozitol bifosfat
PIP ₃	- fosfatidil inozitol trifosfat
PI 3K	- fosfatidil inozitol-3-kinaza
PTEN	- <i>phosphates and tensin homolog deleted on chromosome</i>
RAGE	- receptori za proizvode uznapredovale glikacije (engl. <i>receptors for advanced glycation products</i>)
RNS	- reaktivni dušikovi spojevi (engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROC	- <i>receiver operating curve</i>
ROS	- reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SAA	- serumski amiloid A
SZO	- Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
TLR	- (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	- čimbenik nekroze tumora (engl. <i>tumor necrosis factor</i>)
tPA	- tkivni aktivator plazminogena (engl. <i>tissue plasminogen activator</i>)
TSC	- <i>tuberous sclerosis complex</i>
VLDL	- lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. <i>very low density lipoprotein</i>)
WHO	- svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
XOR	- ksantin oksidoreduktaza
4-HNE	- 4- hidroksinonenal
8-OHdG	- 8-hidroksi-2-deoksigvanozin
8-oxodG	- 8-okso-2-deoksigvanozin (engl. <i>8-oxo-2-deoxyguanosine</i>)
8-NG	- 8-nitrogvanin

1. UVOD

1. METABOLIČKI SINDROM

1.1.1. Definicija metaboličkog sindroma

Metabolički sindrom (MS) uključuje abdominalni tip debljine, hiperglikemiju, dislipidemiju i hipertenziju, poremećaje koji su vezani uz inzulinsku rezistenciju, a predstavljaju rizik za kardiovaskularne bolesti (1). U zemljama Europske Unije prevalencija metaboličkog sindroma kreće se između 20% do 30% odrasle populacije (2), u Sjedinjenim Američkim Državama iznosila je 34,6% (po kriterijima NCEP), odnosno 39% (po kriterijima IDF) (3). Prevalencija metaboličkog sindroma u Hrvatskoj slična je onoj u zemljama zapadne Europe (2). Broj osoba s metaboličkim sindromom u svijetu je u porastu zbog mijenjanja prehrambenih navika, sjedilačkog načina života i starenja populacije (4). MS se intenzivno istražuje, a važni čimbenici njegova nastanka i razvoja njegovih komplikacija su inzulinska rezistencija, patološka pretilost, kronična upala i oksidativni stres (5).

1.1.2. Kriteriji za postavljanje dijagnoze metaboličkog sindroma

Do sada je predloženo više definicija za dijagnozu MS, od kojih je u praktičnoj uporabi najviše ona Američkog nacionalnog programa edukacije o kolesterolu (*US National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*, kratica NCEP-ATP III) (6) i definicija Međunarodne federacije za dijabetes (*International Diabetes Federation*, kratica IDF) (7).

Kriteriji za dijagnozu metaboličkog sindroma po NCEP-ATP III

- središnja pretilost: opseg struka ≥ 102 cm (muškarci), ≥ 88 cm (žene)
- vrijednost triglicerida ≥ 1.7 mmol/L (150 mg/dl)
- snižene vrijednosti HDL-kolesterola: HDL-C $< 1,04$ mmol/L (muškarci), $< 1,29$ mmol/L (žene)
- krvni tlak $\geq 130/85$ mmHg
- glukoza natašte ≥ 6.1 mmol/L (110 mg/dl)

Kriteriji za dijagnozu metaboličkog sindroma po IDF

- središnja pretilost: opseg struka ≥ 94 cm (muškarci), ≥ 80 cm (žene)

+ najmanje 2 sljedeća kriterija:

- vrijednost triglicerida ≥ 1.7 mmol/L (150 mg/dl)
- snižena vrijednosti HDL-kolesterola: HDL-C $< 0,9$ mmol/L (muškarci), $< 1,1$ mmol/L (žene)
- krvni tlak $\geq 130/85$ mmHg ili medikamentozna terapija krvnog tlaka
- glukoza natašte ≥ 6.1 mmol ili od ranije dijagnosticirana šećerna bolest tipa II ili oštećena tolerancija glukoze.

Rjeđe korištene definicije MS su ona Svjetske zdravstvene organizacije (8) i Europske skupine za istraživanje inzulinske rezistencije (engl. *European Group for the Study of insulin Resistance*, kratica EGIR) (9). Definicija *American Heart Assotiation* (AHA) predstavlja osuvremenjenu definiciju NCEP-ATP III (10).

1.13. Inzulinska rezistencija

1.1.3.1. Definicija inzulinske rezistencije

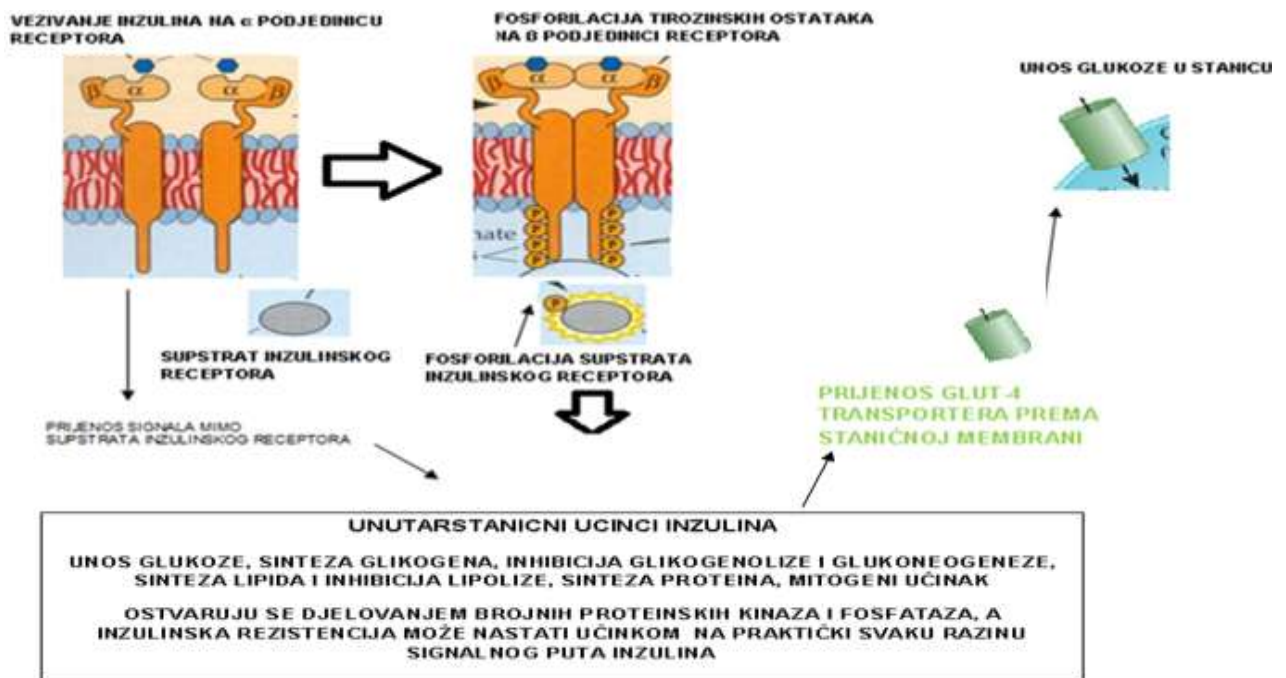
Inzulinska rezistencija znači smanjenu osjetljivost stanica na inzulin, što dovodi do smanjene djelotvornosti inzulina u organizmu i posljedične kompenzatorne hiperinzulinemije (5).

1.1.3.2. Prijenos inzulinskog signala

Inzulin se veže na alfa jedinicu inzulinskog receptora, nakon čega slijedi fosforilacija tirozinskih skupina na beta-podjedinici. Proteinska kinaza fosforilira supstrat inzulinskog receptora-1 (engl. *insulin receptor substrate*, kratica IRS), nakon toga slijedi aktivacija fosfatidil inozitol 3 kinaze (PI-3K), koja fosforilira fosfatidil inozitol bifosfat (PIP₂) u fosfatidil inozitol trifosfat (PIP₃). PIP₃ se veže za staničnu membranu i povezuje s fosfoinozitol-ovisnom kinazom-1 (engl. *phosphoinositol-dependent kinase-1*, kratica PDK-1), nakon čega slijedi fosforilacija i aktivacija protein kinaze B (PKB) ili Akt. Aktivirana PKB fosforilacijom više ciljnih proteina inicira brojne učinke inzulina. Na kraju dolazi do translokacije prijenosnog sustava za glukozu 4 (engl. *glucose transporter 4*, kratica GLUT 4) iz intracitoplazmatskih spremišta na površinu stanice, što omogućuje ulazak glukoze u

stanicu. Paralelni put aktivacije, koji predstavlja nadopunu ranije opisanom putu, a odvija se mimo IRS, predstavlja tirozinska fosforilacija proto-onkogeno Cbl koji je povezan s prilagodbenom bjelančevinom CAP (kratica od engl. *c-Cbl-associated protein*). Oni aktiviraju daljnji prijenos koji završava aktivacijom GLUT-4 transportera (11,12). Aktivirana PKB fosforilacijom više ciljnih proteina inicira brojne učinke inzulina. Na kraju dolazi do translokacije prijenosnog sustava za glukozu 4 (engl. *glucose transporter 4*, kratica GLUT 4) iz intracitoplazmatskih spremišta na površinu stanice, što omogućuje ulazak glukoze u stanicu. Paralelni put aktivacije, koji predstavlja nadopunu ranije opisanom putu, a odvija se mimo IRS, predstavlja tirozinska fosforilacija proto-onkogeno Cbl koji je povezan s prilagodbenom bjelančevinom CAP (kratica od engl. *c-Cbl-associated protein*). Oni aktiviraju daljnji prijenos koji završava aktivacijom GLUT-4 transportera (11, 12). Osim opisanoga puta prijenosa signala za unos glukoze, postoje putevi kojima se inzulinski signal prenosi u svrhu ostvarivanja ostalih staničnih učinaka, a to su sinteza glikogena, inhibicija glukoneogeneze i glikogenolize, stimulacija unosa masnih kiselina, inhibicija lipolize, sinteza proteina, stanični rast i proliferacija (5,11). Između puteva prijenosa inzulinskog signala za različite učinke inzulina postoje brojne interakcije.

Slika 1 prikazuje pojednostavljenu shemu prijenosa inzulinskog signala.



Slika 1. pojednostavljena shema prijenosa inzulinskog signala

1.1.3.3. Uzroci i mehanizmi nastanka inzulinske rezistencije

Prekomjeren unos nezdrave hrane i nedostatna tjelesna aktivnost uz prirođenu predispoziciju koja je uzrokovana nasljednim čimbenicima (5,11,13) i utjecajem okoliša tijekom intrauterinog razvoja na gensku ekspresiju, kao što je pušenje, uzimanje lijekova, premala ili prevelika tjelesna masa pri rođenju (14) dovode do abdominalne pretilosti s patološkim nakupljanjem masnoća. Abdominalna pretilost povezana je s povećanim oslobađanjem slobodnih masnih kiselina, kroničnom upalom i povišenjem razine oksidativnog stresa, koji u tkivima ovisnima o inzulinu uzrokuju inzulinsku rezistenciju ometajući djelovanje inzulina na raznim razinama (5,15). U osoba s inzulinskom rezistencijom smanjen je broj inzulinskih receptora u mišićnim i masnim stanicama, promijenjena je ekspresija GLUT 4 transportera glukoze, inhibiran je prijenos signala od receptora prema sustavu za unos glukoze u stanice, smanjena je aktivnost tirozin-kinaze inzulinskog receptora i smanjena aktivnost glikogen-sintetaze (11). Mehanizmi inzulinske rezistencije nisu u potpunosti razjašnjeni.

Ometanje prijenosa inzulinskog signala na različite načine i na različitim razinama može biti uzrok inzulinske rezistencije u sklopu metaboličkog sindroma. Ranije se pridavalo veliko značenje smanjenju broja inzulinskih receptora, a danas se smatra da je puno značajniji postreceptorski poremećaj u prijenosu inzulinskog signala (11,16). Slobodne masne kiseline, akumulirane masnoće u stanicama, proupalne tvari, reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*, kratica ROS), reaktivni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*, kratica RNS), uznapredovali produkti glikacije (engl. *advanced glycation end products*, kratica AGEs), produkti mikroba, od kojih se najveća važnost pripisuje lipopolisaharidima te endoplazmatski stres interferiraju s prijenosom inzulinskog signala djelujući na različite dijelove njegova prijenosnog sustava (17, 18).

Slobodne masne kiseline aktiviraju protein kinazu C, serinsku kinazu koja povećava serinsku fosforilaciju IRS-1 (19). Metabolitima lipida koji se nakupljaju u mišićima osoba s metaboličkim sindromom pripisuje se važna uloga u razvoju inzulinske rezistencije, ustanovljeno je da je diacilglicerol potentan aktivator protein kinaze C (19), a ceramidi ometaju s inzulinom stimuliranu aktivaciju PKB/Akt (20). Proupalni citokini povećavaju inzulinsku rezistenciju ometajući prijenos signala na nivou IRS i ostalim dijelovima prijenosa inzulinskog signala, a djelovanjem na gensku ekspresiju za proizvodnju proupalnih citokina

povećavaju upalu u drugim stanicama. Čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, kratica TNF) i interleukin-1 β (IL-1 β) preko mehanizma vezanja za stanične receptore aktiviraju stresne kinaze, kao što su Jun-N-terminalna kinaza (engl. *Jun N-terminal kinase*, kratica JNK) i I κ B kinazu (IKK) (18). Aktivacijom JNK potiču fosforilaciju serinskih ostataka IRS-1, a aktivacijom IKK, oslobađaju aktivirajući protein - nuklearni čimbenik κ B (engl. *nuclear factor κ B*, kratica NF κ B), koji ulazi u staničnu jezgru i tamo aktivira gensku ekspresiju za sintezu brojnih proupalnih citokina. TNF potiče lipolizu u adipocitima (15). Na taj način citokini dalje povećavaju inzulinsku rezistenciju i doprinose daljnoj kroničnoj upali i oksidativnom stresu.

ROS-i i RNS-i djeluju na „intrinzične“ kinaze, to jest one, koje sudjeluju u prijenosu inzulinskog signala, kao što su kinaza p70S6, ERK i „ekstrinzične“, koje ne sudjeluju u prijenosu inzulinskog signala, ali ga mogu ometati, fosforilirajući proteine koji sudjeluju u njemu. U „ekstrinzične“ kinaze ubrajaju se mitogenima aktivirane proteinske kinaze (engl. *Mitogen-activated protein kinases*, kratica MAPK) od kojih je najbolje proučen učinak JNK. Proteinske kinaze na IRS-1 fosforiliraju serinske ostatke, ometajući i smanjujući inzulinom stimuliranu fosforilaciju tirozinskih ostataka. Nadalje, pretpostavlja se da pojačana serinska fosforilacija dovodi do otpuštanja IRS-1 iz njegovih spremišta u staničnoj unutrašnjosti i njegove konačne proteasomske degradacije (17).

1.1.4. Abdominalna pretilost i patološko nakupljanje masnoća

MS je karakteriziran povećanim nakupljanjem masnoga tkiva u području trupa (abdominalna ili androidna pretilost) i ektopičnim odlaganjem masnoća u druge organe i tkiva (21-24).

1.1.4.1. Nakupljanje masnoća u metaboličkom sindromu

U osoba s MS masnoće se pojačano nakupljaju u abdominalnom potkožnom masnom tkivu i intraperitonealno (oko omentuma, crijeva i bubrega) (25). Također se nakupljaju unutar prsne šupljine (intratorakalno), oko srca (perikardijalno i epikardijalno masno tkivo) (23, 25),

u plućima, koštanoj srži i adventiciji krvnih žila (26). Masnoće se mogu nakupljati i ektopično – izvan masnoga tkiva, u unutarnjim organima i skeletnim mišićima (24).

Nasljedni čimbenici (13) i „programiranje“ genske ekspresije tijekom inrauterinog razvoja (13,27) predstavljaju podlogu za razvoj inzulinske rezistencije te sklonost odlaganju masnoća u visceralna tkiva, koja su rezistentna na inzulin (13). Nezdrave životne navike, kao što su prekomjeren unos energenata i nedostatna tjelesna aktivnost pogoršavaju inzulinsku rezistenciju i povećavaju nakupljanje visceralnih masnoća. Villjanen i sur. smatraju da je rezistencija masnog, ali ne i drugih tkiva, predodređena rođenjem, naime, redukcijom tjelesne mase smanjuje se inzulinska rezistencija cijeloga tijela, mišića i jetre ali ne i ona masnoga tkiva (21, 28).

1.1.4.2. Karakteristike masnoga tkiva u metaboličkom sindromu

Metabolički aktivno masno tkivo u intraabdominalnom, intermuskularnom, epikardijalnom i perivaskularnom prostoru je slabije osjetljivo na inzulinom posredovanu inhibiciju lipolize i jače otpušta slobodne masne kiseline. Neki autori misle da ono fiziološki služi kao izvor brzo dostupne energije za funkciju organa koje okružuje, (21, 24), a preko mehanizma otpuštanja masnih kiselina u jetru služi i kao izvor ketona za mozak (21). Za duboko potkožno masno tkivo (preperitonelano masno tkivo) se pretpostavlja da služi kao izvor energije za funkciju trbušnih mišića (21,29). Adipociti u osoba s inzulinskom rezistencijom i šećernom bolešću tipa II veći su u odnosu na adipocite osoba bez inzulinske rezistencije (30,31). Zbog slabijeg vezivnog tkiva, adipociti u visceralnim odjeljcima masnoga tkiva skloniji su rupturi, kojoj slijedi infiltracija makrofaga i pogoršanje upale (25).

Perfuzija masnog tkiva smanjena je u pretilih osoba (32). Smanjena perfuzija masnoga tkiva može barem djelomično biti posljedica povećanja adipocita koje nije kompenzirano primjerenom angiogenezom (33). Promjer adipocita (140-180 mikrometara) je veći nego difuzijska udaljenost kisika, što ograničava izmjenu kisika između krvi i citoplazme adipocita. Hipoksija može inhibirati diferencijaciju adipocita i ekspresiju adiponektina, promovirati stvaranje slobodnih kisikovih radikala i upalu (34). Hipoperfuziju i hipoksiju u masnom tkivu povezuju s poremećajem produkcije adipocitokina u pretilih osoba (35).

1.1.4.3. Potkožno masno tkivo i metabolički sindrom

Različiti odjeljci potkožnog masnog tkiva razlikuju se u metaboličkoj i upalnoj aktivnosti. Smatra se da potkožno masno tkivo na bokovima ima zaštitnu ulogu u smislu preuzimanja neesterificiranih masnih kiselina iz cirkulacije (32 , 41). Potkožnom femoralnom i glutealnom masnom tkivu pripisuje se zaštitna uloga, prema rezultatima epidemioloških (42) i kliničkih (43) istraživanja. Za potkožno abdominalno masno tkivo ne postoji konačan stav; prema nekim istraživanjima pokazalo se povezanim s kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima, ali manje od visceralnog (44, 45). Masa potkožnog masnog tkiva je u adipoznih osoba oko 10 puta veća od mase visceralnog masnog tkiva (47), najveći je izvor slobodnih masnih kiselina u organizmu (48). Neki autori pripisuju mu određenu zaštitnu ulogu (49), a Goel i sur. su u istraživanju provedenom u Indijaca našli veću povezanost subkutanog abdominalnog masnog tkiva s metaboličkim sindromom u odnosu na visceralno masno tkivo (46).

Površinsko i duboko potkožno abdominalno masno tkivo iskazuju razlike u u lučenju adipocitokina, oslobađanju masnih kiselina i rezistenciji na inzulin; dok površinsko abdominalno potkožno masno tkivo služi primarno kao organ za pohranu masnoća, duboko abdominalno potkožno masno tkivo pokazuje sličnosti s visceralnim masnim tkivom (21, 29).

1.1.4.4. Ektopično odlaganje masnoća

S porastom tjelesne mase i tijekom starenja, adipociti mogu doseći granicu svojih kapaciteta za pohranu masti, što vodi ektopičnoj pohrani masnoća unutar neadipoznih organa, kao što su skeletni mišići, jetra i gušterača. Ova tkiva normalno sadrže samo male količine masti čija uloga nije dugotrajna pohrana lipida, nego izvor energije u periodima nedostane opskrbe glukozom. Sve je više dokaza da ektopična pohrana masti može voditi oštećenoj funkciji tkiva (50). Ektopično nakupljanje masnoća u srcu i gušterači povezuje se s oštećenjem organa koje se manifestira srčanom lipotoksičnošću i šećernom bolešću tipa II) (50). Miosteatoza (nakupljanje masti u mišićima) povezuje se s inzulinskom rezistencijom i šećernom bolešću tipa II (51).

1.1.4.5. Metode mjerenja masnoga tkiva

Postoje brojni načini procjene količine masnoga tkiva. Opseg struka je široko korištena antropometrijska mjera u kliničkoj praksi zbog jednostavnosti. Pokazao se kao važan pokazatelj metaboličkog sindroma (52) i prediktivan pokazatelj rizika za kardiovaskularne bolesti te dijabetes tipa II (53-55). U odnosu na ultrazvučne metode (56-58) i mjerenje masnoga tkiva računalnom tomografijom (58) ima manju točnost i ponovljivost. Pomanjkanje opsega struka kao mjere za abdominalnu pretilost je u nemogućnosti posebnog mjerenja visceralnog i supkutanog abdominalnog masnog tkiva.

Omjer opsega struka i bokova predstavlja omjer između abdominalnog i gluteofemoralnog masnog tkiva. Iako neka istraživanja upućuju na njegovu slabiju povezanost s kardiovaskularnim rizikom u odnosu na opseg struka (54), druge studije su pokazale da su opseg struka, omjer opsega struka i bokova te indeks tjelesne mase pokazali sličnu prediktivnu vrijednost za razvoj dijabetes tipa II (55). Pomanjkanje omjera struka i bokova kao pokazatelja odnosa količine centralne i periferne masnoće, je u tomu, što opseg bokova, osim o količini masnog tkiva, ovisi i o širini zdjelice te količini zdjelice mišića (59).

Ultrazvučne metode procjene količine masnoga tkiva su jednostavne za primjenu i pouzdane. Postoji više ultrazvučnih metoda procjene masnoga tkiva; intraabdominalna debljina (engl. *intraabdominal thickness*), udaljenost između *linee albe* i prednje stijenke aorte je prvi sonografski indeks koji je korišten u istraživanjima kao mjera abdominalnog adipoziteta (56). Od drugih ultrasonografskih pokazatelja masnoga tkiva mjeri se preperitonealno masno tkivo, mezenterijalno masno tkivo, potkožno masno tkivo, te epikardijalno masno tkivo. U literaturi su opisani i različiti indeksi, izvedeni iz rezultata mjerenja masnog tkiva (56). Ostale metode mjerenja masnog tkiva su računalna tomografija (44,56), magnetska rezonancija (56), denzitometrija (60) i bioelektrična impedancija (61). Mjerenje debljine potkožnog masnog tkiva kaliperom se pokazalo kao jednostavna i vrlo pouzdana metoda (62).

Računalnom tomografijom i magnetskom rezonancijom može se izmjeriti volumen raznih odjeljaka masnoga tkiva, no loša strana navedenih metoda je skupoća, a računalna tomografija je povezana uz znatno zračenje (56).

1.1.5. Kronična upala u metaboličkom sindromu

1.1.5.1. Povijesni pregled povezanosti upale i metaboličkog sindroma

Još g. 1876. Ebstein opazio je povoljan učinak salicilata na simptome šećerne bolesti, a 1901. Williamson smanjenje izlučivanja krvnog šećera mokraćom u bolesnika oboljelih od šećerne bolesti tipa II nakon liječenja visokim dozama salicilata (5-7,5 g dnevno). G. 1957. Reid i sur. su opazili da bolesnik sa šećernom bolešću, dok je bio liječen visokim dozama salicilata zbog reumatske groznice, nije trebao primati inzulin radi regulacije glikemije. Autori su navedeno pokušali tumačiti učinkom acitilsalicilne kiseline na povećanje lučenja endogenog inzulina. Kasnija istraživanja ukazala su na povezanost povišenih razina brojnih čimbenika upale, kao što su CRP, IL-6, inhibitora aktivatora plazminogena, sijalinske kiseline i leukocita sa šećernom bolešću tipa II (18).

Danas je poznato da kronična upala povezana s pretilošću ima odlučujuću ulogu u nastanku poremećaja metabolizma i razvoja kroničnih bolesti povezanih s MS.

1.1.5.2. Mehanizmi aktivacije kronične upale u metaboličkom sindromu

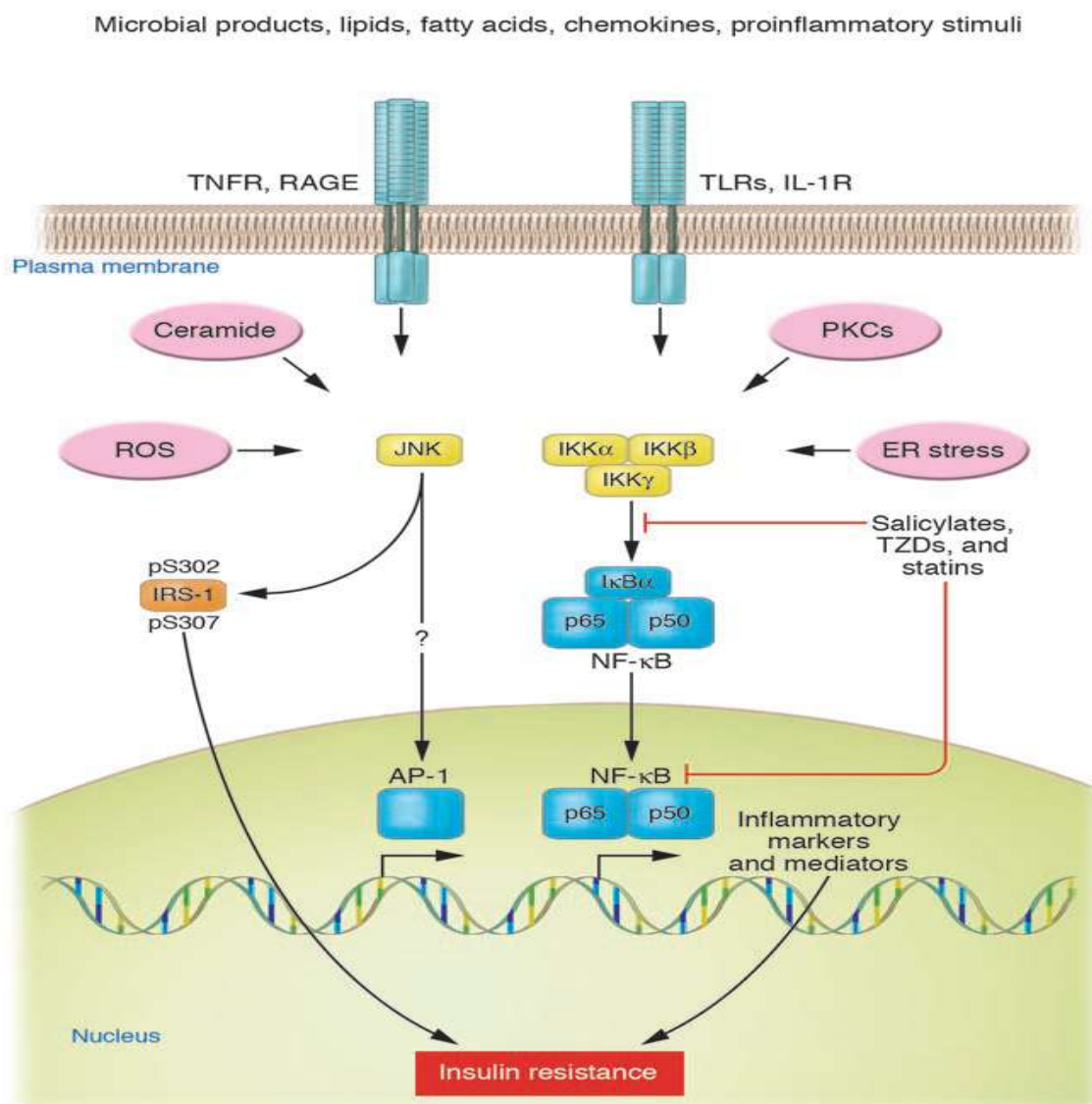
Prekomjerno uzimanje hrane bogate koncentriranim ugljikohidratima i zasićenim masnim kiselinama te nedostatak tjelesne aktivnosti vodi nastanku kronične upale. Adipociti, aktivirani makrofazi i druge stanice, u prvom redu hepatociti, luče brojne bioaktivne tvari, kao što su: leptin, adiponektin, rezistin, čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, kratica TNF), interleukin-6 (IL-6), monocitni kemoatraktivni protein (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, kratica MCP-1), inhibitor aktivatora plazminogena (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, kratica PAI-1), angiotenzinogen, visfatin (63), serumski amiloid A (SAA) i druge (18,64,65). Leptin i adiponektin smatraju se primarnim adipokinima, jer se sintetiziraju isključivo u adipocitima (64,65), kao i visfatin (66). TNF, IL-6, MCP-1 i PAI-1 se sintetiziraju kako u adipocitima, tako i u makrofazima, ali koliko točno ih proizvode jedni ili drugi, još nije utvrđeno. Rezistin u ljudi proizvode makrofazi (65-67). Na lučenje proupalnih tvari u stanicama djeluju brojni čimbenici vezani uz upalu, oksidativni stres i akumulaciju masnoća.

Brojni čimbenici koji uzrokuju stanje kronične upale, istovremeno povećavaju inzulinsku rezistenciju. Proupalni citokini, slobodne masne kiseline, uznapredovali produkti glikozilacije i bakterijski proizvodi, kao što su lipopolisaharidi, djeluju preko vezivanja za stanične receptore, kao što su TLR (*Toll-like receptor*), receptori za proizvode uznapredovale glikacije (engl. *receptors for advanced glycation products*, kratica RAGE) i citokinske receptore, kao što su receptori za TNF, IL-1 i ostale (18,25). TLR-i su receptori za prepoznavanje patogena u sustavu prirodene imunosti, koji prepoznaju i vežu antigene bakterijskog podrijetla, kao što je endotoksin, odnosno lipopolisaharid, a vežu i slobodne masne kiseline (18,68,69). Osim na adipocitima, hepatocitima i miocitima, nalaze se i na drugim stanicama, prije svega stanicama sustava prirodene i adoptivne imunosti (68).

Nakon vezivanja proupalnih tvari na stanične receptore slijedi aktivacija kinaza, kao što su mitogenima aktivirane proteinske kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinases*, kratica MAPK), među kojima se kao najvažnije opisuju c-Jun N-terminal kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, kratica JNK), p38 MAPK i ERK (kratica od engl. *extracellular signal-related kinase*). Neke od staničnih kinaza, kao što su JNK, I κ B kinaza (IKK) i proteinska kinaza C (PKC) inhibiraju djelovanje inzulina učinkom na serinsku fosforilaciju supstrata inzulinskog receptora, a istovremeno iskazuju snažan učinak na aktivaciju proupalnih gena, preko aktivacije kompleksa aktivatorskog proteina-1 (engl. *activator protein-1*, kratica AP-1) i nuklearnog čimbenika kapa-B (engl. *nuclear factor kappa-B*, kratica NF- κ B) (25 Monteiro).

Unutarstanični stresori, kao što su ROS-i, RNS-i, akumulirani lipidi (ceramidi, diacilglicerol i drugi) te endoplazmatski stres aktiviraju stresne kinaze unutar stanice (17,18,64).

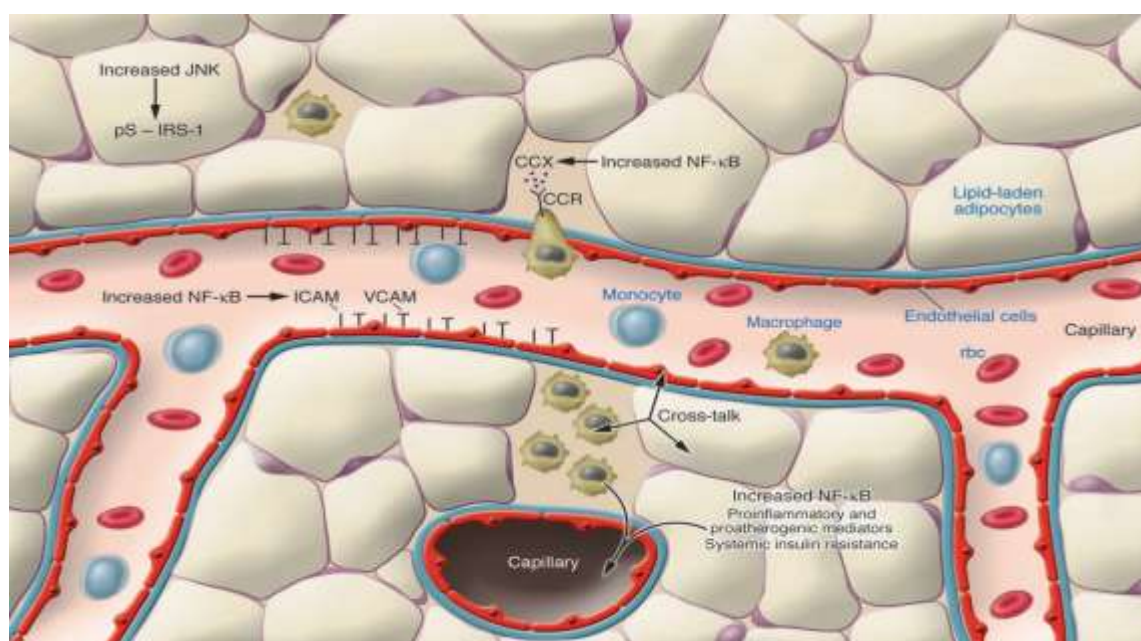
Nakon aktivacije koja se odvija preko receptora ili unutar stanice, inhibitor beta podjedinice nuklearnog čimbenika kapa-B (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*, kratica IKK β) fosforilira inhibitorski protein nuklearnog čimbenika kapa-B (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa BNF- κ B*, I κ B, kratica I κ B α), slijedi odvajanje nuklearnog čimbenika kapa-B (engl. *nuclear factor kappa-B*, kratica NF- κ B) od inhibitorskog proteina i njegova translokacija u jezgru, gdje aktivira brojne ciljane gene, čiji proizvodi induciraju inzulinsku rezistenciju i/ili povećavaju kroničnu upalu (18,70). Na slici 2 prikazani su mehanizmi prijenosa signala za aktivaciju kronične upale i inzulinske rezistencije.



Slika 2. mogući stanični mehanizmi aktivacije prenošenja upalnog signala: izvan stanice slobodne masne kiseline, citokini, uznapredovali proizvodi neenzimske glikozilacije i lipopolisaharidi se vežu na stanične receptore, koji prenose podražaj na stresne kinaze IKK β i JNK. Na stresne kinaze djeluju i unutarstanični stresni čimbenici, kao što su ROS-i, RNS-i, stres endoplazmatske mrežice i akumulirani lipidi (ceramidi). IKK β fosforilira inhibitorni protein I κ B α i oslobađa NF- κ B, koji se translocira u jezgru i aktivira velik broj gena za proizvodnju citokina koji povećavaju upalu i inzulinsku rezistenciju. Na sličan način, aktivacijom stresne kinaze JNK, serinskom fosforilacijom supstrata inzulinskog receptora povećava se inzulinska rezistencija. Aktivnost IKK β i/ili NF- κ B inhibiraju statini, acetilsalicilna kiselina i tiazolidinedioni (TZDs). TNFR – receptor za TNF, RAGE – receptor za uznapredovale produkte glikozilacije, TLR – *toll like* receptor IL-1 R – receptor za interleukin-1. PKCs protein kinaze C, ER stress – stres endoplazmateke mrežice, ROS – reaktivni kisikovi spojevi. NF- κ B – nuklearni čimbenik kapa – B, I κ B α - inhibitor beta podjedinice nuklearnog čimbenika kapa-B. Preuzeto iz članka Shoelson SE, Lee Y, Goldfine B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul 3;116(7): 1769–80, uz dopuštenje autora.

Pokazalo se da i samo uzimanje pojedinačnih obroka, bogatih glukozom ili zasićenim masnoćama, neovisno od akumulacije lipida u stanicama inducira aktivaciju oksidativnog stresa, povećanje vezivanja aktivatora gena, kao što je NF- κ B, povećanje lučenja proupalnih citokina, kao što su TNF i interleukin-1 β (IL-1 β) u mononuklearnim stanicama (71,72).

Uzimanje masne hrane povećalo je ekspresiju *Toll-like* receptora-4 (TLR-4) na mononuklearnim stanicama i razinu lipopolisaharida u krvi (72). Uzimanje zasićenih masnoća uzrokuje jači upalni učinak u odnosu na drugu hranu, a masnoj hrani pripisuju i utjecaj na povećanu permeabilnost crijevne stijenke, što dodatno povećava razinu upale (72). Cani i sur. su u pokusima na miševima ustanovili da visokomasna hrana povećava crijevnu permeabilnost za bakterijske antigene, kao što su LPS i povisuje njihovu razinu u plazmi, a primjena probiotika uz promjenu crijevne flore smanjuje crijevnu permeabilnost, uz smanjenje endotoksemije i kronične upale (73). Proupalne tvari iskazuju lokalni učinak, npr. na endotel krvnih žila gdje povećavaju i žilnu permeabilnost, a lučenjem tvari, kao što je MCP-1 privlače makrofage (18) i povećavaju sintezu adhezijskih molekula. Proupalne tvari djeluju i sustavno, povećavajući kroničnu upalu, inzulinsku rezistenciju i oksidativni stres. Na slici 3. prikazani su potencijalni mehanizmi aktivacije upale u masnom tkivu.



Slika 3. potencijalni mehanizmi aktivacije upale u masnom tkivu. Prekomjeran unos hrane i debljina uzrokuju akumulaciju lipida u stanicama i aktivaciju JNK i NF- κ B, koji, uz vjerojatno druge mehanizme dovode do povećanja lučenja proupalnih citokina, kao što su TNF, IL-6, leptin i rezistin, endotelnih adhezijskih molekula i kemokina, kao što je MCP-1. Pod utjecajem MCP-1 monociti migriraju u masno tkivo, diferenciraju se u makrofage i proizvode proupalne citokine i kemokine, kojima povećavaju otpuštanje slobodnih masnih kiselina iz adipocita, povećavaju upalu u adipocitima. Adipociti i makrofazi uzrokuju i sustavno kronično upalno stanje. CCX – kemokini, CCR – kemokinski receptori, ICAM (međustanična adhezijska molekula (engl. Intercellular Adhesion Molecule), VCAM – žilna stanična adhezijska molekula (engl. *vascular cell adhesion molecule*). Preuzeto iz članka Shoelson SE, Lee Y, Goldfine B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul 3;116(7): 1769–80, uz dopuštenje autora.

1.1.5.3. Proizvodi ciljnih gena NFκB

NFκB aktivira transkripciju velikog broja ciljnih gena, a među najvažnijim proizvodima gena koje NF-κB aktivira navode se: TNF, interleukin-6 (IL-6), C-reaktivni protein (CRP), adiponektin, interleukin-1 α i β (IL-1 α i IL-1 β), interleukin-10 (IL-10), leptin, rezistin, visfatin, angiotenzin (64).

TNF je proupalni citokin, koji sintetiziraju većinom monociti i makrofazi i ima središnju ulogu u upalim i autoimunim poremećajima. Razina TNF povišena je u masnom tkivu i serumu pretilih osoba, redukcija tjelesne mase povezana je sa smanjenjem ekspresije TNF (74). Primjena tvari koje blokiraju TNF u kratkom vremenskom periodu rezultirala je smanjenjem sustavnih pokazatelja upale, ali nije smanjila inzulinsku rezistenciju (75). S druge strane, primjena antagonista TNF u liječenju težih upalnih bolesti, kao što je reumatoidni artritis, poboljšala je inzulinsku senzitivnost (76). TNF je glavni čimbenik koji potiče oslobađanje slobodnih masnih kiselina iz masnog tkiva u krvotok (77).

IL-6 je proupalni citokin koji sudjeluje u regulaciji humoralne i stanične imunosti te igra središnju ulogu u upali i oštećenju tkiva. Pripisuje mu se i važna uloga u inzulinskoj rezistenciji vezanoj uz pretilost (78) te patogenezi koronarne srčane bolesti (79). Razina IL-6 u bolesnika sa šećernom bolešću tipa II je povišena (78). IL-6 u određenim uvjetima iskazuje i protuupalnu aktivnost; mišići tijekom aktivnosti sintetiziraju i otpuštaju IL-6, koji poboljšava učinak inzulina odmah tijekom ranog oporavka nakon tjelesne aktivnosti (79). Lučenje miokina IL-6 proporcionalno je s mišićnom masom i duljinom vježbanja (80).

CRP je reaktant akutne faze upale, proizvodi se pretežito u jetri, a njegovu sintezu potiče IL-6. Korelira s inzulinskom rezistencijom (18). Bolesnici s visokim koncentracijama CRP su skloniji razvoju koronarne srčane bolesti (81), šećerne bolesti tipa II i zloćudnih tumora, kao što je karcinom debelog crijeva (81). Njegova razina povezana je s količinom visceralnog masnog tkiva i ostalim pokazateljima metaboličkog sindroma, smatra se da djeluje i kao izravni patogeni čimbenik. CRP iskazuje multiple učinke; vezanje komplementa, povećanje ekspresije adehezivnih molekula i smanjenu ekspresiju sintaze endotelnog dušikova oksida, stimulira ekspresiju inhibitora aktivatora plazminogena i inducira oksidativni stres (82).

Adiponektin je važan autokrini/parakrini čimbenik koji modulira diferencijaciju preadipocita u zrele adipocite. Kao endokrini čimbenik djeluje u metabolizmu cijelog tijela preko učinaka na ciljane organe – povećava inzulinsku osjetljivost, smanjuje količinu visceralnog masnog tkiva, snižuje serumske trigliceride i povišuje HDL-kolesterol. Svoj učinak ostvaruje mijenjajući razine i aktivnost ključnih enzima (lipoproteinske lipaze i jetrene lipaze) odgovornih za katabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima i HDL. Na taj način utječe na aterosklerozu utječući na ravnotežu aterogenih i antiaterogenih lipoproteina u serumu i modulirajući stanične procese koji su upleteni u stvaranje pjenastih stanica (83). Razina adiponektina u krvi niža je u pretilih osoba u odnosu na mršave. Proupalni čimbenici, kao što su TNF i IL-6 smanjuju produkciju adiponektina (83,84). Smatra se da hormoni štitnjače mogu utjecati na proizvodnju adiponektina, u bolesnika s hipotireozom su ustanovljene više vrijednosti adiponektina (85). Razina adiponektina u serumu raste u bolesnika s renalnom insuficijencijom (86).

Interleukini-1 α i β (IL-1 α i IL-1 β) su proupalni citokini koji se vežu za receptore za IL-1, povećavaju upalu i inzulinsku rezistenciju (64).

Interleukin-10 (IL-10) je protuupalni čimbenik koji se stvara u imunskim stanicama koje se nalaze u masnom tkivu, njegovo djelovanje poboljšava učinak inzulina u adipocitima (64).

Leptin je hormon koji središnje regulira tjelesnu masu, a povezuje prehrambeni status s neuroendokrinom i imunom funkcijom. Stvara se ponajviše u masnom tkivu, njegova cirkulirajuća količina proporcionalna je s količinom masnog tkiva, ulazak leptina u središnji živčani sustav proporcionalan je koncentraciji leptina u serumu. U hipotalamusu djeluje kao čimbenik sitosti, uzrokujući smanjenje unosa hrane i povećanje potrošnje energije, sudjelujući tako u regulaciji unosa hrane, tjelesne mase i količine masnoga tkiva. Razina leptina pozitivno korelira s razinom inzulina, a negativno s razinom glukokortikoda. Akutna infekcija, sepsa i širok spektar upalnih posrednika povišuju sintezu leptina, međutim, kronična stimulacija s proupalnim citokinima uzrokuje njegovu supresiju. Leptin je također uključen u proliferaciju T 4 limfocita, lučenje citokina, reprodukciju, angiogenezu, regulaciju hipotalamo-pituitarno-adrenalne osi i sintezu glukokortikoida (64,84).

Rezistin je proupalni citokin, koji luče stanice masnoga tkiva i imune stanice, a osim proupalnog djelovanja, pripisuje mu se i učinak na inzulinsku rezistenciju (64,84).

Visfatin je adipokin, koji luče adipociti visceralog masnog tkiva i koji smanjuje inzulinsku rezistenciju. Nekompetitivno se veže na inzulinski receptor, što rezultira sniženjem koncentracije glukoze u krvi (63), a djelovanjem na drugi receptor, odnosno receptore iskazuje proupalno djelovanje (64).

Angiotenzin se stvara u jetri i visceralnom masnom tkivu, iskazuje proupalno i prooksidativno djelovanje, potiče oslobađanje proaterogenih adipocitokina, interleukina-6 i inhibitora-1 aktivatora plazminogena (87). Djelovanjem na supstrat inzulinskog receptora povećava inzulinsku rezistenciju (88), a aktivacijom oksidaze NADPH povećava oksidativni stres (89).

1.2. Oksidativni stres

1.2.1. Molekularni kisik i oksidativna fosforilacija

Svi aerobni organizmi za život trebaju kisik. Molekularni kisik je idealan krajnji primatelj elektrona zato što je jak oksidirajući agens. Kisik i pri normalnim koncentracijama, zbog oksidativnih reakcija može dovesti do oštećenja stanica. Godine 1954. Gerschman i sur. su pokazali da je oštećenje stanica uzrokovano nastajanjem reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, kratica ROS) (90). Tijekom redukcije kisika nastaju potencijalno štetne međutvari (engl. *intermediates*). Mitohondriji generiraju staničnu energiju kroz ciklus limunske kiseline i pridruženi elektronski transportni lanac na unutarnjoj strani mitohondrija. Reducirajući ekvivalenti (nikotin adenin dinukleotid - NADH i flavin adenin dinukleotid - FADH₂) nastaju uz ciklus limunske kiseline, a reoksidiraju se preko elektronskog transportnog lanca i povezanu translokaciju protona kroz mitohondrijsku unutarnju membranu, stvarajući transmembranski elektrokemijski gradijent. Navedeni gradijent osigurava elektrokemijski potencijal, koji omogućuje protok protona kroz kompleks adenozin trifosfat (ATP) sintaze, koji je potreban za sintezu adenozin trifosfata (ATP) iz adenozin difosfata (ADP) i fosfata (P) (91).

1.2.2. Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi

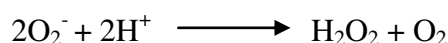
Reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*, ROS) nastaju jednovalentnom redukcijom O₂ (92). Reaktivni dušikovi spojevi (engl. *reactive nitrogen species*, kratica RNS) nastaju zajedno s ROS-ima, neki autori ih navode zajedno kao ROS/RNS (17).

U skupinu ROS-a ubrajaju se slobodni radikali kisika i reaktivni kisikovi spojevi koji nisu radikali (engl. *non-radical ROS*). (93). Slobodni radikali su atomi ili molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Primjer takvih radikala su hidroksi radikal (HO·) i superoksidni anion (O₂⁻). Da bi formirali stabilne elektronske parove oni pokreću lančane reakcije kojima daju ili oduzimaju elektrone drugim molekulama što ih čini visoko reaktivnima (92). U reaktivne kisikove spojevi koji nisu radikali ubrajamo: hidrogen (vodikov) peroksid (H₂O₂), hidroksilni anion (OH⁻), kisik (O₂) i hipoklornu kiselinu (HOCl) (93).

1.2.3. Mjesta i mehanizmi stvaranja reaktivnih spojeva

1.2.3.1. Mitohondriji

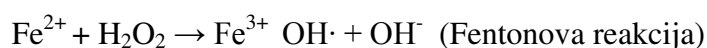
Glavno mjesto stvaranja slobodnih radikala u stanici je unutarnja membrana mitohondrija, gdje se odvija prijenos elektrona s NADPH i FADH₂ na O₂ preko niza reduciranih nosača u respiracijskom lancu. Potpunom redukcijom O₂ s četiri elektrona nastaju dvije molekule vode koje su bezopasni produkt te reakcije. Postupnom redukcijom O₂ i pojedinačnim prijenosom elektrona nastaju slobodni radikali (91). U većini reakcija dolazi do potpune redukcije kisika, tako da nastaje voda. U otprilike 0,2-2% elektrona koji prolaze transportnim lancem kisik se prerano i nepotpuno reducira te nastaje superoksidni radikal (O₂•⁻) (17,91). Superoksid, koji nastaje u unutarnjem matriksu mitohondrija ne može lako prijeći kroz vanjsku mitohondrijsku membranu u citosol, tako da u matriksu djelovanjem enzima mangan-superoksid-dismutaze (Mn-SOD), a u intermembranskom prostoru djelovanjem enzima bakar-cink-superoksid dismutaze (CuZn-SOD) nastaje nastaje vodikov peroksid (H₂O₂), koji značajno doprinosi oksidativnom oštećenju (94).



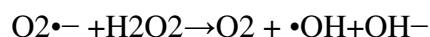
Konačna detoksikacija H₂O₂ u H₂O odvija se djelovanjem glutathion peroksidaze, što predstavlja glavni mehanizam eliminacije u mitohondrijima (pri nižim koncentracijama H₂O₂) ili katalaze (pri višim koncentracijama H₂O₂), koja se nalazi pretežito u peroksisomima (94).



Osim što može biti detoksificiran u u mitohondrijima, vodikov peroksid može difundirati preko mitohondrijske membrane u citoplazmu (94). Umjesto dismutacije u vodikov peroksid i kisik, superoksid (i u prisutnosti SOD), može reagirati s dušikovim monoksidom (NO), tako da nastaje peroksinitrit, koji je snažan oksidans (17). Vodikov peroksid, Fentonovom ili Haber-Weissovom reakcijom s prijelaznim metalima može generirati nastanak hidroksilnih radikala (95), što dovodi do daljnjih lančanih oksidativnih reakcija (17, 94).



$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ (Haber-Weissova reakcija, prvi dio je redukcija Fe^3 , potom slijedi Fentonova reakcija), konačan rezultat je



Nastali hidroksilni radikali su visokoreaktivni spojevi, kratka vijeka i značajno doprinose lokalnom oštećenju staničnih struktura (94).

1.2.3.2. Nikotin adenin dinukleotid fosfat oksidaza

Ranije se mislilo da je svrha NADPH oksidaze (engl. *NADPH oxidase*, kratica NOX) isključivo stvaranje ROS-a u svrhu ubijanja patogenih organizama. Kasnije se ustanovilo da postoje homolozi fagocitne NOX, koji vrše i druge funkcije, kao što su posttranslacijsko procesiranje proteina, prijenos staničnih signala, regulacija genske ekspresije i diferencijacije stanice (96) te regulacija vaskularnog tonusa (89). Najjači stimulator oksidaze NADPH je angiotenzin II (17,89), među drugim važnim stimulatorima navode se čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, kratica TNF) i stres endoplazmatske mrežice (17) te akumulirani lipidi u stanicama (18).

1.2.3.3. Mijeloperoksidaza

Mijeloperoksidaza, hem protein, koji luče fagociti katalizira reakciju vodikova peroksida i kloridnog aniona, a kao rezultat reakcije nastaje hipoklorna kiselina, koja dalje reagira sa superoksidom, s posljedičnim nastankom hidroksilnog radikala (97). Također, oksidira tirozin u tirozilne radikale, rabeći vodikov peroksid kao oksidirajući agens (98). Hipoklorna kiselina i tirozilni radikali su citotoksične tvari, a fagociti ih rabe radi ubijanja bakterija i drugih patogena (99).

1.2.3.4. Ksantin oksidoreduktaza

Sustav enzima oksidoreduktaze ksantina (XOD) katalizira nastanak ksantina iz hipoksantina i mokraćne kiseline iz ksantina. U sisavaca postoje dva oblika: ksantin dehidrogenaza i ksantin oksidaza. Ksantin dehidrogenaza katalizira reakciju nastanka mokraćne kiseline uz NAD^+ i vodu kao supstrate.



Ksantin dehidrogenaza ima veći afinitet za NAD^+ u odnosu na kisik, tako da je rezultat njezina djelovanja nije vodikov peroksid, nego NADH. Takav slijed događaja odvija se u nazočnosti velike količine NAD^+ . Međutim, kada je NAD^+ konvertiran u NADH, ksantin dehidrogenaza će djelovati kao NADH oksidaza, prenositi će elektrone s NADH na FAD, s posljedičnim nastankom superoksida. Navedeni učinak ksantin dehidrogenaze je značajan i iznosi 40% aktivnosti navedenoga enzima vezane uz metabolizam ksantina (100). Ksantin dehidrogenaza može reverzibilno ili ireverzibilno biti konvertirana u ksantin oksidazu, čiji su supstrati ksantin, voda i molekularni kisik, a kao proizvod njezine reakcije nastaju mokraćna kiselina, vodikov peroksid i vodikov superoksid (100,101).

Hipoksija, interleukin-1, interleukin-6, TNF, lipopolisaharidi i steroidi povećavaju transkripcijsku aktivnost gena ksantin oksidoreduktaze (100). Aktivnost ksantin oksidaze je povišena u uvjetima hipoksije, kao što je ishemija udova, veći kirurški zahvat, koronarna srčana bolest i popuštanje srca (101). Fruktaza, čije se povećano uzimanje povezuje s nastankom masne jetre (11). U koronarnim arterijama bolesnika s ishemijskom srčanom bolešću, nađena je povećana aktivnost ksantin oksidaze (97).

1.2.3.5. Sintaze dušikova oksida

Sintaze dušikova oksida (engl. *nitric oxide synthases*, kratica NOSs), su enzimi koji u fiziološkim uvjetima prenose elektrone sa supstrata L-arginina, rezultat reakcije su L-citrulin i dušikov monoksid (NO), koji je posrednik vazodilatacije krvnih žila. Kao kofaktor u navedenoj reakciji služi 5,6,7,8 tetrahidrobiopterin (BH_4). Ukoliko nema dostatne količine

BH₄ ili L-arginina, umjesto dušikova oksida stvarat će se superoksid. Superoksid reakcijom s dušikovim oksidom stvara peroksinitrit, koji oksidira BH₄, što dodatno smanjuje njegovu raspoloživost za sintezu dušikova oksida (97). Razlikujemo konstitutivne oblike sintaza NO, kao što su endotelna i neuronalna NOS te inducibilne oblike, koji se nalaze u upalnim stanicama, ali i u adipocitima te mišićnim stanicama. Njihovu aktivnost potiču različite proupalne tvari, a aktivnost NOS je posredovana aktivacijom aktivatorskog proteina-1, posredstvom proteinskih kinaza, kao što su MAPK (engl *mitogen activated protein kinase*) (17).

1.2.3.6. Endoplazmatska mrežica

Endoplazmatska mrežica je važan izvor ROS-a. U hrapavoj endoplazmatskoj mrežici, između ostalih posttranslacijskih modifikacija tijekom sinteze proteina, odvija se proces, “savijanja” proteina (engl. *protein folding*). Tijekom tog procesa uz stvaranje disulfidnih veza proteini poprimaju terciarnu i kvartarnu strukturu, koja će omogućiti njihovu normalnu funkciju. U tom procesu sudjeluju oksidoreduktaze endoplazmatske mrežice, čijim djelovanjem nastaju reaktivni kisikovi spojevi. Procjenjuje se da konačna sinteza proteina u njoj doprinosi 25% ukupnog stvaranja ROS-a u stanici (17).

1.2.3.7. Ostali izvori ROS-a u stanici

Lipooksigenaze (95) i citokrom P 450, koji je važan izvor ROS-a, povezan s nealkoholnom bolešću jetre (102) su također važni izvori ROS-a. Peroksisomi su, uslijed oksidativnih procesa, koji se u njima odvijaju također značajno mjesto sinteze ROS-a (103).

1.2.4. Funkcijski učinci reaktivnih spojeva

ROS-i i RNS-i imaju važnu ulogu u fiziološkim i patološkim zbivanjima u stanicama, sudjeluju u indukciji ili inhibiciji različitih signalnih puteva (djelovanjem na proteinske kinaze, fosfataze, proteaze, transkripcijske faktore), genskoj ekspresiji indukciji ili inhibiciji proliferacije stanice te u proces stanične smrti (17,97,103), vaskularnom tonusu (17, 99). Imuni sustav rabi smrtonosne učinke oksidansa proizvodeći ROS kao središnji dio svoga mehanizma za ubijanje patogena: s aktiviranim fagocitima proizvodeći i ROS i RNS (99).

1.2.5. Mehanizmi zaštite od štetnih učinaka reaktivnih spojeva

Radi zaštite od toksičnih učinaka ROS-a i RNS-a, stanice su razvile složen zaštitni sustav koji obuhvaća brojne enzimske i neenzimske mehanizme. Prvu liniju čine preventivni antioksidansi, koji sprečavaju inicijaciju lančane reakcije reaktivnih spojeva tako da izravno uklanjaju reaktivne spojeve ili djeluju na način da sprečavaju reakciju metalnih iona s peroksidima i tako zaustavljaju stvaranje hidroksilnih radikala (17). U tu skupinu spadaju proteini, kao što su ceruloplazmin, albumin, transferin, haptoglobin, hemopeksin, mioglobin, mioglobin, feritin. Prva tri spomenuta proteina sekvstriraju željezne i bakrene ione, sprečavajući reakcije u kojima nastaje hidroksilni radikal (104).

Drugu liniju obrane predstavljaju antioksidansi koji uklanjaju ili prekidaju lanac reakcija slobodnih radikala. U prvoj su skupini enzimi peroksidaza, glutation reduktaza, superoksid dismutaza i katalaza. Drugoj skupini pripadaju neenzimski antioksidansi kao što su glutation, vitamin C, vitamin E, razni flavonoidi i karotenoidi. Oni djeluju tako da se vežu sa slobodnim radikalima i na taj način sprečavaju oštećenje stanica (103). Glutation smatraju najvažnijim i najjačim antioksidansom u tijelu, a djeluje putem više mehanizama: kofaktor je glutation peroksidaze i glutation transferaze, izravno čisti hidroksilne radikale i „singlet“ kisik (engl. *singlet oxygen*), reducira oksidirani vitamin C i vitamin E. U staničnoj jezgri sudjeluje u popravku DNA (105). I čestice HDL-kolesterola iskazuju antioksidativna, protuupalna i antiaterogena svojstva (106).

Tercijarnu obranu koja popravlja ili uklanja tkivo oštećeno oksidativnim stresom čine različiti enzimski sustavi koji uklanjaju ili popravljaju DNA i proteine koji su oštećeni ROS-ima. Proteine popravljaju disulfidne reduktaze, nepopravljivo oštećeni proteini se razgrađuju, a

nadomješćuju ih novosintetizirani. Lipidna oštećenja popravljaju enzimi kao što su fosfolipaza A2, glutation peroksidaze, glutation transferaza i drugi (107). Postoji više oblika popravka DNA. Oksidirana oštećenja baza DNA odstranjuju se dvama osnovnim tipovima aktivnosti: popravak ekscizijom baze (engl. *base excision repair* kratica BER), koja odstranjuje pojedinačna oštećenja djelovanjem glikozilaza, koje prepoznaju i odstranjuju oštećene baze, a polimeraze ulažu (engl. *attach*) novu bazu. Ligaze spajaju novouložene baze sa susjednim bazama na DNA. Drugi, kompleksniji mehanizam je odstranjivanje oštećenja nukleotida, koji popravljaju oštećenja koja broje više od jedne baze (engl. *nucleotide excision repair* NER) (108, 109). Dvostruke lomove lanaca DNA popravljaju DNA ligaza, mehanizmom nehomogenog spajanja krajeva (engl. *non-homogenous end-joining*, kratica NHEJ) i mehanizmom homologne rekombinacije (109). Kada stanica pretrpi previše oštećenja, dolazi do apoptoze ili nekroze stanice (110).

1.2.6. Oksidativni stres

Kada stvaranje i učinak reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva nadvlada obrambene mehanizme organizma nastaje oksidativni stres, koji na različite načine može poremetiti metabolizam i oštetiti biološki važne molekule. Rezultat oksidativnog oštećenja staničnih struktura očituje se u povećanoj lipoperoksidaciji (LPO), denaturaciji enzima i mutagenom oštećenju nukleinskih kiselina (103). Ovo stanično oštećenje može doprinosti razvoju bolesti i smatra se jednim od uzroka starenja (111).

Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi mogu biti endogeni, koji nastaju tijekom metaboličkih i drugih biokemijskih reakcija i egzogeni, koji nastaju utjecajem ultraljubičastoga zračenja, duhanskog dima, azbesta i drugih karcinogenih tvari (112).

1.2.7. Stanična oštećenja izazvana reaktivnim spojevima

1.2.7.1. Oksidativno oštećenje lipida

Slobodni radikali (osobito OH[·]) jako su reaktivni i mogu oštetiti stanične membrane poticanjem složene lančane reakcije oksidacije ili razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina koje su osobito osjetljive na oksidativna oštećenja. Oksidacija započinje tako da slobodni radikal (najčešće hidroksilni ili peroksinitritni) oduzima atom vodika s α -metilenskog atoma ugljika višestruko nezasićene masne kiseline pri čemu nastaje alkilni odnosno lipidni radikal, koji teži stabilizaciji reorganizacijom molekule, s rezultirajućim nastajanjem diena, koji brzo reagiraju s kisikom. Slijedi nastanak hidroperoksilnog radikala, koji može širiti lanac oksidacije uzimanjem elektrona s druge polinezasićene masne kiseline, stvarajući drugi lipidni slobodni radikal i molekulu lipidnog hidroperoksida. Reakcija se nastavlja sve dok se lanac ne dokonča, bilo kombinacijom dvaju radikala koji formiraju neradikalni produkt ili dovršenja propagacije u prisutnosti vodika ili donora elektrona. Terminacija se može dogoditi i kao rezultat oduzimanja vodika od vitamina E ili drugoga lipidnog antioksidansa. Vitamin E se naziva i „antioksidansom koji prekida lanac“ (engl. *chain-breaking antioksidant*) jer donira atom vodika lipidnom radikalumu). Lipidna peroksidacija može biti inhibirana i redukcijom lipidnih peroksida u odgovarajuće alkohole, djelovanjem enzima iz skupine selenoperoksidaza, kao što je glutation peroksidaza. Što je veći stupanj nezasićenosti masne kiseline, to je ona podložnija oksidativnom oštećenju. Ukoliko taj početni korak peroksidacije nije kontroliran sustavom antioksidacijske obrane, može započeti lančana reakcija koja dovodi do oštećenja okolnih molekula, a na kraju i smrti stanice (113-115).

Pri raspadu LPO u biološkim sustavima nastaje čitav niz sekundarnih produkata. U prvom redu je to čitav niz aldehida kao što su npr. malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE). Reaktivni aldehidi nisu ROS-i, oni se nazivaju drugim glasnicima, jer i na mjestima udaljenima od njihova nastanka ostvaruju značajne biološke učinke zbog snažnog reagiranja s makromolekulama, kao što su nukleinske kiseline i bjelančevine. Malondialdehid (MDA) je visokoreaktivan aldehyd koji pokazuje afinitet prema deoksigvanozinu, deoksiadenozinu i deoksicitidinu, stvarajući kovalentne spojeve s DNA (engl. *DNA adducts*) (116). 4-HNE oštećuje proteine, što u mnogim slučajevima rezultira oštećenjem njihove funkcije. Njegov štetan učinak povezuje se s razvojem dijabetesa, ateroskleroze i Alzheimerove bolesti (114).

Oksidacijom fosfolipida nastaju izoprostani, od kojih se kao vrlo značajan opisuje 8-izoprostan PGF_{2α} (8-iso PGF_{2α}), čija je razina povišena u oksidativnom stresu i za nj se smatra da djeluje kao posrednički čimbenik u raznim bolestima vezanim uz oksidativni stres (113). Lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*, kratica LDL) su također podložni oksidaciji, posebno su peroksidaciji podložne nezasićene masnoće u sastavu LDL. Oksidirani LDL je jače aterogen u odnosu na neoksidirani (113). Lipidna peroksidacija se povezuje s razvojem ateroskleroze (113, 117) i malignih bolesti (113).

1.2.7.2. Oksidativno oštećenje proteina

Ne-kovalentne veze trodimenzionalne strukture proteina su slabe i zato podložne oksidacijskom stresu. I male promjene u trodimenzionalnoj strukturi proteinske molekule i/ili jednoj aminokiselini mogu dovesti do značajnih promjena u funkciji proteina (118). Oksidacijskim oštećenjem može se modificirati aminokiselina na određenom mjestu u proteinskom lancu, može doći do cijepanja peptidnog lanca i povećanja osjetljivosti na proteolitičke enzime (119). Karbonilne skupine nastaju izravnom oksidacijom postraničnih lanaca bjelančevina, posebice aminokiselinskih ostataka prolina, arginina, lizina i tirozina. Osim toga, karbonilne skupine mogu biti spojene s proteinima sekundarnom reakcijom aldehida (MDA, HNE-4, i akrolein) s nukleofilnim postraničnim lancima (120).

Razina produkata oksidacije proteina, kao što su 3-nitrotirozin i karbonilne skupine su povišene u mnogih bolesti koje se povezuju s oksidativnim stresom, kao što su Alzeimerova bolest, dijabetes tipa II, amiotrofična lateralna skleroza, Crohnova bolest i dr. (120).

1.2.7.3. Oksidativno oštećenje DNA

Stanični genom je stalno izložen egzogenim oštećenjima i reaktivnim kisikovim spojevima koji se stvaraju tijekom metabolizma. DNA je osjetljivija na oksidacijski stres od drugih makromolekula. Zbog toga su razvijeni zaštitni mehanizmi; histoni i ostale kromatinske strukture smanjuju izloženost DNA utjecaju reaktivnih spojeva (121,122). U stanici postoje enzimski i neenzimski sustavi antioksidativne obrane, a nastala oštećenja DNA stalno se popravljaju nizom mehanizama. Nepopravljena oštećenja DNA mogu rezultirati mutacijama

kao što su supstitucija baza, delecija i modifikacija lanca, što vodi nastanku zloćudne preobrazbe – karcinogeneze (108,116,123).

ROS-i različitim mehanizmima uzrokuju oštećenja DNA: induciraju oštećenja na bazama i šećerima, uzrokuju jednostruke i dvostruke lomove lanaca, stvaraju abazične regije i poprečne spojeve između DNA i proteina (108,123). Kisikovi radikali mogu izravno izazivati oštećenja na DNA, a neizravno mogu oksidirati proteinske ili lipidne molekule, koji generiraju posrednike koji reagiraju s DNA, stvarajući kovalentne sveze (engl. *adducts*). Jedan od mehanizama neizravnog oštećenja je djelovanje lipidnih peroksida nastalih djelovanjem slobodnih radikala tijekom oksidativnog stresa. Oni ulaze u jezgru gdje stupaju u reakciju s Fe^{2+} ionima pri čemu nastaje alkoksilni radikal koji napada DNA (124).

Reaktivni spojevi mogu oštetiti membrane u stanicama, čemu slijedi povišenje koncentracije kalcijevih iona koji ulaze u jezgru, gdje mogu aktivirati nukleaze, koje onda uzrokuju lomove DNA lanaca (125). Oštećenju DNA doprinosi i oštećenje enzima koji se nalaze u kromatinu, kao što su enzimi zaduženi za sintezu i popravak DNA (126).

Najznačajniji produkt oštećenja DNA je 8-okso-2-deoksigvanozin (engl. *8-oxo-2-deoxyguanosine*, kratica 8-oxodG), čija je razina povišena u ostarjelim organizmima i stanicama, a povezuje se s brojnim patološkim stanjima, kao što su neurodegenerativne bolesti, srčane bolesti i karcinogeneza (122). Najvažniji slobodni radikal koji uzrokuje oštećenje DNA je hidroksilni radikal, koji može nastati različitim mehanizmima, od kojih se kao posebno značajan navodi Fentonova reakcija vodikova peroksida (koji difundira u jezgru) i iona metala. Hidroksilni radikal oštećuje DNA lance, uzrokujući nastanak različitih oksidativnih produkata. Reakcijom hidroksilnog radikala s gvaninom nastaje 8-hidroksigvanin (engl. *8-hydroxyguanine*, kratica 8-OHGua), odnosno njegov nukleozidni oblik 8-hidroksi-2-deoksigvanozin. Keto-enolnom tautomerizacijom nastaje njegov oksidirani oblik 8-okso-7,8-dihidro-2 deoksigvanozin (engl. *8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine*, kratica 8-OHdG). U znanstvenoj literaturi 8-oxodG i 8-OHdG označavaju isti spoj. Oštećenje je promutageno i smatra se mogućim biomarkerom karcinogeneze (112). 8-oxodG pokazuje sklonost spajanju s adenzinom, što uzrokuje transverzijsku mutaciju (engl. *transversion mutation*) koja označuje transverziju purinsko/pirimidinskog para baza u pirimidinsko/purinski par. Navedena mutacija opažena je u mutiranim onkogenima i tumor-supresorskim genima, kao što je gen proteina za supresiju tumora p53 (116). Određivanje 8-

OHdG može biti kvantitativno i izvodi se u uzorcima urina, organa i leukocitnoj DNA, kao biomarker oksidativnog stresa, starenja i karcinogeneze (112).

Iako i druge nukleobaze DNA reagiraju na sličan način s hidroksilnim radikalom, 8-oxodG je najčešće oštećenje DNA, jer relativno lako nastaje, što se tumači njegovim najnižim ionizacijskim potencijalom (127). Hidroksiadenin (8-OH-Ade) nastaje rjeđe od 8-OhdG i smatra se manje mutagenim od 8-OHdG (108).

Neki RNS-i, kao što je peroksinitrit stvaraju 8-nitrogvanin (8-NG), koji se brzo odvaja od DNA, stvarajući potencijalno mutagena apurinična mjesta. RNS-ima se pripisuje veliko značenje u oštećenju DNA tijekom infekcije bakterijom *Helicobacter pylori* (128).

Malondialdehid (MDA) stvara kovalentne sveze (engl. *adducts*) s bazama DNA (deoksiadenozinom, deoksigvanozinom i deoksicitozinom). Kao posljedica stvaranja kovalentnih veza nastaju supstitucije parova baza. Najbolje je proučen kovalentni spoj između MDA i deoksigvanozina – M₁G, koji inducira transverznu (purinsko/pirimidinskog para u pirimidinsko purinski) i tranzicijsku zamjenu (purinsko/pirimidinski u purinsko/pirimidnski) parova baza (116).

Kovalentni spojevi s DNA posebice narušavaju zavojit oblik molekule DNA vodeći mogućnosti nastanka poremećaja translacije sekvencije DNA. Kada se DNA replicira, baza s perzistirajućim nepopravljenim kovalentnim spojem može biti pogrešno pročitana, uzrokujući mutaciju u kritičnim genima, kao što su onkogeni i tumorski supresorski geni. (123).

ROS-i i RNS-i mogu oštetiti prekursore u sintezi DNA, tako da se i oksidirani nukleotidi mogu ugrađivati u DNA. 8-oksogvanin iz oksidiranih nukleotida odstranjuje enzim 8-okso-dGTP pirofosfohidrolaza (engl. 8-oxo-dGTP pyrophosphohydrolase) (122).

Telomere su krajnji segmenti eukariotskih kromosoma, karakterizirani ponavljajućim sekvencijama DNA (TTAGGG, T – timin, A-adenin, G-gvanin) koje štite kromosom od pregradnje i razgradnje. Broj telomernih ponavljajućih sekvencija i duljina telomera smanjuju se svakom staničnom diobom, a s godinama skraćuje se njihova duljina (115,129). Skraćivanje telomera uzrokuju i oksidativni stres te pogreške u replikaciji kromosoma, odnosno telomera (129). Telomere su posebno osjetljive na oksidativno oštećenje, jer sadrže velik udio gvanina (130). Kritično skraćivanje telomera predisponira stanice za senescenciju i apoptozu putem aktivacije p53. Rijetke (mutantne) stanice, u kojima se ne aktivira adekvatan

odgovor na oštećenje DNA (npr. zbog poremećaja funkcije p53) nastavljaju se dijeliti unatoč disfunkcijskim telomerama, uzrokujući nestabilnost genoma (129). Modifikacije baza DNA uključujući transverzije G u T (gvanina u timin) pokazale su se kao najčešće mutacije u p53 supresorskom genu (123).

Oštećenje DNA kroz dulje vrijeme vodi nastanku ozbiljnih poremećaja kao što su ometanje provođenja signala, arest ili indukcija transkripcije, pogreške u replikaciji i genomska nestabilnost, što sve vodi nastanku zloćudnih bolesti (112).

1.2.7.4. Mutacije genoma

Nepopravljena oštećenja DNA rezultiraju mutacijama, a mutacije gena proteina koji suprimiraju tumore koji sudjeluju u apoptozi, kao što su p53, p19, ARF, Rb, PTEN, TRAIL, CD 95/fas mogu dovesti do preživljavanja maligno promijenjenih stanica. Mutacijom mogu biti aktivirani brojni onkogeni, od kojih se kao najvažniji navode Bcl-2, MDM2 IAPs, NF- κ B, Akt, PI3K). Mutacije u genima koji reguliraju apoptotične puteve prijenosa su česte u većini malignih bolesti (123,131), a mutacija gena za p53 je najčešća u zloćudnim tumorima ljudi (123). Mutacija u Ras genu nađena je u gotovo četvrtini svih tumora. Zamjena gvanina s 8-oksogvaninom u kodonu 61 Ras gena uzrokuje mutirani Ras protein, čija aktivacija uzrokuje hiperaktivaciju mitogenog ERK (kratica od engl. *extracellular signal-regulated kinase*) puta (122).

1.2.8. Stanična senescencija i adaptivni odgovor na oštećenje DNA

Kada proizvodnja i učinak ROS-a nadvladaju obrambene mehanizme i mehanizme popravka DNA, u stanicama koje se dijele dolazi do aktivacije odgovora DNA na oštećenje (engl. *DNA damage response*, kratica DDR), kojemu je svrha spriječiti daljnju diobu stanice i njezinu zloćudnu preobrazbu (110,132).

Kao odgovor na stanične stresove koji dovode do oštećenja DNA, aktivira se protein p53 koji, ovisno o jačini oštećenja DNA, aktivacijom različitih ciljnih gena, čija je uloga sprečavanje daljnje pogoršanja oštećenja DNA i zaštita od zloćudne promjene, dovodi stanice u stanje

ostarjelosti ili senescencije (engl. *senescence*) ili posreduje staničnu apoptozu (110). Smatra se da vrlo visoka doza ROS-a inducira smrt stanica, umjerena inducira senescenciju, dok su niske doze bez učinka ili su čak mitogene (110, 133). Aktivacija p 53 proteina može voditi i privremenom zastoju u staničnoj diobi, koji traje dok se oštećenje ne popravi (132).

Stanična senescencija (engl. *cellular senescence*) je posljedica kompleksnog genskog izražaja koji stanice koje proliferiraju dovodi do permanentnog aresta staničnog ciklusa u G1 fazi, a nastaje kao odgovor na stres koji ih dovodi u rizik od zloćudne promjene. U senescentnim stanicama povećana je genska ekspresija gena povezanih s upalom (interleukin-1 β , interleukin-6 i ostalih), takve stanice oslobađaju brojne proupalne citokine, čimbenike rasta i razgradne proteaze koje ometaju funkciju susjednih stanica koje nisu u stanju senescencije (110,134). Proizvodnja proupalnih citokina i kemokina je neophodna za indukciju i održavanje senescencije, koja sprečava malignu transformaciju premalignih stanica, a također se smatra da je odgovorna za odstranjivanje tumorskih stanica mehanizmom aktivacije stanica imunog sustava (135).

Senescentne stanice ostaju živuće (vijabilne), ali energijski metabolizam (koji je karakteriziran povećanom beta-oksidacijom masnih kiselina uz reduciranu glikolizu i sintezu masnoća) usmjeren je na sprečavanje njihove maligne transformacije. Također je inhibirana i sinteza proteina. Navedene promjene su povezane s oštećenom funkcijom stanice (110).

Senescencija endotelnih stanica povezana je s bržim pogoršanjem arterijske hipertenzije i napredovanjem kardiovaskularnih bolesti (110). U hepatocita je stanična senescencija povezana s razvojem ciroze jetre (136). Senescencija alveolarnih stanica povezana je s plućnim emfizemom (137). Postmitotičke stanice kao što su neuroni, kardiomiociti, stanice skeletne muskulature i adipociti ne podliježu senescenciji. U njih dolazi do adaptivnog odgovora na stres kako bi se osigurale vitalne funkcije od važnosti za cjelokupni organizam; u stanicama srčanog mišića dolazi do patološkog remodeliranja s posljedičnom srčanom ventrikularnom disfunkcijom i srčanim zatajivanjem, u stanicama skeletnih mišića nastaje smanjen porast mase i povećana degradacija proteina, u perifernom supkutanom adipoznom tkivu je inhibirana adipogeneza, dok se u visceralnom masnom tkivu nakupljaju masnoće. U živčanim stanicama dolazi do pokretanja staničnog ciklusa, čemu slijedi stanična smrt, što se povezuje s neurodegenerativnim bolestima (110).

Aktivacija zaštitnih mehanizama od tumora pogoduje pogoršanju kronične upale, ubrzanom razvoju bolesti i starenju organizma. Senescencija stanica koje se dijele i adaptivne promjene u postmitotičnim stanicama povezuju se s poremećajem funkcija organa, razvojem kroničnih bolesti i konačno smrti organizma. Prema Erolu, navedene promjene u stanicama mogu

izazvati sve promjene karakteristične za metabolički sindrom, autor ih je nazvao metaboličkom sindromu sličnom bolešću“ (engl. *metabolic syndrome-like disease*) (110).

Premda starost sama po sebi ne znači bolest, ona predstavlja sklonost obolijevanju od kroničnih bolesti. Sa starenjem nastaju povećanje inzulinske rezistencije, pogoršanje kronične upale i oksidativnog stresa (138), slabi sposobnost popravka oštećenja DNA (109,139). U starijoj dobi rastu incidencija obolijevanja i smrtnost od kroničnih bolesti (109,140).

1.2.9. Stanična apoptoza

Protein koji suprimira tumore p53 posreduje apoptozu izravno aktivirajući transkripciju više gena koji programiraju staničnu smrt. On aktivira gene iz porodice Bcl-2 i Bax, IGF-BP3, DR5, Fas i Apaf. Svoje djelovanje u apoptozu iskazuje i supresijom antiapoptotičnih gena kao što su Map4 i survivin (engl. *survivine*), izravnim apoptogeničnim učinkom na mitohondrije, kamo se translocira i interreagira s Bcl-cl i Bcl-2 proteinima te indukcijom permeabilizacije mitohondrija. Smanjen učinak p53 vodi preživljavanju stanica s oštećenjem DNA, stvarajući predispoziciju za razvoj tumora (123).

1.3. Povezanost metaboličkog sindroma i oksidativnog stresa

Oksidativni stres sudjeluje u razvoju metaboličkog sindroma i njegovih komplikacija, kao što su kardiovaskularne bolesti, cerebrovaskularne bolesti, šećerna bolest tipa II i druge (141).

U osoba s metaboličkim sindromom povišena je aktivnost enzimskih sustava koji proizvode ROS-e, kao što su NADPH-oksidaza (89), ksantin-oksidaza (100), mijeloperoksidaza (141), povećana je proizvodnja i u mitohondrijima (91). ROS-i i RNS-i djelovanjem na stresom aktivirane kinaze (engl. *stress activated kinases*) uzrokuju inzulinsku rezistenciju, a aktivacijom gena koji kodiraju sintezu proupalnih tvari pogoršavaju kroničnu upalu niskog intenziteta (17,18).

Pokazatelji oksidativnog stresa povišeni su u osoba s metaboličkim sindromom, a također je ustanovljena povezanost pokazatelja masnoga tkiva (44,142) i inzulinske rezistencije (141, 142) s pokazateljima oksidativnog stresa. Pokazatelji oksidacije lipida kao što su totalni

peroksidi u plazmi (143) reaktivni aldehidi (144), lipidni peroksidi (143), izoprostani (141, 145), pokazatelji oštećenja proteina kao što su karbonilirani proteini i nitrotirozin (120) povišeni su u osoba s metaboličkim sindromom, dočim su snižene razine antioksidativnih vitamina C i E (142) i sustavni pokazatelji antioksidativne zaštite, kao što su totalni antioksidativni kapacitet (141, 143), totalni antioksidativni status (144), razina reduciranog glutaciona (146), odnos reduciranog i oksidiranog glutaciona (147,148). Visceralni adipozitet i steatoza jetre bili su povezani s porastom koncentracije MDA, a inzulinska rezistencija je bila povezana s koncentracijom oksidiranog LDL-kolesterola i izoprostana (142). Koncentracija HDL- kolesterola u osoba s metaboličkim sindromom je niža, u njih su čestice HDL „disfunkcionalne“; manje su veličine i slabijih protuupalnih te antioksidativnih mogućnosti, niža je koncentracija podskupine HDL-3, koja iskazuje protuupalna i antioksidativna svojstva (106). U osoba s metaboličkim sindromom, čak i bez povišene razine triglicerida, HDL3 čestice u jezgri imaju povećan sadržaj triglicerida, što se povezuje s poremećajem njihove funkcije (149).

Prema podacima iz pregledane literature, većina rezultata istraživanja povezanosti oštećenja jezgrene DNA (engl. *nuclear DNA*, kratica nDNA) i metaboličkog sindroma ukazuje na njihovu povezanost. Izraženije oštećenje DNA ustanovljeno je u osoba s metaboličkim sindromom (143), koronarnom srčanom bolešću (150,151). U osoba s dijabetesom tipa II ustanovljeno je jače opće i oksidativno oštećenje DNA (152-154). Za razliku od navedenih rezultata, Seet i sur. nisu našli poveznost metaboličkog sindroma i oštećenja DNA (155).

Istraživanja koja su ispitivala pokazatelje oksidativnog oštećenja lipida u inače zdravih ljudi s karakteristikama metaboličkog sindroma imala su suprotne rezultate. Prema nekima, pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida nisu bili značajno različiti između ispitanika s metaboličkim sindromom i kontrolne skupine (156), odnosno razlike su bile minimalne (155), dočim su prema drugima bili značajno povišeni u ispitanika s metaboličkim sindromom (145). Tomasello i sur. nalaze veće oštećenje DNA i pokazatelja upale povezano s većom količinom masnoga tkiva (157), dok Seet i sur. ne nalaze povezanost oštećenja DNA s metaboličkim sindromom (155).

1.4. Bolesti povezane s metaboličkim sindromom

1.4.1. Arterijska hipertenzija

Patogeneza esencijalne arterijske hipertenzije vrlo je složena, više od 50 gena uključeno je u regulaciju krvnog tlaka (97). Reninsko-angiotenzinski sustav (RAS) igra ključnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka djelujući na tonus krvnih žila (87). Velika važnost pridaje se angiotenzinu II (AT II) u razvoju kako arterijske hipertenzije, tako i ateroskleroze (97). AT II stimulira NADPH oksidazu, a vodikov superoksid i vodikov peroksid su glavne signalne molekule u prijenosu angiotenzinskog učinka na glatke mišićne stanice stijenke krvnih žila (89). I samo mehaničko rastezanje krvne žile uzrokuje aktivaciju NADPH oksidaze te povećava oksidativni stres u njezinoj stijenci (97). Povećana količina ROS-a smanjuje količinu raspoloživog dušikova oksida, tako da nastaje toksični peroksinitrit, koji pak, dodatno, oksidirajući tetrahidrobiopterin, smanjuje sintezu dušikova oksida (158). Oksidativni stres i endotelna disfunkcija doprinose razvoju ateroskleroze (97,158). Endotelna disfunkcija je uzrok arterijske hipertenzije i djelomično je posredovana oksidativnim stresom (141). Ravnoteža između oksidansa i antioksidansa je važan čimbenik u regulaciji krvnog tlaka. ROS-i i RNS-i sudjeluju u regulaciji žilnog tonusa, a njihova povećana sinteza i pojačan učinak povezani su s povišenim krvnim tlakom (17,141). Liječenje arterijske hipertenzije s blokatorima AT 1 receptora nije samo snizilo krvni tlak, nego je i smanjilo razinu malondialdehida (MDA) te smanjilo endotelnu disfunkciju (159).

1.4.2. Zatajivanje srca

Oksidativni stres i ROS-i podrijetlom od NADPH oksidaze posebice su važni u bolesnika sa zatajivanjem srca. U bolesnika s dekompenziranom ishemičnom i dilatativnom kardiomiopatijom ustanovljena je povišena razina ROS-a podrijetlom od NADPH oksidaze i povišena razina TNF— α (97). Povećano stvaranje ROS-a može smanjiti dostupnost dušikova oksida i oštetiti dijastoličku funkciju srca (97). Povišena razina peroksinitrita može dovesti do oštećenja sistoličke funkcije srca (160).

1.4.3. Koronarna bolest

Koronarna bolest je češća u bolesnika s metaboličkim sindromom (141). Rizični čimbenici za koronarnu bolest, kao što su arterijska hipertenzija, ateroskleroza, šećerna bolest i hiperkolesterolemija povezani su s povišenim oksidativnim stresom u stijenci krvnih žila (158). Povišena razina oksidativnog stresa povezana je s težinom koronarne bolesti, proizvodnja ROS-a je značajno viša u nestabilnoj u odnosu na stabilnu anginu pektoris, smatra se da ROS-i mogu utjecati na stabilnost plaka (161).

Ishemija u srcu dovodi do konverzije ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu, čijim djelovanjem nastaju velike količine ROS-a i RNS-a (100,103). I ostali enzimski sustavi, kao što su NADPH oksidaze i sintaza dušikova oksida doprinose povišenju razine oksidativnog stresa (103).

Razina oksidativnog oštećenja DNA u limfocitima periferne krvi bila je viša u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom u odnosu na bolesnike sa stabilnom anginom pektoris (150). Razina oksidativnog oštećenja DNA u cirkulirajućim progenitorskim endotelnim stanicama bila je viša u bolesnika s koronarnom bolešću u odnosu na zdrave ispitanike, također je bila viša u bolesnika s infarktom miokarda u odnosu na bolesnike sa stabilnim anginom pektoris. Duljina telomera bila je kraća u stanica bolesnika s infarktom miokarda u odnosu na bolesnike sa stabilnom anginom pektoris (151).

1.4.4. Šećerna bolest tipa II

Inzulinska rezistencija, kronična upala i oksidativni stres povezani su s nastankom šećerne bolesti i njenim komplikacijama. Rezultati brojnih istraživanja navode na činjenicu da dugotrajno izlaganje povećanim koncentracijama glukoze i/ili masnih kiselina povezanih s povećanim stvaranjem ROS-a i RNS-a dovodi do njihova oštećenja (103). Beta-stanice imaju relativno nisku razinu detoksificirajućih i redoks-regulirajućih enzima, kao što su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza i tioredoksin (91,103). Prekomjerman unos glukoze i slobodnih masnih kiselina dovodi do oštećenja mitohondrija u beta stanicama gušterače.

Povećano opterećenje glukozom stimulira i NADPH oksidaze. Navedenim mehanizmima dodatno se povećava proizvodnja reaktivnih spojeva (91).

Brownlee opisuje četiri mehanizma kojima hiperglikemija uzrokuje komplikacije šećerne bolesti: aktivacija poliolskog puta, povećano stvaranje uznapredovalih proizvoda glikozilacije (engl. *advanced glycation end-products*, kratica AGE), aktivacija protein kinaze C i aktivacija heksozaminskog puta. Hiperglikemija aktivira sve navedene mehanizme, a blokada proizvodnje ROS-a ili interferiranje u njihove signalne puteve snižava aktivnost svih četiriju puteva aktivacije (162).

U bolesnika sa šećernom boleću povećana je oksidacija lipida, proteina (141) i DNA (141, 152-154). Mehanizmi koji vode povišenju razine OS u bolesnika sa šećernom bolešću su autooksidacija glukoze, nastanak uznapredovalih proizvoda glikozilacije (engl. *advanced glycation end-products*, kratica AGE) i poliolski put (163). Uznapredovali produkti glikozilacije, djelujući na stanične receptore za AGE (engl. *receptors for advanced glycation end-products*, kratica RAGE), preko kojih oni potiču daljnje stvaranje reaktivnih spojeva, a aktivacijom aktivacijskog čimbenika NF κ B potiču lučenje proupalnih tvari (18,163).

Oksidativni stres i kronična upala u osoba s dijabetesom tipa II povezani su s endotelnom disfunkcijom, ubrzanom aterosklerozom i posljedičnim oštećenjem niza organa (163). Asimetrični dimetil arginin (engl. *asymmetric dimethyl arginine*, ADMA) je endogeni kompetitivni inhibitor sintaze dušikova oksida, nastaje katabolizmom ubikvitarnih bjelančevina koje sadrže metilirane argininske ostatke. Njegova razina povišena je u bolesnika sa šećernom boleću. Povišena serumska razina homocisteina, koja je povišena u osoba s metaboličkim sindromom izravno inhibira enzim koji razgrađuje ADMA, dimetilarginin dimetilaminohidrolazu (DDAH) (164). Aktivacija poliolskog puta dovodi do smanjenja količine reduciranoga NADPH, što smanjuje količinu glutaciona u stanici i sintezu dušikova oksida (163).

1.4.5. Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti kao što su Alzhemierova, Parkinsonova, Huntington-Leeova, lateralna amiotrofična skleroza, multipla skleroza i druge, povezane su s kroničnom upalom i oksidativnim stresom koji sudjeluju u oštećivanju i smrti stanica živčanog sustava (165).

Senescencija glijalnih stanica i poremećaj njihove funkcije također se povezuje s oksidativnim stresom i razvojem neurodegenerativnih bolesti (110).

1.4.6. Metabolički sindrom i karcinogeneza

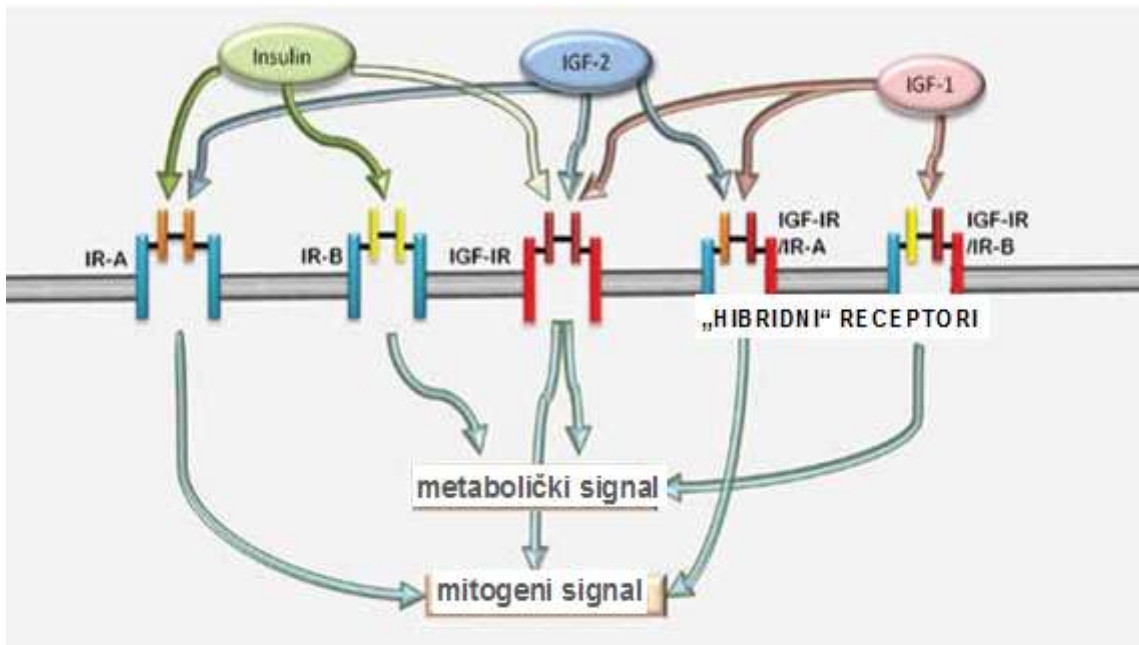
S poremećajima vezanim uz metabolički sindrom povezuje se veća učestalost i slabija prognoza brojnih zloćudnih bolesti.

U osoba s većim indeksom tjelesne mase ustanovljena je veća smrtnost od svih vrsta zloćudnih bolesti ukupno, kao i od pojedinačnih tumora, kao što su rak jednjaka, debelog crijeva, jetre, žučnog mjehura, gušterače i bubrega, kao i od non-Hodkginova limfoma te multiplog mijeloma (166). Podaci o povezanosti debljine i raka prostate se razlikuju (167). Vjerojatnost raka debelog crijeva povezana je s indeksom tjelesne mase i opsegom struka (168), dijabetesom (169,170), omjerom IGF (engl. *insulin-like growth factor*, kratica IGF) i proteina koji vezuje IGF-3 (engl. *insulin-like growth factor binding protein-3*, kratica IGFBP-1), razinom C-peptida u serumu, a negativno s razinom IGFBP-1 (171). Karcinom dojke češći je u adipoznih žena, što se tumači većom razinom estrogena. Povećana incidencija karcinoma jednjaka, endometrija i karcinoma žučnih vodova također je češća u pretilih osoba. Šećerna bolest tipa II pokazala se kao prediktor smrtnosti, neovisan o debljini, od raka debelog crijeva, gušterače i dojke u žena, a u muškaraca od raka jetre i mokraćnog mjehura (167).

Mehanizmi, za koje se pretpostavlja da pogoduju nastanku i rastu tumora u osoba s metaboličkim sindromom predmet su istraživanja. Metabolički sindrom je upalno stanje povezano s povećanim oksidativnim stresom. Karcinogeneza može biti uzrokovana izravnim djelovanjem ROS-a i RNS-a na DNA, neizravno preko proizvoda oštećenja lipida, kao što su reaktivni aldehidi. ROS-i mogu povećati ekspresiju transkripcijskih čimbenika, kao što su c-fos i c-jun (172).

Osim povećanog mutagenog oštećenja DNA, s razvojem zloćudnih tumora povezuje se i povišena razina inzulina i inzulinu sličnih čimbenika rasta te drugih hormona. Smatra se da je hiperinzulinemija u osoba s metaboličkim sindromom povezana s povećanim rizikom obolijevanja i smrtnosti od zloćudnih bolesti. Važna uloga u prijenosu signala za rast tumorskih stanica pridaje se djelovanju inzulina i inzulinu sličnih čimbenika rasta (engl. *insulin-like growth factor*, kratica IGF), koje ostvaruju vezivanjem na inzulinske receptore i receptore za IGF. Pored navedenih receptora, postoje i tzv. hibridni receptori, koji se sastoje od jedne podjedinice za inzulinski receptor i druge podjedinice za IGF, na koje se vežu pretežito IGF-1 i IGF-2. Učinak IGF na rast odnosi se na poticanje sinteze proteina, proliferacije i diferencijacije stanica te redukciju apoptoze (167). Inzulin i inzulinu slični čimbenici rasta te njihovi receptori slične su molekularne strukture. Inzulin vezivanjem za podtip „A“ inzulinskog receptora aktivacijom MAPK posreduje mitogeni učinak, a vezivanjem za podtip „B“ receptora aktivacijom protein kinaze B (AKT) posreduje metabolički i antiapoptotični učinak. Inzulin ostvaruje i slabije izražen mitogen i metabolički učinak na receptor za inzulinu sličan čimbenik rasta 1 (engl. *insulin-like growth factor 1 receptor*, kratica IGF-1R). Inzulinu sličan čimbenik rasta -1 (engl. *insulin-like growth factor-1*, kratica IGF-1) svoj učinak ostvaruje preko IGF-1R i „hibridnih“ receptora, za koje se veže znatno jačim afinitetom u odnosu na inzulin (167,173). U jetri se proizvodi 75% IGF-1, a hiperinzulinemija povećava njegovu proizvodnju (167). IGF-2, koji je u ljudi najvažniji fetalni čimbenik rasta također je izražen u jetri (167,174).

Slika 4. prikazuje shemu vezanja inzulina, IGF-1 i IGF-2 na stanične receptore.

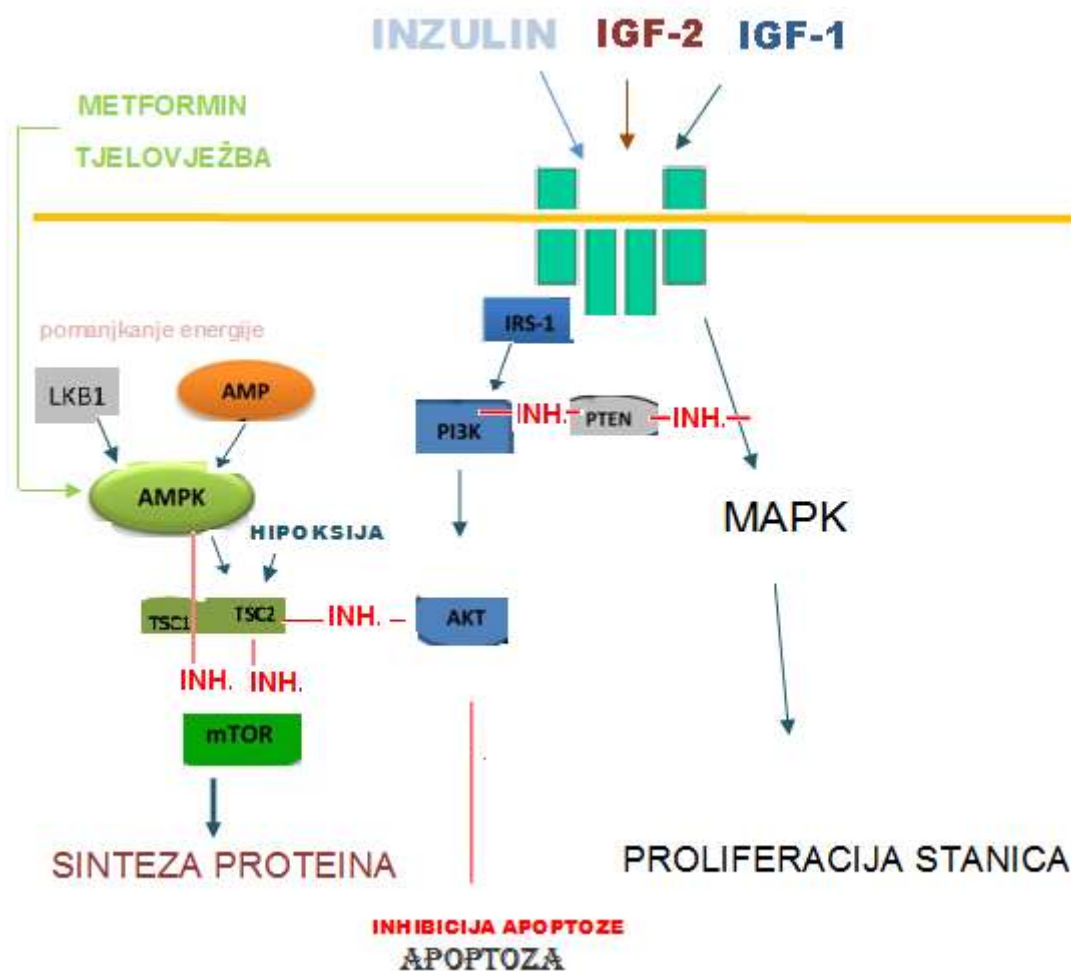


Slika 4. Vežanje inzulina i inulinu sličih čimbenika rasta na stanične receptore. IGF-1 i IGF-2. Inzulin primarno djeluje preko inzulinskih receptora (IR-A i IR-B), a sa smanjenim afinitetom i na receptor za IGF-1R. IGF-1 djeluje na receptor za IGF-1 (IGF-1R) i „hibridne“ receptore IGF-1R/IR-A te IGF-1R/IR-B. IGF-2 se vežuje na IR-AIGF-1 i IGF-1R/IR-A „hibridni“ receptor. Vežanje inzulina i IGF-2 na IR-A pretežito rezultira mitogenim učinkom a aktivacijom receptora IR-B inicira metaboličko signaliziranje. IGF-1 i IGF-2 djelovanjem na IGF-1R i IGF1R/IR-A „hibridni“ receptor pretežito aktiviraju mitogeni signalni put. Aktivacija „hibridnog“ receptora IGF-1R/IR-B rezultira pretežito metaboličkim učinkom. Prikazano uz dopuštenje izdavača. (Reprinted from *Endocrine Practice*, Vol 16 Gallagher EJ, Fierz Y, Ferguson RD, Leroith D, The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy. 864-73, 2010, with permission from the American Association of Clinical Endocrinologists)

IGF-1 i receptor za IGF-1 (IGF-1 R) su neophodni za normalan rast i funkciju stanice, a receptori za IGF-1 i inzulin jače su izraženi u tumorskim stanicama. Gen za IGF-2 je u zdravih stanica „utisnut“ (engl. *imprinted*), tako da je izražen samo alel naslijeđen od majke. Gubitak „utisnutosti“ alela gena za IGF-2 rezultira u njegovoj prekomjernoj izraženosti, koja je nađena u stanicama sluznice osoba s karcinomom debelog crijeva (174). Pojačana ekspresija i učinak čimbenika rasta te njihovih receptora potiču rast i razmnožavanje tumorskih stanica. IGF ometa apoptozu inhibicijom p53, a također inducira angiogenezu. Inzulin povišuje koncentraciju IGF-1, a neke zloćudne stanice mogu i same proizvoditi IGF-1 (174). Tumorski supresorski protein adenozin monofosfat protein kinaza (AMPK) izravnim učinkom na mTOR (kratica od engl. *mammalian target of rapamycin*). i posrednim učinkom, stimulacijom aktivacije TSC (kratica od engl. *tuberous sclerosis complex*) kompleksa inhibira mitogeni učinak čimbenika rasta. PTEN (kratica od engl. *phosphates and tensin*

homolog deleted on chromosome) inhibira PI3K, a također i mitogeni učinak, koji se prenosi aktivacijom MAPK (kratica od engl. *mitogen activated protein kinases*).

Slika 5. prikazuje prijenos signala inzulina i inzulinu sličnih čimbenika rasta za metaboličke, antiapoptotične i mitogene učinke.



Slika 5. Pojednostavljen prikaz prijenosa signala za metabolički, apoptotični i proliferativni učinak. Inzulin, IGF-1, IGF-2 vežu se na receptor. Slijedi aktivacija fosfatidil inozitol kinaze (PI3K) i protein kinaze B (AKT). Jedan od puteva prijenosa signala AKT je inaktivacija apoptoze. Drugi put je fosforilacija TSC (kratica od engl. *tuberous sclerosis complex*), što odstranjuje inhibiciju mTOR (kratica od engl. *mammalian target of rapamycin*). mTOR aktivira sintezu proteina. Tumorski supresor PTEN (kratica od engl. *phosphates and tensin homolog deleted on chromosome*) inhibira PI3K. Manjak energije uzrokuje ekspresiju supresorskog gena LKB1 (kratica od engl. *liver kinase B-1*) i manjak adenozin monofosfata (AMP), što aktivira adenozin monofosfat protein kinazu (AMPK), koja inhibira sintezu proteina izravno preko inhibicije mTOR ili neizravno preko aktivacije TSC (kratica od engl. *tuberous sclerosis complex*) kompleksa. Hipoksija uzrokuje ekspresiju tumorskog supresorskog gena REDD1 (kratica od engl. *regulated in development and DNA damage responses 1*), koji aktivira TSC kompleks. Treći put je aktivacija signala za staničnu proliferaciju preko aktivacije MAPK (kratica od engl. *mitogen activated protein kinases*). PTEN inhibira i ovaj signalni put. Povećana koncentracija i učinak inzulina te inzulinu sličnih čimbenika rasta, kao i poremećaj funkcije tumor-supresorskih gena, koji može biti uzrokovan njihovim mutacijama pogodovat će nastanku i proliferaciji tumorskih stanica. Metformin i tjelovježba stimuliraju AMPK. Prilagođeno prema Gallagher i sur.

Proteini koji vežu čimbenike rasta (engl. *insulin-like growth factor binding proteins*, kratica IGFBP) produžuju poluživot IGF-1 i IGF-2 u plazmi štiteći ih od degradacije, ali i smanjujući njihovo vezivanje za receptore. Do sada ih je otkriveno šest. Smatra se da IGFBP 3 iskazuje protutumorsko djelovanje. p53 povišuje koncentraciju IGFBP-3, čija je koncentracija od svih IGFBP-a najviša, a povišena razina inzulina i IGF-1 je snizuju. Povišena koncentracija inzulina u plazmi također snizuje razinu IGFBP-1, kojemu se pripisuje antitumorski učinak (174). Estrogeni induciraju ekspresiju receptora za IGF-1 u stanicama karcinoma dojke s pozitivnim estrogenim receptorima. U adipoznih žena, zbog veće mase masnoga tkiva, povećana je razina aromataze, koja povećava sintezu estrogena. Debljina, hiperinzulinemija i povišena koncentracija IGF-1 smanjuju razinu globulina koji vezuje spolne hormone (engl. *sex hormone-binding globulin* kratica SHBG), povećavajući razinu slobodnog estrogena i njegov učinak. Aktivacija IGF-1R i receptora za estrogene sinergistički djeluju na aktivaciju mitogenima aktiviranih proteinskih kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinases*, kratica MAPK). Leptin, inzulin, TNF- α i IL-6, koji su povišeni u osoba s metaboličkim sindromom, induciraju aromatazu (168).

1.5. Nealkoholna masna jetra

Nealkoholna masna jetra (engl. *Non-alcoholic fatty liver disease* kratica NAFLD) je najčešća kronična jetrena bolest u zapadnim zemljama, čija prevalencija raste širom svijeta. NAFLD se smatra jetrenom manifestacijom MS, neki autori predlažu da se NAFLD uvrsti u kriterije za dijagnostiku MS (175, 176).

Procjenjuje se da danas između 17 i 33% odraslih osoba ima masnu jetru (177). U većini slučajeva radi se o jednostavnoj masnoj jetri. U 10 do 20% bolesnika s NAFLD nalazi se nealkoholni steatohepatitis (engl. *non-alcoholic steatohepatitis*, kratica NASH) koji je karakteriziran s oštećenjem hepatocita i upalom (177). Nealkoholni steatohepatitis može voditi fibrozi i i cirozi jetre, jetrenoj insuficijenciji te hepatocelularnom karcinomu. Citroza se, prema različitim statistikama, razvija između 5 do 20% slučajeva NASH (178). Oko 70% pacijenata s kriptogenom cirozom jetre imaju kliničke karakteristike koje upućuju na NASH (179). Nakupljanje masnoća u jetri nastaje ponajviše zbog prekomjerna dotoka masnih kiselina u jetru, kao rezultat periferne inzulinske rezistencije, pretežito iz masnog tkiva (81% natašte, 61% postprandijalno), ali i zbog povećane jetrene *de novo* sinteze masnih kiselina i

smanjena eksporta masnih kiselina uslijed nedostatne sinteze lipoproteina (7% natašte i 9% postprandijalno). Slobodne masne kiseline podrijetlom iz hrane čine 10% prinosa natašte i 26% postprandijalno (180).

Inzulinska rezistencija i povišene slobodne masne kiseline utječu na oksidaciju masnih kiselina uzrokujući stvaranje slobodnih radikala u hepatocitima (177). Smatra se da NASH nastaje mehanizmom „dvaju udara“ (engl. *two hits*); prvi događaj je jetrena akumulacija triglicerida, uzrokovana inzulinskom rezistencijom, a drugi je stvaranje slobodnih radikala i oslobađanje proupalnih tvari (177).

Masna jetra povezana je s kroničnom upalom, u kojoj ulogu imaju, kako stanice jetrenog parenhima, tako i imune stanice (68,182). Jetra, između brojnih ostalih funkcija djeluje i kao važan sastavni dio sustava prirodne imunosti, a u sklopu metaboličkog sindroma ima važnu ulogu u nastanku i održavanju kroničnog upalnog stanja. U jetri se odvija biosinteza od 80% do 90% proteina sustava urođene imunosti, uključujući komponente komplementa i proteine odgovora akutne faze (68).

U jetri se osim hepatocita, stanica žučnog epitela, sinusoidalnih stanica nalaze i stanice imunskog sustava, od kojih su najbrojnije Kupfferove stanice i limfociti. Među limfocitima su najbrojnije stanice „prirodne ubojice“ (engl. *natural killer cells*, kratica NK-cells) i „T-stanice prirodne ubojice“ (engl. *natural killer T cells*, kratica NKT-cells), dok B limfociti čine manji dio limfocita. NKT stanice se nalaze u jetri u znatno većem broju nego u ostalim tkivima i organima (64,68). NKT stanice imaju ulogu u održavanju ravnoteže između proupalnih i protuupalnih tvari (68,183), a smanjenje njihova broja povezuje se s nastankom masne jetre (68). U imunskom odgovoru akutne faze sudjeluju kako hepatociti, tako i stanice imunog sustava (68,182).

Nakupljanje masnoća u jetri, cirkulirajuće masne kiseline podrijetlom iz masnoga tkiva, hrane, produkti crijevnih bakterija, ugljikohidrati, kao i citokini podrijetlom iz masnoga tkiva, kao što je TNF potiču aktivaciju aktivaciju proupalnih gena u hepatocitima (64) i stanicama sustava prirodne imunosti u jetri (68).

Povećan unos fruktoze (koja je sastojak glukozno-fruktoznog sirupa, široko korištenoga sredstva za zaslađivanje napitaka) ističe se kao jedan od važnih uzroka nastanka NAFLD. Kao mogući mehanizmi kojima povećan unos fruktoze uzrokuje NAFLD navode se povećana aktivnost fruktokinaze i deplecija adenzintrifosfata (ATP) (184), povećana proizvodnja triglicerida, pogoršanje upale i povećanje lipidne peroksidacije (185). Za razliku od glukoze, koja postprandijalno ulazi pretežito u mišićno tkivo, gotovo sva resorbirana fruktoza metabolizira se u jetri, jer jetra sadrži fruktokinazu, koju nemaju druga tkiva (11). Fruktoza

može u jetri biti metabolizirana u glukozu, od koje se sintetiziraju glikogen i trigliceridi. U metabolizmu fruktoze u jetri ne postoji povratna inhibicija fosfofruktokinaze citratom i ATP, tako da je fruktoza u odnosu na glukozu znatno veći izvor glicerol-3-fosfata i acetil-Co-A za jetrenu lipogenezu. Fruktoza ne stimulira lučenje inzulina i leptina, koji su supresori apetita, pa se smatra da prehrana bogata fruktozom uzrokuje i veći porast tjelesne mase (186). Povećana ekspresija 11-beta hidrokortikosteroid dehidrogenaze u jetri također se dovodi u svezu s nastankom nealkoholne masne jetre (187).

Smatra se da i poremećaj mikrocirkulacije u jetri, koji nastaje zbog suženja mikrovaskularnih prostora uslijed hipertrofije hepatocita ispunjenih lipidima uzrokuje pogoršanje upale i oksidativnog stresa (188).

Nealkoholna masna jetra nije samo odraz poremećaja metabolizma i kroničnog upalnog stanja u sklopu MS, nego je važan aktivni sudionik u njegovu razvoju i značajno utječe na sustavna zbivanja. Rezultati nekih istraživanja navode na zaključak da bi steatoza jetre mogla biti prvi (189), odnosno najbolji (190) pokazatelj povezan s kardiometaboličkim rizikom. Prema rezultatima Fabbrini i sur., sadržaj triglicerida u jetri je bolji pokazatelj poremećaja metabolizma vezanih uz pretilost od količine visceralnoga masnoga tkiva (191). Speliotes i sur. su u svom istraživanju s ispitanicima iz *Framingham Heart study* našli povezanost masne jetre, neovisnu od visceralne masnoće s pokazateljima metabolizma glukoze (prevalencijom dijabetesa tipa II, oštećene tolerancije glukoze i inzulinske rezistencije), metabolizma lipida (HDL-kolesterol, trigliceridi) i razine adiponektina (192). D'Adamo i sur. su na temelju rezultata istraživanja provedenoga u skupini pretilih adolescenata zaključili da masna jetra ima središnju ulogu u ranim zbivanjima vezanima uz patogenezu inzulinske rezistencije (193). Pokazatelji masne jetre su se pokazali kao značajni prognostički čimbenici za razvoj bolesti. Drugi autori su našli da je visceralno masno tkivo jače povezano s čimbenicima metaboličkog rizika u pretilih muškaraca (194). Količina visceralnog masnoga tkiva, a ne masnoća u jetri bila je jedini snažan neovisan prediktor smrtnosti od svih uzroka (195). Kim i sur. su našli neovisnu povezanost visceralnog masnog tkiva i pokazatelja količine masti u jetri s metaboličkim sindromom, ustanovili su bolju povezanost visceralnog masnog tkiva s metaboličkim sindromom u mršavih ispitanika a bolju povezanost masne jetre s metaboličkim sindromom u pretilih ispitanika (196).

1.6. Skeletni mišići i metabolički sindrom

1.6.1. Inzulinska rezistencija u skeletnim mišićima

Inzulinska rezistencija skeletnih mišića rezultat je složena međudjelovanja između mišića i drugih tkiva, među kojima su najvažnija masno tkivo i jetra, a uzrokuju je povećan dotok slobodnih masnih kiselina, proupalni spojevi i oksidativni stres (197).

Tijekom „bazalnih“ uvjeta, između obroka 50% glukoze metabolizira se u mozgu, koji je inzulin-neovisan organ, oko 25% u splahnhičkom području (jetra i gastrointestinalna tkiva), preostalih 25% u tkivima ovisnima o inzulinu, ponajviše u mišićima (198). Poslije obroka, porast glukoze u plazmi potiče oslobađanje inzulina iz pankreatičnih beta stanica, 75% glukoze preuzimaju mišići, dok se mali dio (5 do 15%) metabolizira u adipocitima (11). U postapsorptivnom peridu, mišići većinu svojih energijskih potreba podmiruju oksidacijom masnih kiselina (199).

Povećana lipoliza dovodi do povećanja dotoka slobodnih masnih kiselina u mišićna tkiva. Slobodne masne kiseline i proupalne tvari koje luče adipociti, makrofazi, hepatociti i ostale stanice aktiviraju stresom aktivirane kinaze (engl. *stress activated kinases*). Navedene kinaze kataliziraju fosforilaciju serinskih ostataka na supstratu inzulinskog receptora-1 (engl. *insulin receptor substrate-1*, kratica IRS-1), inhibirajući njegovu aktivnost i preusmjeravajući ga prema proteasomskoj degradaciji. Osim djelovanja na IRS-1, stanične kinaze mogu ometati prijenos inzulinskog signala na svim ostalim razinama (200).

Povećan dotok masnih kiselina dovodi do njihova povećana unosa u mišiće i reesterifikacije u trigliceride. Patološko ektopično nakupljanje lipida u mišićima (lipotoksičnost) povezano je s inzulinskom rezistencijom (200). U novije vrijeme smatra se da trigliceridi nakupljeni u mišićima nisu uzrok inzulinske rezistencije, već se njezinim uzrokom smatraju metaboliti lipida, kao što su diacilglicerol, ceramidi, dugolančane masne kiseline–koenzim A (engl. *long-chain fatty acyl-CoAs*, kratica LCFA-CoA) i acilkarnitin, produkti nepotpune oksidacije masnih kiselina (197) te lipidni peroksidi (201). Njihova količina korelira sa sadržajem triglicerida u mišićima (202), oni također aktiviraju stanične kinaze i ometaju prijenos inzulinskog signala (197).

Petersen i sur. smatraju da je mišićna inzulinska rezistencija inicijalni događaj u razvoju metaboličkog sindroma i da prethodi akumulaciji masnoća u jetri i visceralnom masnom tkivu. Na osnovu rezultata pokusa s mladim, mršavim i tjelesno neaktivnim ispitanicima zaključili su da se u mišićima osoba s mišićnom inzulinskom rezistencijom smanjuje sinteza glikogena, a glukoza se preusmjerava u jetru za *de novo* lipogenezu. Autori također smatraju da razvoj masne jetre prati nakupljanje masnoća u visceralnom masnom tkivu (203).

1.6.2. Upala i oksidativni stres u skeletnim mišićima

Inzulinska rezistencija skeletnih mišića povezana je s kroničnom upalom; mišićno tkivo osoba s inzulinskom rezistencijom infiltrirano je makrofazima (197,204), u njemu se nalazi povišena razina proupalnih molekula, kao što su TNF, IL-6, inducibilna sintaza dušičnog oksida, fibrinogen, CRP, inhibitor aktivatora plazminogena i sijalinska kiselina (205).

Kroničnu upalu u mišićima potiču slobodne masne kiseline i proupalne tvari podrijetlom iz adipocita, makrofaga, hepatocita i ostalih stanica te akumulirani lipidi u miocitima. Proupalne tvari sintetiziraju se i u miocitima (197). Oksidativni stres osobina je metaboličkog sindroma, šećerna bolest tipa II, pretilost i metabolički sindrom povezani su s povišenim sadržajem ROS-a u mišićima (200), smatra se da ROS-i utječu na inzulinsku rezistenciju u mišićima (200,206).

Šećerna bolest tipa II, pretilost i metabolički sindrom značajno su povezani s povišenim mišićnim sadržajem reaktivnih kisikovih spojeva (199,200).

1.6.3. Miokini

U novije vrijeme smatra se da i mišićno tkivo funkcionira kao endokrini organ, u kojemu se stvaraju citokini i peptidi koji se nazivaju miokinima. Na njihovu sintezu utječe mišićna aktivnost. Miokini djeluju endokrino i parakrino te utječu na stvaranje sustavnog protuupalnog okruženja i iskazuju specifični endokrini učinak na visceralno masno tkivo. Smatra se da miokini mogu djelovati i lokalno unutar mišića iskazujući učinak na signale u putovima vezanim uz oksidaciju masnoća i preuzimanju glukoze (207,208).

Broj otkrivenih miokina se povećava, od kojih su najznačajniji sljedeći:

Čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, kratica TNF), interleukini (IL), kao što su IL-6, IL-1, IL-8, IL-10, IL-15 i monocitni kemotaktički protein (engl. *monocyte chemotactic protein*, kratica MCP-1), BDNF (kratica od engl. *brain-derived neurotrophic factor*). Proupalno djelovanje iskazuju TNF, IL-1, miostatin, a protuupalno djelovanje i pozitivan učinak na inzulinsku rezistenciju iskazuju IL-10 IL 15, BDNF (205).

IL-6 u različitim okolnostima iskazuje proupalna odnosno protuupalna djelovanja; od proupalnih učinaka pripisuje mu se važna uloga u inzulinskoj rezistenciji vezanoj uz pretilost (64) i patogenezi koronarne srčane bolesti (188). Mišići tijekom aktivnosti sintetiziraju i otpuštaju IL-6, koji poboljšava učinak inzulina odmah tijekom ranog oporavka nakon tjelesne aktivnosti (209). Lučenje miokina IL-6 je proporcionalno s mišićnom masom i duljinom vježbanja (210).

Proupalni miokin miostatin povećano se luči iz neaktivnih mišića (211,212), a tjelesna aktivnost smanjuje njegovu sintezu (211). Miostatin smanjuje sintezu proteina, a povećava njihovu razgradnju. Miševi s inaktiviranim genom za miostatin, odnosno miševi tretirani antagonistom miostatina imali su veću mišićnu masu i slabije izražene karakteristike metaboličkog sindroma (212).

BDNF (kratica od engl. *brain-derived neurotrophic factor*) luči se u aktivnim mišićima, a pripisuje mu se ključna uloga u regulaciji preživljavanja, rastu i održavanju živčanih stanica, a u mišićnim stanicama povećava oksidaciju masnoća. Njegova razina je niska u osoba s neurodegenerativnim bolestima, depresijom, debljinim i šećernom bolešću tipa II. Mišićna aktivnost povišuje serumsku razinu BDNF podrijetlom iz mozga, ali ne mišića, tako da se smatra da je djelovanje BDNF nastaloga u mišićima autokrino i parakrino (207,208). BDNF je aktivator adenozin-monofosfat kinaze (AMPK) i povećava oksidaciju masnih kiselina u mišićima (208).

IL-15 iskazuje anabolički učinak na skeletni mišić *in vitro* i *in vivo* te može djelovati na smanjenje masnog tkiva (207), Nielsen i sur. su pokazali da je njegova koncentracija povezana sa smanjenjem visceralnog, ali ne i potkožnog masnog tkiva (213).

1.6.4. Povoljan učinak mišićne aktivnosti na inzulinsku rezistenciju i metabolički sindrom

Tjelesna aktivnost u mišićima poboljšava osjetljivost mišićnog tkiva na inzulin 16 sati i dulje nakon njena prestanka. Tijekom mišićne aktivnosti i neposredno nakon njezina prestanka unos glukoze u mišić je neovisan o inzulinu, u drugoj fazi on je povećan uz inzulinsku aktivnost (214). Mišićna aktivnost stimulira AMPK, koja preko više mehanizama povećava unos glukoze u stanice: pretpostavlja se supresija fosforilacije serinskih ostataka na supstratu inzulinskog receptora-1 (engl. *insulin receptor substrate-1*, kratica IRS-1), povećanje aktivnosti enzima za unos glukoze, kao što su GLUT-4 i heksokinaza, povećanjem njihove genske transkripcije. AMPK fosforilira IRS-1 na mjestu Ser-789 i posljedično aktivira fosfatidil inozitol-3 kinazu (215). Mišićna aktivnost povećava sintezu glikogena u mišićima i smanjuje sintezu lipida u jetri (216).

Do smanjenja inzulinske rezistencije tjelesnom aktivnošću dovodi i poboljšanje lipidnog sastava u mišićima u smislu manje količine štetnih metabolita lipida, kao što su već spomenuti diacilglicerol, ceramidi, dugolančani masno kiselinski koenzim A i acilkarnitinski produkti nepotpune oksidacije masnih kiselina (202) te lipidni peroksidi (217).

Osobe koje se bave sportovima izdržljivosti, kao što su trkači maratona imaju povećan sadržaj triacilglicerola u mišićima, koji služi kao izvor energije za mišiće tijekom njihove aktivnosti, ali triacilglicerol u njima nije povezan s inzulinskom rezistencijom. Neprestano trošenje i obnavljanje njegovih zaliha u mišićima osoba koje se bave sportovima izdržljivosti sprečava, odnosno smanjuje nastanak lipidnih peroksida koji su povezani s inzulinskom rezistencijom i oksidativnim stresom (217).

Pretpostavlja se da uslijed manjka tjelesne aktivnosti i nedostatna proizvodnja miokina uzrokuje disfunkciju drugih tkiva i organa, kao i povećan rizik od srčanožilnih bolesti, raka te demencije (207).

1.6.5. Povezanost mišićne mase s metaboličkim sindromom

Osim povezanosti mišićne aktivnosti i metabolizma, neki autori navode povoljan utjecaj mase mišićnog tkiva na MS. Prema rezultatima *Adelaide Male Ageing Study*, mišićna masa i snaga su se pokazali kao značajni zaštitni čimbenici za nastanak metaboličkog sindroma, neovisni od

inzulinske rezistencije i nakupljanja abdominalne masti (218). Srikathan i Karlamangla su ustanovili obrnutu povezanost između mišićne mase i inzulinske rezistencije, prevalencije predijabetesa te razine preddijabetičke glikemije u velikom reprezentativnom uzorku koji je obuhvaćao oba spola i sve dobne skupine ispitanika. Navedeno istraživanje nije ustanovilo kauzalnu povezanost mišićne mase i navedenih osobina MS (219). Mišićna masa je negativno korelirala s pokazateljima kronične upale (220), razinom mokraćne kiseline (221) i triglicerida, a pozitivno s razinom HDL kolesterola (222).

Sarkopenija povezana s debljinom (engl. *sarcopenic obesity*) označuje smanjenje mišićne mase i snage uz povećanu količinu masnoga tkiva. U starijih osoba smanjuje se mišićna snaga, dolazi do promjena kvalitete mišićnog sastava (kompozicije), kao što su smanjivanje broja i veličine mišićnih vlakana, smanjivanje kontraktilnosti preostalih mišićnih vlakana te poremećaj inervacije mišića (223). Više čimbenika uzrokuje nastanak sarkopenije u starosti, od kojih su najvažniji kronična upala, inzulinska rezistencija, mišićna neaktivnost, hormonske promjene (223, 224) i oksidativni stres (224).

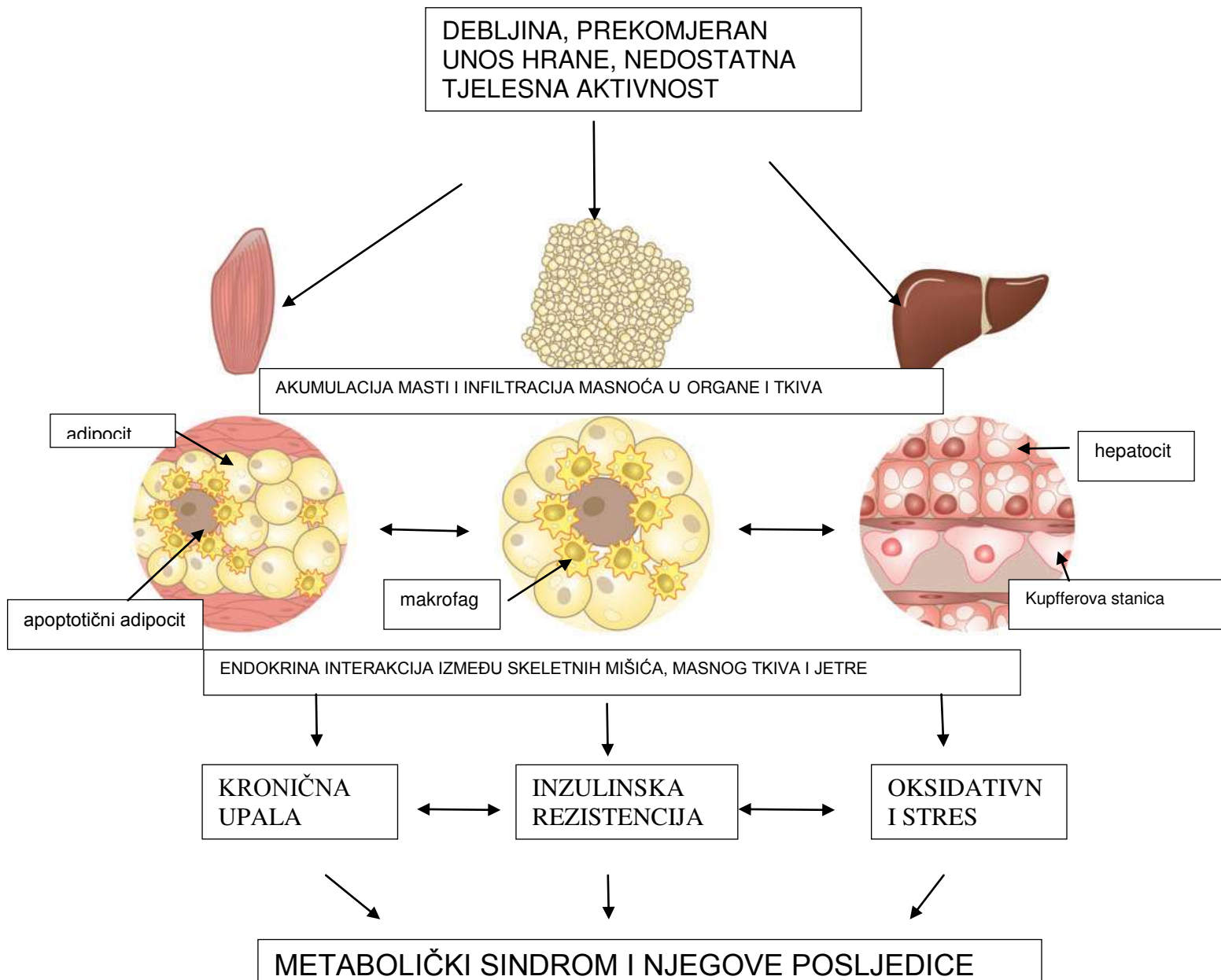
1.6.6. Miosteatoza

Miosteatoza označuje ektopično nakupljanje masnoća u mišićima, kako između mišićnih fascija, tako i unutar mišićnog sincicija. Miosteatoza se povezuje s inzulinskom rezistencijom i šećernom bolešću tipa II (24). Weiss i sur. su u ne-pretilim adolescentima ustanovili povezanost povećane količine intramiocelularne masnoće s oštećenom tolerancijom glukoze i inzulinskom rezistencijom (225).

1.7. Zbirni prikaz međusobnog utjecaja organa i tkiva te upale, oksidativnog stresa i inzulinske rezistencije u metaboličkom sindromu.

Usljed nezdrava načina života, koji je karakteriziran prekomjernim unosom nezdrave hrane i nedostatnom tjelesnom aktivnošću, u predisponiranih osoba u mišićnom tkivu, masnom tkivu i jetri nakupljaju se masnoće, razvijaju se upala, inzulinska rezistencija i oksidativni stres. Mišićno tkivo, masno tkivo i jetra međusobno utječu jedni na druge, lučenjem različitih tvari, kao što su slobodne masne kiseline, citokini, upalni posrednici, metaboliti reaktivnih

kisikovih spojeva, a upala, inzulinska rezistencija i oksidativni stres također su povezana stanja. Rezultat navedenih zbivanja je razvoj metaboličkog sindroma i njegovih posljedica. Slika 5. pojednostavljeno prikazuje međuodnos masnog, mišićnog tkiva i jetre te upale, inzulinske rezistencije i oksidativnog stresa u razvoju MS.



Slika 6. Zbirni prikaz povezanosti nakupljanja masnoća, kronične upale i oksidativnog stresa u nastanku metaboličkog sindroma i njegovih posljedica. Modificirano prema Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-46. Prikazano uz dopuštenje autora.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

2.1. Cilj istraživanja

Glavni cilj

Istražiti razlike u oksidativnom oštećenju jezgrene deoksiribonukleinske kiseline (DNA) između ispitanika s metaboličkim sindromom i ispitanika kontrolne skupine.

Sporedni ciljevi

Istražiti razlike u laboratorijskim nalazima, antropometrijskim mjerama, rezultatima ultrazvučnih mjerenja i indeksa izvedenih iz mjerenih vrijednosti između ispitanika s metaboličkim sindromom i kontrolne skupine. Odrediti one pokazatelje prema kojima se te dvije skupine statistički značajno razlikuju.

Istražiti povezanost indeksa masne jetre s metaboličkim sindromom i oksidativnim stresom.

Istražiti povezanost udjela mišićne mase s metaboličkim sindromom i oksidativnim stresom.

2.2. Hipoteza istraživanja

Glavna hipoteza

Ispitanici s metaboličkim sindromom razlikuju se od zdravih ljudi (kontrolna skupina) u razini općeg i specifičnog oksidativnog oštećenja jezgrene DNA.

Sporedne hipoteze

Ispitanici s metaboličkim sindromom i ispitanici bez metaboličkog sindroma razlikuju se u vrijednostima pokazatelja metaboličkog sindroma i oksidativnog stresa.

Indeks masne jetre povezan je s metaboličkim sindromom i oksidativnim stresom.

Udio mišićne mase povezan je s metaboličkim sindromom i oksidativnim stresom.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. Ispitanici

Ispitivanjem su bili obuhvaćeni muškarci u dobi od 32 do 58 godina (radno aktivna populacija), nepušači, koji nisu bolovali ni od kakvih kroničnih bolesti osim arterijske hipertenzije i/ili dijabetesa tipa II. U istraživanje je bilo uključeno 69 konsekutivnih ispitanika koji su dolazili na pregled u internističku ambulantu, a koji su zadovoljavali kriterije za MS po kriterijima Američkog nacionalnog programa edukacije o kolesterolu (NCEP ATP III, 2001) za MS. Kriteriji za neuključivanje u studiju bili su zloćudne bolesti, popuštanje srca, nedavni kirurški zahvati, upalne bolesti, kao što su infekcije, autoimune bolesti, bolesti središnjeg živčanog sustava, bubrega i jetre. Kontrolnu skupinu činilo je 59 osoba koje nisu zadovoljavale kriterije za MS, bez značajnih razlika u odnosu na pripadnike ispitivane skupine. Prilikom pregleda na osnovu biokemijskih nalaza i kriterija NCEP-ATP III utvrdili smo pripada li ispitanik u skupinu ispitanika s MS ili u kontrolnu skupinu. Prema kriterijima NCEP-ATP III, dijagnoza MS u muškaraca postavlja se ako ispitanik zadovoljava 3 od 5 navedenih kriterija: opseg struka iznad 102 cm, razina glukoze natašte iznad 6,1 mmol/l; serumski trigliceridi iznad 1,7 mmol/l; serumski HDL kolesterol ispod 1,04 mmol/l; krvni tlak iznad 130/85 mm (6). Istraživanje je odobrilo etičko povjerenstvo poliklinike „Sunce“, u njemu je bilo osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa. Svi ispitanici su dali dragovoljni pristanak za sudjelovanje, koji su potvrdili potpisivanjem informirane suglasnosti.

3.2. Postupci

Od svakog ispitanika venepunkcijom je bio uzet uzorak krvi, iz kojega su se odredile hematološke i biokemijske pretrage, malondialdehid i glutation te ispitivanje općeg i oksidativnog oštećenja DNA (*Comet* test). Također su se obavila antropometrijska i ultrazvučna mjerenja.

3.2.1. Hematološke i biokemijske pretrage

Broj ukupnih leukocita, neutrofila i podaci općeg biokemijskog nalaza (HDL kolesterol, trigliceridi, mokraćna kiselina, alanin transaminaza (ALT), gama-glutamil-transferaza (GGT), C-reaktivni protein (CRP) i fibrinogen) bili su određeni u laboratoriju Poliklinike Sunce. Broj leukocita i neutrofila određen je na automatskom protočnom citometru Beckman Coulter HIX (Brea, Ca, SAD). Opće biokemijske pretrage određivale su se na automatskom analizatoru Olympus (Tokyo, Japan) uz uporabu test reagensija tvrtke Herbos Dijagnostika d.o.o. (Sisak, Hrvatska) ili tvrtke Siemens Healthcare Diagnostics (München, Njemačka).

3.2.2. Malondialdehid i glutation

U uzorcima plazme bili su određeni parametar oksidativnog oštećenja lipida (malondialdehid) i antioksidans glutation. Koncentracija malondialdehida određena je metodom reakcije s tiobarbiturnom kiselinom uz uporabu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) s fluorescencijskim detektorskim uređajem podešenom na λ_{ex} 527 nm i λ_{em} 551 nm (226). Koncentracija glutationa izmjerena je Ellmanovom metodom sa spektrofotometrom podešenim na 412 nm (227).

3.3. Opće i oksidativno oštećenje jezgrene DNA

U limfocitima periferne krvi u suradnji sa znanstvenicima s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada bio je izmjeren stupanj oštećenja DNA i stupanj oksidativnog oštećenja DNA (8-oksodG) pomoću elektroforeze izvedene na pojedinačnim stanicama (engl. *single cell electrophoresis*) ili *Comet* testa. Primarno oštećenje DNA bilo je procijenjeno alkalnim *Comet* testom, koji detektira jednostruke lomove lanaca (engl. *single strand breaks*) i mjesta osjetljiva na lužine (engl. *alkali labile sites*). Test je bio izveden prema Singhu i sur. s manjim modifikacijama (228). Stakalca obrađena s 0,1 mmola otopine vodikova peroksida služila su kao kontrola. Na brušena stakalca nanesen je sloj 1%-tne agaroze normalnog tališta, NMP (od engl. *normal melting point*) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, SAD). Nakon hlađenja, višak agaroze pažljivo je ostrugan, a stakalca su sušena na sobnoj temperaturi. Na

tako pripremljena stakalca dodano je 300 μL 0,6 % NMP agaroze. Nakon deset minuta na 0 $^{\circ}\text{C}$, dodan je sloj od 8 μL pune krvi pomiješane s 100 μL 0,5 % agaroze niskog tališta, LMP (od engl. *low melting point*). Uzorci su neposredno nakon izrade preparata uronjeni u hladnu otopinu za lizu staničnih membrana (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, pH 10, 10 mM Tris-HCl, 1 % Na-sarkozinat (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) i 10 % DMSO (Kemika), te ostavljeni 24 h na + 4 $^{\circ}\text{C}$. Denaturacija proteina i odmatanje DNA provedeni su na 4 $^{\circ}\text{C}$ u puferu za denaturaciju (1 mM Na₂EDTA i 300 mM NaOH) (pH 13,0) u trajanju od dvadeset minuta. Horizontalna elektroforeza u svježem hladnom puferu za denaturaciju provedena je na 300 mA i 25 V kroz dvadeset minuta.

Uzorci su isprani u puferu za neutralizaciju (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5, Sigma) tri puta po **pet** minuta.

Po završenoj neutralizaciji, uzorci su rehidrirani 70%-tnim etanolom (deset minuta), te zatim 96%-tnim etanolom (10 minuta). Osušeni uzorci spremljeni su u kutije za pohranu preparata do analize. Neposredno prije analiziranja, stakalca sa suhim gelovima su rehidrirana pola sata puferom za neutralizaciju, a zatim su bila bojana s 50 μL etidij-bromida (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma) po stakalcu. Svi uzorci bili su analizirani pod epifluorescentnim mikroskopom povećanja 250x (Zeiss, Njemačka) s ekscitacijskim filtrom između 515 i 560 nm, spojenim s crno-bijelom CCD (kratica od *charged-couple device*) kamerom (Cohu Inc, San Diego, SAD). Duljina i intenzitet repa izmjereni su automatski pomoću računalnog sustava analize slike (engl. *image analysis software*). Analizirane DNA odabirane su slučajno, na istoj dubini gela. Analizirano je 100 *Cometa* po stakalcu.

Oksidativno oštećenje DNA bilo je izmjereno uporabom Comet testa s enzimom humana hidroksigvanin glikozilaza 1 (engl. *human hydroxyguanine glycosylase 1*, kratica hOGG1), u skladu s protokolom po Smith i sur. (229). hOGG1 enzim (Trevigen, MD, USA) je razrijeđen u Flare reakcijskom puferu (v/v 1:1000) s inkubacijom u vlažnoj komori na 37 $^{\circ}\text{C}$ tijekom 10 minuta. Denaturacija je izvedena na 4 $^{\circ}\text{C}$ u puferu za elektroforezu (1,5 M NaCl, 1 mM Na₂EDTA, pH 12,1) tijekom petnaest minuta. Elektroforeza je trajala dvadeset minuta na 0,7 V/cm, 300 mA. Duljina i intenzitet repa izmereni su jednako kao u alkalnom *Comet* testu.

3.4. Antropometrijska mjerenja, indeks masne jetre

Ultrazvučnim uređajem „Philips“ (Eindhoven, Nizozemska) bili su izmjereni: debljina epikardijalnog masnog tkiva, „intraabdominalna debljina“ (engl. *intraabdominal thickness*), debljina trbušnog potkožnog masnog tkiva. Debljina epikardijalnog masnog tkiva odgovara anehogenom prostoru između vanjskog zida lijeve klijetke i visceralnog lista perikarda. Izmjerena je na slobodnom zidu desne klijetke srca, u projekciji „kratke osi“, na kraju sistole uz uporabu kardiološke sonde od 2-4 MHz. Intraabdominalna debljina, koja predstavlja udaljenost između *linee albe* i aorte u truhu bila je izmjerena konveksnom sondom od 2-5 MHz. Debljinu sloja potkožnog trbušnog masnog tkiva na središnjoj točki između ksifoidnog nastavka prsne kosti i pupka izmjerili smo linearnom sondom od 5-12 MHz. Krojačkim metrom izmjerni su opsezi struka i bokova. Opseg struka bio je mjeren na sredini između najnižeg rebra i *cristae iliaca*. Opseg bokova bio je mjeren preko najšireg dijela glutealne regije. Iz ovih dvaju mjerenja izračunali smo omjer struka i bokova te omjer bokova i struka. Visinomjerom i elektroničkom vagom „Omron“ (Kyoto, Japan) bile su izmjerene tjelesna visina i masa. Iz vrijednosti tjelesne visine i mase izračunali smo indeks tjelesne mase po formuli:

$$\text{Indeks tjelesne mase (kg/m}^2\text{)} = \text{masa u kg/tjelesna visina u metrima}^2$$

Iz vrijednosti triglicerida, gama-glutamilttransferaze, indeksa tjelesne mase i opsega struka izračunali smo indeks masne jetre prema formuli Bedognija i suradnika (230 Bedogni).



FLI – indeks masne jetre (engl. *fatty liver index*)

e – baza prirodnih logaritama

ln – prirodni logaritam

triglycerides – koncentracija triglicerida u mg/dL

waist circumference – opseg struka u cm

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

GGT – gama-glutamilt transferaza u jedinicama aktivnosti po litri.

Metodom bioelektrične impedancije – uređajem „Omron“ (Kyoto, Japan) izmjerili smo udio suhe mišićne mase.

3.5. Statistička analiza

Podaci u provedenoj studiji prikazani su kao aritmetička sredina (\bar{x}), standardna devijacija (SD), te minimum, prvi kvartil (Q1), medijan, treći kvartil (Q3) i maksimum. Podaci su grafički prikazani kombinacijom *dot-plot* i *box-and-whisker* postupaka, što se smatra optimalnim prikazom za veličinu uzorka studije. Prednost je postupka što prikazuje sve pojedinačne ispitanike (*dot-plot*), uz istodobni prikaz strukture podataka (*box-and-whisker*). Usporedba varijabli između skupine ispitanika s metaboličkim sindromom i kontrolne skupine obavljena je multivarijantnim permutacijskim testom za dvije skupine, a to je neparametrijska zamjena za Hotellingov T-test. Permutacijski testovi smatraju se optimalnom statističkom metodom za usporedbu dviju skupina pri većem broju varijabli jer sprječavaju lažno pozitivne rezultate, daju pouzdane zaključke i onda kada podaci odstupaju od Gaussove distribucije te imaju izuzetno visoku snagu. Svi primijenjeni testovi bili su dvosmjerni, a $P \leq 0,05$ smatran je statistički značajnim. Informacijska bitnost varijabli određena je algoritmima rekurzivnog particioniranja (RP) (231). To su metode koje služe za izgradnju klasifikacijskih i regresijskih modela, a primjenjuju se u eksploratorne, deskriptivne i prediktivne svrhe. RP je koristan postupak za rješavanje cijelog niza problema, ponajviše zbog sposobnosti opisa kompleksnih i nelinearnih interakcija. U provedenoj studiji izgrađen je klasifikacijski model za razlikovanje ispitanika kontrolne skupine od osoba s metaboličkim sindromom. Budući da je naglasak cjelokupnog istraživanja na izgradnji klasifikacijskog modela, analiza snage studije je tomu prilagođena. Naime, rekurzivno particioniranje daje vrlo pouzdane rezultate kada je broj ispitanika pet do deset puta veći od broja varijabli. Budući da studija uključuje 126 ispitanika broj varijabli je ograničen na dvadeset, to jest šest puta manje od broja ispitanika, što odgovara zahtjevima za rekurzivno particioniranje. Korištene su dvije metode RP-a, SimpleCART i RepTree. Razlog korištenja dviju metoda je u tome što ponekad mogu dati različite rezultate, što može poboljšati uvid u strukturu podataka. Učinkovitost varijabli izdvojenih postupcima rekurzivnog particioniranja dodatno je opisana uporabom ROC analize. Deskriptivna statistika, permutacijski testovi i ROC analiza obavljani su pomoću programskog jezika R (verzija 2.14), javno dostupnog programa za statističku i grafičku analizu podataka (<http://www.R-project.org/>). Analiza pomoću RP-a obavljena je pomoću programa Weka (verzija 3.6.5).

4. REZULTATI

Provedena studija, sa statističke točke gledišta, usporedba je dviju skupina po više varijabli i zbog toga pripada kategoriji multivarijantnih studija. Analiza je provedena u četiri koraka:

1. deskriptivna statistika – podaci za kontrolne ispitanike i bolesnike s MetS opisani su kao aritmetička sredina (\bar{x}), standardna devijacija (SD), minimum (min), prvi kvartil (Q1), medijan, treći kvartil (Q3), te maksimum. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablicama x i xy .
2. usporedba varijabli između kontrolne skupine i bolesnika s MetS. Usporedba je obavljena tako da je prvo pomoću multivarijantnog permutacijskog testa za dvije skupine izračunata sveukupna P vrijednost za matricu podataka. Dobivena P vrijednost od 0,02 upućuje da razlika među ciljnim skupinama doista postoji, te da se isplati analizirati razliku u pojedinačnim varijablama. Usporedba je obavljena uporabom pojedinačnih permutacijskih testova. Razlika je utvrđena za četrnaest varijabli, što je prikazano u tablici xy . Rezultati su također prikazani grafički kombinacijom *box-and-whisker* metode s pojedinačnim mjerenjima.
3. Svrha multivarijantne analize bila je dvostruka: (1) pronaći optimalnu varijablu ili kombinaciju varijabli za diskriminaciju kontrolnih ispitanika i ispitanika s MetS; (b) analizirati međuodnos varijabli, odnosno dobiti uvid u strukturu podataka. Multivarijantna analiza provedena je uporabom klasifikacijskih programa RepTree i SimpleCART. Rezultat analize s oba programa može se prikazati kao stablo odluke što znatno olakšava interpretaciju rezultata. Programi koriste različite algoritme za konstrukciju stabla odluke i dva su kuta gledanja na isti problem.
4. ROC analiza provedena je s ciljem utvrđivanja optimalne vrijednosti indeksa masne jetre (FLI), koji je multivarijantna analiza izdvojila kao jedini i vrlo učinkoviti parametar za diskriminaciju kontrolnih ispitanika i ispitanika s MetS.

4.1 Deskriptivna statistika i multivarijatni permutacijski test za dvije skupine

Rezultati deskriptivne statistike i multivarijatnog permutacijskog testa za dvije skupine prikazani su u tablicama xy, xy i xy. Permutacijski test izdvojio je sljedeće varijable kao statistički signifikantno različite između kontrolne skupine i skupine s MetS: opseg struka (cm), omjer opsega struka i bokova, omjer opsega bokova i opsega struka, postotak suhe mišićne mase, debljina epikardijalnog masnog tkiva (cm), intraabdominalna debljina (cm), HDL-kolesterol (mmol/L), trigliceridi (mmol/L), C-reaktivni protein (mg/L), alanin transaminaza (U/L), gama-glutamil transferaza (U/L), mokraćna kiselina ($\mu\text{m/L}$), ukupan broj leukocita ($10^9/\text{L}$), te indeks masne jetre. Nismo našli značajne razlike između dviju skupina u vrijednostima fibrinogena i broja neutrofila u krvi. Skupine se nisu razlikovale niti u duljini i intenzitetu repa, mjenima alkalnim i hOGG1 *Comet* testom, što znači da nema razlika kako u općem, tako ni u oksidativnom oštećenju DNA. Vrijednost malondialdehida je bila nešto viša, a vrijednost reduciranog glutationa nešto niža u ispitanika s metaboličkim sindromom, međutim razlike nisu dosegle statističku značajnost.

U tablicama 1. i 2. prikazani su rezultati deskriptivne statistike za ispitanike kontrolne skupine i ispitanike s metaboličkim sindromom.

U tablici 3. prikazani su rezultati multivarijatnog permutacijskog testa.

Podaci iz deskriptivne statistike prikazani su i grafički – kombinacijom točkastog dijagrama (engl. *dot-plot*) i grafikona okvira s ručicama (engl. *box-and-whisker plot*) prikaza.

Tablica 1. Deskriptivna statistika analiziranih parametara za kontrolne ispitanike.

Parametar	N	\bar{x}	Medijan	Minimum	Maksimum	Q1	Q3	SD
Dob (godine)	59	46,88	46	37,00	58,00	44,00	51,00	5,02
Opseg struka (cm)	59	88,90	89,00	71,00	108,00	84,00	95,00	8,29
Omjer opsega struka i bokova	59	0,88	0,89	0,76	0,99	0,83	0,91	0,05
Omjer opsega bokova i struka	59	1,14	1,13	1,01	1,31	1,10	1,20	0,07
Postotak suhe mišićne mase (%)	55	37,17	36,90	30,60	45,00	35,00	39,30	3,30
Debljina epikardijalnog masnog tkivo (mm)	52	4,09	3,65	1,50	8,50	3,00	4,90	1,47
Debljina abdominalno potkožnog masnog tkiva (cm)	56	1,31	1,31	0,17	2,59	0,82	1,82	0,64
Intrabdominalna debljina (<i>linea alba</i> – aorta) (cm)	56	3,75	3,65	0,60	8,64	2,69	4,72	1,57
HDL- kolesterol (mmol/L)	58	1,58	1,55	1,06	2,50	1,33	1,75	0,33
Trigliceridi (mmol/L)	59	1,14	0,96	0,490	3,24	0,79	1,34	0,55
C-reativni protein (CRP) (mg/L)	55	1,18	0,80	0,100	5,30	0,40	1,20	1,24
Alanin transaminaza (ALT) (U/L)	59	24,14	21,00	7,00	53,00	16,00	31,00	9,82
Gama-glutamil transferaza (GGT) (U/L)	59	23,42	19,00	9,00	75,0	16,00	27,00	12,33
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	56	302,0 ₈	297,00	152,00	401,50	273,50	336,50	48,59
Fibrinogen (g/L)	58	3,46	3,26	2,38	7,02	2,98	3,60	0,84
Leukociti ($10^9/\text{L}$)	57	5,75	5,80	3,50	8,80	5,20	6,40	1,19
Neutrofili ($10^9/\text{L}$)	56	3,22	3,20	1,20	5,10	2,70	3,80	0,93
Indeks masne jetre (engl. fatty liver index) (FLI)	58	30,23	25,41	1,67	68,53	17,40	43,90	17,53
Alkalni Comet test - duljina repa (μm)	35	16,92	15,80	12,80	28,30	15,17	17,58	3,41
Alkalni Comet test - intenzitet repa (%)	35	2,23	1,71	0,31	8,10	0,93	3,31	1,76
hOGG1Comet test - duljina repa (μm)	29	14,95	14,37	11,22	23,23	13,85	16,16	2,48
hOGG1Comet test - intenzitet repa (%)	29	1,98	1,48	0,17	6,84	0,96	2,63	1,51
Glutation ($\mu\text{mol/L}$)	35	4,38	4,02	3,11	10,17	3,93	4,55	1,23
Malondialdehid ($\mu\text{mol/L}$)	36	2,26	1,85	0,45	7,61	1,27	3,02	1,46

Tablica 2. Deskriptivna statistika analiziranih parametara za ispitanike s metaboličkim sindromom.

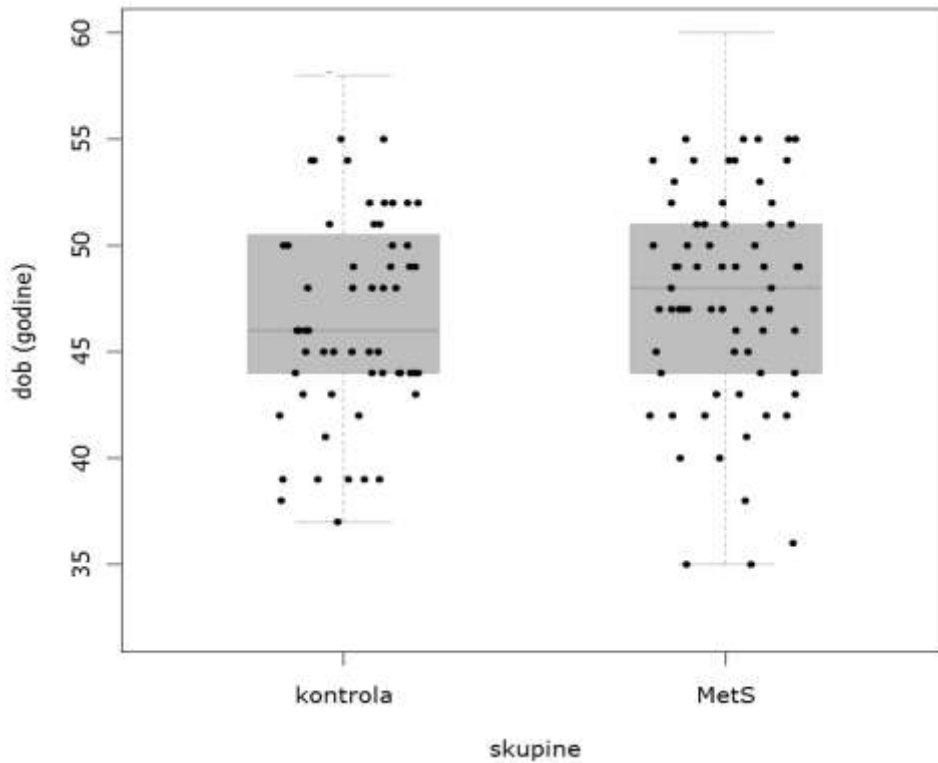
Parametar	N	\bar{x}	Medija	Minimum	Max	Q1	Q3	SD
Dob (godine)	69	47,45	48,00	32,00	62	44	51,00	5,53
Opseg struka (cm)	69	111,49	108,00	94,00	162,00	105,00	116,00	10,84
Omjer opsega struka i bokova	69	0,98	0,97	0,85	1,19	0,95	1,01	0,06
Omjer opsega bokova i struka	69	1,02	1,03	0,84	1,18	0,99	1,05	0,06
Postotak suhe mišićne mase (%)	63	31,15	31,30	15,20	37,40	29,50	32,70	3,22
Debljina epikardijalnog masnog tkivo (mm)	62	7,71	8,00	4,00	12,50	6,40	8,80	1,76
Debljina abdominalno potkožnog masnog tkiva (cm)	63	1,81	1,68	0,63	3,26	1,30	2,30	0,64
Intraabdominalna debljina (<i>linea alba</i> – aorta) (cm)	63	7,33	7,00	3,00	15,90	5,80	8,76	2,47
HDL- kolesterol (mmol/L)	68	1,23	1,19	0,61	2,40	1,06	1,38	0,29
Trigliceridi (mmol/L)	69	2,98	2,45	0,65	9,04	1,73	3,82	1,85
C-reaktivni protein (CRP) (mg/L)	68	3,47	2,95	0,60	16,30	1,35	4,15	3,17
Alanin transaminaza (ALT) (U/L)	69	51,77	39,00	12,00	209,00	31,00	61,00	35,11
Gama-glutamil transferaza (GGT) (U/L)	69	61,16	47,00	13,00	236,00	32,00	77,00	43,94
Mokraćna kiselina ($\mu\text{mol/L}$)	69	393,98	390,00	220,00	614,00	342,00	441,00	82,05
Fibrinogen (g/L)	68	3,41	3,40	2,14	5,60	2,94	3,67	0,65
Leukociti ($10^9/\text{L}$)	67	7,19	6,80	3,70	12,10	6,20	8,20	1,76
Neutrofili ($10^9/\text{L}$)	67	3,96	3,70	1,30	8,60	2,90	4,70	1,48
Indeks masne jetre (engl. fatty liver index) (FLI)	69	87,83	93,97	38,27	99,97	84,73	97,10	14,08
Alkalni Comet test - duljina repa (μm)	36	16,22	15,39	13,47	24,17	14,64	17,33	2,47
Alkalni Comet test - intenzitet repa (%)	36	1,90	1,69	0,38	4,977	1,02	2,62	1,10
hOGG1 Comet test - duljina repa (μm)	32	15,00	14,20	12,04	30,54	13,13	15,83	3,46
hOGG1 Comet test - intenzitet repa (%)	32	2,51	1,27	0,14	27,84	0,87	2,47	4,78
Glutation ($\mu\text{mol/L}$)	36	4,13	4,07	3,80	4,82	3,93	4,23	0,25
Malondialdehid ($\mu\text{mol/L}$)	38	3,49	2,64	0,68	19,22	1,97	4,03	3,16

Multivarijantni permutacijski test za dvije skupine

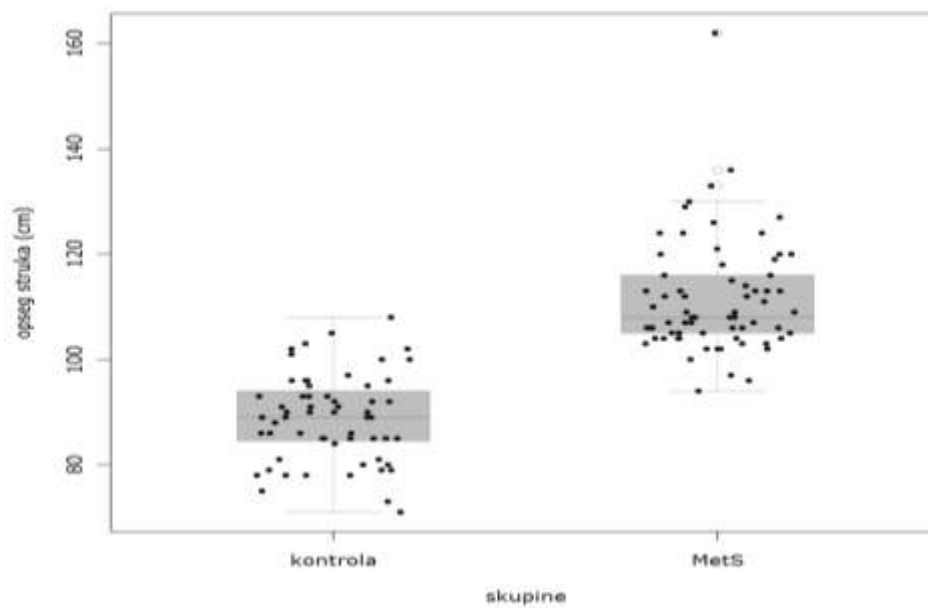
Tablica 3. Rezultati multivarijantnog permutacijskog testa za dvije skupine.

Parametar	Kontrola (n = 59)	MetS (n=69)	P
Dob (godine)	46,9 ± 5,09 (n = 59)	47,4 ± 5,65 (n = 69)	0,337
Opseg struka (cm)	88,90 ± 8,30 (n = 59)	111,49 ± 10,84 (n = 69)	0,001
Omjer opsega struka i bokova	0,88 ± 0,05 (n = 59)	0,98 ± 0,06 (n = 69)	0,001
Omjer opsega bokova i struka	1,14 ± 0,07 (n = 59)	1,02 ± 0,06 (n = 69)	0,001
Postotak suhe mišićne mase (%)	37,17 ± 3,30 (n = 55)	31,15 ± 3,22 (n = 63)	0,001
Debljina epikardijalnog masnog tkivo (mm)	4,09 ± 1,47 (n = 52)	7,71 ± 1,76 (n = 62)	0,001
Debljina abdominalno potkožnog masnog tkiva (cm)	1,31 ± 0,64 (n = 56)	1,81 ± 0,64 (n = 63)	0,001
Debljina intraabdominalnog masnog tkiva (linea alba – aorta) (cm)	3,75 ± 1,57 (n = 56)	7,33 ± 2,47 (n = 63)	0,001
HDL- kolesterol (mmol/L)	1,58 ± 0,33 (n = 58)	1,23 ± 0,29 (n = 69)	0,001
Trigliceridi (mmol/L)	1,14 ± 0,55 (n = 59)	2,98 ± 1,85 (n = 69)	0,001
C-reaktivni protein (CRP) (mg/L)	1,18 ± 1,24 (n = 55)	3,47 ± 3,17 (n = 68)	0,001
Alanin transaminaza (ALT) (U/L)	24,14 ± 9,82 (n = 59)	51,77 ± 35,11 (n = 69)	0,001
Gama-glutamil transferaza (GGT) (U/L)	23,42 ± 12,33 (n = 59)	61,16 ± 43,94 (n = 69)	0,003
Mokraćna kiselina (μmol/L)	302,08 ± 48,59 (n = 56)	393,98 ± 82,05 (n = 69)	0,001
Fibrinogen (g/L)	3,46 ± 0,84 (n = 58)	3,41 ± 0,65 (n = 68)	0,573
Leukociti (10 ⁹ /L)	5,75 ± 1,19 (n = 57)	7,19 ± 1,76 (n = 67)	0,007
Neutrofili (10 ⁹ /L)	3,22 ± 0,93 (n = 56)	3,96 ± 1,48 (n = 67)	0,149
Indeks masne jetre (engl. fatty liver index) (FLI)	30,23 ± 17,53 (n = 58)	87,83 ± 14,08 (n = 69)	0,001
Alkalni Comet test - duljina repa (μm)	16,87 ± 3,37 (n = 36)	16,22 ± 2,47 (n = 36)	0,994
Alkalni Comet test - intenzitet repa (%)	2,22 ± 1,74 (n = 36)	1,90 ± 1,10 (n = 36)	0,829
hOGG1 Comet test - duljina repa (μm)	15,31 ± 3,13 (n = 30)	15,00 ± 3,46 (n = 32)	0,379
hOGG1 Comet test - intenzitet repa (%)	2,25 ± 2,10 (n = 30)	2,51 ± 4,78 (n = 32)	0,556
Glutation (μmol/L)	4,38 ± 1,22 (n = 35)	4,13 ± 0,25 (n = 36)	0,105
Malondialdehid (μmol/L)	2,26 ± 1,46 (n = 36)	3,49 ± 3,16 (n = 38)	0,282

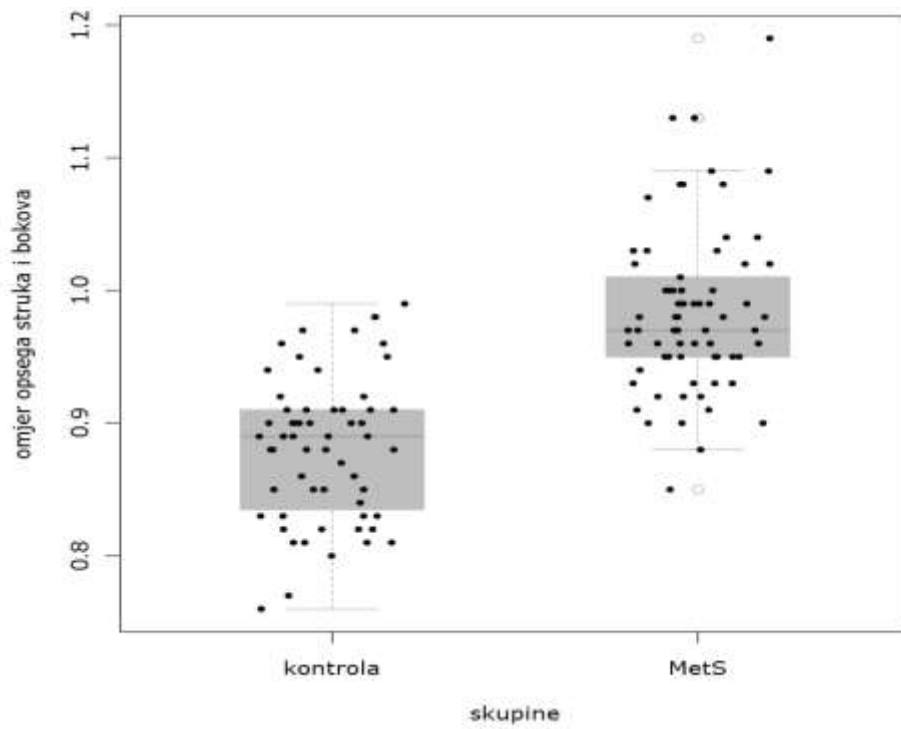
Grafički prikaz deskriptivne statistike kombinacijom točkastog dijagrama i grafikona okvira s ručicama.



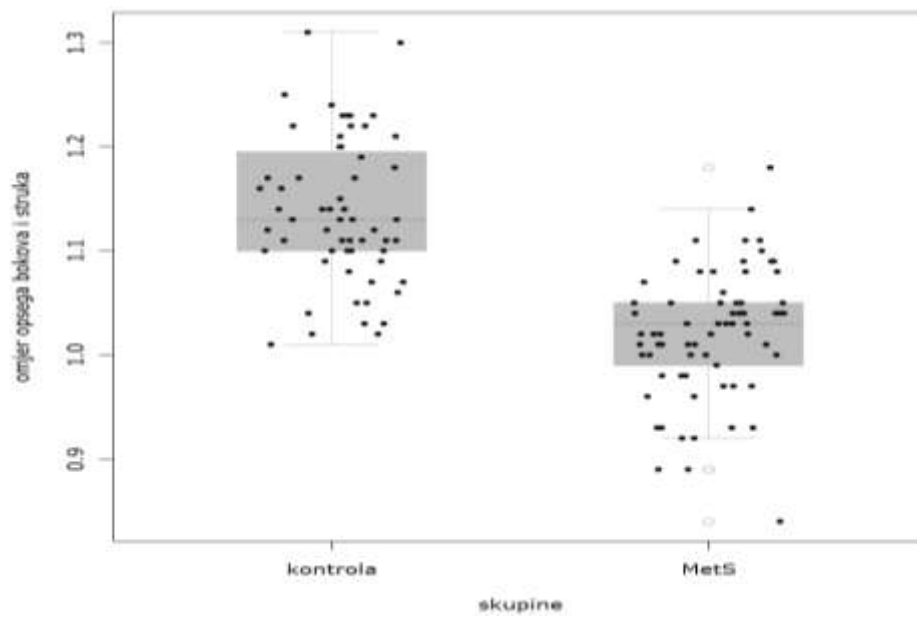
Slika 7. Usporedba dobi (godine) za kontrolne i MS ispitanike ($p = 0,337$).



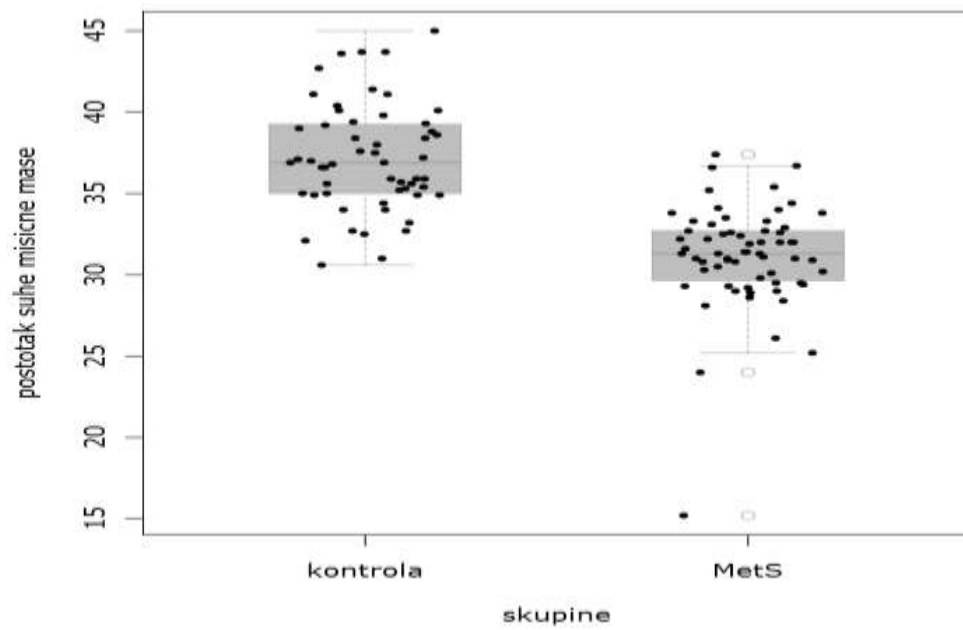
Slika 8. Usporedba opsega struka (cm) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



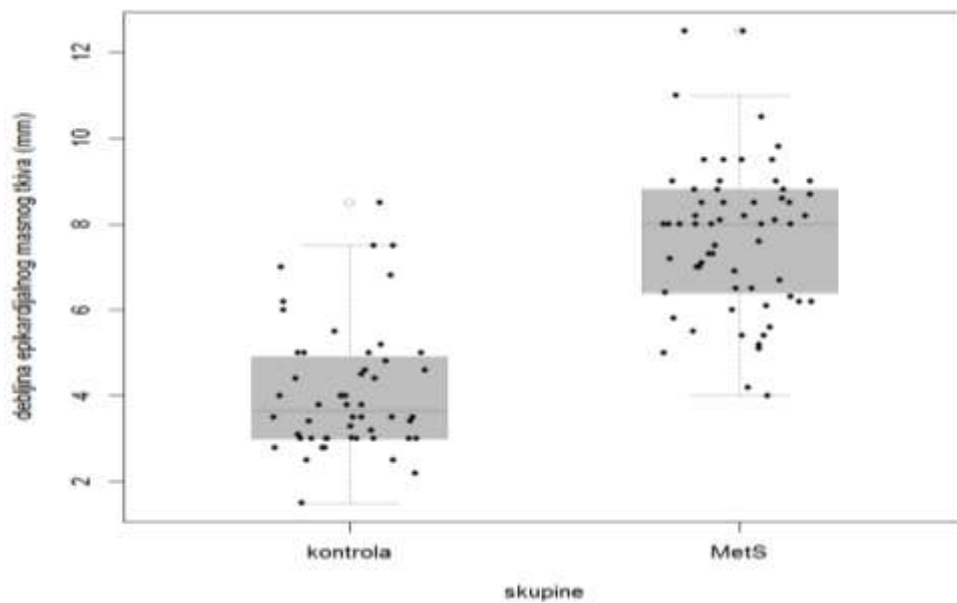
Slika 9. Usporedba omjera opsega struka i bokova za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



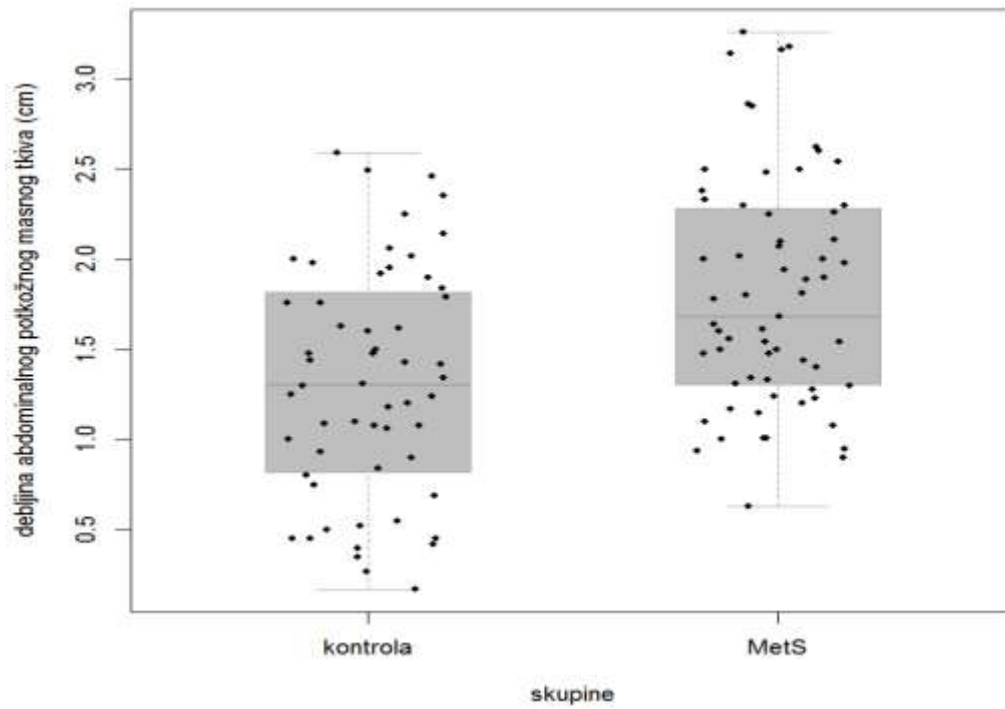
Slika 10. Usporedba opsega bokova i struka za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



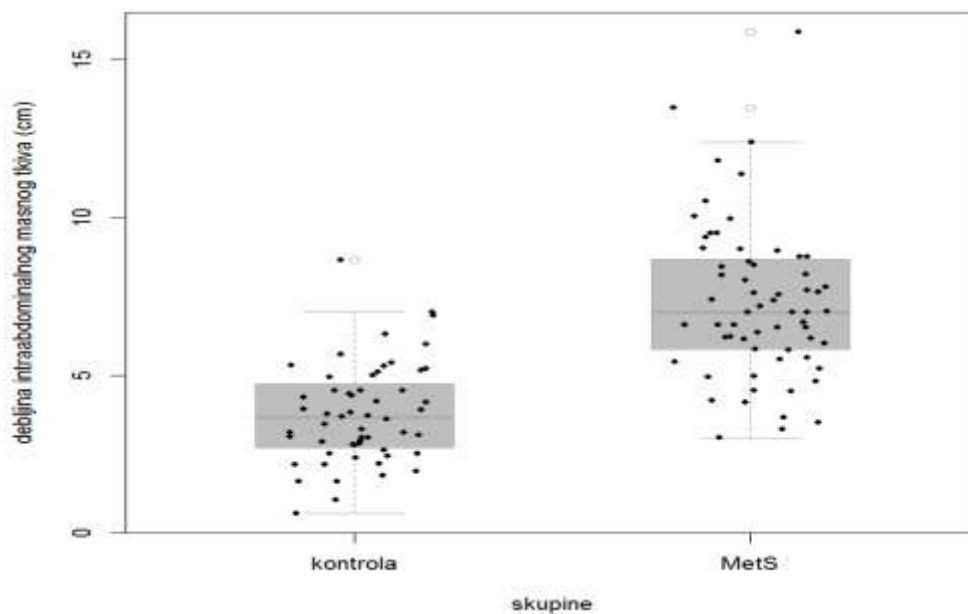
Slika 11. Usporedba udjela (postotka) suhe mišićne mase za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



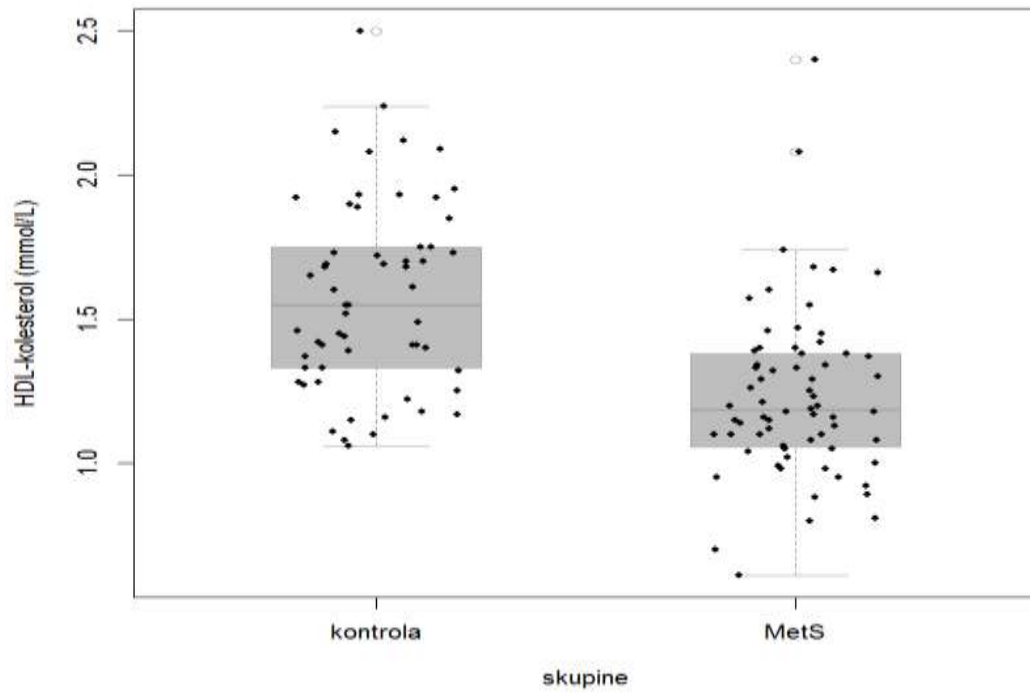
Slika 12. Usporedba debljine epikardijalnog masnog tkiva (mm) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



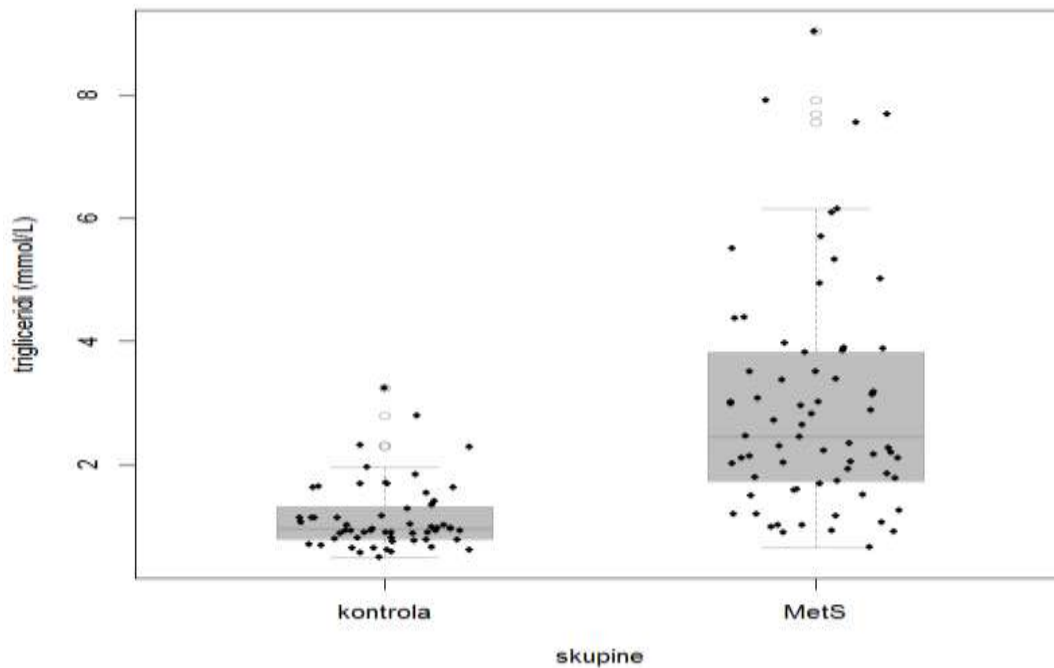
Slika 13. Usporedba debljine abdominalnog potkožnog masnog tkiva (cm) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



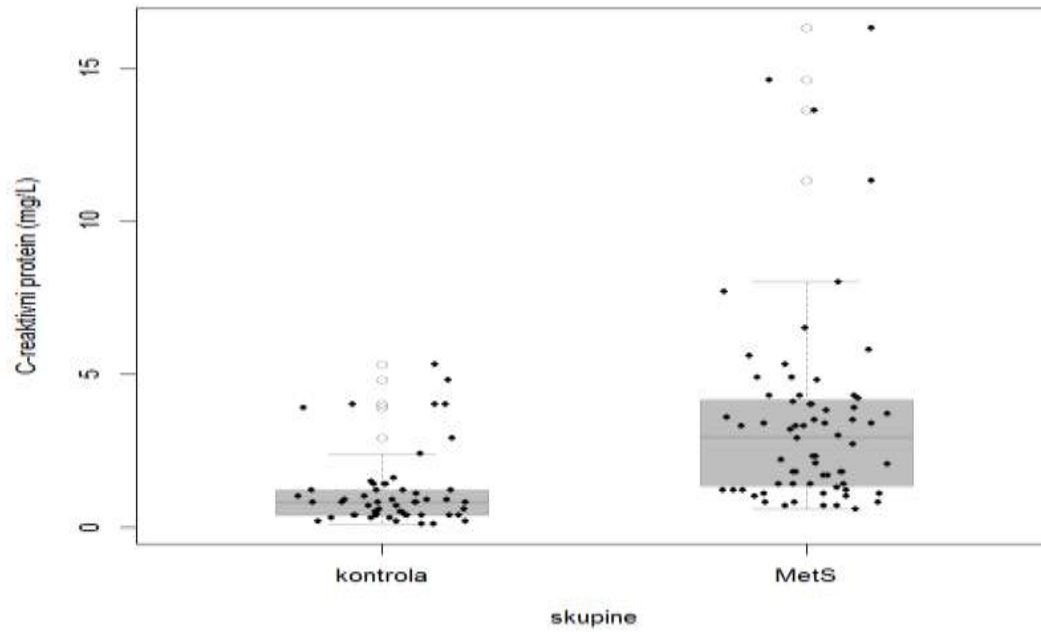
Slika 14. Usporedba debljine intraabdominalnog masnog tkiva (cm) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



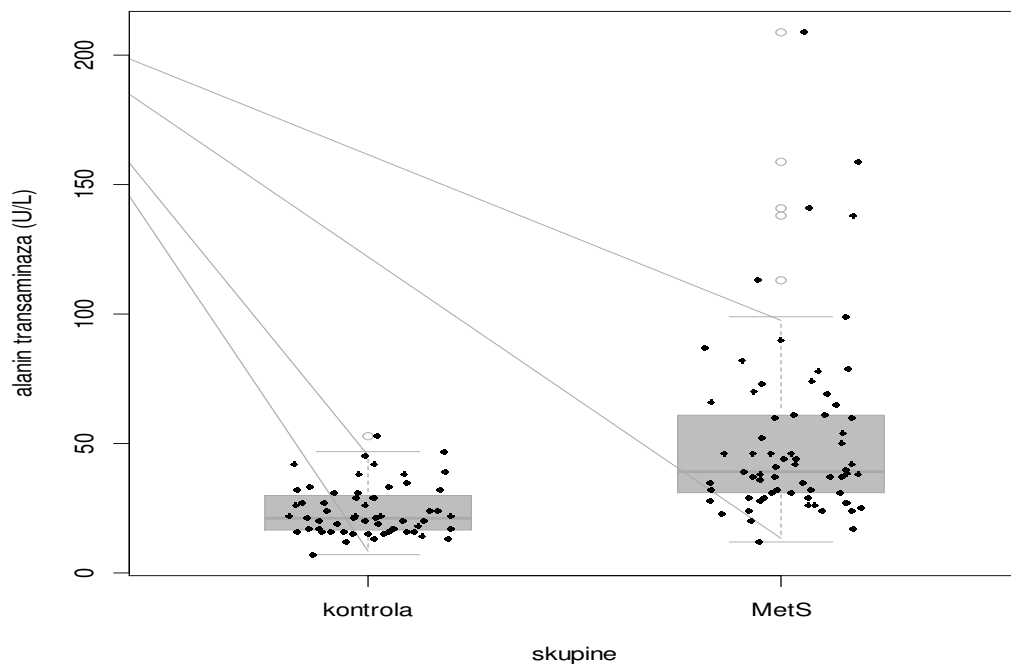
Slika 15. Usporedba HDL-kolesterola (mmol/L) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



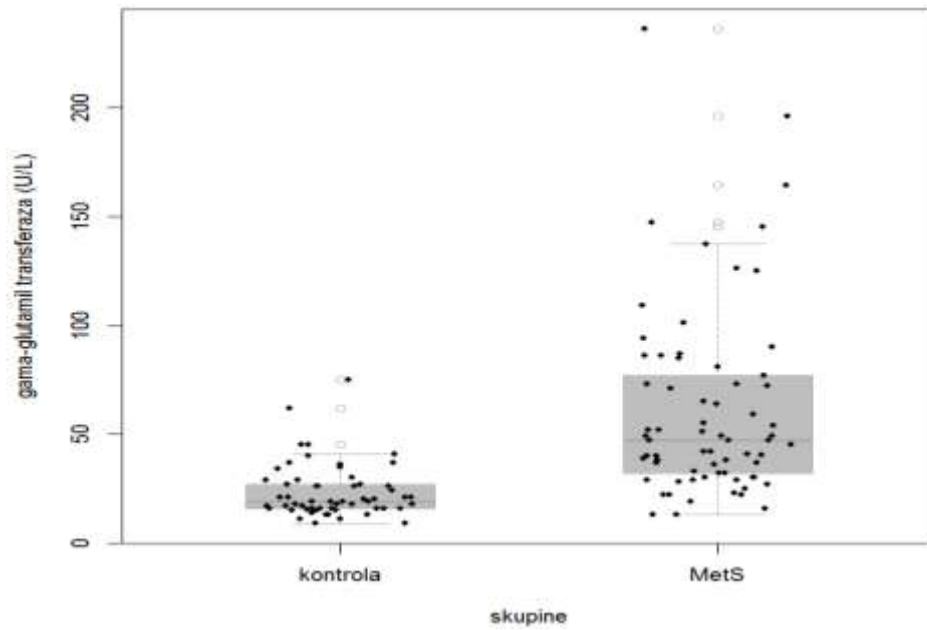
Slika 16. Usporedba triglicerida (mmol/L) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



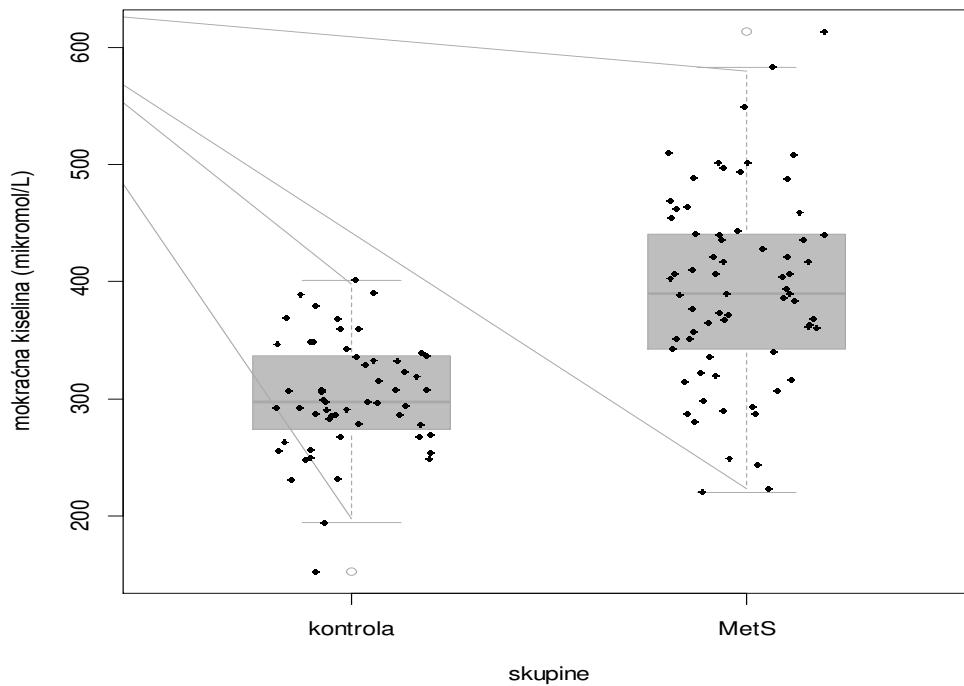
Slika 17. Usporedba C-reaktivnog proteina (mg/L) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



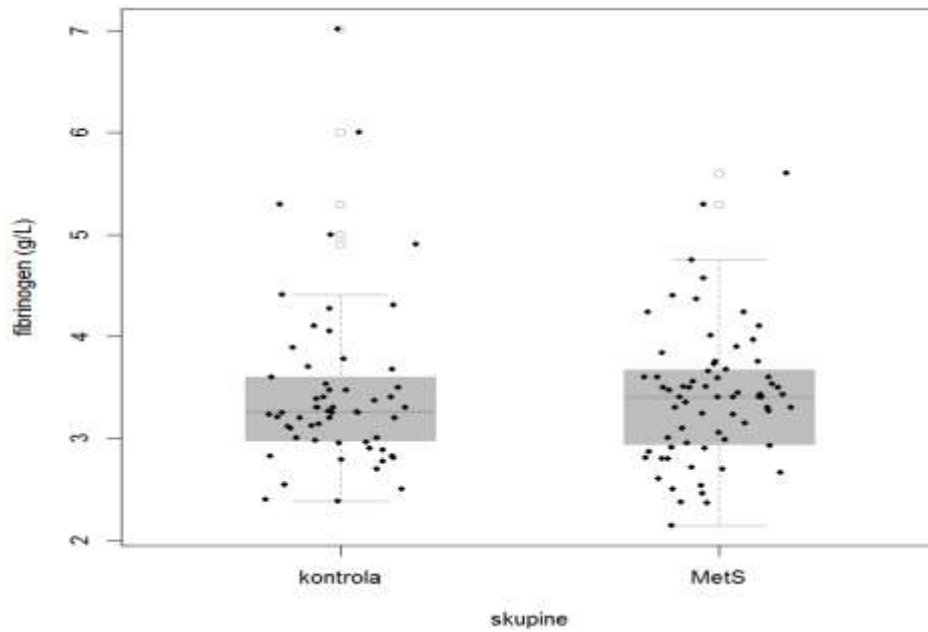
Slika 18. Usporedba alanin transaminaze (U/L) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



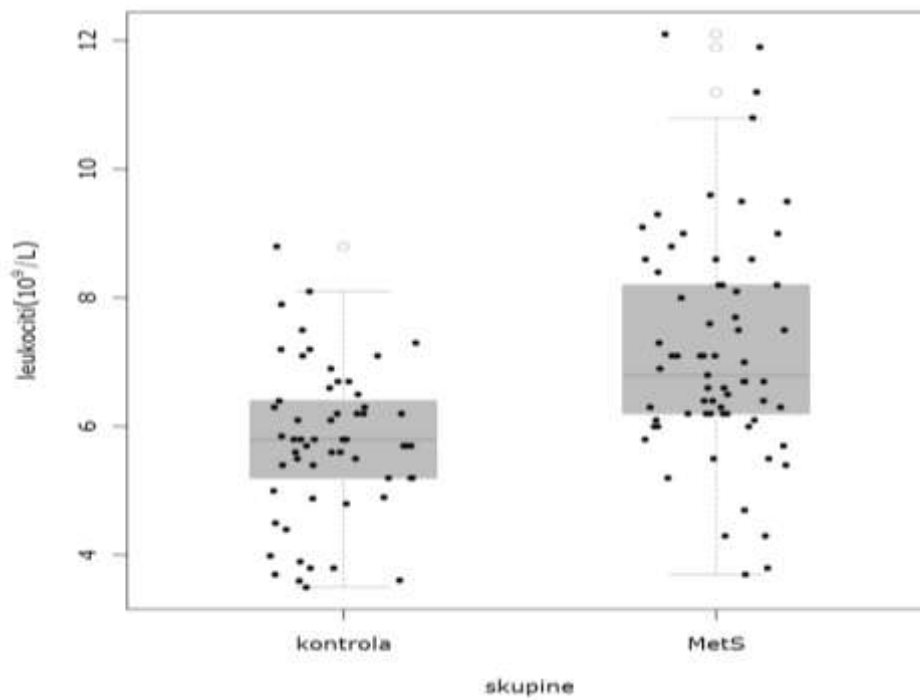
Slika 19. Usporedba gama-glutamil transferaze (U/L) za kontrolne i MS ispitanike (P = 0,003).



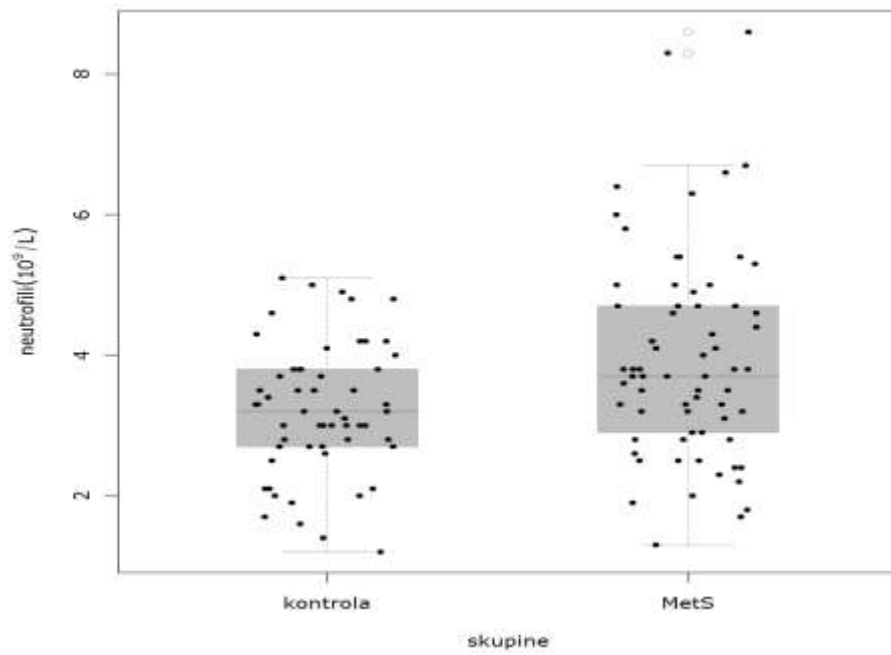
Slika 20. Usporedba mokraćne kiseline (µmol/L) za kontrolne i MS ispitanike (P = 0,001).



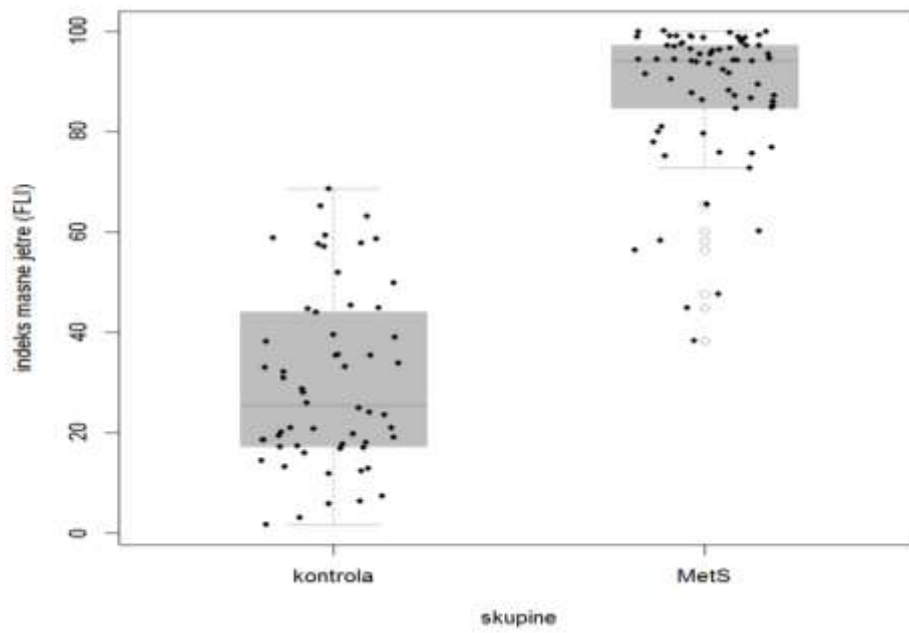
Slika 21. Usporedba fibrinogena (g/L) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,573$).



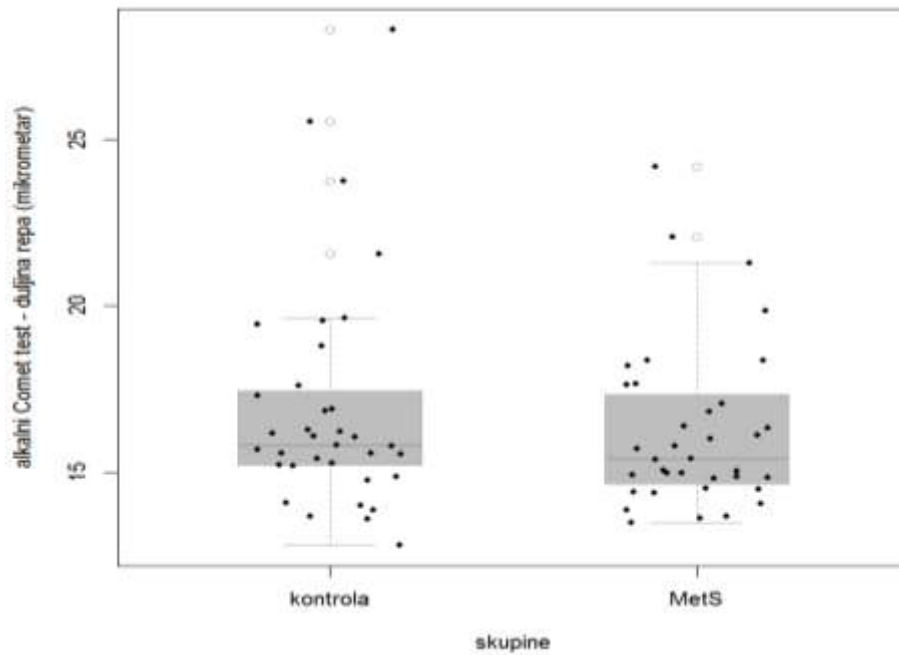
Slika 22. Usporedba leukocita ($10^9/L$) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,007$).



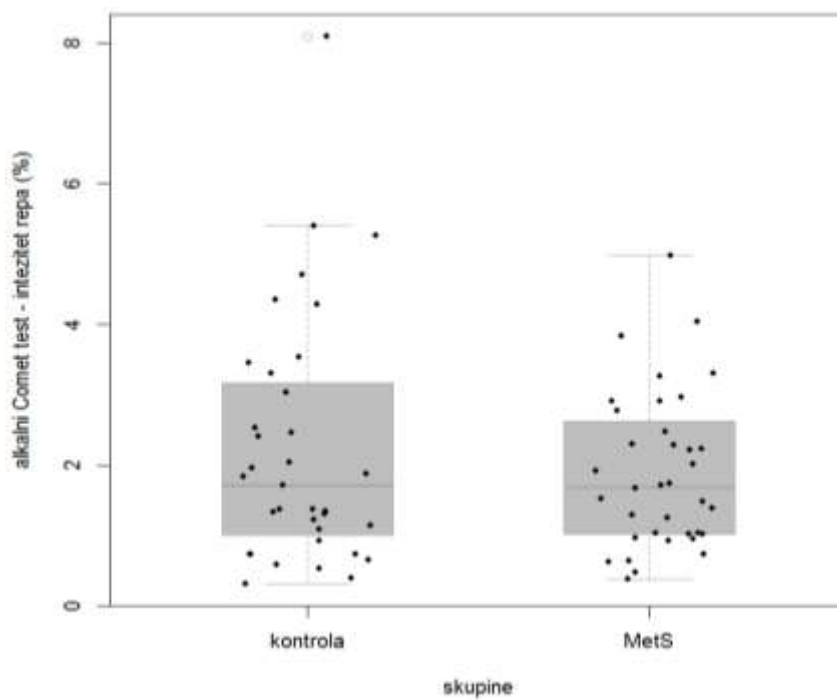
Slika 23. Usporedba neutrofila ($10^9/L$) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,1493$).



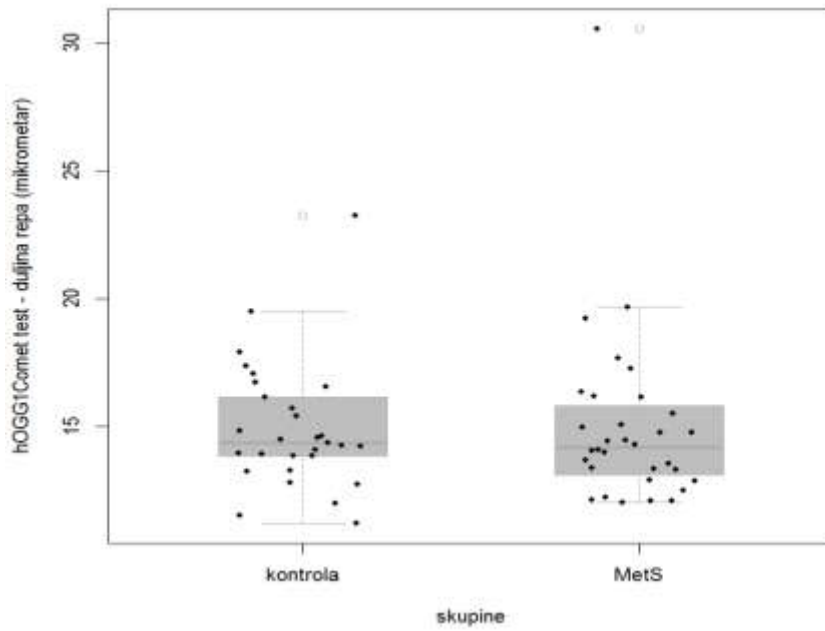
Slika 24. Usporedba indeksa masne jetre za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,001$).



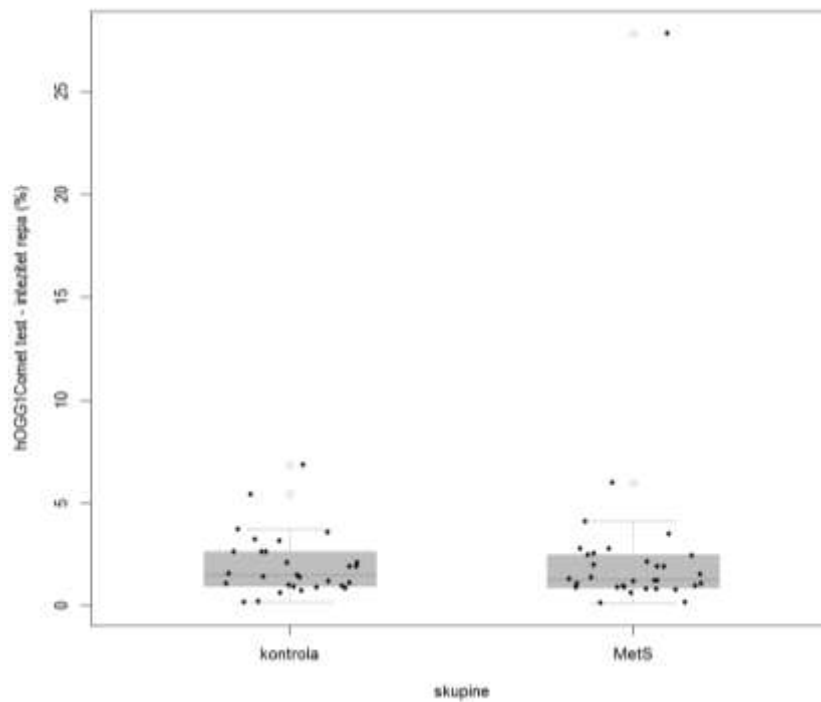
Slika 25. Usporedba alkalnog *Comet* testa (duljina repa - μm) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,994$).



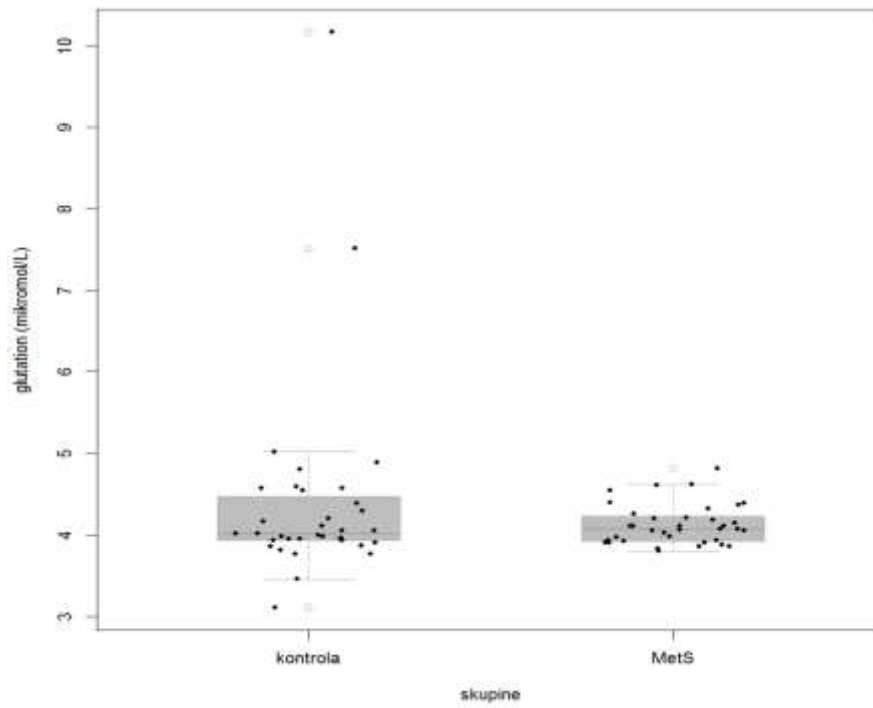
Slika 26. Usporedba alkalnog *Comet* testa (intezitet repa - %) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,829$).



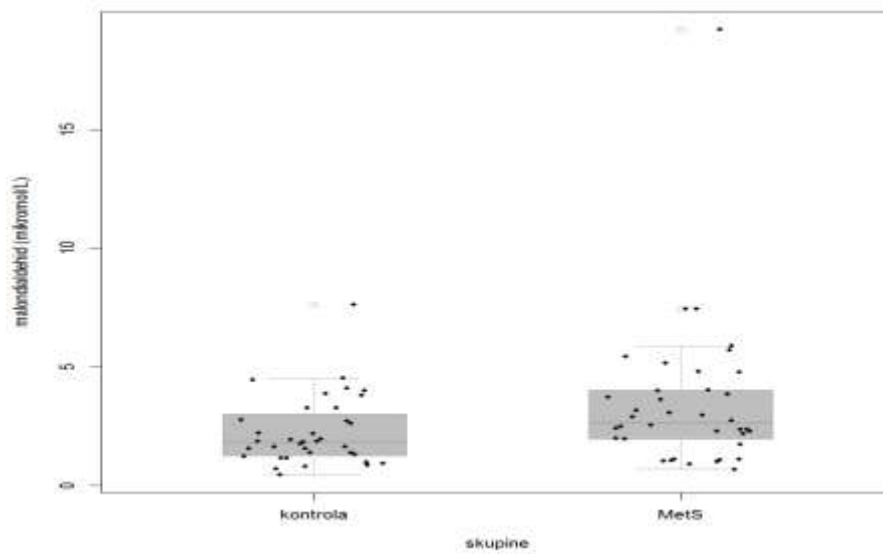
Slika 27. Usporedba hOGG1 *Comet* testa (duljina repa - μm) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,379$).



Slika 28. Usporedba hOGG1 *Comet* testa (intezitet repa - %) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,556$).



Slika 29. Usporedba glutaciona ($\mu\text{mol/L}$) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,105$).



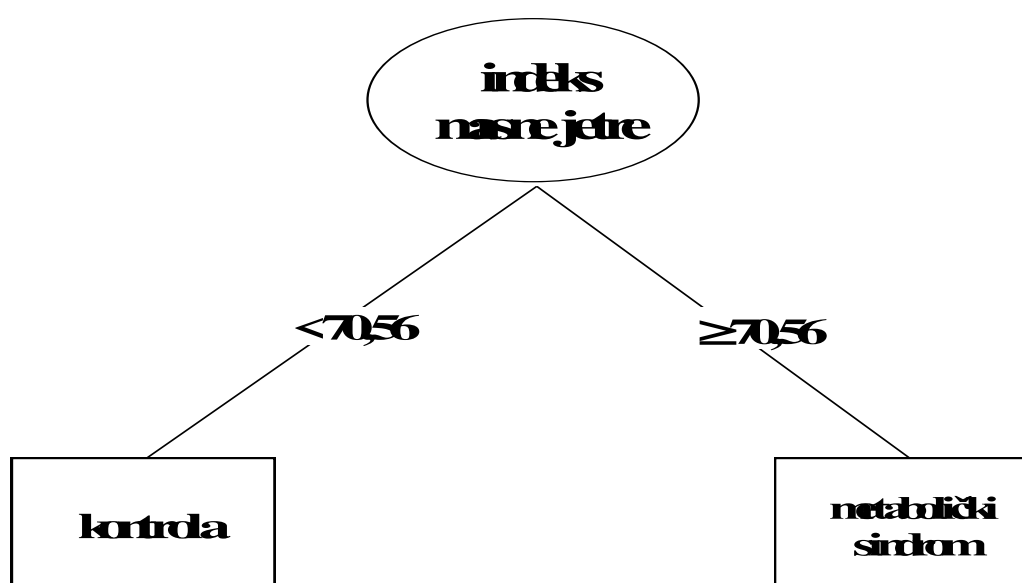
Slika 30. Usporedba malondialdehida ($\mu\text{mol/L}$) za kontrolne i MS ispitanike ($P = 0,282$).

4.2 Multivarijatna analiza

Multivarijatna analiza provedena je uporabom klasifikacijskih programa SimpleCART i RepTree. Rezultati analize za SimpleCART prikazani su u tablici 4. i slici 30., dok su rezultati za RepTree prikazani u tablici 5. i slici 31. Oba programa izdvajaju indeks masne jetre (engl. *fatty liver index*, kratica FLI) kao najbolji i jedini pokazatelj. Minimalne razlike u vrijednosti FLI potječu od činjenice što koriste različite algoritme za određivanje kriterijske vrijednosti.

Tablica 4. Rezultati analize uporabom SimpleCART klasifikacijskog programa.

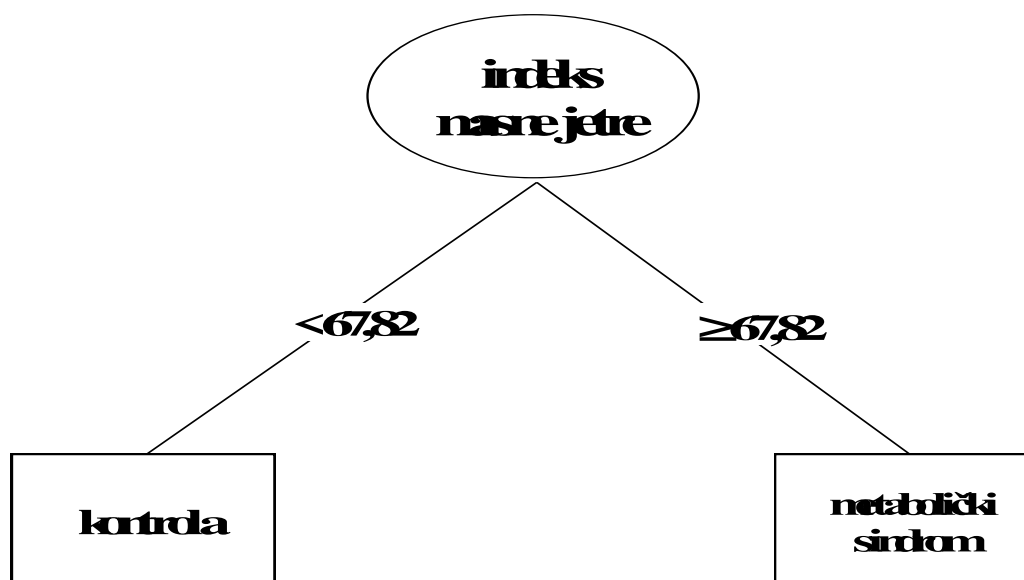
AKO JE FLI < 70.56 ONDA KLASIFICIRATI KAO= kontrola (42.5/4) [23/3] AKO JE FLI >= 70.56 ONDA KLASIFICIRATI KAO = MetS (42.5/0.5) [20/0]	
Sveukupna klasifikacija Korektno klasificirani slučajevi 120 (93.75%) Nekorektno klasificirani slučajevi 8 (6.25%)	Leave-one-out unakrsna validacija Nekorektno klasificirani slučajevi 120 (93.75%) Nekorektno klasificirani slučajevi 8 (6.25%)
=== Matrica konfuzije === a b <-- razvrstani kao 58 1 a = kontrola 7 62 b = MetS	=== Matrica konfuzije === a b <-- razvrstani kao 58 1 a = kontrola 7 62 b = MetS



Slika 31. Rezultat analize uporabom SimpleCART klasifikacijskih programa, pri čemu je vrijednost indeksa masne jetre od 70,56 izdvojena kao optimalna vrijednost za diskriminaciju ispitanika kontrolne skupine i ispitanika s MS.

Tablica 5. Rezultati analize uporabom RepTree klasifikacijskog programa.

AKO JE FLI < 67.82 ONDA KLASIFICIRATI KAO = kontrola (43.51/5) [21/2] AKO JE FLI >= 67.82 ONDA KLASIFICIRATI KAO = MetS (41.49/0.49) [22/1]	
Sveukupna klasifikacija Korektno klasificirani slučajevi 119 (92.9688 %) Nekorektno klasificirani slučajevi 9 (7.0313 %)	Leave-one-out unakrsna validacija Korektno klasificirani slučajevi 118 (92.1875 %) Nekorektno klasificirani slučajevi 10 (7.8125 %)
=== Matrica konfuzije === a b <-- classified as 57 2 a = kontrola 7 62 b = MetS	=== Matrica konfuzije === a b <-- classified as 56 3 a = kontrola 7 62 b = MetS



Slika 32. Rezultat analize uporabom Reptree klasifikacijskih programa, pri čemu je vrijednost indeksa masne jetre od 67,82 izdvojena kao optimalna vrijednost za diskriminaciju kontrolnih ispitanika i ispitanika s MS.

4.3. ROC analiza

Analiza pomoću permutacijskog testa (tablica xy) izdvojila je četrnaest varijabli koje se statistički signifikantno razlikuju između kontrolnih bolesnika i bolesnika s MetS. Multivarijatna analiza pomoću RepTree i SimpleCART klasifikatorskih programa upućuje na indeks masne jetre (FLI) kao najbolji diskriminacijski čimbenik za razlikovanje navedenih skupina. Zbog visokog informacijskog sadržaja FLI gotovo savršeno razdvaja dvije ciljne klase ispitanika, dodavanje novih varijabli praktički ništa ne poboljšava učinkovitost klasifikacije.

FLI je zbog toga dodatno analiziran pomoću ROC analize kako bi se utvrdila njegova praktična vrijednost u razlikovanju normalnog i patološkog nalaza. Naime, ta nam analiza kazuje koja je optimalna vrijednost FLI (zvana kriterij) za najbolje razlikovanje po načelu senzitivnost i specifičnost.

Osnovna vrijednost koju izračunava ROC analiza je ROC krivulja i takozvana površina ispod ROC krivulje (AUC – prema engleskom izvorniku *Area Under the Curve*). AUC se može kretati u rasponu od 0,5 do 1, ili izraženo kao postotak od 50-100%. Površina se računa na grafikonu na kojem *x*-os predstavlja specifičnost (od 0 do 1), a *y*-os senzitivnost (od 0 do 1). Površinu ispod ROC krivulje treba tumačiti kao vjerojatnost da će optimalna vrijednost varijable (kriterija) istodobno pravilno razvrstati dva slučajno odabrana entiteta, i to po jednog iz svake skupine. Potpuno slučajan rezultat je AUC od 0,5 (50%), a kvaliteta kriterija se određuje po tome koliko je dotični kriterij veći od navedene vrijednosti. Idealan kriterij AUC bi bio 1 ili 100%.

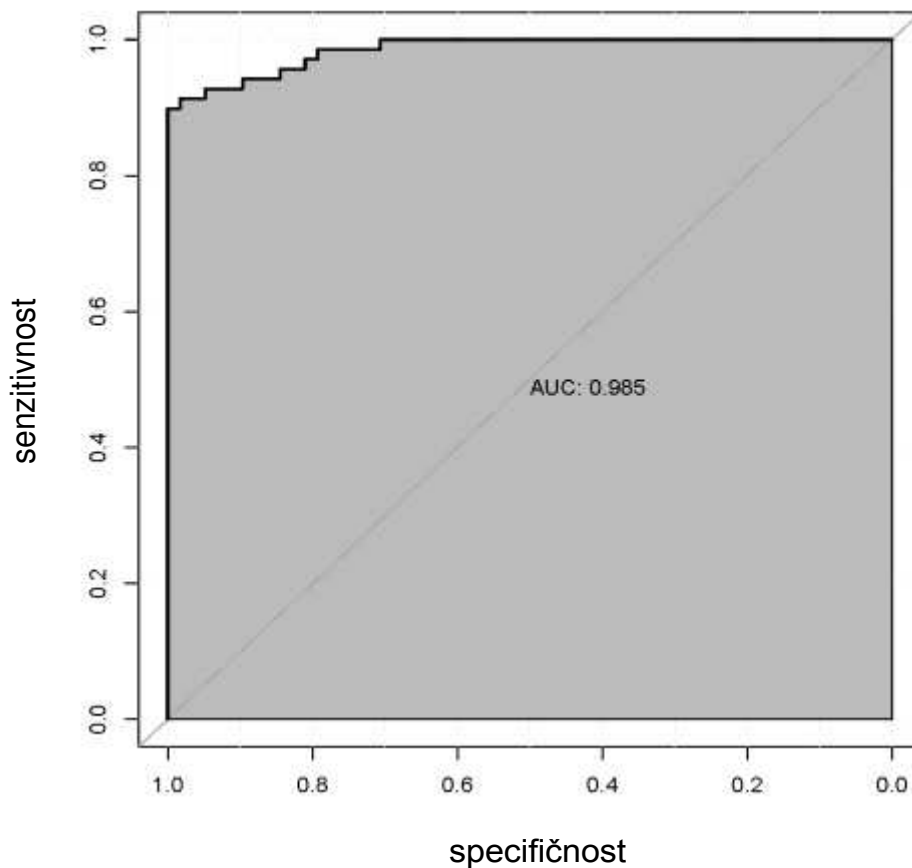
Većina programa za ROC analizu kao kriterij odabire onu točku na ROC krivulji koja je najmanje udaljena od gornjeg lijevog kuta grafikona ROC krivulje. Idealna situacija za primjenu ROC analize je onda, kada su ispitivane skupine otprilike podjednako velike i kada veličina svake skupine nadmašuje broj od 50. Oba su uvjeta u provedenoj studiji ispunjena i stoga se rezultati provedene ROC analize mogu smatrati relevantnima.

Uz vrijednost FLI od 68,53 kao optimalnog kriterija za razdvajanje kontrolnih ispitanika i osoba s MetS dobiva se površina ispod ROC krivulje od 0,985 ili 98,5%, što ukazuje da se radi o gotovo savršenom prediktoru. Senzitivnost FLI u predikciji MS iznosi 89,86%, a specifičnost 100%.

Optimalna vrijednost FLI minimalno se razlikuje između ROC analize (68,53) i klasifikacijskog programa SimpleCART (70,56). Razlika proistječe iz toga što ROC analiza traži vrijednost FLI koja optimizira kompromis između senzitivnosti i specifičnosti, dok SimpleCART traži vrijednost FLI koja optimizira postotak točno klasificiranih ispitanika.

Detalji analize opisani su u tablicama 6. i 7. te slici 32.

Slika 33. ROC krivulja za parametar indeks masne jetre (FLI). FLI ima površinu ispod ROC krivulje od 98,5%, a koja je označena sivom bojom.



Tablica 6. Rezultat ROC analize za indeks masne jetre (FLI) kao prediktora metaboličkog sindroma..

Optimalni kriterij	68,53
Površina ispod ROC krivulje (AUC)	0,985
95% granice pouzdanosti	od 0,946 do 0.998
<i>P</i> vrijednost	<0.001

Tablica 7. Vrijednosti FLI korištene za određivanje ROC krivulje, te njihova osjetljivost i specifičnost s 95% granicama pouzdanosti. Optimalna vrijednost (kriterij) označena je zvjezdicom *.

Kriterij (FLI)	Senzitivnost	95% granice pouzdanosti za osjetljivost	Specifičnost	95% granice pouzdanosti za specifičnost
>=1,67	100,00	94,8 - 100,0	0,00	0,0 - 6,2
>38,07	100,00	94,8 - 100,0	70,69	57,3 - 81,9
>38,27	98,55	92,2 - 100,0	70,69	57,3 - 81,9
>44,76	98,55	92,2 - 100,0	79,31	66,6 - 88,8
>44,81	97,10	89,9 - 99,6	79,31	66,6 - 88,8
>45,31	97,10	89,9 - 99,6	81,03	68,6 - 90,1
>47,48	95,65	87,8 - 99,1	81,03	68,6 - 90,1
>51,78	95,65	87,8 - 99,1	84,48	72,6 - 92,7
>56,38	94,20	85,8 - 98,4	84,48	72,6 - 92,7
>57,75	94,20	85,8 - 98,4	89,66	78,8 - 96,1
>58,18	92,75	83,9 - 97,6	89,66	78,8 - 96,1
>59,21	92,75	83,9 - 97,6	94,83	85,6 - 98,9
>60,17	91,30	82,0 - 96,7	94,83	85,6 - 98,9
>65,1	91,30	82,0 - 96,7	98,28	90,8 - 100,0
>65,35	89,86	80,2 - 95,8	98,28	90,8 - 100,0
>68,53 *	89,86	80,2 - 95,8	100,00	93,8 - 100,0
>99,97	0,00	0,0 - 5,2	100,00	93,8 - 100,0

5. RASPRAVA

Metabolički sindrom (MS) predstavlja sve značajniji zdravstveni problem širom svijeta. Broj osoba s MS povećava se u gotovo svim zemljama svijeta, bez obzira na stupanj razvijenosti. Radi se o složenom poremećaju mijene tvari, u čijem nastanku i razvoju sudjeluju patološko nakupljanje masnoća, kronična upala i oksidativni stres. Smatra se da povišen oksidativni stres igra središnju ulogu u MS i njegovim sastavnim dijelovima, te može biti objedinjujući čimbenik u progresiji bolesti.

Oksidativni stres oštećuje sve stanične strukture i smatra se jednim od uzroka starenja organizma (109, 115). Osobe s metaboličkim sindromom izložene su jačem oksidativnom stresu i imaju veći rizik obolijevanja od kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih, neurodegenerativnih i malignih bolesti (17,141). U posljednje vrijeme širom svijeta je proveden velik broj istraživanja o povezanosti oksidativnog stresa s MS. Unatoč napretku u istraživačkom radu, preostaju bitne poteškoće definiranja i kvantifikacije oksidativnog stresa u biološkim sustavima (17). Pitanje treba li oksidativni stres definirati kao stanje povećanja inteziteta prooksidativnih procesa, stanje neravnoteže između prooksidativnih procesa i antioksidativne zaštite ili kao stanje oksidativnog oštećenja makromolekula, kao što su lipidi, proteini i DNA, još uvijek je nerazriješeno. Daljnje poteškoće u istraživanju oksidativnog stresa predstavljaju različiti mehanizmi stvaranja reaktivnih spojeva i njihova učinka na različite strukture i procese u organizmu, različiti pokazatelji oksidativnog stresa te metode njihova određivanja (17).

Jedno od neodgovorenih pitanja glede oksidativnog stresa i razvoja MS sindroma jest nastaje li oksidativno oštećenje molekula kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline, prije pojave MS, istovremeno s njim ili nakon što je MS trajao neko vrijeme.

U ovom istraživanju željeli smo ustanoviti postoje li razlike u pokazateljima oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja makromolekula kao što su lipidi i jezgrena DNA između ispitanika s MS srednje životne dobi, radno sposobnih, bez kroničnih bolesti (osim arterijske hipertenzije i šećerne bolesti tipa II), koje predstavljaju kriterije za dijagnozu MS i ispitanika kontrolne skupine. Također smo u naših ispitanika, između ispitivanih pokazatelja željeli naći najbolji pokazatelj MS.

Između dviju skupina ispitanika ustanovili smo razlike u antropometrijskim, biokemijskim i hematološkim parametrima (osim u broju neutrofila i koncentraciji fibrinogena). Nismo našli razlike između ispitivanih skupina u oštećenju jezgrene DNA i razinama pokazatelja lipidne peroksidacije malondialdehida i antioksidansa glutationa.

5.1. Oksidativno oštećenje jezgrene DNA

Ovo je prvo istraživanje koje je bilo provedeno na definiranoj skupini ispitanika s MS u kojemu je ispitivanje oksidativnog oštećenja jezgrene DNA bilo učinjeno *Comet* testom uz enzim ljudskog podrijetla, 8-hidroksigvanin DNA glikozilaza (hOGG1), koji mjeri specifična oksidativna oštećenja jezgrene DNA.

Dosadašnja istraživanja su s alkalnim *Comet* testom ustanovila oštećenja DNA u ispitanika s MS (143), koronarnom srčanom bolešću (150) i šećernom bolešću tipa II (154). Song i sur. našli su razlike u razini oštećenja DNA između zdravih ispitanika, ispitanika s oštećenom tolerancijom glukoze, te novootkrivenih ispitanika sa šećernom bolešću (Song). Veće specifično oksidativno oštećenje DNA našli su Tomasello i sur. s *Comet* testom uz primjenu enzima formamidopirimidin glikozilaze u mladim ispitanicima (25-35 g.) normalne tjelesne mase, ali s udjelom masnoga tkiva većim od 30% (engl. *normal weight obese*, NWO), u odnosu na ispitanice koje su imale <30% masnoga tkiva (157). Blasiak i sur. su primjenom *Comet* testa s enzimom formamidopirimidin glikozilazom (FPG) našli veće oksidativno oštećenje i smanjenu učinkovitost njegova popravka u bolesnika s DM2 (152).

Prema rezultatima studije Al Aubaidya, oksidativno oštećenje DNA, mjereno razinom 8-hidroksideoksigvanozina (8-OHdG) u serumu je bilo značajno više u osoba sa šećernom bolešću tipa II u odnosu na osobe s povišenom razinom glukoze u krvi natašte i zdravih ispitanika. Također, osobe s povišenom razinom glukoze natašte imale su značajno višu razinu 8-OHdG u odnosu na zdrave ispitanike (153). Simon i sur. su CBMN (kratica od engl. *Cytokinesis-block micronuclei*) testom ustanovili veće oštećenje DNA u bolesnika s MetS i koronarnom bolešću u odnosu na zdrave ispitanike (232). Za razliku od navedenih rezultata, Seet i sur., nisu, u inače zdravih ispitanika mlađe i srednje dobi, našli povezanost oksidativnog oštećenja DNA s MetS, mjereći razinu 8-OHdG u urinu kao pokazatelj

oksidativnog oštećenja (155). Anderson i sur. primjenom su alkalnog *Comet* testa našli čak i nešto manje oštećenje DNA u bolesnika sa šećernom bolešću tipa I i tipa II u odnosu na zdrave ispitanike. Autori su pretpostavili da je razlog tomu jača aktivacija zaštitnih mehanizama, koji, osim zaštite i popravka DNA, štite i popravljaju druga stanična oštećenja, tako da je krajnji rezultat manje oštećenje DNA u stanici izloženoj stresu (233).

U našoj studiji, nismo našli statistički značajne razlike u razini oštećenja DNA između ispitanika s MS i zdravih pojedinaca. Moguć razlog ovih rezultata može biti dobra funkcija sustava antioksidativne zaštite i mehanizama popravaka oštećenja DNA. Drugi razlog može biti da sustavna razina oksidativnog stresa nije dostatna da u značajnoj mjeri ošteti makromolekule, kao što su DNA, lipidi i proteini. Značajno oksidativno oštećenje DNA u naših ispitanika moglo bi nastati u budućnosti, uslijed porasta razine oksidativnog stresa i smanjivanja učinkovitosti mehanizama obrane i popravka DNA tijekom starenja organizma i/ili njihova slabljenja nakon duljeg trajanja metaboličkog sindroma.

Općenito se smatra da se sposobnost popravka oštećenja DNA umanjuje tijekom procesa starenja, te da je jedan od razloga starenja nakupljanje DNA oštećenja. Na primjer, Piperakis i sur. ustanovili su da se s godinama smanjuje sposobnost popravka oštećenja DNA, a povećava njezino oštećenje; u djece (5-10 godina) sposobnost je popravka DNA bila bolja u odnosu na odrasle (40-50 godina), a naslabija je bila u starih (60-70 godina) ispitanika (139). Prema većini drugih istraživanja, učinkovitost svih oblika popravka jezgrene DNA smanjuje se s godinama (109). Suprotne rezultate objavio je Humphreys, u čijem su istraživanju oksidativno oštećenje DNA, otpornost prema oksidativnom stresu i popravak oštećenja DNA pokazivali tendenciju porasta od mlađe prema starijoj dobi (234). U vrlo starih osoba, kao što su devedesetogodišnjaci, bio je ustanovljen značajno niži stupanj oksidativnog oštećenja DNA uz manju prevalenciju MS u odnosu na ispitanike starosti između 60 i 74 godina. Autori su pretpostavili bolju antioksidativnu zaštitu u 90-godišnjaka, koja im je omogućila da dožive visoku dob bez razvoja smrtonosnih bolesti (235). Slično su pretpostavili Humphreys i sur. za najstarije ispitanike (75-82 g.) u svom istraživanju (234). Demirbag i Al-Aubaidy su u svojim studijama objavili statistički značajno povišenu razinu DNA oštećenja u ispitanika s metaboličkim sindromom u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika. No, u njihovim studijama prosječna starost ispitanika bila je značajno viša od naših ispitanika (>10 godina). Osim toga, moguće je da su oštećenja DNA mogla nastati zbog duljeg trajanja MS u odnosu na naše ispitanike. Ispitanici Seeta i sur., koji nisu našli povezanost oštećenja DNA s MS bili

su nešto mlađi od naših ispitanika (155). Stoga, moguće je da su dob ispitanika i trajanje poremećaja bitni faktori koji određuju razinu oštećenja DNA i drugih makromolekula.

Iza 64. godine života značajno raste incidencija obolijevanja od kroničnih bolesti, kao što su kardiovaskularne, cerebrovaskularne, zloćudne, neurodegenerativne i druge bolesti (Baklaić), što može biti povezano sa slabijom mogućnošću popravka oštećenja DNA u dobi od 60-70 godina u odnosu na mlađe dobne skupine (139). Stoga je logično pretpostaviti da je u ispitanika s oštećenjem DNA povećan rizik nastanka navedenih kroničnih bolesti, kako u odnosu na ispitanike njihove dobi bez metaboličkog sindroma, tako i u odnosu na osobe mlađe dobi s metaboličkim sindromom, ali bez značajnijeg oštećenja DNA. Također pretpostavljamo da veća sklonost razvoju kroničnih bolesti, povezana sa slabljenjem mehanizama zaštite i popravka DNA nastaje u kasnijoj životnoj dobi od one koju su imali naši ispitanici.

Prema pregledanoj literaturi, prijetno je prethodi li oštećenje DNA promjenama karakterističnim za MS, nastaje li istovremeno s njima ili nastaje nakon njih. Tomasello i sur. su na temelju rezultata svoga istraživanja provedenog na mladim ispitanicama (25-35 g.) zaključili da bi oštećenje DNA, vezano uz povećanje masnoga tkiva moglo nastati prije razvoja MS (157). Seet i sur. u ispitanika oba spola, nešto mlađih od naših, nisu našli povezanost oksidativnog oštećenja DNA, mjereno razinom 8-OHdG u urinu sMS (155). Razlike između naših rezultata i rezultata studije Tomasello i sur. mogu se objasniti razlikama u metabolizmu između spolova, koje su povezane s učinkom hormona, s obzirom da estrogeni smanjuju inzulinsku rezistenciju (236) te djeluju protuupalno (237) i antioksidativno (238-240). Prema podacima iz literature, u žena je ustanovljeno manje oksidativno oštećenje DNA u odnosu na muškarce (Slyskova), što se tumači utjecajem estrogena na aktivaciju „antioksidativnih“ gena (239,240). Moguće je da povećanje količine masnoga tkiva u žena prati veći porast oksidativnog oštećenja DNA u odnosu na jednako povećanje masnog tkiva u muškaraca, na što bi mogli upućivati rezultati istraživanja Paulsena i sur., koji su našli znatno nižu ekspresiju glasnike RNA za 11-beta-hidroskisteroid-dehidrogenazu (11- β -HSD1) u masnom tkivu mršavih žena u odnosu na mršave muškarce, dok između pretilih žena i pretilih muškaraca nije bilo razlika (242). Povećan učinak kortizola u masnom tkivu mogao bi smanjiti zaštitni učinak estrogena njihovom inaktivacijom, mehanizmom sulfonacije (241).

5.2. Laboratorijski pokazatelji oksidativnog stresa i metaboličkog sindroma

U našoj studiji, razine malondialdehida (MDA), kao pokazatelja peroksidacije lipida i reduciranoga glutaciona (GSH), kao glavnog antioksidansa u organizmu nisu se značajno razlikovale između dviju skupina. U razinama MDA i GSH postojao je trend razlika između skupina, te stoga pretpostavljamo da bi u budućnosti razlike mogle postati značajne, nakon duljeg trajanja metaboličkog sindroma, uz povećanje stvaranja ROS-a i RNS-a te iscrpljenje zaštitnih mehanizama. Razlog tomu može biti još nedostatno stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, što bi uzrokovalo značajno oksidativno oštećenje lipida i/ili kompenzatorno povećanje aktivnosti mehanizama zaštite od oksidativnog stresa (engl. *upregulation*), koje nastaje kao odgovor na povećano stvaranje reaktivnih spojeva (243,244) te sprečava značajniju peroksidaciju lipida.

U većini istraživanja ustanovljena je veća razina MDA u plazmi ispitanika s metaboličkim sindromom (144,245). U našem istraživanju, razina reduciranog glutaciona u plazmi bila je nešto niža u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom, ali razlika između dviju skupina nije dosegla statističku značajnost. U našem istraživanju nismo mjerili oksidirani glutation (GSSG). Odnos reduciranog i oksidiranog glutaciona mogao bi dati uvid u ravnotežu oksidirajućih i reducirajućih reakcija u plazmi. Prosječna dob naših ispitanika je približno 45 godina, dob poslije koje se, prema rezultatima istraživanja Jonesa i sur., odnos GSH/GSSG pomiče prema strani oksidiranog glutaciona, što bi moglo značiti slabljenje antioksidativnih mogućnosti toga redoks-sustava nakon navršениh 45 godina života. Ravnoteža drugog tiolsko-disulfidnog redukcijско-oksidacijskog sustava, cisteinsko-cistinskog sustava pomiče se prema oksidiranom stanju linearno tijekom cijeloga života (148). U plazmi postoji više redukcijско-oksidacijskih sustava, koji različito reagiraju na kemijska i fiziološka događanja, tako da se ravnoteža između reakcija oksidacije i redukcije ne može promatrati kroz jedan individualni redoks sustav (246). Općenito, smatra se da starenjem organizma slabe sustavi antioksidativne zaštite.

Ispitanici s metaboličkim sindromom u našem istraživanju imali su više vrijednosti gama-glutamilttransferaze (GGT) i razine mokraćne kiseline u plazmi u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. Povezanost mokraćne kiseline i MS poznata je dugo vremena (247). Reakcijom u kojoj nastaje mokraćna kiselina, nastaju reaktivni kisikovi spojevi (100).

Mokraćna kiselina ima antioksidativna svojstva, u smislu uklanjanja (engl. *scavenging*) slobodnih radikala (248,249), ali svojstva antioksidansa iskazuje isključivo u hidrofilnom okruženju, ekstracelularno (250). U određenim okolnostima, kao što je aterosklerotično prooksidativno okruženje, molekula mokraćne kiseline u reakciji s intracelularnim oksidansima iskazuje značajan prooksidativni učinak (250,251).

Povišena aktivnost GGT u naših ispitanika s metaboličkim sindromom znak je povećane izloženosti oksidativnom stresu (252). Oksidativni stres putem složenih mehanizama inducira ekspresiju gena za sitenzu GGT (252). GGT ima važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti stanica, jer omogućuje unos glutationa u stanicu (253). Manjak GGT uzrokuje povećanu osjetljivost stanica na oksidativno oštećenje (253,254). Osim toga, GGT u prisutnosti iona metala, kao što je željezo, generira reaktivne kisikove spojeve (255,256), a u aterosklerotskim plakovima katalizira oksidaciju LDL-kolesterola (256). GGT se, prema tome, smatra pokazateljem oksidativnog stresa, ali i čimbenikom koji izaziva oksidativni stres.

Prema rezultatima studije *CARDIA*, vrijednosti GGT povezane su s kasnijim porastom razine pokazatelja oksidacije lipida izoprostana, na temelju čega su autori zaključili da razina aktivnosti GGT može služiti kao neizravan pokazatelj rizika oksidativnog oštećenja u budućnosti (257). U naših ispitanika s metaboličkim sindromom, više vrijednosti GGT mogu upućivati na rizik nastanka oksidativnog oštećenja lipida u budućnosti. Razina GGT je također bila povezana s brojnim čimbenicima rizika za metabolički sindrom i kardiovaskularne bolesti (256).

Alanin transaminaza ili alanin aminotransferaza (ALT) laboratorijski je pokazatelj masne jetre, a među „jetrenim“ enzimima (GGT, alkalna fosfataza, transaminaze) smatra se najspecifičnijim za masnu jetru (258,259). ALT aktivnost u ovom istraživanju bila je značajno viša u ispitanika s metaboličkim sindromom. No, slično istraživanju Bedognija i sur., indeks masne jetre bio je značajnije povezan s ultrazvučnim nalazom masne jetre u odnosu na ALT (231), te je stoga bolji pokazatelj metaboličkog sindroma nego ALT.

Iako nismo određivali visokoosjetljivi CRP (engl. *high-sensitive C-reactive protein*, hs-CRP), ustanovili smo značajnu razliku u vrijednosti CRP-a između dviju skupina. Srednja vrijednost CRP-a u naših ispitanika s metaboličkim sindromom iznosila je 3,47 mg/L, što se smatra vrijednošću koja ukazuje na upalu niskog intenziteta (260) te označava umjeren rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Prema AHA smjernicama (*American Heart Association*), vrijednost CRP-a koja označava povećan rizik za kardiovaskularne bolesti je >3 mg/L (261).

Budući da je CRP bio određen standardnom metodom, koja se ne opisuje kao pogodna za procjenu rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (260,262), vrijednost naših rezultata je manja u odnosu na rezultate koji bi bili dobiveni određivanjem hs-CRP. U istraživanju Stefanske i sur. hs-CRP bio je dobar pokazatelj metaboličkog sindroma, vrijednost koja je razdvajala ispitanike s metaboličkim sindromom od ispitanika kontrolne skupine iznosila je 2,52 ng/L, (263). Međutim, prema rezultatima analize metodom ROC, njegova pouzdanost i specifičnost kao pokazatelja koji definira metabolički sindrom bile su slabije no što su bile za FLI u našem istraživanju.

Vrijednosti triglicerida u plazmi bile su signifikantno više, a vrijednosti HDL-kolesterola u plazmi signifikantno niže u ispitanika s metaboličkim sindromom u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. Povišena vrijednost triglicerida u skupini ispitanika s metaboličkim sindromom bila je 2,98 mmol/L, što je prema kriterijima američkog nacionalnog programa edukacije o kolesterolu (engl. *National Cholesterol Education Program*, NCEP) razina koja je povezana s umjerenim rizikom za razvoj kardiovaskularne bolesti (6).

Prosječna vrijednost ukupnog HDL-kolesterola u naših ispitanika s metaboličkim sindromom iznosila je 1,23 mmol/L, što po kriterijima NCEP pripada u srednju skupinu rizika (6). Kako smo određivali jedino ukupan HDL-kolesterol, općenito možemo reći da ispitanici s metaboličkim sindromom imaju veći rizik nastanka kardiovaskularnih bolesti u odnosu na ispitanike kontrolne skupine. S obzirom da smo ustanovili prosječnu razinu ukupnog HDL-kolesterola, koja je po NCEP klasificirana kao pokazatelj umjerena rizika za kardiovaskularne bolesti, kao i to da nismo ustanovili značajno oksidativno oštećenje DNA i lipida, za bolju procjenu kardiovaskularnog rizika naših ispitanika, kao i utvrđivanje razlika antioksidativnih i antiaterogenih svojstava HDL-kolesterola između dviju skupina, valjalo bi odrediti razinu „zaštitne“ HDL-3 subpopulacije, te protuupalnu i antioksidativnu aktivnost HDL-kolesterola – određivanjem aktivnosti enzima u sastavu HDL, kao što su paraoksonaza 1 (PON1), PON3, lecitin-kolesterol aciltransferaza i glutation peroksidaza.

Srednja razina fibrinogena u ispitanika s metaboličkim sindromom i ispitanika kontrolne skupine nije se razlikovala. Ma i sur. u svom istraživanju ustanovili su da slične vrijednosti fibrinogena predstavljaju povećani rizik od nastanka infarkta miokarda (264). Iako je u literaturi opisana značajna varijabilnost u vrijednostima fibrinogena, posebice u svezi s godišnjim dobima, koja bi mogla otežati interpretaciju vrijednosti fibrinogena kao čimbenika

rizika za kardiovaskularne bolesti (265), ne možemo naći zadovoljavajuće objašnjenje za nepostojanje razlike u razini fibrinogena između dviju skupina, a posebice nije jasno zašto su relativno visoke vrijednosti fibrinogena nađene u ispitanika kontrolne skupine.

Ukupan broj leukocita, no ne i neutrofila, bio je značajno viši u skupini s metaboličkim sindromom. Broj neutrofilnih leukocita bio je nešto viši u ispitanika s metaboličkim sindromom, no razlika nije bila statistički značajna. Moguće je da bi razlika postala značajna uz dulje trajanje metaboličkog sindroma. Brojne epidemiološke studije ustanovile su povezanost broja leukocita i neutrofila s povećanim kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim rizikom. Veći broj leukocita povezuje se s povećanim brojem komponenata metaboličkog sindroma (266,267), povišenim rizikom od koronarne bolesti (268,269), ishemične moždane kapi (Lee) i razvoja zloćudnih bolesti (270,271). Prema rezultatima epidemiološkog istraživanja *NHANES II Mortality Study*, vrijednosti ukupnog broja leukocita ispod kojih je ustanovljen manji rizik smrtnosti od koronarne srčane bolesti bile su $<6.1 \times 10^9/L$, a povećan rizik bio je povezan s brojem leukocita $> 7.6 \times 10^9/L$. Slične vrijednosti kardiovaskularnog rizika ustanovljene su i u drugim studijama, kao na primjer za veći rizik od infarkta miokarda (broj leukocita $<6 \times 10^9/L$ bio je povezan s manjim rizikom od akutnog infarkta miokarda, a broj leukocita povezan s većim rizikom bio je iznad $>9 \times 10^9/L$) (272). Naši ispitanici s metaboličkim sindromom bi prema broju leukocita mogli imati veći rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti, dočim bi odsutnost značajne razlike između broja neutrofilnih granulocita u ispitanika s metaboličkim sindromom mogla govoriti protiv povećana rizika, čime bi se možda neutralizirao utjecaj povećanog broja leukocita na rizik nastanka kardiovaskularne bolesti.

5.3. Antropometrijski pokazatelji masnoga tkiva

Svi ispitivani rezultati mjerenja debljine visceralnog masnog tkiva, debljina potkožnog abdominalnog masnog tkiva, opseg struka i omjer opsega struka i bokova razlikovali su se između dviju skupina ispitanika, ali je njihova povezanost s metaboličkim sindromom bila manja od one indeksa masne jetre.

Srednja vrijednost epikardijalnog masnog tkiva bitno se razlikovala između dviju skupina ispitanika, a vrijednosti su slične onima u opisanoj literaturi (273). Povećana debljina epikardijalnog masnog tkiva ukazuje na rizik pojave kardiovaskularnih bolesti.

Intraabdominalna debljina (engl. *intraabdominal thickness*), tj. udaljenost između *linee albe* i prednje stijenke aorte prvi je sonografski indeks koji je korišten u istraživanjima kao mjera abdominalnog adipoziteta (56). Prosječna vrijednost intraabdominalne debljine u naših ispitanika s metaboličkim sindromom usporediva je s prijelomnom vrijednošću (engl. *cut-off*) za umjeren rizik od kardiovaskularnih bolesti iz istraživanja Leite i sur., u kojoj je debljina od ≥ 9 cm bila povezana s visokim kardiovaskularnim rizikom (57).

Debljina potkožnog abdominalnog masnog tkiva bila je veća u ispitanika s metaboličkim sindromom, što je u skladu s rezultatima istraživanja koja su našla veću količinu potkožnog masnog tkiva u ispitanika s metaboličkim sindromom (44,49,274). Opseg struka i omjer opsega struka i bokova također su bili znatno veći u ispitanika s metaboličkim sindromom. Ultrazvučni pokazatelji u literaturi navode se kao pouzdaniji i reproducibilniji pokazatelji masnog tkiva nego opseg struka (56).

5.4. Indeks masne jetre

Daljnjom statističkom analizom svih varijabli u cilju nalaženja najboljeg pokazatelja metaboličkog sindroma, uporabom klasifikacijskih testova, kao što su Simple CART i RepTree ustanovili smo indeks masne jetre (engl. *fatty liver index*, kratica FLI) kao jedini neovisni prediktor MS, to jest jedini pokazatelj čija vrijednost može pouzdano razlikovati osobe s MS od onih bez njega. Bedogni i sur. osmislili su indeks masne jetre kao matematički pokazatelj, čija vrijednost od ≤ 60 upućuje na masnu jetru dijagnosticiranu ultrazvukom s osjetljivošću od 61% i specifičnošću od 86%, a vrijednost < 30 je isključuje s osjetljivošću od 87% te specifičnošću od 64% (230).

U naših ispitanika s MS, vrijednosti FLI izračunate uz oba testa slične su i nešto su više od vrijednosti za koju su Bedogni i suradnici izračunali da sa statistički značajnom vjerojatnošću ukazuje na ultrazvučni nalaz masne jetre. Prosječna vrijednost FLI u naših ispitanika bez MS odgovara vrijednosti indeksa masne jetre za koji su Bedogni i sur. ustanovili da je s velikom

vjerojatnošću isključuje (230). U cilju provjere dijagnostičke uporabljivosti indeksa masne jetre koja se temelji na osjetljivosti i specifičnosti indeksa masne jetre izvršili smo ROC (skraćena od engl. *receiver operating curve*) analizu. Područje unutar krivulje (engl. *area under curve*, kratica AUC) je iznosilo 0,985 s 95% intervalom pouzdanosti između 0,946 i 0,998, što odgovara kriterijima za izvrstan test. To znači da FLI kao matematički pokazatelj koji detektira masnu jetru s vrlo velikom pouzdanošću ukazuje na metabolički sindrom.

Lerchbaum i sur. nedavno su proveli ispitivanje FLI kao pokazatelja MS u ispitanica sa sindromom policističnih jajnika. Vrijednost FLI koja definira prisutnost MS u žena s policističnim jajnicima iskazala je gotovo jednaku pouzdanost (AUC 0,96) onoj iz našeg istraživanja (AUC 0,985), dok je vrijednost AUC koja definira MetS u ispitanica koje nemaju policistične jajnike bila nešto slabija (0,87). Vrijednosti FLI koje razlikuju ispitanice s MS od ispitanica bez MS bile su znatno niže od vrijednosti FLI koje su definirale MS u našem istraživanju, kako u skupini ispitanica s policističnim jajnicima (FLI=34,6), tako i u skupini ispitanica koje nisu imale policistične jajnike (FLI=25) (275).

Jedan očit razlog nižega FLI koji definira MS u žena je manja vrijednost opsega struka kao kriterija za dijagnozu MS. Kako je opseg struka sastavni dio formule za FLI, tako će i FLI u žena s MS biti niži. Jedan od drugih pretpostavljenih razloga nižega FLI u žena kao razlikovnog kriterija za MS mogla bi biti veća razina upale i oksidativnog stresa u žena u odnosu na muškarce s usporedivom količinom masnoća u jetri. Prema epidemiološkom istraživanju Balkau i sur., žene su imale veći rizik od razvoja dijabetesa tipa II u odnosu na muškarce s usporedivim indeksom masne jetre (276). Barem jedan razlog tomu bi mogla biti pojačana inaktivacija estrogena, stimulirana kortizolom (241), čija je razina povišena u masnoj jetri (277).

Usporedivu pouzdanost u razlučivanju ispitanika s MS od kontrola, u drugim su istraživanjima iskazali pokazatelji MetS, kao što su produkt akumulacije lipida (engl. *lipid accumulation product*, kratica LAP), matematički pokazatelj izveden iz opsega struka i koncentracije triglicerida u serumu te omjer triglicerida/ HDL-kolesterola, koje su autori naveli kao surogatne pokazatelje abdominalnog masnog tkiva, odnosno inzulinske rezistencije (278,279).

FLI nije kvantitativni pokazatelj masne jetre, tako da ne možemo potvrditi da su stupanj masne infiltracije jetre ili postotak masnoća u jetrenom parenhimu povezani s metaboličkim sindromom na jednak način kao FLI. Prema rezultatima ROC analize, u našem istraživanju je FLI bio jače povezan s metaboličkim sindromom (AUC 0,985), nego što je bio povezan s ultrazvučnim nalazom masne jetre u istraživanju autora koji su ga osmislili (AUC 0,85) (230). FLI je koncipiran kao surogatni pokazatelj masne jetre, računski pokazatelj koji je povezan s ultrazvučnim nalazom svijetle, odnosno masne jetre. Ultrazvučna pretraga ima ograničenja u dijagnostici masne jetre, kao što su subjektivnost izvođača pretrage, smanjena osjetljivost u morbidno pretilih osoba i nemogućnost detekcije masne jetre kada je jetrena infiltracija masnoćama niska. Ultrazvuk ne mjeri količinu masnog tkiva u jetri i ne može detektirati masnu jetru, ako masnoća u jetri nije iznad 30%, a kriterij za masnu jetru je sadržaj masnoća u jetri od $\geq 5\%$ (179, 280). Osim ultrasonografije, kao metode dijagnosticiranja masne jetre su najviše u uporabi računalna tomografija i metode magnetske rezonancije. Osjetljivost ultrazvuka usporediva je s računalnom tomografijom i iznosi 83%, ukoliko jetreni parenhim sadrži više od 33% masnoća (280). Najveću osjetljivost imaju magnetska rezonancija i magnetska rezonancija spektroskopija, koja mjeri količinu triglicerida u jetri, ali su navedene metode skupe (280). Bozkurt i sur. su na maloj podskupini (17 ispitanica s gestacijskim dijabetesom, 8 ispitanica s oštećenom tolerancijom glukoze) ustanovili značajnu korelaciju FLI i sadržaja jetrenih masnoća, mjerenih magnetskom rezonancijom – spektroskopijom (engl. *magnetic resonance spectroscopy*) (281). Iako je korelacija bila jaka, na temelju njihovih rezultata ne možemo tvrditi da je FLI pokazatelj količine masnoća u jetri

„Zlatni standard“, biopsija jetre invazivna je metoda i jedina koja može dati pouzdane podatke o upali u jetri, no njome se određuje količina masnoća u samo jednom dijelu jetre, što može dati netočan nalaz, obzirom da razni dijelovi jetre mogu biti nejednako infiltrirani masnoćama (179,280). Računanje FLI i ultrazvučni pregled, iako su manje pouzdane metode detekcije u odnosu na računalnu tomografiju i magnetsku rezonanciju, uporabljive su dijagnostičke metode u svakodnevnoj praksi i epidemiološkim istraživanjima.

Povezanost MS i FLI temelji se i na tomu da su pokazatelji koji su sastavni dijelovi formule pomoću koje se računa FLI poznati pokazatelji metaboličkog sindroma, a opseg struka i koncentracija triglicerida u plazmi su dva od pet dijagnostičkih kriterija za metabolički sindrom. Svi pokazatelji pojedinačno; opseg struka, trigliceridi, GGT (navedeno u drugim odlomcima), indeks tjelesne mase (282), poznati su prediktori za metabolički sindrom, kardiovaskularne bolesti i šećernu bolest tipa II. Kozakova i sur. ustanovili su da vrijednost

FLI >60, predstavlja neovisan čimbenik rizika za ranu aterosklerozu. Kada su u statističkoj analizi FLI zamijenili s pojedinačnim komponentama (vrijednostima koje ulaze u formulu za njegov izračun), našli su značajnu povezanost s GGT, koja je također pokazatelj masne jetre, ali nije kriterij za dijagnozu metaboličkog sindroma (283).

FLI nije samo pokazatelj steatoze jetre, već je i prognostički čimbenik nastanka brojnih bolesti. FLI je bio povezan s inzulinskom rezistencijom, omjerom debljine medije i intime karotidne arterije (engl. *intima-media thickness*, kratica IMT) te rizikom razvoja kardiovaskularnih bolesti (284). Calori i sur. našli su povezanost FLI s inzulinskom rezistencijom, neovisnu povezanost sa smrtnošću od svih bolesti zajedno, kardiovaskularnih, zloćudnih bolesti i smrtnošću vezanu uz bolesti jetre. Kada je u analizu bila uključena inzulinska rezistencija, FLI je bio neovisno povezan samo sa smrtnošću od bolesti jetre. Autori su zaključili da je rizik povezanosti FLI sa smrtnošću od ostalih, ne-jetrenih bolesti bio usko vezan uz inzulinsku rezistenciju (285). Slična povezanost nealkoholne masne jetre sa smrtnošću od jetrenih bolesti (286) i kardiovaskularnih bolesti (287) ustanovljena je radiološkim, odnosno metodama prikazivanja (engl. *imaging*).

5.5. Udio mišićne mase

Udio mišićne mase bio je manji u ispitanika s MS, ali je bio slabije povezan s metaboličkim sindromom u odnosu na FLI. Na temelju naših rezultata možemo reći da veći udio mišićne mase predstavlja povoljniji tjelesni sastav (engl. *body composition*), s manjim udjelom masnoga tkiva (kojega dio čini i metabolički aktivno masno tkivo).

Uloga mišića u metabolizmu i povezanost mišića s metaboličkim sindromom složene su i ovise i o drugim čimbenicima, kao što su tjelesna aktivnost (208), mišićna snaga (218, 288) te sastav i kvaliteta mišića (51). U dosadašnjim istraživanjima, mišićnom tkivu pridavao se manji značaj u odnosu na masno tkivo. Ciljevi budućih istraživanja mogli bi biti usmjereni na ulogu mišića u razvoju MS i bolesti povezanih s njim.

5.6. Osobine oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja makromolekula u našem istraživanju

Iako nismo našli razlike između dviju skupina u ispitivanim pokazateljima oksidativnog oštećenja DNA i lipida, kao ni razlike u razini antioksidansa u plazmi, to ne znači da oksidativni stres ne sudjeluje u nastanku metaboličkog sindroma. Uz upalu i akumulaciju masnoća u odjeljcima masnoga tkiva, te ektopično nakupljanje masnoća u jetri, povećana je aktivnost prooksidativnih procesa, koja se manifestira s višom razinom mokraćne kiseline i povećana aktivnošću GGT u skupini ispitanika s MS.

Pretpostavljamo da u ranom stadiju metaboličkog sindroma ne nastaje značajno oksidativno oštećenje lipida, proteina i nukleinskih kiselina, moguće zbog još nedostatnog stvaranja reaktivnih spojeva koji bi ga uzrokovali i/ili dobre funkcije obrambenih mehanizama koji sprečavaju njihov nastanak. U naših ispitanika, na povišenje aktivnosti zaštitnih mehanizama od oksidativnog oštećenja ukazuje povišena aktivnost GGT, a da su obrambeni sustavi dostatno učinkoviti da spriječe oksidativno oštećenje, moglo bi kazivati nepostojanje značajnih razlika u razini reduciranog glutationa (GSH) između dviju skupina. Naznaku budućega značajnijega oksidativnog oštećenja lipida daju naslutiti kroz trend više prosječne vrijednosti MDH u ispitanika s MS i povišena aktivnost GGT, kojoj se pridaje prediktivna vrijednost za buduće povišenje pokazatelja oksidacije lipida (257).

Prema podacima iz literature, još nema konačnog odgovora u kojem vremenu nastaje oksidativno oštećenje makromolekula, kao što su DNA, lipidi i proteini u odnosu na nastanak metaboličkog sindroma. Također nije razjašnjeno razvija li se oštećenje DNA paralelno s nastankom oštećenja drugih molekula (lipidi, proteini) ili nastaje nakon njega. Sjögren i sur. nisu našli povišene pokazatelje peroksidacije lipida u inače zdravih 63-godišnjaka s metaboličkim sindromom (156). Helmersson i sur. našli su višu razinu pokazatelja oksidativnog oštećenja lipida – izoprostana F_2 jedino u bolesnika sa šećernom bolešću tipa II, čije je trajanje bilo dulje od sedam godina te su zaključili da je upala rani događaj u patogenezi dijabetesa, dok se oksidativno oštećenje vjerojatno javlja kasnije (289). Suprotno navedenim rezultatima, Gopaul i sur. našli su povišene vrijednosti F_2 -izoprostana u plazmi ispitanika u stadiju predijabetesa (oštećene tolerancije glukoze) i ranog dijabetesa tipa II, što ih je navelo na zaključak da oksidativno oštećenje prethodi razvoju dijabetesa (290). Meigs i sur. su u okviru framinghamske studije našli povezanost produkta oksidacije fosfolipida, 8-

epi-prostaglandina-2 α u urinu i inzulinske rezistencije, kako u ispitanika s MS, tako i u onih bez njega (145). Kelishadi i sur. našli su povezanost razine MDA u serumu i opsega struka u studiji s ispitanicima od 10-18 godina (291).

Seet i sur. su, u inače zdravih ispitanika, s karakteristikama MS, prosječne srednje starosne dobi, između brojnih pokazatelja oksidacije lipida u plazmi i urinu našli minimalne promjene u pokazateljima oksidativnog oštećenja lipida, a nikakvu povezanost oksidativnog oštećenja DNA (mjenog razinom 8-hidroksigvanina u urinu) s karakteristikama MetS. Visokoosjetljivi CRP bio je najbolje povezan s brojem komponenata MetS i inzulinskom rezistencijom. U žena su našli povezanost GGT i razine mokraćne kiseline s brojem komponenata metaboličkog sindroma i inzulinskom rezistencijom te razine 7 β -hidroksikolesterola s inzulinskom rezistencijom. U muškaraca su našli povezanost omjera 2,3-dinor-F₂-izoprostana i kreatinina s inzulinskom rezistencijom. Nisu znali točan uzrok razlika, ali su pretpostavili da su razlike u hormonskom i metaboličkom profila između spolova (155).

U istraživanju provedenom na mladim ženama, u skupini pretilih ispitanica i ispitanica normalne tjelesne mase, ali s udjelom masnoća >30% nađena je značajno viša razina lipidnih peroksida, a niža razina reduciranog glutationa i neproteinskog antioksidativnog kapaciteta, uz povišene pokazatelje upale u odnosu na ispitanice normalne tjelesne mase i s udjelom masnoća manjim od 30% (291). U drugom istraživanju s istim ispitanicama ustanovljen je veći stupanj oksidativnog i općeg oštećenja DNA u odnosu na kontrolnu skupinu (157).

Prema rezultatima našeg istraživanja, oksidativno oštećenje makromolekula (DNA i lipida) ne nastaje paralelno s nastankom metaboličkog sindroma. Pretpostavljamo da bi u budućnosti oštećenje lipida moglo nastati prije oštećenja DNA, a razlog tomu mogla bi biti bolja zaštićenost DNA uz bolje mehanizme njezina popravka u odnosu na druge makromolekule (lipide i proteine).

Oksidativni stres oštećuje sve stanične strukture - lipide, proteine i nukleinske kiseline. Povećanje stvaranja reaktivnih spojeva aktivira obrambene mehanizme i mehanizme popravaka od oksidativnog oštećenja. Njihova funkcija povećava se (engl. *upregulation*) s povećanjem razine oksidativnog stresa (243,244). Nepopravljivo oštećeni proteini i lipidi mogu biti nadomješteni sintezom *de novo*, čemu je preduvjet neoštećena DNA. Teška oštećenja DNA ugrožavaju funkciju stanice. Stoga je jezgrena DNA, kao krucijalna molekula

stanice posebno zaštićena vezanjem uz histone (121,122), a razvijeni su i složeni mehanizmi njezina popravka (108-110).

Mogući razlozi razlika rezultata istraživanja koja su ispitivala povezanost oksidativnog stresa, oksidativnog oštećenja staničnih struktura i MS su brojni:

- Različiti pokazatelji oksidativnog stresa,
- Razlike u metodama njihova određivanja, broju ispitanika, statističkoj obradi rezultata i njihovoj interpretaciji,
- Nepostojanje podataka o trajanju metaboličkog sindroma, i
- Nepoznavanje svih čimbenika koji djeluju na razlike u metabolizmu između muškaraca i žena.

Patološka akumulacija masnoća, kronična upala niska intenziteta i povećano stvaranje reaktivnih spojeva karakteristika je ranijih stadija MS, dok je oksidativno oštećenje molekula kao što su lipidi i DNA odsutno. FLI je najpouzdaniji pokazatelj MS. S obzirom da FLI nije kvantitativni pokazatelj masne jetre, već surogatni matematički pokazatelj kojemu su autori koji su ga osmislili namijenili ulogu detekcije masne jetre, ne možemo reći da je masna jetra značajnije povezana s MS od pokazatelja nakupljanja masnoga tkiva. Ipak, naše istraživanje potvrdilo je nealkoholnu masnu jetru kao hepatičku komponentu MS i jednu od negovih najranijih manifestacija. I drugi pokazatelji masne jetre, kao što su ALT i GGT, bili su viši u skupini ispitanika s MetS, ali nisu bolji pokazatelji od FLI. Masna jetra je prediktivni čimbenik za razvoj ateroskleroze, kardiovaskularnih te zloćudnih bolesti. Stoga bi u kliničkom radu s osobama koje imaju MS bilo korisno detektirati masnu jetru, a uspjeh liječenja MS pratiti pokazateljima masne jetre. FLI i ehosonografija jetre su u kliničkoj praksi najprimjenjiviji pokazatelji kojima se može dijagnosticirati masna jetra.

5.7. Ograničenja istraživanja

U ovom istraživanju nije bilo ispitivano oštećenje mitohondrijske DNA. Količina mitohondrijske DNA je vrlo mala u odnosu na jezgenu DNA i *Comet* test ne može mjeriti njezina oštećenja (294). Oštećenje mitohondrijske DNA dovodi do oštećenja i disfunkcije

mitochondrija, što uzrokuje povećanje stvaranje ROS-a i pogoršava oksidativni stres (295). Mitochondrijska DNA podložnija je oštećenju u odnosu na jezgenu DNA zbog blizine stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva, slabijih sustava zaštite i popravka (295), stoga bi oštećenje mitochondrijske DNA moglo nastati ranije od oštećenja jezgrene DNA.

Nismo određivali proizvode oksidativnog oštećenja proteina, kao što su karbonilirani proteini i nitrotirozin.

Od pokazatelja oksidativnog oštećenja lipida, mjerili smo samo malondialdehid. Uz više pokazatelja oksidativnog oštećenja lipida, kao i pokazatelje oštećenja proteina, imali bismo bolju sliku oštećenja molekula u osoba s MS u ranom stadiju. Osim toga, nije bilo učinjeno određivanje inzulinske rezistencije, koja je temeljna odrednica MS.

Istraživanje je bilo provedeno na malom broju ispitanika, a ispitanici su bili isključivo muškog spola, tako da se naši rezultati mogu odnositi isključivo na muškarce. Za potvrđivanje indeksa masne jetre kao pokazatelja koji razlučuje osobe s MS od onih koji ga nemaju bio bi potreban veći uzorak u sklopu epidemiološkog ispitivanja.

5.8. Mogući ciljevi budućih istraživanja

Usporedbom naših rezultata i rezultata drugih autora pretpostavili smo da je odsutnost značajnijeg oksidativnog oštećenja makromolekula u ispitanika s MS povezana s još dobrim općim zdravstvenim stanjem naših ispitanika i adekvatno funkcionirajućim mehanizmima antioksidativne zaštite. Stoga bi cilj budućih istraživanja bio naći moguće razlike u oksidativnom oštećenju DNA, lipida i proteina između starijih i mlađih ispitanika s metaboličkim sindromom kako bi se ustanovilo u kojoj životnoj dobi razlike u oksidativnom oštećenju između osoba s metaboličkim sindromom i onih bez njega postaju veće, te ustanoviti da li su razlike uvjetovane starenjem ili duljinom trajanja MS. Zadatak budućih istraživanja bio bi ustanoviti koji čimbenici utječu na nastanak oksidativnog oštećenja.

Postavlja se pitanje postoji li i kakav je redoslijed nastanka oksidativnih oštećenja staničnih struktura. Prema podacima iz pregledane literature, malo je istraživanja bilo provedeno s ciljem utvrđivanja nastaje li oštećenje DNA paralelno s oštećenjem drugih molekula, ili nastaje nakon njih. Rezultati istraživanja se razlikuju (155,157). Također bi, s obzirom na razlike u metabolizmu između muškoga i ženskoga spola, bilo potrebno ciljano istražiti utjecaj spola na upalu, oksidativni stres i oksidativno oštećenje vezane uz MS. Sljedeće bitno

pitanje je kada nastaje značajnije oštećenje mitohondrijske DNA u odnosu na oštećenje jezgrene DNA, lipida i proteina.

Kako u sustavnoj razini nismo ustanovili značajno oksidativno oštećenje makromolekula u ispitanika s MS, ali smo ustanovili najveće razlike u FLI, kao surogatnom pokazatelju masne jetre i odjeljcima visceralnog i potkožnog abdominalnog tkiva, bilo bi vrijedno istražiti razine lokalnog oksidativnog oštećenja DNA i lipida u jetri i masnim tkivima, te ustanoviti njihovu povezanost s MS i istražiti moguće razlike među spolovima.

6. ZAKLJUČAK

1. Nije utvrđena razlika u oksidativnom oštećenju jezgrene DNA između ispitanika srednje životne dobi s relativno kratkim trajanjem metaboličkog sindroma i ispitanika kontrolne skupine.
2. U ranom stadiju metaboličkog sindroma nije utvrđena značajna razlika u razinama pokazatelja oksidativnog oštećenja lipida između ispitanika s metaboličkim sindromom i ispitanika kontrolne skupine.
3. Za indeks masne jetre utvrđeno je da je najbolji pokazatelj metaboličkog sindroma u ranom stadiju bolesti.
4. Funkcija antioksidativne zaštite, procijenjena razinom reduciranog glutaciona u plazmi bila je održana u ranim stadijima metaboličkog sindroma.
5. Za razinu mokraćne kiseline i aktivnost gama-glutamil transferaze utvrđeno je da su su dobri i jednostavno primjenjivi pokazatelji metaboličkog sindroma u ranom stadiju.

6. LITERATURA

1. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005 Apr 16; 365:1415- 28.
2. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2008;28:629-36.
3. Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care*. 2005;28:2745-9.
4. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33:351–75.
5. Eckel RH. The metabolic syndrome. In: Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson DL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (17th Ed). New York: McGraw-Hill; 2008. p 1509-14.
6. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May;285(19):2486-97.
7. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*. 2005 Sep 24-30;366:1059-62.
8. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization; 1999.
9. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. *Diabetic Medicine* 1999;16:442-3.
10. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant D, for the Conference Participants. Definition of metabolic syndrome: report of the National, Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109:433-8.
11. Kahn CR, Saltiel AR. The Molecular Mechanism of Insulin Action and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. In: Kahn RC, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ, editors. *Joslin's diabetes mellitus*. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004. p.146-67.
12. Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem J*. 2008 Jul 15;413:201-15.
13. Nelson TL, Vogler GP, Pedersen NL, Hong Y, Miles TP. Genetic and environmental influences on body fat distribution, fasting insulin levels and CVD: are the influences shared? *Twin Res*. 2000 Mar 3;3: 43–50.
14. Jaddoe VWV. Fetal nutritional origins of adult diseases: challenges for epidemiological research. *Eur J Epidemiol*. 2008; 23:767–71.
15. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Possible Links With Inflammation. *Hypertension*. 2005 Apr 11;45:828-33.
16. Drazanin B. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85 α . *Diabetes*. 2006 Aug; 55(8): 2392-7.
17. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev*. 2009 Jan 1;89:27-71.
18. Shoelson SE, Lee Y, Goldfine B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul 3;116(7): 1769–80.
19. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*. 1999 June; 48:1270-4.

20. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20; 274:24202-10.
21. Iozzo P. Viewpoints on the Way to the Consensus Session: Where does insulin resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care*. 2009 Nov; 32 Suppl 2: 168-73.
22. Mathur A, Marine M, Lu D, Swartz-Basile DA, Saxena R, Zyromski NY, Pitt HA. Nonalcoholic fatty pancreas disease. *HPB (Oxford)*. 2007; 9(4): 312-8.
23. Shimabukuro M. Cardiac Adiposity and Global Cardiometabolic Risk New Concept and Clinical Implication. *Circ J*. 2009; 73: 27 – 34.
24. Miljkovic I, Zmuda JM. Epidemiology of myosteatosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 May ; 13(3): 260-4.
25. Monteiro R, Azevedo I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. Mediators of Inflammation. [Internet]. 2010 [cited 2012 Aug 11]; ID 289645, 10 pages. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2010/289645/>
26. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* 2011 Feb; 11, 85-97.
27. Nathanielsz PW, Thornburg KL. Fetal programming: from gene to functional systems – an overview. *J Physiol*. 2003; 547(1): 3-4.
28. Viljanen AP, Lautamaki R, Jarvisalo M et al. Effects of weight loss on visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue blood-flow and insulin-mediated glucose uptake in healthy obese subjects. *Ann Med*. 2009;41:152-60.
29. Monzon JR, Basile R, Heneghan S, Udipi V, Green A. Lipolysis in adipocytes isolated from deep and superficial subcutaneous adipose tissue. *Obes Res*. 2002 Apr 10;10:266-9.
30. Eriksson JW, Smith U, Waagstein F, Wysocki M, Jansson PA. Glucose turnover and adipose tissue lipolysis are insulin-resistant in healthy relatives of type 2 diabetes patients: is cellular insulin resistance a secondary phenomenon? *Diabetes* 1999 Aug;48:1572-78.
31. Azuma K, Heilbronn LK, Albu JB, Smith SR, Ravussin E, Kelley DE; the Look AHEAD Adipose Research Group. Adipose tissue distribution in relation to insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jul;293:E435-42.
32. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Aug;27:875-88.
33. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* 2008 Aug;100:227-35.
34. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 July 31; 293:E1118-28.
35. N. Hosogai, A. Fukuhara, K. Oshima et al., "Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation," *Diabetes*. 2007 Apr; 56(4): 901-11.
36. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*. 1998 Dec 14;14:263-83.
37. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest*. 2003 Dec;112:1821-30.
38. Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol*. 2008 Oct; 3(5): 545-6.
39. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005 Sep 8;46:2347-55.
40. Canello R, Henegar C, Viguier N et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005 Jan 17;54: 2277-86.

41. Snijder MB, Visser M, Dekker JM, et al. Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study. *Diabetologia*. 2005 Feb;48:301–8.
42. Kim JE, Heshka S, Albu JB, Heymsfield S, Gallagher D. Femoral-gluteal subcutaneous and intermuscular adipose tissues have independent and opposing relationships with CVD risk. *J Appl Physiol*. 2008 Mar 1; 104(3): 700–7.
43. Ruige JB, Van Gaal LF. Low Fasting Triglycerides: Hallmark of the Healthy Large Hip? *Obesity*. 2009 Aug; 17:1621-26.
44. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U et al. Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Volumes Are Cross-Sectionally Related to Markers of Inflammation and Oxidative Stress. The Framingham Study. *Circulation*. 2007 Sep 11; 116:1234-41.
45. Liu J, Fox SC, DeMarc A et al. Impact of Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue on Cardiometabolic Risk Factors: The Jackson Heart Study *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010 Dec;95(12):5419-26.
46. Goel K, Misra A, Vikram NK, Poddar P, Gupta N. Subcutaneous abdominal adipose tissue is associated with the metabolic syndrome in Asian Indians independent of intra-abdominal and total body fat. *Heart* 2010 April;96:579-83.
47. Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest*. 1995 Jul; 96:88–98.
48. Jensen MD. Adipose tissue as an endocrine organ: implications of its distribution on free fatty acid metabolism. *Eur Heart J Suppl*. 2006 May;Suppl 8:B13-9.
49. Porter AS, Massaro JM, Hoffmann U et al. Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue: a Protective Fat Depot? *Diabetes Care*. 2009 Jun;32(6):1068-75.
50. Unger RH. Weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 2003 Dec;144: 5159–65.
51. Miljkovic I, Zmuda JM. Epidemiology of myosteatosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 May ; 13(3): 260–4.
52. Shen W, Punyanitya M, Chen J, Gallagher D. Waist circumference correlates with metabolic syndrome indicators better than percentage fat. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Apr;14(4):727-36.
53. Klein S, Allison DB, Heymsfield SB et al. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Am J Clin Nutr*. 2007 May;85(5):1197-202.
54. Dobbelsteyn CJ, Joffres MR, MacLean DR, Flowerdew G. A comparative evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as indicators of cardiovascular risk factors. The Canadian Heart Health Surveys. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001 May;25(5):652-61.
55. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR Jr, Silventoinen K. Comparison of Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist/Hip Ratio in Predicting Incident Diabetes: A Meta-Analysis *Epidemiol Rev* 2007;29:115–28.
56. Vlachos IS, Hatzioannou A, Perelas A, Perrea DN. Sonographic assessment of regional adiposity. *AJR Am J Roentgenol*. 2007 Dec;189(6):1545-53.
57. Leite CC, Wajchenberg BL, Radominski R, Matsuda D, Cerri GG, Halpern A. Intra-abdominal thickness by ultrasonography to predict risk factors for cardiovascular disease and its correlation with anthropometric measurements. *Metabolism*. 2002 Aug;51(8):1034-40.
58. Kim SK, Kim HJ, Hur KY et al. Visceral fat thickness measured by ultrasonography can estimate not only visceral obesity but also risks of cardiovascular and metabolic diseases. *Am J Clin Nutr* 2004 Apr;79:593–9.
59. Ketel IJ, Volman MN, Seidell JC, Stehouwer CD, Twisk JW, Lambalk CB. Superiority of skinfold measurements and waist over waist-to-hip ratio for determination of body fat distribution in a population-based cohort of Caucasian Dutch adults. *Eur J Endocrinol*. 2007 June; 156 (6): 655–61.

60. Andreoli A, Scalzo G, Masala S, Tarantino U, Guglielmi G. Body composition assessment by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Radiol Med.* 2009 Mar;114(2):286-300.
61. Dehghan M, Merchant AT. Is bioelectrical impedance accurate for use in large epidemiological studies? *Nutr J.* 2008 Sep 9;7:26.
62. Orphanidou C, McCargar L, Birmingham CL, Mathieson J, Goldner E. Accuracy of subcutaneous fat measurement: comparison of skinfold calipers, ultrasound, and computed tomography. *J Am Diet Assoc.* 1994 Aug;94(8):855-8.
63. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005 Jan 21;307:426–30.
64. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007 May;132(6):2169-80.
65. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006 Oct;6(10):772-83.
66. Stofkova A. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. *Endocr Regul.* 2010 Jan;44(1):25-36.
67. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001 Jan 18;409:307–12.
68. Zhan YT, An W. Roles of liver innate immune cells in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010 Oct 7;16(37):4652-60.
69. Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Cur Opin Lipidol.* 2009 Oct; 20:379–85.
70. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
71. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells following a high-fat high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care.* 2009 Dec 12;32:2281–7.
72. Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J et al. Differential Effects of Cream, Glucose, and Orange Juice on Inflammation, Endotoxin, and the Expression of Toll-Like Receptor-4 and Suppressor of Cytokine Signaling-3. *Diabetes Care.* 2010 May 5; 33:991–7.
73. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008 Jun;57:1470–81.
74. Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* 2002 Feb 19;105(7):804-9.
75. Dominguez H, Storgaard H, Rask-Madsen C et al. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J Vasc Res.* 2005 Nov-Dec;42(6):517-25.
76. Gonzalez-Gay MA, De Matias JM et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006 Jan-Feb;24(1):83-6.
77. Lorenzo M, Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci.* 2008 Apr;86:94-104.
78. Muller S, Martin S, Koenig W et al. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- or its receptors. *Diabetologia.* 2002 Jun;45:805–12.
79. Fisman EZ, Tenenbaum A. The ubiquitous interleukin-6: a time for reappraisal. *Cardiovascular Diabetology [Internet].* 2010 Oct 11. [cited 2012 Jan]. Available from: <http://www.cardiab.com/content/9/1/62>
80. Fischer PC. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 2006;12:6-13.

81. Buckley DI, Fu R, Freeman M, Rogers K, Hefland M. C-Reactive Protein as a Risk Factor for Coronary Heart Disease: A Systematic Review and Meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Ann Intern Med. 2009 Oct 6;151:483-95.
82. Mathieu, Lemieux I, Despres JP. Obesity, Inflammation, and Cardiovascular Risk. 2010 Apr;87(4):407-16.
83. Lara-Castro C, Fu Y, Chung HB, Garvey T. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. Current Opinion In Lipidology 2007, 18:263-70.
84. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol. 2011 Feb;11(2):85-97.
85. Hsieh CJ, Wang PW. Serum concentrations of adiponectin in patients with hyperthyroidism before and after control of thyroid function. Endocr J. 2008 Jul;55(3):489-94.
86. Komura N, Kihara S, Sonoda M. Increment and impairment of adiponectin in renal failure. Cardiovasc Res. 2010 Jun 1;86(3):471-7.
87. Montecucco F, Pende A, Mach F. The Renin-Angiotensin System Modulates Inflammatory Processes in Atherosclerosis: Evidence from Basic Research and Clinical Studies. Mediators of Inflammation [Internet] . 2009 [Cited 2012 Apr 6], Article ID 752406, 13 pages. Available from: <http://www.deepdyve.com/lp/hindawi-publishing-corporation/the-renin-angiotensin-system-modulates-inflammatory-processes-in-D6NOXUkwW>
88. Taniyama Y, Hitomi H, Shah A, Alexander RW, Griendling KK. Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 1142–47
89. Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. c-SRC induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003 Jun 1;23:981-7
90. Gerschman R., Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. Science. 1954;119: 623-6.
91. Newsholme P, Haber EP, Hirabara M et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. J Physiol. 2007 Jun 27;583.1:9-24.
92. Oberley TD. Oxidative damage and cancer. Amer J Pathol. 2002 Feb 2; 160:403-8.
93. Pham-Huy L, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Int J Biomed Sci. 2008 Jun;4(2):89-96
94. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Jan 19; 292: 2023-31.
95. Kehrer. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology. 2000 Aug 14;149(1):43-50.
96. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2007 Jan; 87:245–313.
97. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jan;25:29-38.
98. Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. J Clin Invest. 1993 Jun;91:2866-72.
99. Lien APH, Hua H, Chuong PH. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Int J Biomed Sci. 2008 Jun;15;4(2):89-96.
100. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. J Physiol. 2004 March 15;16;555(3):589–606.
101. George J, Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. Vasc Health Risk Manag. 2009 March; 5: 265–72.

102. Dayem AA, Choi HY, Kim JH, Cho SG. Role of Oxidative Stress in Stem, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Cancers*. 2010 May 17; 2, 859-84.
103. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39 (1): 44–84.
104. Thomas AJ. Oxidant Defense in Oxidative and Nitrosative Stress. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins, RJ, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p 685-94.
105. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004 Mar;134(3):489-92
106. Podrez EA. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Jul;37(7):719-25.
107. Davies KJA. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. 2000 Oct; *IUBMB Life*, 50: 279–89.
108. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003 Jul;17(10):1195-214.
109. Best BP. Nuclear DNA Damage as a Direct Cause of Aging. *Rejuvenation Res*. 2009 Jun;12(3):199-208.
110. Erol A. Systemic DNA damage response and metabolic syndrome as a premalignant state. *Curr Mol Med*. 2010 Apr 3;10:321-34.
111. Rattan SI. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic. Res*. 2006 Dec;40 (12): 1230–8.
112. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-Hydroxy-2deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J. Environ Sci Health Part C*. 2009; 27:120–39.
113. Jones PJH, Kubow A. Lipids, Sterols and Their Metabolites. In: Shils, ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins, RJ. editors. *Modern Nutrition in Health and Disease* 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. p. 93-122.
114. Mattson PM. Roles of the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in Obesity, the Metabolic Syndrome, and Associated Vascular and Neurodegenerative Disorders. *Exp Gerontol*. 2009 Oct; 44(10): 625–33.
115. Duraković Z, Žarković N. Biologija starenja i gerijatrija. In: Vrhovac B, Jakšić B. Reiner Ž, Vucelić B, editors. *Interna medicina*. 3th ed. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. p 69-77.
116. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*. 2002 Dec 27;181-182:219-22.
117. Patrignani P, Tacconelli S. Isoprostanes and other markers of peroxidation in atherosclerosis. *Biomarkers*. 2005 Nov;10 Suppl 1:S24-9.
118. Shimoke K, Kudo M, Ikeuchi T. MPTP-induced reactive oxygen species promote cell death through a gradual activation of caspase-3 without expression of GRP78/Bip as a preventive measure against ER stress in PC12 cells. *Life Sci*. 2003; 73:581-93.
119. Halliwell B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? *Free Radic Biol Med*. 1989, 7:645-51.
120. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003 Mar;329(1-2):23-38.
121. Ljungman, M, Hanawalt PC. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Mol. Carcinog*. 1992;5:264–9.
122. Rai P. Oxidation in the nucleotide pool, the DNA damage response and cellular senescence: Defective bricks build a defective house. *Mutat Res*. 2010 Nov 28;703(1):71-81.
123. Oyagbemi A, Azeez OI, Saba Ab. Interactions between Reactive Oxygen Species and Cancer: the Roles of Natural Dietary Antioxidants and their Molecular Mechanisms of Action. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 10, 535-44.

124. Fraga, CG, Tapple AL. Damage to DNA concurrently with lipid peroxidation in rat liver slices. *Biochem J.* 1988;252: 893-6.
125. Mc Conkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J.* 1989 May;3(7):1843-9.
126. Haliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem. J.* 2007;401:1–11.
127. Yang X, Wang XB, Vrpapel ER, Wang SL. Direct experimental observation of the low ionization potentials of guanine in free oligonucleotides by using photoelectron spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Dec 21; 101(51): 17588-92.
128. De Bont, R, Van Larebeke, N. Endogeneous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004;19(3):169-85.
129. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and Aging. *Physiol Rev.* 2008 Apr; 88: 557–79.
130. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002 Jul 27;27:339–44.
131. Sun S, Hail N, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst.* 2004 May 5, 96, 662-72.
132. Bodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.* 2007 December; 35(22): 7475–84.
133. Colavitti R, Finkel T. Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB Life.* 2005 Apr-May;57:277–81.
134. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 2005 Sep;120:513–22.
135. Ren JL, Pan JS, Lu YP, Sun P, Han J. Inflammatory Signaling and Cellular Senescence. 2001 Mar;21(3):378-83.
136. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB.* 2002 Jul;16(9):935-42.
137. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Oct 15;174(8):886-93.
138. Paolisso G, Tagliamonte MR, Rizzo MR, Giugliano D. Advancing age and insulin resistance: new facts about an ancient history. *Eur J Clin Invest.* 1999 Sep;29(9):758-69.
139. Piperakis SM, Kontogianni K, Karanastasi G, Iakovidou-Kritsi Z, Piperakis MM. The use of comet assay in measuring DNA damage and repair efficiency in child, adult, and old age populations. *Cell Biol Toxicol* 2009. 25:65–71.
140. Baklajić Ž, Dečković-Vukres V, Kuzman M. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2011 Nov.
141. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life sciences.* 2009 May 22; 84(21-22):705–12.
142. Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr.* 2006 Dec 1; 136(12):3022-6.
143. Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, Celik H, Guzel S, Selek S, Kocyqit A. DNA damage in metabolic syndrome and its association with antioxidative and oxidative measurements. *Int J Clin Prac.* 2006 Oct; 60(10):1187-93.
144. Demircan N, Gurel A, Armutcu F, Unalacak M, Aktunc E, Atmaca H. The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit.* 2008 Feb;14(2):CR97-101
145. Meigs JB, Larson MG, Fox CS, Keane JF Jr, Vasan RS, Benjamin EJ. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care.* 2007 Oct;30:2529–35.

146. Cardona F, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2008 Jul;38(7):510-5.
147. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*. 2003 May-Jun;57(3-4):145-55.
148. Jones DP, Mody VC Jr, Carlson JL, Lynn MJ, Sternberg P Jr. Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med*. 2002 Nov 1;33(9):1290-300.
149. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol*. 2010 Aug;21(4):312-8.
150. Demirbag R, Yilmaz R, Kocyigi A et al. Lymphocyte DNA damage in patients with acute coronary syndrome and its relationship with severity of acute coronary syndrome. *Mutat Res*. 2005 Oct 15;578(1-2):298-307.
151. Satoh H, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2008;198(2):347-53.
152. Blasiak J, Arabski M, Krupa R et al. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation research – Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2004 Oct 4;554(1-2):297-304.
153. Al Aubaidy H, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus, *European Journal of Endocrinology*. *Eur J Endocrinol*. 2011 Jun;164(6):899-904.
154. Song F, Jia W, Yao Y, Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2007 Jun;112(12):599-606.
155. Seet RC, Lee CY, Lim EC et al. Markers of oxidative damage are not elevated in otherwise healthy individuals with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2010 May;33(5):1140-2.
156. Sjogren, Basu S, Rosell M et al. Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec;25(12):2580-6.
157. Tomasello B, Malfa G, Galvano F, Renis M. DNA damage in normal-weight obese syndrome measured by Comet assay *Mediterr J Nutr Metab*. 2011 Aug;4(2) 99-104.
158. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2010 May;459(6):923-39.
159. Koh K, Ahn J, Han S et al. Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Sep;42:905–10.
160. Ferdinandy P, Dhanlaxmi H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ Res*. 2000 Aug 4;87:241–7.
161. Channon KM. Oxidative stress and coronary plaque stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Nov 1;22(11):1751-2.
162. Brownlee M: The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25
163. Jay D, Hitomi H, Griending KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 15;40(2):183-92.
164. Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia. *Vasc Med*. 2005 Jul;10 Suppl 1:S27-33.
165. Melo A, Monteiro L, Lima RMF, de Oliveira DM, de Cerqueira MD, El-Bachá Rs. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet], 2011, ID 467180, 14 pages, 2011[cited 2012 May 20];Available from <http://www.hindawi.com/journals/oximed/2011/467180/cta/>
166. Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol*. 2004 Jun 15;159(12):1160-7.

167. Braun S, Bitton-Worms K, LeRoith D. The link between the metabolic syndrome and cancer. *Int J Biol Sci.* 2011 Aug 16;7(7):1003-15.
168. Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr.* 2007;86: 556-65.
169. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005 Nov; 16;97:1679–87.
170. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol.* 2011 Nov;106(11):1911-21.
171. Wei EK, Ma J, Pollak MN et al. A prospective study of C-peptide, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-1, and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Apr;14(4):850-5.
172. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2009 Jan;3(1):73-80.
173. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2009 Jan;3(1):73-80.
174. Gallagher EJ, LeRoith D. The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2010 Oct;21: 610-8.
175. Seo HI, Cho YK, Lee WY, Rhee EJ, Which metabolic syndrome criteria best predict the presence of non-alcoholic fatty liver disease *Diabetes Res Clin Pract.* 2012 Jan;95(1):19-24.
176. Fu JF, Shi HB, Liu LR. Non-alcoholic fatty liver disease: An early mediator predicting metabolic syndrome in obese children? *World J Gastroenterol* 2011 February 14; 17(6): 735-42.
177. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40:1:S17-29.
178. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006;4:S99–112.
179. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic Steatohepatitis an the Metabolic Syndrome. *Am J Med Sci.* 2005 Dec;330(6):326-35.
180. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ: Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115:1343-51.
181. Grattagliano I, Caraceni P, Portincasa P, et al. Adaptation of subcellular glutathione detoxification system to stress conditions in choline-deficient diet induced rat fatty liver. *Cell Biol Toxicol.* 2003 Nov;19:355–66.
182. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology.* 2008 Feb;47(2):729-36.
183. Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the role of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells and T helper 1 immune responses. *Immunol Rev.* 2000;174:35–46.
184. Oberhaensli RD, Galloway GJ, Taylor DJ, Bore PJ, Radda GK. Assessment of human liver metabolism by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Br J Radiol* 1986;59:695–99.
185. Kelley GL, Allan G, Azhar S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinol* 2004 Feb;145(2):548–55
186. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome 1,2,3. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2002 Nov; 76(5): 911-2.
187. Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review: The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Aug;94(8):2692-701.

188. Farrell GC, Teoh NC, and McCuskey. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anat Rec*. 2008 Jun; 291:684–92.
189. Perseghin G: Viewpoints on the way to a consensus session: where does insulin resistance start? The liver. *Diabetes Care*. 2009Nov 2; 32(Suppl 2):S164–7.
190. Albu JB, Heilbronn LK, Kelley DE et al. Metabolic changes following a 1-year diet and exercise intervention in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2010 Mar, 59:627–33.
191. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Sep 8;106:15430–5.
192. Speliotes EK, Massaro JM, Hoffmann U et al. Fatty Liver is Associated With Dyslipidemia and Dysglycemia Independent of Visceral Fat: The Framingham Heart Study. *Hepatology*. 2010 Jun;51(6):1979-87.
193. D'Adamo E, Cali AM, Weiss R, Santoro N, Pierpont B, Northrup V, Caprio S. Central role of fatty liver in the pathogenesis of insulin resistance in obese adolescents. *Diabetes Care*. 2010 Aug;33(8):1817-22.
194. Nguyen-Duy TB, Nichaman MZ, Church TS, et al. Visceral fat and liver fat are independent predictors of metabolic risk factors in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E1065-71.
195. Kuk JL, Nichaman MZ, Church TS, et al. Liver fat is not a marker of metabolic risk in lean premenopausal women. *Metabolism* 2004; 53: 1066-71.
196. Kim LJ, Nalls MA, Eiriksdottir G. et al. Associations of visceral and liver fat with the metabolic syndrome across the spectrum of obesity: the AGES-Reykjavik study. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1265-71.
197. Kewalramani G, Bilan PJ, Klip A. Muscle insulin resistance: assault by lipids, cytokines and local macrophages. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Jul;13:382–90.
198. Mealey B, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2007 Jun; 44: 127–53.
199. Abdul-Ghani MA, De Fronzo RA. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. [Internet]. 2010 [cited 2012 Feb 22]; ID 476279, 19 pages. Available from: <http://downloads.hindawi.com/journals/chol/2011/851750.pdf>
200. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in Health and Disease*. [Internet]. 2012 [cited 2012 Feb 26];available from: <http://www.lipidworld.com/content/pdf/1476-511X-11-30.pdf>
201. Russell AP, Gastaldi, Bobbioni-Harsch et al. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? *FEBS Lett*. 2003 Sep 11;551, 104–6.
202. Muoio DM. Intramuscular triacylglycerol and insulin resistance: guilty as charged or wrongly accused? *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar; 1801:281–88.
203. Petersen KF, Dufour Savage DB, Bilz S et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(31):12587-94
204. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72:219–46.
205. Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS et al. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 19 Dec; 294:673–8.
206. Samocha-Bonet D, Heilbronn LK, Lichtenberg D, Campbell LV. Does skeletal muscle oxidative stress initiate insulin resistance in genetically predisposed individuals? *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Feb;21(2):83-8.
207. Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2010 [cited 2011 Aug 11];ID 520258:6 pages. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jbb/2010/520258/cta/>

208. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011 Jan; 15:214:337-46.
209. Fisman EZ, Tenenbaum A. The ubiquitous interleukin-6: a time for reappraisal. *Cardiovascular Diabetology* [Internet]. 2010 Oct 11. [cited 2012 Jan]. Available from: <http://www.cardiab.com/content/9/1/62>
210. Fischer PC. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Excer Immunol Rev* 2006;12:6-13.
211. Hittel DS, Berggren JR, Shearer J, Boyle K, Houmard JA. Increased secretion and expression of myostatin in skeletal muscle from extremely obese women. *Diabetes.* 2009 Jan;58(1):30–8.
212. LeBrasseur NK, Walsh K, Arany Z. Metabolic benefits of resistance training and fast glycolytic skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011 Jan 18:300:3–10.
213. Nielsen AR, Hojman P, Erikstrup C, Fischer CP. Association between IL-15 and obesity: IL-15 as a potential regulator of fat mass. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Nov 1; 93: 4486-93.
214. Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol.* 2005; 99:338-43.
215. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and Disease. *Physiol Rev.* 2009 Jul;89(3):1025–78.
216. Rabøl R, Petersen KG, Dufour S, Flannery C, and Shulman GI. Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals. *PNAS.* Aug 16;2011:108 (33) 13705–9.
217. Russell AP, Gastaldi, Bobbioni-Harsch et al. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? *FEBS Lett.* 2003 Sep 11;551, 104–6.
218. Atlantis E, Martin SA, Haren MT, Taylor AW, Wittert GA. Inverse associations between muscle mass, strength, and the metabolic syndrome. *Metabolism.* 2009 Jul ;58(7):1013-22.
219. Srikanthan P, Karlamangla AS. Relative Muscle Mass Is Inversely Associated with Insulin Resistance and Prediabetes. Findings from The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab.* Sepr 2011, 96(9):2898–903.
220. Visser M, Pahor M, Taaffe, DR et al. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study *J Gerontol A. Biol Sci Med Sc.* 2002 May; 57(5):326–32.
221. Beavers KM, Beavers DP, Serra MC, Bowden RG, Wilson RL. Low relative skeletal muscle mass indicative of sarcopenia is associated with elevations in serum uric acid levels: findings from NHANES III. *J Nutr Health Aging.* 2009 Mar;13(3):177-82.
222. De Oliveira EP, Manda RM, Torezan GA, Corrente JE, Burini RC. Dietary, anthropometric and biochemical determinants of plasma high-density lipoprotein-cholesterol in free-living adults. *Cholesterol* [Internet]. 2011 [cited 2011 Aug 11]; ID 851750, 7 pages Available from: <http://downloads.hindawi.com/journals/chol/2011/851750.pdf>
223. Stenholm S, Harris TB, Rantanen et al. Sarcopenic obesity - definition, etiology and consequences. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008 Nov ; 11(6): 693–700.
224. Meng SJ, Yu LY. Oxidative Stress, Molecular Inflammation and Sarcopenia *Int J Mol Sci.* 2010 Apr 12;11:1509-26.
225. Weiss R, Dufour S, Taksali SE, et al. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet.* 2003 Sep 20; 362(9388):951–957.
226. Drury JA, Nycyk JA, Cooke RWI. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin Chim Acta* 1997 Jul 25;263:177–85.
227. Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* 1958 Apr;74:443–50.
228. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988 Mar;175:184–91.

229. Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 2006 May ;21:185–90.
230. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, Tiribelli C: The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2006 Nov 2 [cited 2011 Aug 11]; 6(33):7p. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/6/33153>
231. R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2011. ISBN 3-900051-07-0, URL Available from: <http://www.R-project.org/>
232. Simon AS, Dinesh RD, Jayapal V, Vijayakumar T. Biochemical and genetic studies on cardiometabolic syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2010 Oct 1; 25 (2): 164-8.
233. Anderson, D, Yu TW, Wright J, Ioannides C. An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. *Mutat. Res.* 1998 Feb 28;398, 151–6.
234. Humphreys V, Martin RM, Ratcliffe B. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection: a comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample. *Age Ageing*. 2007 Sep;36(5):521-6.
235. Frisard MI, Rood JC, Fano X et al. Metabolic syndrome and risk factors for cardiovascular disease: are nonagenarians protected? *Age (Dordr)*. 2009 March; 31(1): 67–75.
236. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology*. 2009 May;150(5):2109-17.
237. Miller CN, Brown LM, Raylam S, Della-Fera MA, Baile CA. Estrogens, inflammation and obesity: an overview. *Front Biol*. 2012;7(1)40-7.
238. Slyskova J, Naccarati A, Polakova V et al. DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals *Environ Mol Mutagen*. 2011 Aug;52(7):511-7.
239. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*. 2003 Jul 25;93(2):170-7.
240. Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. 2010. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. [Internet]. 2010 Apr 13 [cited Jul 20];5(4):11p. Available from:<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010164>
241. Gong H, Jarzynka MJ, Cole TJ, et al. Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase. *Cancer Res*. 2008, Sep 15 68: 7386-93.
242. Paulsen SK, Pedersen SB, Fisker S, Richelsen B. Beta-HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Aug;15(8):1954-60.
243. Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res*. 2008 Feb 1;638(1-2):98-102.
244. Zhu H, Zhang L, Amin AR, Li Y. Coordinated upregulation of a series of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes as a novel strategy for protecting renal tubular cells from oxidative and electrophilic stress. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 Jun;233(6):753-65.
245. Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Hypomagnesemia, oxidative stress, inflammation, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Nov-Dec;22(6):471-6.
246. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79.
247. Tsouli SG, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Athyros VG, Elisaf MS. Elevated serum uric acid levels in metabolic syndrome: an active component or an innocent bystander? *Metabolism*. 2006 Oct;55(10):1293-301.

248. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 Sep 1; 22:1402–8.
249. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol*. 2005 Aug 1;70(3):343-54.
250. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 June ; 27(6): 608–19.
251. Hayden MR, Tyagi SC. Uric acid: A new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle. *Nutr Metab (Lond)*. [Internet].2004 Oct 19 [Cited 2012 Jun 24];1(1):15p.Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC529248/>
252. Zhang H, Forman HJ. Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Nov;41(5):509-15.
253. Meister A. Metabolism and transport of glutathione and other β -glutamyl compounds. In: Larsson A, Orrenius S, Holmgren A, Mannervik B, editors. *Functions of glutathione: Biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects*. New York: Raven press; 1983. p. 1-22.
254. Jean JC, Liu Y, Brown LA, Marc RE, Klings E, Joyce-Brady M. Gamma-glutamyl transferase deficiency results in lung oxidant stress in normoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 Oct;283:766–76.
255. Drozd R, Parmentier C, Hachad H, Leroy P, Siest G, Wellman M. Gamma-Glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. *Free Radic Biol Med*. 1998 Nov 1;25(7):786-92.
256. Emdin M, Pompella A, Paolicchi A. Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. *Circulation* 2005 Oct 4;112:2078–80.
257. Lee DH, Jacobs DR Jr, Gross M, et al. Gamma-glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Clin Chem*. 2003 Aug;49(8):1358-66.
258. Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Nov-Dec;22(6):437-43.
259. Westerbacka J, Cornér A, Tiikkainen M et al. Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia*. 2004 Aug;47(8):1360-9.
260. Windgassen EB, Funtowic Lunsford TN. C-Reactive Protein and High-Sensitivity C-Reactive Protein: An Update for Clinicians. *Postgraduate medicine* [Internet]. 2011 Jan. [cited 2012 Aug 1]; 123(1). Available from: https://www.postgradmed.org/doi/10.3810/pgm.2011.01.2252#ref_4
261. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):499-511.
262. Clearfield MB. C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease. *J Am Osteopath Assoc*. 2005 Sep;105(9):409-16.
263. Stefanska A, Sypniewska G, Blaszkiewicz B, Ponikowska I, Cwiklinska-Jurkowska M. Comparison between C-reactive protein and adipocyte fatty acid-binding protein as a component of metabolic syndrome in middle-aged women. *Clin Biochem* 2011 Mar;44:304–6.
264. Ma J, Xu A, Jia C, Liu L et al. Associations of fibrinogen with metabolic syndrome in rural Chinese population. *J Atheroscler Thromb*. 2010 May;17(5):486-92.
265. Rosenson RS, Mosca L, Staffileno BA, Tangney CC. Variability in fibrinogen measurements: an obstacle to cardiovascular risk stratification. *Atherosclerosis*. 2001 Nov;159(1):225-30.

266. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. White blood cell count and clustered features of metabolic syndrome in Japanese male office workers. *Occup Med (Lond)*. 2002 Jun;52(4):213-8.
267. Kim DJ, Noh JH, Lee BW et al. The associations of total and differential white blood cell counts with obesity, hypertension, dyslipidemia and glucose intolerance in a Korean population. *Korean Med Sci*. 2008 Apr;23(2):193-8.
268. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation*. 1991 Mar;83(3):836-44.
269. Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ, Chambless LE, Shahar E, Wolfe DA. White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and white men and women: Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol*. 2001 Oct 15;154(8):758-64.
270. Jee SH, Park JY, Kim HS, Lee TY, Samet JM. White Blood Cell Count and Risk for All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality in a Cohort of Koreans. *Am J Epidemiol*. 2005 Dec 1;162(11):1062-9.
271. Erlinger TP, Muntner P, Helzlsouer KJ. WBC Count and the Risk of Cancer Mortality in a National Sample of U.S. Adults: Results from the Second National Health and Nutrition Examination Survey Mortality Study *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Jun;13(6):1052-6.
272. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA*. 1987 May 1;257(17):2318-24.
273. Iacobellis G, Ribaudo MC, Assael F et al. Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Nov;88:5163–8.
274. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007 Jul 3;116(1):39-48.
275. Lerchbaum E, Gruber HJ, Schwetz V et al. Fatty liver index in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2011 Dec;165(6):935-43.
276. Balkau B, Lange C, Vol S, Fumeron F, Bonnet F (2010) Nine-year incident diabetes is predicted by fatty liver indices: the French D.E.S.I.R. study. *BMC Gastroenterol* 10: 56. [Internet]. 2010 Jul [cited 2012 Jul]: 9 pages. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-230X-10-56.pdf>
277. Iwasaki Y, Takayasu S, Nishiyama M et al. 2008 Is the metabolic syndrome an intracellular Cushing state? Effects of multiple humoral factors on the transcriptional activity of the hepatic glucocorticoid-activating enzyme (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1) gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Mar 26;285(1-2):10-8.
278. Taverna MJ, Martínez-Larrad MT, Frechtel GD, Serrano-Ríos M. Lipid accumulation product: a powerful marker of metabolic syndrome in healthy population. *Eur J Endocrinol*. 2011 Apr;164(4):559-67.
279. Cordero A, Laclaustra M, León M et al. Comparison of serum lipid values in subjects with and without the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 2008 Aug 15;102(4):424-8.
280. Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med*. 2008 Oct;75(10):721-8.
281. Bozkurt L, Go bl GS, Tura A et al. Fatty Liver Index Predicts Further Metabolic Deteriorations in Women with Previous Gestational. *PLoS One* [Internet]. 2012 Feb 29 [cited Jul 2011];7(2):e32710: 8pages. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3290578/pdf/pone.0032710.pdf>
282. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR Jr, Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiol Rev*. 2007;29:115-28.

283. Kozakova M, Palombo C, Eng MP et al. Fatty liver index, gamma-glutamyltransferase, and early carotid plaques. *Hepatology*. 2012 May;55(5):1406-15.
284. Gastaldelli A, Kozakova M, Højlund K, Flyvbjerg A, Favuzzi A, Mitrakou A, Balkau B, RISC Investigators: Fatty liver is associated with insulin resistance, risk of coronary heart disease, and early atherosclerosis in a large European population. *Hepatology* 2009, 49:1537–1544.
285. Calori G, Lattuada G, Ragona F et al. Fatty liver index (FLI) and mortality: The cremona study at the 15th year of follow up. *Hepatology* 2011;54(1):145-52.
286. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):113-21.
287. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010 Sep 30;363(14):1341-50.
288. Jurca R, Lamonte MJ, Barlow CE, Kampert JB, Church TS, Blair SN. Association of muscular strength with incidence of metabolic syndrome in men. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Nov;37(11):1849-55.
289. Helmersson J, Vessby B, Larsson A, Basu S. Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation* 2004 Apr 13;109:1729–34.
290. Gopaul NK, Manraj MD, Hebe A et al. Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia* 2001 Jun;44:706–12.
291. Kelishadi R, Sharifi M, Khosravi A, Adeli K. Relationship between C-reactive protein and atherosclerotic risk factors and oxidative stress markers among young persons 10-18 years old. *Clin Chem*. 2007 Mar;53(3):456-64.
292. Di Renzo L, Galvano F, Orlandi C et al. Oxidative stress in normal-weight obese syndrome. *Obesity (Silver Spring)*;2010 Nov 18;25:1–6.
293. Wei EK, Ma J, Pollak MN, et al. A prospective study of C-peptide, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-1, and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Apr;14 (4):850-5.
294. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008 May;23(3):143-51.
295. Marchi S, Giorgi C, Suski JM et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct*. [Internet]. 2012 [cited Jul 2012];Article ID329635:17p. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jst/2012/329635/>

8. SAŽETAK

Oksidativni stres sudjeluje u nastanku metaboličkog sindroma i razvoju njegovih komplikacija. Cilj našeg istraživanja bio je ustanoviti postoji li značajnije oksidativno oštećenje DNA i lipida u ispitanika srednje životne dobi s metaboličkim sindromom. Također smo željeli naći najbolji rani pokazatelj metaboličkog sindroma.

Usporedili smo pokazatelje općeg i oksidativnog oštećenja DNA, malondialdehid kao pokazatelj peroksidacije lipida, reducirani glutation kao pokazatelj antioksidativnog statusa, antropometrijske, biokemijske i hematološke pokazatelje između skupine ispitanika s metaboličkim sindromom (69 ispitanika) i kontrolne skupine (59 ispitanika). Metodama rekurzivnog particioniranja, uporabom klasifikacijskih algoritama REPTree i Simple CART željeli smo izdvojiti najbolji pokazatelj metaboličkog sindroma.

Dvije skupine značajno su se razlikovale u svim antropometrijskim, općim biokemijskim i hematološkim pokazateljima, osim u broju neutrofilnih granulocita i razini fibrinogena.

Pokazatelji oštećenja DNA, razine malondialdehida i glutationa nisu se značajno razlikovali između dviju skupina. Dva različita postupka rekurzivnog particioniranja izdvojila su indeks masne jetre kao najbolji pokazatelj koji razdvaja ispitanike s metaboličkim sindromom od ispitanika kontrolne skupine (Weka REPTree 67,82, SimpleCART 70,56). ROC analiza ustanovila je visoku pouzdanost indeksa masne jetre kao pokazatelja koji definira metabolički sindrom.

U ispitanika srednje životne dobi s metaboličkim sindromom nismo našli znakove oštećenja jezgrene DNA i lipida. Istraživanje je ukazalo na indeks masne jetre kao najbolji pokazatelj metaboličkog sindroma.

9. SUMMARY

COMPARISON OF THE METABOLIC SYNDROME DETERMINANTS: THE ROLE OF THE OXIDATIVE DNA DAMAGE

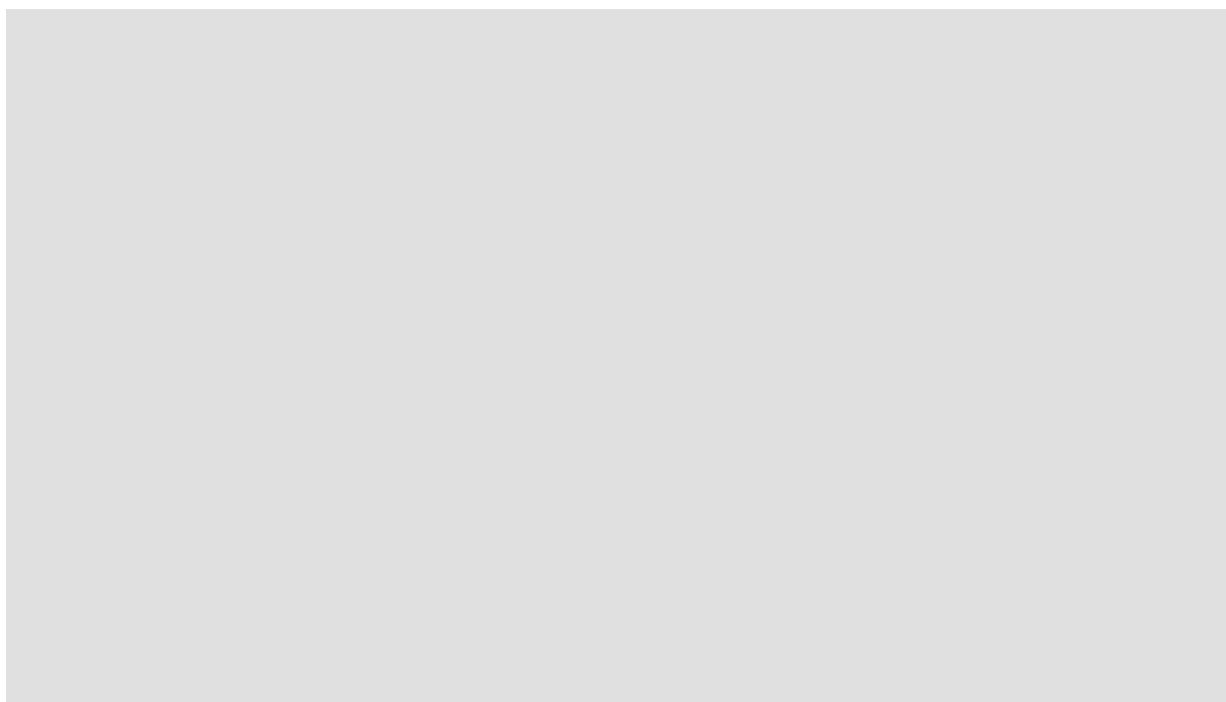
Oxidative stress is involved in the genesis of the metabolic syndrome and its complications. The aim of our study was to examine significant oxidative damage of DNA and lipids in middle-aged subjects with metabolic syndrome. Also, we intended to find the best early indicator of metabolic syndrome.

We compared markers of primary and specific oxidative damage of DNA, malondialdehyde as marker of lipid peroxidation, and reduced glutathione as marker of antioxidative status, anthropometric, biochemical and hematological parameters between subjects with metabolic syndrome (n=69) and healthy controls (n=59). We used methods of recursive partitioning, Weka REPTree and SimpleCART algorithms to identify the most reliable predictor of metabolic syndrome.

Our study has shown a significant difference between healthy individuals and MetS patients in anthropometric, biochemical, and hematological parameters (save for fibrinogen and neutrophils). Oxidative damage parameters of DNA, levels of malondialdehyde and glutathione did not differ between the groups. Two different methods of recursive partitioning signed out fatty liver indeks as the best parameter for discriminating between healthy and metabolic syndrome subjects (Weka REPTree 67,82, SimpleCART 70,56). This finding was confirmed by the receiver-operating curve (ROC) analysis as the best discriminating value for metabolic syndrome.

The signs of oxidative damage of DNA and lipids were absent in middle-aged subjects with metabolic syndrome. Our study has indicated the fatty liver index as the best indicator of the metabolic syndrome.

10. ŽIVOTOPIS



Naobrazba:

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu	1985-1991.
Specijalizacija iz int. medicine	1993-1998.
Magisterij znanosti	1997.

Radno iskustvo:

Period:	Mjesto i opis rada:
1993-1998.	KBC Rebro, specijalizant int. medicine
1998-2001.	Sveučilišna Klinika „Vuk Vrhovac“, dijabetološka ambulanta
2001-2003	Specijalna bolnica Novi Marof, centar za dijalizu
2003-2007.	Opća bolnica Brežice, interni odjel, odjelni liječnik
2007-2010.	Poliklinika „Sunce“, Zagreb, internistička ambulanta
2011-	Opća bolnica Brežice, interni odjel, odjelni liječnik

Stručna usavršavanja:

1995.	Krankenhaus der Elisabethinen, Linz, odjel hematologije – 3 mjeseca
1999.	poslijediplomski tečaj „Suvremena dijabetologija“ Sveuč. klinika „Vuk Vrhovac“, Zagreb
2001.	edukacija iz dijalize u trajanju 6 mjeseci, KBC Rebro, Zagreb
2003.	Klinički centar Ljubljana – klinički odjel za intenzivnu internu medicinu - 2 mjeseca
2005.	poslijediplomski tečaj iz ultrazvuka abdominalnih organa

MATERINSKI JEZIK

- Hrvatski jezik

OSTALI JEZICI

- Engleski, njemački, slovenski.

OSTALE AKTIVNOSTI

- planinarenje, tjelovježba, plivanje, pisanje kratkih literarnih tekstova.