

# Analiza leptina, adiponektina i polimorfizama gena za adiponektin i leptinski receptor u pretilo djece i adolescenata

---

Janković, Sunčana

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:171:335384>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sunčana Janković**

**ANALIZA LEPTINA, ADIPONEKTINA I POLIMORFIZAMA GENA ZA  
ADIPONEKTIN I LEPTINSKI RECEPTOR U PRETILE DJECE I ADOLESCENATA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina: 2013./2014.**

**Mentor: prof. dr. sc. Irena Drmić Hofman**

**Split, studeni 2014. g.**

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	4
2. Cilj istraživanja.....	12
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Ispitanici.....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Antropometrija.....	13
3.2.2. Laboratorijski testovi.....	14
3.2.3. Genetički testovi.....	14
3.2.4. Statistička obrada rezultata.....	15
4. Rezultati .....	16
5. Rasprava.....	19
6. Zaključci.....	22
7. Popis citirane literature.....	23
8. Sažetak.....	26
9. Summary.....	27
10. Životopis.....	29

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Drmić Hofman na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Srdačno zahvaljujem Danijeli Šupe-Domić, mag. med. biochem. na susretljivosti i ustupljenim uzorcima za analizu. Također, hvala i dr. Jošku Božiću na statističkoj analizi prikupljenih podataka.

Hvala svim kolegama bez kojih ove protekle godine studija ne bi bile tako zabavne, a najveće hvala mojoj obitelji i najbližim prijateljima na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci koju su mi pružali tijekom studiranja.

## 1. UVOD

U današnjem svijetu pretilost je sve veći problem, kako među odraslom populacijom, tako i među djecom i adolescentima. Europska udruga za proučavanje pretilosti (EASO) nedavno je pokazala da je prevalencija pretilih u pedijatrijskoj populaciji Europe (dob 7-17 godina) bila od 16-22%, dok je 4-6% djece i adolescenata već bilo pretilo. Udio prekomjerno teške i pretile djece i adolescenata skoro se udvostručio samo u 2010. godini u odnosu na cijelo razdoblje 1990.-2003. Procjenjuje se da u Europskoj Uniji godišnje gotovo 1,3 milijuna djece postaje pretilo dok se u pedijatrijskoj populaciji bilježi 300 000 novih slučajeva na godinu. (1)

Pretilost u dječjoj i adolescentskoj dobi privlači pozornost kao „bolest sama po sebi“, ali i zbog svojih sekundarnih posljedica. Međunarodna klasifikacija bolesti (MKB-10) obilježava pretilost kao zasebni entitet (E66). Pretilost se definira kao kronična multifaktorijska bolest karakterizirana poremećajem sekretorne aktivnosti masnog tkiva. Za procjenu stanja uhranjenosti, odnosno pretilosti, primjenjuje se percentilna vrijednost indeksa tjelesne mase (ITM) za dob i spol, standardna devijacija i z-vrijednost, a u starijim istraživanjima tjelesna masa za dob, tjelesna masa za visinu/duljinu i relativna tjelesna masa. Nasljeđe, obiteljsko okruženje, socijalno-ekonomske i kulturološke prilike te svakodnevne navike utječu na pojavu pretilosti, pri čemu svakako treba istaknuti njihovu međusobnu interakciju.

Manjak tjelesne aktivnosti i povećani kalorijski unos uzroci su rastuće pretilosti u djece i adolescenata. U razdoblju ranog djetinjstva adipociti se brojčano formiraju zbog čega pretela djeca najčešće postaju pretili odrasli. Povezanost pretilosti u djetinjstvu s povećanjem prevalencije metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2, kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, moždanog udara u adolescenciji i odrasloj dobi nesumnjiva je, stoga se debljina mora smatrati kroničnom bolesti koja zahtijeva dugotrajni multidisciplinarni pristup.

U većine ljudi, tjelesna težina održavana je u stabilnom stanju. Ljudi mogu imati istu tjelesnu težinu dugi niz godina, ali uz uvjet postojanja energetske ravnoteže. (2)

Energetska bilanca kod ljudi regulirana je prvim zakonom termodinamike i često se izražava kroz jednostavnu jednadžbu:

$$\text{unos energije} = \text{potrošena energija} + \text{pohranjena energija.}$$

Pohrana lipida u masnom tkivu predstavlja zapravo višak unosa energije u odnosu na energetske potrošnje. Iako u osnovi točno, ovo jednostavno shvaćanje kruženja energije u organizmu previđa nekoliko ključnih obilježja energetske homeostaze *in vivo*. Prvo, iako je unos hrane relativno lako mjeriti, to nije precizan parametar koji određuje količinu energije dovedenu u sustav. Učinkovitost apsorpcije kalorija u crijevima, što je puno teže mjeriti, a obično je ignorirano u praksi, mora se uzeti u obzir. Kao drugo, odgovor tijela na promjene energetske unosa ili potrošnje nije statičan. U principu, energetska homeostaza regulirana je tako da štiti najveću postignutu težinu. Tako se dobrovoljnom smanjenju unosa hrane suprotstavlja prisilno smanjenje potrošnje energije, što mršavljenje čini težim od jednostavne interpretacije jednadžbe. Sve u svemu, energetska bilanca osjetljiva je na brojne utjecaje, uključujući hormone i neuronske veze, kao i psihološke i kulturološke čimbenike. (3)

Masno tkivo ignorirano je od anatoma i liječnika već stoljećima budući je smatrano da je samo depo za pohranu energije s nekoliko zanimljivih osobina. Dobro dokumentirani porast pretilosti u posljednjih 30 godina pridonio je nastanku negativne slike masnoga tkiva, posebice u modernoj kulturi. U protekla dva desetljeća, međutim, došlo je do vala intenzivnog znanstvenog interesa za ovu vrstu stanica, potaknutog dijelom zabrinutošću zbog pretilosti i povezanih metaboličkih posljedica, a dijelom otkrićem koje ukazuje na to da adipociti integriraju široku lepezu homeostatskih procesa. (3)

Ideju da masno tkivo može imati značajan utjecaj na ukupnu kontrolu glikemije isprva nije bilo lako prihvatiti. Prijašnje studije utvrdile su da se samo manji dio glukoze nakon obroka (oko 10-15%) odlaže u masno tkivo, dok je većinski ostatak pohranjen u mišićima. Ipak, bilo je jednako tako jasno da promjene u količini masnog tkiva imaju duboke posljedice na homeostazu glukoze; previše masnog tkiva (pretilost), a i premalo (lipodistrofija), povezano je s otpornošću na inzulin i hiperglikemijom. Osim toga, PPAR- $\gamma$  (eng. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) liganadi kao tiazolidindionski (TZD) lijekovi imaju izvrsnu anti-dijabetičku aktivnost, usprkos činjenici da većinu PPAR- $\gamma$  nalazimo u masnom tkivu, a ne u mišićima. Sad je razumljivo da je značajan učinak adipocita na ravnotežu glukoze posredovan preko nekoliko različitih mehanizama koji se mogu labavo kategorizirati kao endokrini i ne-endokrini. (3)

Osim regulacije mase masnog tkiva i homeostaze hranjivih tvari, adipociti su uključeni u imunološki odgovor, kontrolu krvnog tlaka, koštane mase, reproduktivne funkcije kao i funkcije štitnjače. Ovi procesi koordinirani su uglavnom kroz sintezu i oslobađanje peptidnih hormona od strane adipocita.

Leptin, „hormon sitosti“, prvi je otkriveni adipokin koji ima ulogu u moduliranju adipociteta, a ujedno je i najbolje proučavan. Leptin gotovo isključivo izlučuje masno tkivo te služi kao glavni „adipostat“ u suzbijanju unosa hrane i promicanju potrošnje energije. Predvidljivo, ljudi s mutacijama bilo leptina bilo leptinskog receptora su pretili dok su paradoksalno razine leptina u krvi pretilih povećane, što se objašnjava rezistencijom na leptin. Leptinski receptori u brojnim tkivima izraženi su u niskoj razini, ali ih u visokim razinama nalazimo u mediobazalnom hipotalamusu, osobito arkuatnoj jezgri, ventromedijalnoj jezgri i dorzomedijalnoj jezgri. Aktivacija receptora za leptin na tim mjestima dovodi do potiskivanja oreksigenskih putova i indukciju anoreksigenskih putova. (3)

Uloga leptina pokazala se, naime, izrazito složenijom nego što se činila na prvi pogled. Leptin djeluje kao aferentni signal u jezgrama hipotalamusa u dva smjera: smanjuje aktivnost putova koji potiču glad i potiče aktivnost putova koji izazivaju sitost. Osim na smanjenje unosa hrane, leptin djeluje i na pojačanu potrošnju energije utječući tako na simpatički sustav i termogenezu. Prosljeđujući informaciju hipotalamusu o količini energije spremljene u masnom tkivu, leptin predstavlja dio povratne sprege koja kontrolira stabilnost ukupnih zaliha energije. U gladovanju leptin pada i neposredno se potiču sveukupni hormonski, metabolički i kognitivni mehanizmi prilagodbe na nedostatak hrane te dolazi do pojačanja teka i smanjenja energetske potrošnje. U obrnutom slučaju, kod obilne ponude hrane, leptin smanjuje tek i pojačava energetske potrošnju. Promjene razine leptina djeluju u smislu protivljenja promjeni težine u bilo kojem smjeru poput termostata. (4)

Antihyperglikemijsko djelovanje leptina očituje se u nekoliko različitih organa. Poboljšava inzulinsku osjetljivost u mišićima i smanjuje razinu lipida unutar miocita direktno preko AMP-om aktivirane protein-kinaze (AMPK) i indirektno putovima središnjeg živčanog sustava. Prema trenutnoj ideji da unutarstanični lipidi doprinose otpornosti na inzulin, upravo učinak koji leptin ima na cijepanje lipida može pomoći da se objasni povećana osjetljivost na inzulin. Leptin poboljšava osjetljivost na inzulin u jetri te u njoj, kao i u mišićima, djeluje na smanjenje jetrenih unutarstaničnih razina triacilglicerola. Raspravljalo se o hipotezi osi adipociti-inzulinski otočići gdje inzulin potiče izlučivanje leptina i leptin inhibira oslobađanje inzulina. U skladu s tom pretpostavkom, ablacija leptinskih receptora iz  $\beta$ -stanica rezultira poboljšanim bazalnim lučenjem inzulina i hipoglikemije u gladovanju. Učinak leptina na razine inzulina posljedica je inhibicije sinteze proinzulina i smanjenja lučenja. (3)

Leptin ima utjecaj na različite biološke mehanizme, uključujući reprodukciju (inicijacija puberteta), imunološki i upalni odgovor, hematopoezu, angiogenezu, formiranje kostiju i zacjeljivanje rana. (2)

Leptinu sinergističan hormon, s kojim dijeli slično djelovanje i ostvaruje komplementarne aktivnosti, je adiponektin koji regulira brojne metaboličke procese, uključujući regulaciju razine glukoze i oksidacije masnih kiselina.

Adiponektin je glavni adipokin kojeg luče adipociti i jedini čija se koncentracija u pretilosti smanjuje. (1) Izlučuje ga isključivo masno tkivo i posteljica tijekom trudnoće u obilnim količinama naspram drugih hormona. Razina adiponektina u krvi odraslih obrnuto je proporcionalna postotku masti u tijelu, dok je ta veza u dojenčadi i male djece manje poznata. (5) Također, razina adiponektina povezana je posebice s raspodjelom masnoga tkiva pa je značajno niža u osoba s više visceralnog nego potkožnog masnog tkiva. (6)

Adiponektin ima utjecaj na senzitivizaciju inzulina kroz više mehanizama, inhibira glukoneogenezu u jetri te povećava transport glukoze u adipocite i mišićne stanice. Iskazuje i protektivne kardiovaskularne učinke (kroz smanjivanje ekspresije adhezijskih molekula i proliferacije glatkih mišićnih stanica) te potiskuje transformaciju makrofaga u pjenušave stanice. Isto tako, ima i izravan antitrombotski učinak te potiče proizvodnju dušikovog (II) oksida u malim krvnim žilama. (1) Koristan je biljeg već i ranih aterosklerotskih promjena. Budući da su u bolesnika s ishemijskom bolešću srca pronađene niže razine adiponektina, prepoznata je važna veza između niže razine adiponektina i kardiovaskularnih bolesti (6)

Kompleksnost patogeneze pretilosti je očita, jer uključuje interakcije ponašanja pojedinca, njegova okruženja i genetičkih čimbenika te upravo zbog razlika među osobama je toliko raznolika. Porast broja oboljelih od pretilosti može se djelomično pripisati unosu vrlo kalorične hrane i sjedilačkom načinu života modernog doba. Doista, ono što se sada smatra bolest mogla je biti prednost u primitivnijim vremenima kada je hrana bila manje dostupna, a visoki izdaci energije kroz fizičku aktivnost bili način života. Tako su oni s tzv. štedljivim fenotipom imali prednost za preživljavanje, zbog učinkovitijeg korištenja kalorija.

Prikupljeni dokazi snažno podupiru ulogu genetičke komponente u nastanku pretilosti. Studije blizanaca često su korišten model pri procjeni genetičke komponente u određenoj osobini zbog činjenice da su jednojajčani (MZ-monozigotni) blizanci genetički identični, dok dvojajčani (DZ-dizigotni) blizanci dijele samo 50% svog genetičkog materijala. Podudarnost pri proučavanju količine masnog tkiva među MZ blizancima je u rasponu od 70-90%, dok je u



DZ blizanaca od 35-45%. (7) Osim toga, iako ne postoji povezanost između ITM kod DZ blizanaca razdvojenih pri rođenju, postoji značajna veza kod MZ blizanaca odraslih odvojeno. Daljnje dokaze pronalazimo u studijama posvojiteljskih obitelji, gdje je uočena snažna korelacija između ITM posvojenika i bioloških roditelja, ali ne i posvojiteljskih roditelja.

Razlike u učestalosti pretilosti među geografskim i etničkim skupinama također pružaju uvid u genetsku komponentu, primjerice, učestalost od 35% ili manje u populaciji europskog podrijetla i azijskoj populaciji do 50% ili više u Pima Indijanaca i stanovnika otočja u Južnom Moru Tihog Oceana. (7) Takvi nalazi snažno podupiru ideju da geni igraju ključnu ulogu u određivanju ITM i, posljedično, u patogenezi pretilosti. Međutim, pokazalo se izazovom prepoznavanje specifičnih genetičkih uzroka pretilosti zbog složenih interakcija koje sudjeluju u njenoj regulaciji.

S ciljem da identificiraju još nepoznate gene uključene u pretilost, istraživači su pokušali analizirati cijeli genom tražeći vezu između polimorfnih biljega i bolesti povezanih s određenim fenotipovima. Koristeći genetičke markere ravnomjerno raspoređene po cijelomu genomu, znanstvenici mogu odrediti gdje se specifični lokusi dijele češće među zahvaćenim pojedincima unutar i između obitelji nego što bi se očekivalo slučajno. Ova metoda je bila uspješna u mapiranju monogenских bolesti, kao i lokusa za kvantitativna svojstva, poput visine i tjelesne težine.

Studije sekvenciranja gena otkrivaju da, na razini nukleotida, gen koji kodira specifični protein može imati brojne razlike u slijedu. Te razlike ne mijenjaju ukupni proizvod dovoljno značajno za proizvodnju drugačijeg proteina, ali mogu imati učinak na specifičnosti supstrata te njegovu aktivnost i funkciju (8). Genetički polimorfizam mogao bi objasniti zašto su neki pojedinci predisponirani za određenu bolest, uključujući i pretilost.

Polimorfizam pojedinačnog nukleotida (eng. SNP, *single nucleotide polymorphism*) je varijacija u slijedu DNA u kojoj se pojedini nukleotid, A, T, C, G ili duži zajednički slijed nukleotida, u genomu razlikuje između pripadnika iste vrste ili u istom paru kromosoma (9). SNP-ovi su normalna pojava unutar molekule DNA. Oni se u prosjeku javljaju jednom na svakih 300 nukleotida, što znači da ih u ljudskom genomu ima oko 10 milijuna (10). Genomska distribucija SNP nije homogena: pojavljuju se češće u nekodirajućim regijama, intronima, nego u kodirajućim regijama, eksonima, ili, općenito, gdje prirodna selekcija djeluje i eliminira druge varijante SNP-a, od kojih ostavlja one koji predstavljaju

najpovoljniju genetičku adaptaciju. Drugi čimbenici kao što su genetičke rekombinacije i mutacije također mogu odrediti gustoću SNP-a (9).

Pristup cjelogenomske studije povezanosti (eng. GWAS, *genom-wide association study*) je učinkovita metodologija koja omogućuje genetičarima skenirati guste nizove SNP-ova (~0.1-5 milijuna SNP) protežući se preko cijelog ljudskog genoma, koristeći snažne statističke metode za proučavanje povezanosti između određenog fenotipa bolesti i zastupljenosti svih zajedničkih varijacija u genomu. Ovi SNP-ovi nipošto se ne smatraju uzročnima, jer djeluju kao markeri te bilježe zajedničke haplotipske varijacije u određenom području ljudskog genoma. Tek kad je SNP-oznaka povezana s određenim svojstvom onda to područje od obično nekoliko stotina kilobaza predstavlja mjesto gdje bi se uzročna varijanta trebala nalaziti (7). Većina SNP-a nema nikakvog utjecaja na zdravlje iako su se neke od tih genetičkih razlika, međutim, pokazale vrlo važnima u istraživanju ljudskog zdravlja. Istraživači su otkrili SNP-ove koji mogu pomoći predvidjeti reakciju osobe na određene lijekove, utjecaje okolišnih čimbenika, kao što su toksini, te rizik od razvoja određenih bolesti. SNP-ovi se također mogu koristiti za praćenje nasljeđivanja gena za određenu bolest unutar obitelji. Međutim, njihovo najveće značenje u biomedicinskim istraživanjima ima u usporedbi regija genoma među skupinama, zahvaćenima i nezahvaćenima bolešću, kako ispitivanim tako i kontrolnim.

Gen za adiponektin, ADIPOQ, je identificiran i nalazi se na kromosomu (3q27). U ovoj regiji kromosoma, GWAS-om je otkriveno 13 SNP-ova ADIPOQ gena te je to mjesto povezano sa osjetljivošću za dijabetes tipa 2, koronarnu bolest srca i pretilost (11). Brojne studije navode da su određeni polimorfizmi kodirajućeg gena adiponektina (ADIPOQ) snažno povezani s razinama adiponektina.

Razine adiponektina pokazuju snažnu genetičku poveznost, a nasljednost se procjenjuje između 30 i 50%. (13) Nedavno je GWAS-om utvrđeno da jedan SNP ovoga gena, (rs26671), pokazuje najveću povezanost s razinom adiponektina. U ovoj studiji, autori su ponovno proučili i druge SNP u ADIPOQ i utvrdili da SNP rs266729 i SNP rs182052 također pokazuju značajnu povezanost. Prethodne studije su ispitivale povezanost nekoliko polimorfizama u genu ADIPOQ, uključujući rs822395, rs822396, + 2019delA, rs17300539, rs266729, rs2241766 i rs1501299. Tri SNP-a, rs266729, rs2241766 i rs1501299 su najčešće proučavana (12). Međutim, neke od tih povezanosti nisu potvrđene i u drugim istraživanjima.

ADIPOQ gen je vrlo polimorfan, dok povezanost razina adiponektina i/ili metaboličkog sindroma pokazuje genetske varijante u mnogim populacijama, ali često s proturječnim rezultatima.

Učinci leptina u reguliranju težine su posredovani vezanjem i aktivacijom duge izoforme njegovog receptora (LEPR-b) u hipotalamusu. Analiza LEPR-a pomogla je u definiranju novih molekularnih putova metabolizma energije i regulacije tjelesne težine. LEPR je veliki transmembranski protein, mapiran na 1p31 kromosomu (16), koji pripada gp 130 obitelji citokina klase I receptora (14). Ima nekoliko alternativno prekrojenih izoformi (jednu dugu izoformu i nekoliko kratkih) raspoređenih u mnogim tkivima (15).

Više pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (SNP-ova) je opisano u genu LEPR u ljudi. Neki polimorfni geni uključeni u regulaciju leptina istraživani su kao mogući čimbenici povezani s pretilošću. Mutacije LEPR-a čija je posljedica prijevremeni raskid unutarstanične domene odgovorne su za morbidnu pretilost u mišjim modelima, kao i za nekoliko rijetkih slučajeva pretilosti u ljudi (15). Varijante LEPR-a uobičajeno se pojavljuju, što uzrokuje promjene, aminokiseline lizin u asparagin na kodonu 656 u eksonu 14 (K656N), lizin u arginin na kodonu 109 eksona 4 (K109R), glutamin u arginin na kodonu 223, tri tihe mutacije (T→C na nukleotidu 1222, A→G na nukleotidu 3217 i G→A na nukleotidu 3250) i četiri varijante sekvenci u intronima. Promjena aminokiselina utječe na sve vrste receptora (16).

Zamjena baze G→A dovodi do zamjene glutamina u arginin u kodonu 223 (Q223R) LEPR gena te mijenja naboj aminokiselina od neutralnog do pozitivnog. Navedena promjena mogla bi utjecati na funkcionalnost receptora i promijeniti njegov signalni kapacitet u onaj povezan s većom srednjom razinom cirkulirajućeg leptina. Ovaj polimorfizam se nalazi u regiji koja kodira izvanstaničnu domenu receptora za leptin. Uočena je kod osoba homozigotnih za alel G povezanost s varijacijama vezujuće aktivnosti za ligand za razliku od homozigota za A alel A (16).

Mutirani receptor vezan je za leptin i cirkulira u visokim koncentracijama. Kao što je slučaj u glodavaca, LEPR *null* ljudi su hiperfagični, patološki pretili i ne uspijevaju proći normalno spolno sazrijevanje. Nadalje, ovi pacijenti nisu odgovorili na terapije tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH) i hormona oslobađanja hormona rasta (GHRH), što ukazuje na ključnu ulogu leptina u neuroendokrinom regulaciji. Istraživanja su pokazala da je odnos vezanog i slobodnog leptina je povećan kod pretilosti, trudnoće i mutacija (17).

Dokaz značajnog učinka polimorfizma Gln223Arg na sastav ljudskog tijela je raspravljan u nekim nedavnim studijama. Učestalost pojedinih alela tih polimorfizama pokazuje razlike u etničkoj raspodjeli, kada se primjerice promatra u muškaraca europskog

podrijetla ili u postmenopauzalnih žena. S druge strane, negativni rezultati zabilježeni su za Gln223Arg polimorfizam LEPR gena kod različitih populacije bijele rase, misleći pritom na studije na američkim, britanskim, danskim i turskim skupinama (14). Veza između LEPR Gln223Arg polimorfizma i fenotipova povezanih s pretilošću je sporna. U meta-analizama, polimorfizmi LEPR-a (Gln223Arg, Lys109Arg, Lys656Asn, Pro1019Pro) nisu značajno povezani s rizikom za pretilost (15).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Temeljem dosadašnjih znanstvenih saznanja i pretraživanja dostupne literature o pretilosti i njenim posljedicama u odraslih, može se zaključiti da uzročno-posljedična veza količine masnog tkiva i koncentracije adipokina u organizmu nije u potpunosti ispitana u djece i adolescenata.

U tu svrhu analizirana je povezanost antropometrijskih (opseg struka i bokova, tjelesna visina i masa, ITM, sistolički i dijastolički arterijski tlak) i metaboličkih parametara (GUK, inzulin, kolesterol, trigliceridi) te razine leptina i adiponektina u krvi kao i učestalost pojedinih polimorfizama gena za ekspresiju leptinskog receptora i adiponektina u pretile djece u usporedbi s djecom koja su primjereno uhranjena za svoju dob i spol.

Za pretpostaviti je, da je u pretilih odraslih, ali i u pretile djece i adolescenata razina leptina u krvi povećana, a razina adiponektina smanjena, pa se postavlja pitanje koji je razlog tomu. Hipoteza je da je razina leptina povećana upravo zbog neosjetljivosti leptinskih receptora na leptin pa istraživanje ide k tomu da se sazna utječe li pojedina varijacija gena za sintezu leptinskog receptora i na rezistenciju samog receptora na leptin i sukladno tome povećanu razinu leptina. Također, cilj je i otkriti imaju li polimorfizmi gena za adiponektin utjecaj na njegovu sniženu razinu u krvi pretile djece i adolescenata.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. ISPITANICI**

Ova studija predstavlja presječno istraživanje razina leptina i adiponektina te polimorfizama gena za adiponektin i leptinski receptor kod ispitanika (pretila djece i adolescenata) i kontrolne skupine (normalno uhranjena djeca i adolescenti) odobreno na sjednici Etičkog povjerenstva KBC Split. Roditelji svih maloljetnih sudionika su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje, dok su sami sudionici bili upoznati s protokolom studije.

Ispitanici su djeca i adolescenti u dobi 10-17 godina (n=30), koji se liječe na Klinici za dječje bolesti KBC Split zbog prekomjerne težine i/ili pretilosti, a udovoljavaju sljedećim uvjetima: ITM iznad 90. percentile za dob i spol po smjernicama Hrvatskog pedijatrijskog društva te ne boluju od drugih kroničnih bolesti (poput dijabetesa, primarnog hipotiroidizma ili je njihova pretilost sindromska kao kod Downovog ili Prader-Willijevog sindroma).

Kontrolnu skupinu čine djeca i adolescenti u dobi 10-17 godina, približno jednako raspodijeljeni po spolu kao i u ispitivanoj skupini, koji ne boluju od nikakvih endokrinih, kardiovaskularnih, gastrointestinalnih i renalnih kroničnih bolesti te imaju ITM između 5. i 90. percentile za dob i spol po smjernicama Hrvatskog pedijatrijskog društva.

#### **3.2. METODE**

##### **3.2.1. ANTROPOMETRIJA**

Prije antropometrijskih mjerenja i venepunkcije, izvršen je fizikalni pregled sudionika i uzeta detaljna osobna i obiteljska anamneza. Potom se ispitanicima izmjerila visina na Harpenden stadiometru, a kao konačna vrijednost uzeta je aritmetička sredina triju mjerenja u razmaku od po pet minuta. Vrijednosti tjelesne mase dobivene su u laganoj odjeći i bez obuće na analognoj vagi preciznosti 0.1 kg. Indeks tjelesne mase izračunat je po standardnoj formuli omjera tjelesne težine u kilogramima i visine u metrima na kvadrat te u percentilima i korigiran Z-zbirom. Obujam struka i bokova izmjeren je neelastičnom metarskom vrpcom neposredno iznad gornje ilijačne kriste i pubične simfize. Sistolički i dijastolički krvni tlak

prikazani su kao srednja vrijednost triju uzastopnih mjerenja u trima položajima: ležećem, sjedećem i stojećem. Sva mjerenja izvršena su na Klinici za dječje bolesti KBC Split.

### 3.2.2. LABORATORIJSKI TESTOVI

Venepunkcijom su nakon noćnog gladovanja uzeti uzorci krvi za analizu ispitivanih parametara. Iz odvojenog seruma odmah po prikupljanju uzorka standardiziranim metodama u Kliničkom laboratoriju KBC Split analizirani su: glukoza na tašte, ukupni kolesterol, LDL, HDL i trigliceridi. Inzulin natašte mjeren je elektrokemiluminescentnim imunoesejem „ECLIA“ (Elecsys Insulin MCE on Elecsys 1010/2010 analyzers, Roche, Germany; osjetljivost 1.39 pmol/L).

HOMA indeks izračunat je po formuli:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{inzulin natašte u } \mu\text{U/mL} \times \text{glukoza natašte u mmol/L}) / 22.5.$$

Dio pripremljenog seruma za analizu leptina i adiponektina do analize je čuvan u epruvetama s K<sub>3</sub>-EDTA antikoagulansom na -80°C, a dio za izolaciju DNA i genskih polimorfizama na -20°C.

Koncentracije leptina i adiponektina analizirane su enzimski vezanim imunosorbentnim esejem Human Leptin ELISA Clinical Range (BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Češka) osjetljivost 0.2 ng/mL te Human Total Adiponectin ELISA kit (BlueGene Biotech, China) osjetljivost 0.1 mg/mL.

### 3.2.3. GENETIČKI TESTOVI

Genomska DNA izolirana je metodom „*salting out*“ iz sloja leukocita „*buffy coat*“, preostalih nakon centrifugiranja uzoraka krvi. Količina ekstrahirane DNA određena je spektrofotometrijski. PCR-RFLP korišten je za identifikaciju SNP-ova gena LEPR (QR, QQ, RR) i ADIPOQ (TT, GT, GG). Pojedini polimorfizmi odabrani su pregledom postojeće literature i GWAS-ove baze polimorfizama za gene od interesa.

Korištene PCR početnice su:

1. LEPR SNP Q223R F: 5'-ACC CTT TAA GCT GGG TGT CCC AAA TAG-3' i R: 5'-AGC TAG CAA ATA TTT TTG TAA GCA ATT-3'
2. ADIPOQ SNP G276T F: 5'-GGC CTC TTT CAT CAC AGA CC-3' i R: 5'-AGA TGC AGC AAA GCC AAA GT-3'.

Korišten je standardizirani PCR sustav u tri koraka. U početnom koraku provodi se denaturacija na 95°C tijekom 5 minuta. Nakon toga slijedi vezanje parova na 60.2°C u trajanju od 45 sekundi, 72°C kroz 45 sekundi i konačno proširenje pri 72°C tijekom 7 minuta. Procedura se ponavlja oko 35 ciklusa. Umnoženi PCR produkti razdvojeni su na 2%-tnom agaroznom gelu te vizualizirani etidij bromid bojom. Amplificirani PCR produkti podvrgnuti su RFLP Smal restrikcijskom enzimu za 37°C preko noći i prikazani obojani etidij bromidom na 3%-tnom agaroznom gelu.

#### **3.2.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Računalni program MedCalc za Windows, verzija 11.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) korišten pri statističkoj obradi podataka. Kvantitativne varijable prikazane su kao srednja vrijednost i standardna devijacija, a kvalitativne varijable kao broj i udio u skupini. Za statističku analizu kvantitativnih varijabli korišten je Studentov t-test, a za analizu kvalitativnih varijabli korišten je hi-kvadrat test. Granica statističke značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ .



#### 4. REZULTATI

**Tablica 1.** Raspodjela ispitivane skupine pretilo djece i kontrolne skupine po spolu (n=30)

Spol	Ispitivana skupina (n=30)	Kontrolna skupina (n=30)	<i>P</i> *
<b>Muški</b> †	18 (60%)	15 (50%)	0.603
<b>Ženski</b> †	12 (40%)	15 (50%)	

\**P*<0.05 se smatra statistički značajno.

† Rezultati su prikazani kao apsolutna brojčana vrijednost (n) i postotak n(%).

**Tablica 2.** Antropometrijska obilježja ispitivane skupine pretilo djece i kontrolne skupine (n=30)

Varijabla	Ispitivana skupina (n=30)	Kontrolna skupina (n=30)	<i>P</i> *
<b>Dob (god/dec)</b> †	13.2±2.6	12.7±2.9	0.542
<b>ITM§ (kg/m<sup>2</sup>)</b> †	31.2±4.4	19.1±2.7	<0.001
<b>ITM§ (percentile)</b> †	97.4±3.7	53.5±23.2	<0.001
<b>ITM§ (z-zbir)</b> †	2.1±0.4	0.1±0.6	<0.001
<b>Opseg struka (cm)</b> †	100.6±9.1	68±7.3	<0.001
<b>Opseg bokova (cm)</b> †	111.1±11.1	83.3±10.6	<0.001
<b>Sistolički arterijski tlak (mmHg)</b> †	123.6±13.7	103.6±10.1	<0.001
<b>Dijastolički arterijski tlak (mmHg)</b> †	69.9±9.9	70.5±13.1	0.834

\**P*<0.05 se smatra statistički značajno.

† Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

§ITM- indeks tjelesne mase

**Tablica 3.** Rezultati analize metabolizma glukoze i lipidograma ispitivane skupine pretile djece i kontrolne skupine (n=30)

Varijabla	Ispitivana skupina (n=30)	Kontrolna skupina (n=30)	<i>P</i> *
Glukoza natašte (mmol/L) <sup>‡</sup>	4.6±0.5	5.1±0.4	<0.001
Inzulin natašte (mU/L) <sup>‡</sup>	16.7±10.9	7.8±3.6	<0.001
HOMA-IR <sup>‡</sup>	3.6±2.8	1.8±0.8	0.002
Ukupni kolesterol (mmol/L) <sup>‡</sup>	3.9±0.8	4.0±0.9	0.572
LDL (mmol/L) <sup>‡</sup>	2.1±0.6	2.1±0.8	0.896
HDL (mmol/L) <sup>‡</sup>	1.1±0.27	1.4±0.3	<0.001
Trigliceridi (mmol/L) <sup>‡</sup>	1.0±0.4	0.8±0.4	0.029

\**P*<0.05 se smatra statistički značajno.

‡ Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Tablica 4.** Rezultati analize razine leptina i adiponektina ispitivane skupine pretile djece i kontrolne skupine (n=30)

Varijabla	Ispitivana skupina (n=30)	Kontrolna skupina (n=30)	<i>P</i> *
Leptin (ng/mL) <sup>‡</sup>	34.0±20.4	9.1±6.4	<0.001
Adiponektin (ng/mL) <sup>‡</sup>	3.56±1.1	6.78±0.36	<0.001

\**P*<0.05 se smatra statistički značajno.

‡ Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

**Tablica 5.** Rezultati analize polimorfizma gena za leptinski receptor ispitivane skupine pretila djece i kontrolne skupine (n=30)

<b>Polimorfizam gena</b>	<b>Ispitivana skupina (n=30)</b>	<b>Kontrolna skupina (n=30)</b>	<b><i>P</i>*</b>
<b>QR</b> ‡	13 (43.3%)	19 (63.3%)	0.297
<b>QQ</b> ‡	12 (40%)	8 (26.7%)	
<b>RR</b> ‡	5 (16.7%)	3 (10%)	

\* $P < 0.05$  se smatra statistički značajno.

‡ Rezultati su prikazani kao apsolutna brojčana vrijednost (n) i postotak n(%).

**Tablica 6.** Rezultati analize polimorfizma gena za adiponektin ispitivane skupine pretila djece i kontrolne skupine (n=30)

<b>Polimorfizam gena</b>	<b>Ispitivana skupina (n=30)</b>	<b>Kontrolna skupina (n=30)</b>	<b><i>P</i>*</b>
<b>TT</b> ‡	17 (56.7%)	14 (46.7%)	0.361
<b>GT</b> ‡	9 (30%)	13 (43.3%)	
<b>GG</b> ‡	4 (13.3%)	3 (10%)	

\* $P < 0.05$  se smatra statistički značajno.

‡ Rezultati su prikazani kao apsolutna brojčana vrijednost (n) i postotak n(%).

## 5. RASPRAVA

Nakon provedene analize leptina, adiponektina i polimorfizama gena za adiponektin i leptinski receptor kod pretila djece, ovom studijom ustanovljeno je sljedeće: najveću povezanost s pretilošću pokazuju razine leptina i adiponektina u krvi, a utjecaj proučavanih polimorfizama gena na pretilost nije dokazan.

Raspodjela ispitivane skupine pretila djece i kontrolne skupine po spolu prikazana je u tablici 1. U ispitivanoj skupini odnos muških i ženskih ispitanika je 60:40, a u kontrolnoj skupini 50:50 što ukazuje na relativno ravnopravnu raspodjelu i statistički neznčajnu razliku među ispitanicima i kontrolama po spolu ( $p=0.603$ ).

Dob ispitanika je  $13.2\pm 2.6$  godina zbog čega je i dob sudionika u kontrolnoj skupini sukladna i iznosi  $12.7\pm 2.9$  godina te ne pokazuje statistički značajnu razliku (tablica 2.).

Antropometrijske mjere (ITM u  $\text{kg/m}^2$ , percentilima i z-zbiru, opseg struka i bokova u centimetrima i sistolički arterijski tlak u mmHg) ispitivane grupe djece i adolescenata pokazuju statistički značajnu razliku u usporedbi s djecom i adolescentima kontrolne grupe ( $p<0.001$ ). Jedina vrijednost koja ne pokazuje statistički značajnu razliku je dijastolički arterijski tlak u mmHg ( $p=0.834$ ) (tablica 2.).

U tablici 3. prikazani su rezultati analize metabolizma glukoze i lipidograma ispitivane skupine pretila djece i kontrolne skupine. Razine glukoze na tašte u mmol/l, inzulina na tašte u mU/L i HDL-a u mmol/L pokazuju statistički značajnu razliku među skupinama ( $p<0.001$ ), dok HOMA indeks, ukupni kolesterol, LDL i trigliceridi u mmol/l nisu pokazali značajne razlike ( $p=0.002$ ,  $p=0.572$ ,  $p=0.896$ ,  $p=0.029$ ).

Statističkom analizom razina leptina i adiponektina u ng/mL između ispitivane i kontrolne skupine utvrđena je značajna razlika čija p vrijednost iznosi manje od 0.001 (tablica 4.). Ovi rezultati podudaraju se s istraživanjem Gherlana i suradnika u kojem je razina leptina u plazmi znatno veća u skupini pretilih u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je razina adiponektina značajno niža u pretila djece u odnosu na djecu normalne tjelesne težine (1).

Rijetke su studije koje se bave proučavanjem bazalnih razina leptina i adiponektina kod pretila djece i adolescenata. Većinom su uspoređivane razine leptina i adiponektina kod

pretile djece i adolescenata prije i nakon intervencije (izmjena životnog stila kroz prehranu i tjelesnu aktivnost) (18, 19, 20).

Međusobnom usporedbom rezultata navedenih studija dolazimo do dvosmislenih zaključaka, jer u Italiji Cambuli i suradnici nakon trajanja intervencije od godinu dana bilježe porast razina adiponektina kod djece čiji je ITM opao, a razine leptina su neovisne o promjeni ITM-a (18), dok u studiji Blühera i suradnika u Njemačkoj, od također godinu dana trajanja izmjena životnog stila, razine leptina u pretile djece padaju nakon smanjenja tjelesne težine, a razine adiponektina ne pokazuju značajne promjene (19). Nakon 4-6 tjedana bolničkog liječenja pretilosti kod djece, Siegrist i suradnici opazili su pad razina leptina i porast razina adiponektina (20).

Mogući uzrok nepodudarajućih rezultata je raznoliki broj ispitanika i lokacije intervencija, s obzirom na različitu snagu i karakter psihosocijalnih faktora u bolnici i kod kuće te samo trajanje intervencija.

Statističkom analizom u ovoj studiji nije utvrđena značajna razlika ( $p=0.297$ ) u učestalosti polimorfizama QR, QQ i RR gena za leptinski receptor u postotcima ispitivane skupine pretile djece i adolescenata u odnosu na djecu iz kontrolne skupine (tablica 5.).

U Japanu, Endo i suradnici istraživali su je li Gln223Arg polimorfizam gena za leptinski receptor povezan s pretilošću u djece školske dobi i pokazali da nema povezanosti tog polimorfizma i pretilosti (21). Također, u studiji Pyrzak i suradnika nisu nađeni dokazi za povezanost LEPR Q223R genskog polimorfizma kod pretile djece s pretilošću, razinom lipida i leptina u krvi te rezistencijom na inzulin (14).

Statistički značajnu povezanost LEPR Q223R SNP-a s tjelesnom težinom i kasnijim razvojem metaboličkih bolesti Souren i suradnici utvrdili su pri proučavanju razina leptina iz pupčane vrpce kod netom rođenih dizigotnih i monozigotnih blizanaca (22).

Kao i kod učestalosti polimorfizama za LEPR gen, tako i kod učestalosti polimorfizama za gen adiponektina TT, GT i GG u postotcima, prikazane u tablici 6., nije uočena statistički značajna razlika među proučavanim skupinama, što pokazuje i vrijednost  $p=0.361$ .

Rezultati sustavnog pregleda pokazuju da polimorfizmi u ADIPOQ genu povećavaju rizik od pretilosti, a polimorfizmi u LEPR genu nemaju utjecaj na razvoj pretilosti. No, uključene studije o polimorfizmima LEPR gena imale su neadekvatne uzorke što je rezultiralo neadekvatnom statističkom obradom. Dakle, sadašnji negativni rezultati još uvijek imaju

premalu snagu, a dodatna pojašnjenja mogla bi se dobiti iz studija s većim brojem ispitanika (15).

Pregledom dostupne literature i usporedbom rezultata uočeno je da su razine leptina i adiponektina te varijacije njihovih gena najčešće proučavane u odrasloj populaciji i njenim geografskim i spolnim subpopulacijama (23, 24, 25, 26, 27, 28), te su pri izradi preglednih članaka i meta analiza, ionako rijetki, radovi (n=14) o dječjoj i adolescentskoj populaciji isključivani bez navedenih razloga za isključenje (29).

## 6. ZAKLJUČCI

1. Potvrđena je pretpostavka da je i kod pretile djece kao i kod pretilih odraslih razina leptina u krvi povećana, a razina adiponektina smanjena.

2. Suprotno očekivanom, dobiveni rezultati upućuju na to da genetička varijabilnost leptinskog receptora ne utječe na rezistenciju samog receptora na leptin i posljedično tome nije povezana s većim koncentracijama leptina u krvi kod pretile djece i adolescenata.

3. Raspodjela učestalosti polimorfizama gena za adiponektin kod ispitivane skupine pretile djece kao i kod kontrolne skupine nije pokazala povezanost pojedinog polimorfizma s razinama adiponektina u krvi.

Razlozi ovakvim rezultatima, drugačijima od pretpostavljenog, mogli bi biti nedovoljno velik broj uključenih ispitanika u ispitivanoj i kontrolnoj skupini te sama kompleksnost patogeneze pretilosti. Dodatne studije ispitanika i kontrola, s većim i homogenijim uzorcima, te većim brojem ispitivanih SNP ovih gena od interesa mogle bi osigurati dodatna pojašnjenja.

## 7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Gherlan I, Vladoiu S, Alexiu F, Giurcaneanu M, Oros S, Brehar A, et al. Adipocytokine profile and insulin resistance in childhood obesity. *Maedica (Buchar)*. 2012;7(3):205-13.
2. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev*. 2007;8(1):21-34.
3. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):847-53.
4. Monteleone P, Maj M. Dysfunctions of leptin, ghrelin, BDNF and endocannabinoids in eating disorders: beyond the homeostatic control of food intake. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(3):312-30.
5. Ukkola O, Santaniemi M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J Mol Med (Berl)*. 2002;80(11):696-702.
6. Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(3):293-300.
7. Xia Q, Grant S.F. The genetics of human obesity. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1281:178-90.
8. Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD) National Library of Medicine (US); 2001 [published 2014 November 11]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/mutationsanddisorders/neutralmutations>
9. Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet*. 2008;40(3):340-5.
10. Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD) National Library of Medicine (US); 2001 [published 2014 November 11]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/snp>
11. Gu HF, Abulaiti A, Ostenson CG, Humphreys K, Wahlestedt C, Brookes AJ, Efendic S. Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish caucasians. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S31-5.
12. Zhang H, Mo X, Hao Y, Gu D. Association between polymorphisms in the adiponectin gene and cardiovascular disease: a meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2012;13:40.
13. Kyriakou T1, Collins LJ, Spencer-Jones NJ, Malcolm C, Wang X, Snieder H, et al. Adiponectin gene ADIPOQ SNP associations with serum adiponectin in two female populations and effects of SNPs on promoter activity. *J Hum Genet*. 2008;53(8):718-27.



14. Pyrzak B, Wisniewska A, Kucharska A, Wasik M, Demkow U. No association of LEPR Gln223Arg polymorphism with leptin, obesity or metabolic disturbances in children. *Eur J Med Res.* 2009;14 Suppl 4:201-4.
15. Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(2):396-406.
16. Jamil K, Kumar K, Reddy M. Association of adiponectin gene functional polymorphisms (+45T/G and 276G/T) with obese breast cancer. *J Mol Biomark Diagn* 2012;3:6.
17. Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav.* 2004;81(2):223-41.
18. Cambuli VM, Musiu MC, Incani M, Paderi M, Serpe R, Marras V, et al. Assessment of adiponectin and leptin as biomarkers of positive metabolic outcomes after lifestyle intervention in overweight and obese children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(8):3051-7.
19. Blüher S, Panagiotou G, Petroff D, Markert J, Wagner A, Klemm T, et al. Effects of a 1-year exercise and lifestyle intervention on irisin, adipokines, and inflammatory markers in obese children. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22(7):1701-8.
20. Siegrist M, Rank M, Wolfarth B, Langhof H, Haller B, Koenig W, Halle M. Leptin, adiponectin, and short-term and long-term weight loss after a lifestyle intervention in obese children. *Nutrition.* 2013;29(6):851-7.
21. Endo K, Yanagi H, Hirano C, et al. Association of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and no association of Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor gene in Japanese schoolchildren with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(4): 443-9.
22. Souren NY, Paulussen AD, Steyls A, Loos RJ, Stassen AP, Gielen M, et al. Common SNPs in LEP and LEPR associated with birth weight and type 2 diabetes-related metabolic risk factors in twins. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(8):1233-9.
23. van Rossum CT, Hoebee B, van Baak MA, Mars M, Saris WH, Seidell JC. Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin, and weight gain in young Dutch adults. *Obes Res.* 2003;11(3):377-86.
24. Duarte SF, Francischetti EA, Genelhu VA, Cabello PH, Pimentel MM. LEPR p.Q223R, beta3-AR p.W64R and LEP c.-2548G>A gene variants in obese Brazilian subjects. *Genet Mol Res.* 2007;6(4):1035-43.

25. Fan SH, Say YH. Leptin and leptin receptor gene polymorphisms and their association with plasma leptin levels and obesity in a multi-ethnic Malaysian suburban population. *J Physiol Anthropol.* 2014;33:15.
26. Siitonen N, Pulkkinen L, Lindström J, Kolehmainen M, Eriksson JG, Venojärvi M, et al. Association of ADIPOQ gene variants with body weight, type 2 diabetes and serum adiponectin concentrations: the Finnish Diabetes Prevention Study. *BMC Med Genet.* 2011;12:5.
27. Gu HF, Abulaiti A, Ostenson CG, Humphreys K, Wahlestedt C, Brookes AJ, Efendic S. Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish caucasians. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 1:S31-5.
28. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, et al. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet.* 2002;11(21):2607-14.
29. Zhang L, Yuan LH, Xiao Y, Lu MY, Zhang LJ, Wang Y. Association of leptin gene -2548 G/A polymorphism with obesity: a meta-analysis. *Ann Nutr Metab.* 2014;64(2):127-36.

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Utvrditi razine leptina i adiponektina u krvi pretila djece i adolescenata te saznati utječe li pojedini polimorfizam gena za sintezu leptinskog receptora na rezistenciju samog receptora na leptin i razinu leptina. Procijeniti utjecaj polimorfizama gena za adiponektin na njegovu razinu u krvi.

**MATERIJALI I METODE:** Presječno istraživanje slučajeva i kontrola usporedbom ispitivane grupe od 30 pretila djece i adolescenata (dob  $13.2 \pm 2.6$  godina) sa kontrolnom skupinom od 30 djece normalne težinu usklađene dobi (dob  $12.7 \pm 2.9$  godina). U obje skupine izmjeren je indeks tjelesne mase (ITM) i opseg struka i bokova te sistolički i dijastolički krvni tlak. Izmjereni su i standardni metabolički parametri (GUK natašte, ukupni kolesterol i njegove frakcije, serumski trigliceridi). Osjetljivost na inzulin je procijenjena korištenjem inzulinemije natašte i HOMA-indeksa. Razine adiponektina i leptina određene su korištenjem ELISA metode. SNP-ovi su locirani PCR-RFLP metodom.

**REZULTATI:** Serumska razina leptina bila je značajno veća ( $34.0 \pm 20.4$  ng/mL u usporedbi s  $9.1 \pm 6.4$  ng/mL,  $p < 0.001$ ), a razina adiponektina značajno manja ( $3.56 \pm 1.1$  ng/ml naspram  $6.78 \pm 0.36$  ng/mL,  $p < 0.001$ ) u skupini pretilih u odnosu na kontrolnu skupinu. LEPR SNP-ovi nisu značajno povezani s višim razinama leptina ni u skupini pretilih ni u kontrolnoj skupini (QR 43.3% za razliku od 63.3%; QQ 40% u odnosu na 26.7%; RR 16.7% usporedno sa 10%,  $p = 0.297$ ). Nema značajne povezanost između ADIPOQ SNP-ova (TT 56.7% naspram 46.7%; GT 30% u odnosu na 43.3%; GG 13.3% spram 10%,  $p = 0.361$ ) i razina adiponektina u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.

**ZAKLJUČCI:** Studija potvrđuje višu razinu cirkulirajućeg leptina i nižu koncentraciju adiponektina u ispitivanoj skupini pretila djece. U djece s pretilošću nije uočena povezanost genskih polimorfizama ADIPOQ s razinom adiponektina. Rezultati upućuju na to da genetička varijabilnost leptinskog receptora nije povezana s većim koncentracijama leptina. Pretpostavka je da su rezultati ove studije drugačiji od očekivanih su zbog malene veličine ispitivanog uzorka te bi dodatne studije s većim uzorcima trebale dati primjerenije rezultate.

## 9. SUMMARY

**DIPLOMA THESIS TITLE:** Analysis of leptin, adiponectin and adiponectin gene polymorphism and leptin receptor in obese children and adolescents

**OBJECTIVES:** To determine serum levels of leptin and adiponectin of obese children and adolescents and to identify the influence of the polymorphisms of leptin receptor gene on leptin resistance and leptin levels. Furthermore, to examine the association between the polymorphisms of adiponectin gene and adiponectin levels.

**PATIENTS AND METHODS:** A case-control study comparing a study group of 30 obese children and adolescents (age  $13.2 \pm 2.6$  years) to a normal weight age matched (age  $12.7 \pm 2.9$  years) control group of 30 children. In both groups body mass index (BMI) and waist and hip circumference, systolic and diastolic blood pressure were measured. Also, the classical metabolic parameters (fasting glycemia, total cholesterol and its fractions, serum triglycerides) were measured. Insulin sensitivity was evaluated using fasting insulinemia and HOMA-index. Adiponectin and leptin levels were determined using ELISA method. PCR-RFLP based assay was utilized to genotype SNPs.

**RESULTS:** Serum level of leptin was significantly higher ( $34.0 \pm 20.4$  ng/mL versus  $9.1 \pm 6.4$  ng/mL,  $p < 0.001$ ), while adiponectin levels were significantly lower ( $3.56 \pm 1.1$  ng/mL versus  $6.78 \pm 0.36$  ng/mL,  $p < 0.001$ ) in the obese group compared to control group. LEPR SNPs were not significantly related to higher levels of leptin in the obese group nor in the non-obese (QR 43.3% versus 63.3%; QQ 40% versus 26.7%; RR 16.7% versus 10%,  $p=0.297$ ). No significant association was identified between ADIPOQ SNPs (TT 56.7% versus 46.7%; GT 30% versus 43.3%; GG 13.3% versus 10%,  $p=0.361$ ) and adiponectin levels in the case group compared to the control group.


**CONCLUSIONS:** The study confirms higher levels of circulating leptin and lower concentrations of adiponectin in case group. In children with obesity was not observed association of the ADIPOQ gene polymorphisms with adiponectin levels. Results suggest that genetic variability in the leptin receptor is not associated with higher leptin concentrations. It

is assumed these results were underpowered due to a small pooled sample size, and analysis of additional studies with larger sample sizes should provide further clarifications.

## 10. ŽIVOTOPIS

### OSOBNJE INFORMACIJE

Sunčana Janković

 Novakova 14, 21000 Split (Hrvatska)

 +385 981957811

 suncana.jankovic@gmail.com

**Spol** Žensko | **Datum rođenja** 06/02/1990 | **Državljanstvo** hrvatsko

### RADNO ISKUSTVO

---

2012–danas **Eksplantacijski koordinator**

Ministarstvo zdravlja

Administrativni poslovi prijave i unosa podataka o donoru i koordinacija te organizacija aktivnosti pri procesu eksplantacije u KBC-u Split

2008–danas **Volonter**

CroMSIC Split

Volonter u brojnim edukativnim i promotivnim medicinskim akcijama udruge studenata medicine

2005–2010 **Računalni operater i poslovna tajnica**

Anafora d.o.o., Novakova 22, Split  
anafora@st-t-com.hr

Izrada službene reprezentativne dokumentacije te računalna i tehnička podrška na službenim sastancima i predavanjima; poslovi tajnice tvrtke

**Djelatnost ili sektor** Građevina

### OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

---

10/2008–09/2014 **Doktor medicine**

razina 7  
EKO-a

Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Šoltanska 2, Split

- 05/2014 Predavač edukacijskog programa "Govoriš li donorski"  
Hrvatska donorska mreža i CroMSIC Split  
Prvi nastupni predavač edukacijskog programa "Govoriš li donorski" u sklopu zdravstvenog odgoja za srednje škole i Nacionalog programa za mlade
- 08/2012 Profesionalna studentska razmjena iz područja opće kirurgije  
IFMSA-International Federation of Medical Students' Associations, Nancy (Francuska)  
Praktično medicinsko iskustvo i teoretska nastava iz opće kirurgije
- 09/2010–06/2012 B2 razina znanja njemačkog jezika  
Hrvatsko-njemačko društvo Split, Škola njemačkog jezika "Delfin", Sinjska ulica 3, Split  
Položen ispit iz B2 razine znanja njemačkog jezika
- 04/2011 Predavač edukacijskog programa "mRAK kampanja"  
CroMSIC i Udruga oboljelih i liječenih od malignih bolesti, njihovih obitelji i prijatelja "Za novi dan"  
Sudjelovanje na Y-PEER radionici i održavanje edukativnih predavanja učenicima srednjih škola u Splitu
- 06/2009 The 6th ISABS conference on human genome project based applications in forensic science, anthropology and individualized medicine  
ISABS-International Society of Applied Biological Sciences, Split
- 09/2004–06/2008 Završena srednja škola-gimnazija razina 4  
EKO-a  
I. Gimnazija, Split, Teslina 10, Split  
Jezični smjer gimnazijskog obrazovanja
- 09/2000–06/2008 C1 razina znanja engleskog jezika i B1 razina znanja njemačkog jezika  
Centar znanja, Ustanova za obrazovanje odraslih, Trg Republike 2, Split  
Položen Cambridge CAE-Certificate in Advanced English i ispit iz B1 razine znanja njemačkog jezika

09/1996 Završena osnovna škola

razina 1  
EKO-a

Osnovna škola "Sućidar", Perivoj Ane Roje 1, Split

Osvojeno 3. mjesto na Županijskom natjecanju iz njemačkog jezika 2004.

## OSOBNJE VJEŠTINE

---

Strani jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
Cambridge Certificate in Advanced English (C)					
njemački	C1	C1	C1	C1	C1
Hrvatsko-njemačko društvo Split (B2)					
španjolski	B2	B2	B1	B1	A1

Stupnjevi: A1/A2: Početnik - B1/B2: Samostalni korisnik - C1/C2  
Iskusni korisnik

[Zajednički europski referentni okvir za jezike](#)

**Računalne vještine** Vješto vladanje alatima Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) i programima grafičkog oblikovanja (Adobe Illustrator, PhotoShop), iskusno pretraživanje baza podataka (PubMed, Cochrane Database i sl.) te odlično poznavanje mogućnosti Interneta

**Vozačka dozvola** Kategorija: B

## DODATNE INFORMACIJE

---

### Preporuke

-prof. dr. sc. Zoran Đogaš, prodekan Medicinskog fakulteta  
-dr. med. Irena Zakarija-Grković, FRACGP, DRANZCOG, IBCLC  
-dr. med. Mate Perković, spec. anestezije, reanimacije i intenzivnog liječenja, glavni eksplantacijski koordinator KBC-a Split

(Preporuke, e-mailovi i brojevi mobitela navedenih kontakata se dostavljaju na zahtjev.)