

Povezanost jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 u ljudskom genu FTO s tjelesnom masom u žena Zagrebačke županije

Huđek, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:899852>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2016.

Ana Huđek
624/MB

**POVEZANOST JEDNOSTRUKOG
NUKLEOTIDNOG
POLIMORFIZMA rs17817449 U
LJUDSKOM GENU *FTO* S
TJELESNOM MASOM U ŽENA
ZAGREBAČKE ŽUPANIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom prof.dr.sc. Višnje Bačun-Družina, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Najprije bih se zahvalila svojoj obitelji na potpori i velikom strpljenju tijekom nastajanja ovog rada kao i na pruženoj ljubavi i povjerenju.

Također, veliko hvala mojoj mentorici prof. dr.sc. Višnji Bačun-Družina na pruženoj prilici da ovaj rad dobije strukturu i smisao, nesebičnom dijeljenju znanja i životnom iskustvu.

Hvala cijelom Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu na suradnji, ugodnom boravku i stečenim znanjima.

Hvala svima koji su na bilo koji način dali posebnu notu ovom radu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

POVEZANOST JEDNOSTRUKOG NUKLEOTIDNOG POLIMORFIZMA rs17817449 U LJUDSKOM GENU *FTO* S TJELESNOM MASOM U ŽENA ZAGREBAČKE ŽUPANIJE

Ana Huđek, 624/MB

Sažetak: U današnjem industrijaliziranom svijetu, pretilost postaje jedna od glavnih prijetnji za zdravlje odraslih ljudi, adolescenata i djece jer nepovoljno utječe na kvalitetu života i očekivani životni vijek ljudi te potiče razvoj različitih bolesti. Etiologija pretilosti je vrlo složena i veliki broj kombinacija okolišnih faktora i faktora načina života može uzrokovati različite genetičke polimorfizme. Gen *FTO* (*engl.* Fat mass and obesity-associated gene) ističe se kao značajniji genetički uzročnik poligenske pretilosti i faktor utjecaja na indeks tjelesne mase (*engl.* Body Mass Indeks, BMI). Cilj ovog rada bio je utvrditi povezanost jednostrukog nukleotidnog polimorfizma (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism, SNP) rs17817449 u genu *FTO* s BMI-om i razlikom u sastavu mikroorganizama usne šupljine u žena Zagrebačke županije normalnog BMI-a i BMI-a većeg od 30 kg m⁻², a što je već prethodno dokazano za populaciju Europe, Koreje, Sjeverne Amerike i Indije bez istraživanja mikrobioma usta. Ovo istraživanje je prvo takve vrste provedeno samo na ženskoj populaciji u kontinentalnoj Hrvatskoj. Za genotipizaciju je korištena metoda lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu i uočena je veća učestalost rizičnog alela G polimorfizma rs17817449 u skupini pretilih žena te njegova povezanost s BMI-om i povišenim krvnim tlakom. Također, uočene su razlike u mikrobiomu usne šupljine te razlike u životnim i prehrambenim navikama između ispitivanih skupina žena. Dobiveni rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju uloge polimorfizma rs17817449 gena *FTO*, mikrobioma usta i načina života u razvoju pretilosti kod žena te samim time pomoći u razvoju terapijskih strategija u borbi protiv pretilosti i bolesti uzrokovanih pretilošću.

Ključne riječi: *pretilost, gen FTO, rs17817449, mikrobiom usta, žene Zagrebačke županije*

Rad sadrži: 46 stranica, 12 slika, 12 tablica, 55 literaturnih navoda, 4 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof.dr.sc. Višnja Bačun-Družina*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos*
2. Prof.dr.sc. *Višnja Bačun-Družina*
3. Izv.prof.dr.sc. *Ksenija Durgo*
4. Doc.dr.sc. *Jurica Žučko* (zamjena)

Datum obrane: 04. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ASSOCIATION STUDY OF *FTO* GENE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM rs17817449 WITH BODY MASS IN WOMEN FROM THE ZAGREB REGION

Ana Huđek, 624/MB

Abstract: In today's industrialized world, obesity has become one of the major threats to the health of adults, adolescents and children. Obesity adversely affects the quality of life and life expectancy of people as well as the development of various diseases. The etiology of obesity is very complex, and any combination of environmental factors and lifestyle factors can cause a variety of genetic polymorphisms. *FTO* (Fat mass and obesity-associated) gene is the most significant genetic cause of polygenic obesity and factor than can affect the body mass index (BMI). The aim of this study was to show the connection between *FTO* gene rs17817449 SNP with BMI and the difference in the oral composition of microorganisms in women from the Zagreb region with normal BMI and BMI greater than 30 kg m⁻², what has already been proven for the population of Europe, Korea, North America and India without oral microbiome research. This study is the first research on the female population in the continental Croatia. For genotyping was used real time PCR method. In DNA of obese women from Zagreb region was observed a higher frequency of the *FTO* gene rs17817449 SNP risk allele G and its association with BMI and hypertension. Furthermore, differences were detected in the oral microbiome and in the dietary habits between the two test groups. The results should contribute to a better understanding of the role *FTO* gene rs17817449 SNP, oral microbiome and lifestyle in the development of obesity and help in developing strategies for treating obesity.

Keywords: *obesity, FTO gene, rs17817449, oral microbiome, women from the Zagreb Region*

Thesis contains: 46 pages, 12 figures, 12 tables, 55 references, 4 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Višnja Bačun-Družina, Full Professor*

Reviewers:

1. PhD *Blaženka Kos*, Full Professor
2. PhD *Višnja Bačun-Družina*, Full Professor
3. PhD. *Ksenija, Durgo*, Associate professor
4. PhD. *Jurica, Žučko*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 04 July 2016

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Pretilost kao globalni problem modernog doba	4
2.2. Genetska podloga pretilosti	5
2.2.1. Gen <i>FTO</i>	6
2.2.2. Polimorfizmi gena <i>FTO</i>	8
2.2.3. Jednostruki nukleotidni polimorfizam rs17817449 gena <i>FTO</i>	9
2.3. Epigenetika i utjecaj okolišnih čimbenika na razvoj pretilosti	10
2.4. Utjecaj mikrobioma usne šupljine na razvoj pretilosti.....	11
2.5. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. Genotipizacija.....	14
3.1.1. Izolacija DNA iz krvi	14
3.1.2. Metoda lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu	16
3.2. Izolacija mikroorganizama iz sline	17
3.2.1. Hranjive podloge	17
3.2.2. Izolacija čiste kulture.....	18
3.2.3. Laboratorijska oprema za uzgoj i praćenje rasta bakterijskih stanica	18
3.3. Identifikacija mikroorganizama spektrometrijom masa.....	19
3.4. Obrada podataka	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Genotipizacija polimorfizma rs17817449 u genu <i>FTO</i>	21
4.2. Izolacija i identifikacije mikroorganizama iz sline	25
4.3. Statistička obrada anketnih upitnika	32
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	40
7. PRILOZI.....	47
7.1. Popis i objašnjenje kratica	47
7.2. Anketni upitnik	48
7.3. Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju – kontrolna skupina.....	50
7.4. Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju – skupina pretilih	53

1. UVOD

Pretilost je dosegla razmjere epidemije i dalje raste alarmantnom brzinom obuhvaćajući ljude različite dobi u zemljama diljem svijeta. Etiologija pretilosti je vrlo složena i veliki broj kombinacija okolišnih čimbenika i čimbenika načina života može uzrokovati različite genetičke polimorfizme. Do danas, gen *FTO* (*engl.* Fat mass and obesity-associated gene) se ističe kao najznačajniji genetički uzročnik poligenske pretilosti, a rizični aleli različitih *FTO* polimorfizama koji obuhvaćaju područje introna 1 i egzona 2 povezani su s pretilošću i povišenim indeksom tjelesne mase (*engl.* Body Mass Indeks, BMI). Različita istraživanja su pokazala značajnu povezanost polimorfizma rs17817449 gena *FTO* s BMI-om u Europi i Sjevernoj Americi (Price i sur., 2008; Hubacek i sur., 2008; Dina i sur., 2007; Frayling, 2007; Hunt i sur., 2008), Koreji (Cha i sur., 2008), sjevernoj Indiji (Prakash i sur., 2011) i na otoku Hvaru (Zhang i sur., 2010), ali nije pronađena povezanost za Afričku Ameriku (Wing i sur., 2009), Kinu (Li i sur., 2008) i Japan (Horikoshi i sur., 2007). Također, u tim radovima, pronađena je povezanost ovog polimorfizma s povišenom glukozom u krvi, rezistencijom na inzulin, postotkom masnog tkiva i krvnim tlakom.

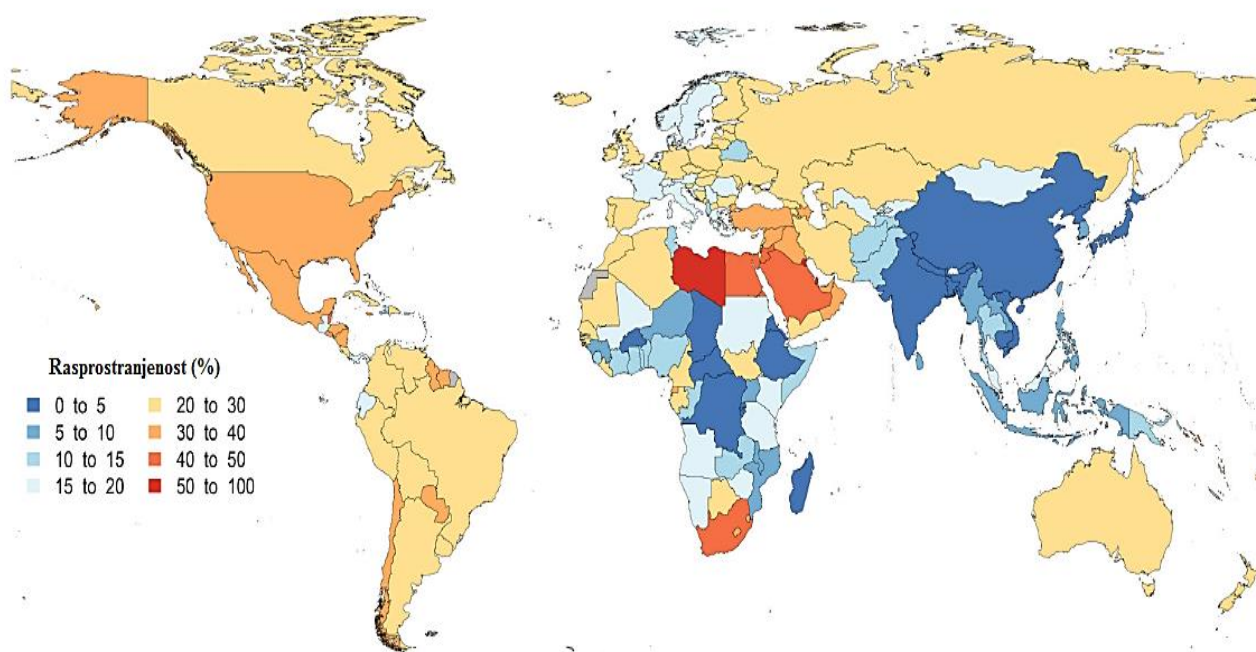
Mnoga istraživanja su jednoglasno ukazala na isti skup okolišnih faktora koji potiču razvoj pretilosti, a to su visokokalorična prehrana, sjedilački način života i okolišni ksenobiotici nazvani spojevi koji potiču debljinu (*engl.* obesogens). Isto tako, pretpostavlja se da slina može služiti kao osjetljivo i neinvazivno mjesto za istovremeno praćenje mikrobnih i okolišnih faktora čije su interakcije temelj zdravlja i bolesti domaćina (Yang i sur., 2014). Mikrobiota sline potencijalni je dijagnostički indikator različitih bolesti. Na primjer, povećani broj bakterija *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* i *Streptococcus mitis* u slini povezan je s pojavom oralnih tumora (Mager i sur., 2005), a povišena razina bakterija *Selenomonas noxia* povezana je s pretilošću u žena (Goodson i sur., 2009).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi povezanost jednostrukog nukleotidnog polimorfizma (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism, SNP) rs17817449 u genu *FTO* s indeksom tjelesne mase (*engl.* Body Mass Index, BMI) žena Zagrebačke županije većim od 30 kg m⁻² te uočiti da li se mikroorganizmi izolirani iz sline pretilih žena na LB kompletnoj hranjivoj podlozi razlikuju u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, utvrditi razlike u distribuciji pojedinog genotipa polimorfizma rs17817449 unutar dvije ispitivane skupine žena s obzirom na BMI metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (*engl.* real time polymerase chain reaction, RT PCR) i pronaći povezanost genotipova s BMI-om, životnim navikama, mikrobiomom usne šupljine i bolestima povezanim s pretilošću.

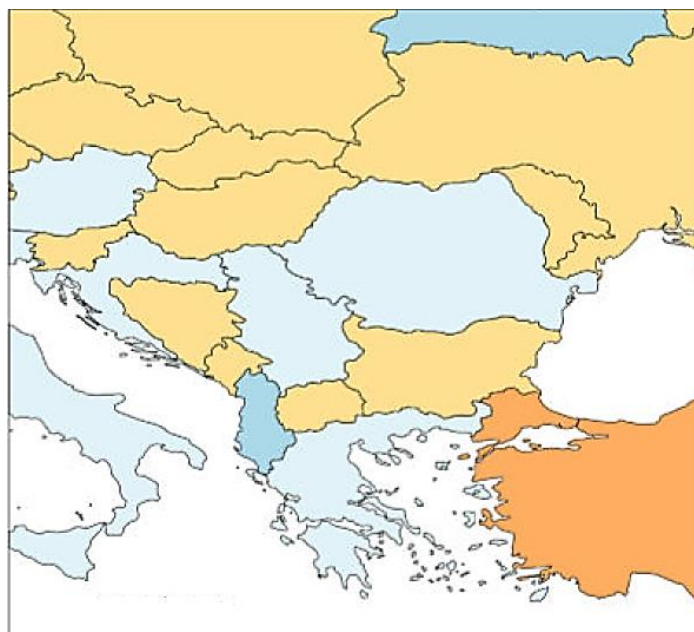
2. TEORIJSKI DIO

U današnjem industrijaliziranom svijetu, pretilost postaje jedna od glavnih prijetnji za zdravlje odraslih ljudi, kao i adolescenata te djece. Rastuća pojava pretilosti bez znakova smanjivanja i činjenica da je kontroliranje pretilosti uglavnom neučinkovito, otvaraju nova područja istraživanja kao što je ispitivanje gena povezanih s pretilošću, utjecaj okoliša te međudjelovanje genetskih i okolišnih čimbenika s namjerom formiranja personalizirane medicine i prehrane. Pretilost simbolizira prekomjerna akumulacija masnoće i nedavno je priznata kao 5. uzrok na ljestvici najčešćih uzročnika smrti u svijetu od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO). Pojam „pretile osobe“ dodijeljen je pojedincima čiji indeks tjelesne mase (engl. Body Mass Index, BMI) premašuje 30 kg m^{-2} .

Danas je više od trećine američke populacije pretilo što Ameriku rangira na prvo mjesto ljestvice zemalja u svijetu s najviše pretilih stanovnika. Prosječan BMI američke populacije je u rasponu koji označava prekomjernu težinu i iznosi $28,1 \text{ kg m}^{-2}$. Više od 30% Amerikanaca ima $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$, a više od 64% ima $\text{BMI} > 25 \text{ kg m}^{-2}$ (Price i sur., 2008). Prema podacima iz 2015. godine Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Hrvatska je sedma u Europi po broju pretila djece, a u posljednjih deset godina broj se utrostručio. Isto tako, statistika pokazuje da 63% muškaraca i 54% žena u Hrvatskoj ima prekomjernu težinu, a pretilo ih je 20%, podjednako muškaraca i žena pa se prema tome Hrvatska ubraja u "debele nacije". Na ljestvici debelih država u Europi Hrvatska je na petom mjestu, a u cijelome svijetu, između 194 obrađene zemlje svijeta, Hrvatska zauzima visoko 71. mjesto. Na slici 1 prikazana je rasprostranjenost pretilih žena ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$) starijih od 20 godina u zemljama diljem svijeta, a na slici 2 prikazana je rasprostranjenost pretilih žena ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$) starijih od 20 godina u zemljama jugoistočne Europi gdje se nalazi i Hrvatska. Ostatak svijeta prati isti trend što pokazuje činjenica da se globalna stopa pretilosti od 1980. godine gotovo udvostručila. Posljedično tome, posljednja predviđanja za buduće generacije su smanjenje očekivanog trajanja života i kvalitete života.



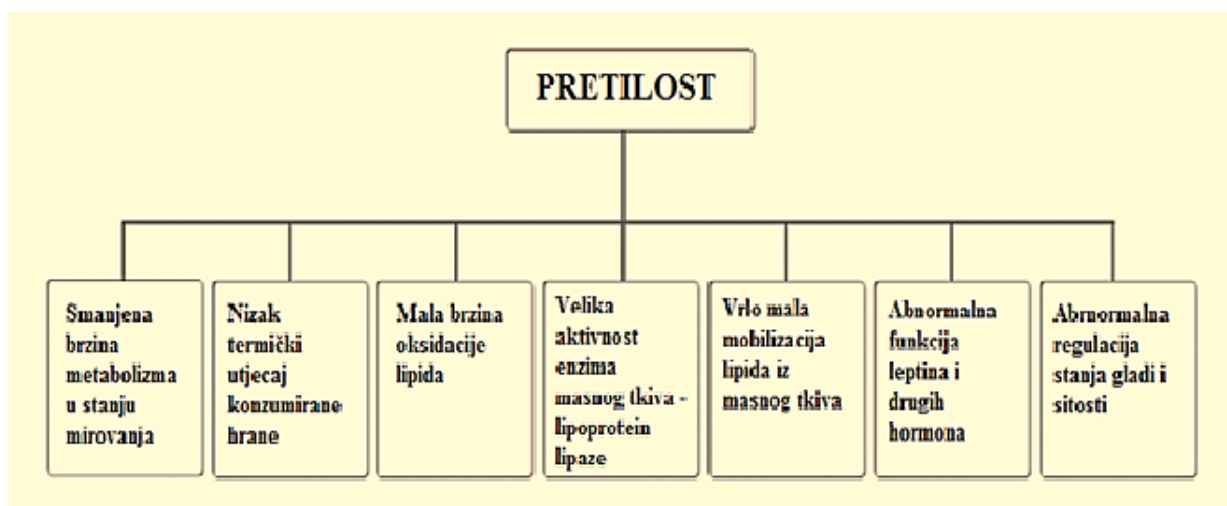
Slika 1. Prikaz rasprostranjenosti (%) pretilih ženskih osoba ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$) starijih od 20 godina u zemljama diljem svijeta. Na legendi su označeni intervali BMI-a koje pojedina boja prikazuje na karti (preuzeto i prilagođeno prema Europe PMC Funders Group, 2014).



Slika 2. Prikaz rasprostranjenosti (%) pretilih ženskih osoba ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$) starijih od 20 godina u zemljama jugoistočne Europe gdje se vidi i status Hrvatske kao zemlje rangirane na visoko peto mjesto na ljestvici debelih država u Europi. Ova slika predstavlja povećani dio slike 1 i bojama su označeni intervali BMI-a prema legendi na slici 1 (preuzeto i prilagođeno prema Europe PMC Funders Group, 2014).

2.1. Pretilost kao globalni problem modernog doba

Pretilost je rezultat načina života povezan s unosom hrane povećanih kalorijskih vrijednosti i nedostatkom tjelesne aktivnosti. Visokokalorična hrana povećava unos energije, a smanjena tjelesna aktivnost smanjuje potrošnju energije što rezultira pozitivnom energetsom bilancom. Kao rezultat, dolazi do pohranjivanja energije u masnom tkivu što dovodi do povećanja količine masnog tkiva i pojave fenotipa pretilosti. Pretilost nepovoljno utječe na zdravlje, kvalitetu života i očekivani životni vijek ljudi jer povećava rizik pojave velikog broja bolesti kao što je dijabetes tipa II, kardiovaskularne bolesti, hipertenzija, hiperglikemija, bolesti jetre, astma, osteoartritis, različiti tumori, kronični mišićni problemi i problemi s kožom. Nedavna istraživanja su pokazala da proces arterioskleroze počinje u ranoj dobi i pozitivno je povezan s pretilošću (Mirhosseini i sur., 2012). Na slici 3 prikazane su fiziološke promjene u organizmu povezane s pretilošću u ljudi, a one mogu biti uzrokovane različitim čimbenicima kao što su genetičke i epigenetičke predispozicije te metabolički, hormonalni, okolišni, socijalni i kulturološki aspekti. Genski lokusi koji su povezani s fenotipom pretilosti, smješteni su na svim kromosomima, osim na kromosomu Y. Postoje dva tipa pretilosti s obzirom na raspodjelu masnog tkiva u pretilih osoba: (1) android pretilost koju karakterizira taloženje masti u gornjoj (središnjoj) tjelesnoj regiji, uglavnom oko područja trbuha i (2) ginoid pretilost koju karakterizira taloženje masti u bokovima i bedrima (Mirhosseini i sur., 2012). Android pretilost je povezana s kardiovaskularnim bolestima, krvnim tlakom, rezistencijom na inzulin i dijabetesom tipa II.



Slika 3. Fiziološke promjene u organizmu čovjeka povezane s pretilošću koje mogu biti posljedica genetičke i epigenetičke predispozicije te metaboličkih, hormonalnih, okolišnih, socijalnih i kulturoloških aspekata. Navedene promjene mogu nepovoljno utjecati na zdravlje, kvalitetu života i očekivani životni vijek ljudi jer povećavaju rizik pojave velikog broja bolesti (preuzeto i prilagođeno prema Bašić i sur., 2012).

Kao mjera pretilosti, najčešće se koristi indeks tjelesne mase zbog svoje jednostavnosti utvrđivanja, a definira se kao težina osobe u kilogramima podijeljena s kvadratom visine osobe u metrima (kg m^{-2}). Iako je BMI samo komparativni broj, mnoga istraživanja su pokazala da BMI dobro korelira sa sadržajem masnog tkiva u velikoj većini ljudi (Xia i Grant, 2013). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji osobe BMI-a između 25 i 29,9 kg m^{-2} definiraju se kao osobe s prekomjernom tjelesnom težinom, a osobe kojima je BMI jednak ili iznad 30 kg m^{-2} smatraju se pretilim osobama. Osobe kojima je BMI ispod 18,5 kg m^{-2} smatraju se pothranjenima, a između 18,5 i 24,9 kg m^{-2} osobe s normalnom tjelesnom težinom.

Prekomjerna tjelesna težina i pretilost te s njima povezani zdravstveni problemi imaju značajan ekonomski utjecaj na izravne i neizravne medicinske troškove. Izravni medicinski troškovi mogu uključivati preventivne i dijagnostičke usluge vezane za liječenje pretilosti, a neizravno troškovi se odnose na gubitak prihoda od smanjene produktivnosti ljudi, ograničene aktivnosti i bolovanja što potvrđuje podatak da 10 do 15% ukupnih zdravstvenih troškova razvijenih zemalja se potroši na liječenje dijabetesa tipa II. Primjerice, za liječenje dijabetesa tipa II u Hrvatskoj se godišnje troši 2,5 milijuna kuna odnosno 11,49% proračuna Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje. S obzirom na složenost pretilosti, nije iznenađujuće da se većina današnjih terapija koje za cilj imaju ublažiti faktore rizika pokazala nedjelotvornim. Korištenjem različitih strategija moguć je kratkoročan gubitak težine dok se održivi gubitak težine za mnoge pokazao nedostižnim.

2.2. Genetska podloga pretilosti

Unatoč značajnom genetičkom doprinosu, identifikacija povezanosti gena s pretilošću otežana je dugi niz godina zbog ograničenja razumijevanja arhitekture ljudskog genoma i bioloških metaboličkih puteva povezanih s pretilošću. Pojavom GWAS (*engl.* genome-wide association approach) pristupa u tehnologiji genotipizacije, dramatično se povećala učestalost otkrića gena povezani s gomilanjem masnog tkiva. Identificirano je približno 2 000 genskih lokusa povezanih s više od 300 bolesti uključujući najmanje 75 povezanih s pretilošću (Lu i Loos, 2013). Unatoč velikom napretku, svi značajni lokusi otkriveni do danas zajedno objašnjavaju otprilike 10% nasljeđivanja dok je ostatak još uvijek nejasan.

Genetička nasljednost pretilosti procjenjuje se na 40-70% što ukazuje na to da se polovica individualne varijacije u tjelesnoj težini može pripisati genima dok je druga polovica zbog utjecaja okolišnih čimbenika (Xia i Grant, 2013). Razlikujemo dva glavna tipa pretilosti: monogensku i poligensku pretilost. Monogenska pretilost je primarno uzrokovana mutacijom u jednom genu i javlja se u malom broju slučajeva s ekstremno ranom pojavom pretilosti.

Istraživanja ovog rijetkog oblika pretilosti su otkrila mutacije u manje od desetak gena kao što je *LEP* koji kodira za leptin i *LEPR* koji kodira za receptor leptina (Hinney i sur., 2010) i one rezultiraju smanjenom sitošću, povećanom potrebom unosa hrane i skladištenjem energije u obliku masnog tkiva što u konačnici dovodi do pojave pretilosti. Na primjer, leptin (*LEP*) je vitalni homeostatski hormon koji se izlučuje u krv preko masnog tkiva kako bi signalizirao hipotalamusu da je organizam dovoljno opskrbljen energijom. Receptor za leptin (*LEPR*) je glavni medijator aktivnosti leptina. Poremećaj u ovom signalnom putu preko mutacija u genima *LEP* i *LEPR* će utjecati na kontrolu apetita, unos hrane i energetske ravnotežu (Hinney i sur., 2010). Poligenska pretilost je uzrokovana varijacijama DNA u multiplim genima istovremeno. Jedna poligenska varijanta sama po sebi vrlo malo doprinosi razvoju pretilosti, ali u kombinaciji s drugim varijantama ima veliki utjecaj. Svaka varijanta povećava rizik pojave pretilosti te se procjenjuje da postoji ukupno 100 takvih gena s malim utjecajem na pretilost (Hinney i Hebebrand, 2008). Gen *FTO* (*engl.* Fat mass and obesity associated gene) i gen za receptor melanokortina 4 su geni s malim, ali ponovljivim i jasnim utjecajem na BMI i pretilost (Dina i sur., 2007).

Nutrigenomika opisuje kako preinake u individualnoj prehrani mogu poboljšati zdravlje i pomoći u prevenciji pretilosti razumijevanjem učinaka međudjelovanja hrane i porasta tjelesne težine. Nutrigenetika uključuje retrospektivno istraživanje kako genetičke varijacije kao što su jednostruki nukleotidni polimorfizmi (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP), uzrokuju razliku odgovora na specifičnu prehranu i eventualno vode do promjene zdravstvenog stanja i statusa bolesti u pojedinaca (Lau i sur., 2008).

2.2.1. Gen *FTO*

Gen *FTO* (*engl.* Fat mass and obesity-associated gene) je prvi gen identificiran kao poveznica s uobičajenim oblicima pretilosti. Smješten je na 16. kromosomu na regiji 16q12.2 u ljudi, a njegov mehanizam djelovanja povezan s pretilošću još uvijek nije jasan. Otkriven je 2007. godine te se od tada koristi kao najznačajniji i najčešće ispitivan gen u istraživanjima fenotipova pretilosti. Komparativna istraživanja genoma pokazala su da se homolog gena *FTO* može naći u kralješnjacima i morskim algama, ali ih nema u biljkama, gljivama ni beskralješnjacima (Xia i Grant, 2013).

Ubrzo nakon identifikacije, koristeći bioinformatičke alate, određeno je da je *FTO* protein 2-oksoglutarat (2-OG) Fe (II) ovisna demetilaza srodna bakterijskoj DNA metilazi AlkB i AlkB homologima u sisavaca (*ABH1* i *ABH2*; Loos & Yeo, 2014). U bakterija i sisavaca, AlkB je enzim koji popravljao oštećenja DNA na način da katalizira 2-OG ovisnu demetilaciju oštećenih

DNA supstrata. *In vitro*, rekombinantni FTO može katalizirati Fe (II) i 2-OG ovisnu demetilaciju 3-metiltimina u jednostrukoj uzvojnici DNA uz istovremenu produkciju sukcinata, formaldehida i CO₂ te 3-metiluracila i 6-metiladenozina u jednostrukoj uzvojnici RNA, pokazujući potencijalnu ulogu u popravku i modifikaciji nukleinskih kiselina (Gerken i sur., 2007). Dostupna je kristalna struktura proteina FTO koja pokazuje da sadrži N-terminalnu katalitičku domenu i C-terminalnu domenu nepoznate funkcije (Han i sur., 2010). Katalitički aktivno mjesto sadrži pet aminokiselinskih ostataka esencijalnih za obavljanje katalitičke funkcije, histidin (H) i aspartat (D) koji vežu Fe (II) te histidin (H) i dva arginina (R) potrebna za vezanje 2-OG (Meyre i sur., 2010). Protein FTO demetilira 6-metiladenozin što je najčešća modifikacija nukleozida pronađena u mRNA s 50 puta većim afinitetom nego za 3-metiluracil (Jia i sur., 2011). Ti rezultati ukazuju na ulogu proteina FTO u popravku ili modifikaciji nukleinskih kiselina, a postoji dokaz da neučinkovitost genomske procesa popravaka vodi do pretilosti i metaboličkih sindroma (van der Pluijm i sur., 2007).

Gen *FTO* je eksprimiran u jezgri stanica gotovo svih tkiva u ljudskom organizmu. Najviša razina ekspresije pronađena je u mozgu, posebice u hipotalamusu za kojeg se zna da ima ulogu u kontroli energetske ravnoteže i prehrambenih navika, hipofizi i nadbubrežnim žlijezdama. To ukazuje na potencijalnu ulogu gena *FTO* u hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda osi uključenoj u regulaciju tjelesne težine. Uloga gena *FTO* u regulaciji energetske ravnoteže, dokazana je istraživanjima provedenim na ljudima, miševima i glodavcima koja su pokazala da je *FTO* mRNA ekspresija regulirana prehranom (Tung i sur., 2010), razinom cirkulirajuće glukoze (Poritsanos i sur., 2011), statusom težine i potrošnjom energije (Harbron i sur., 2014). Također je dokazano da utišana (*engl.* knockdown) ekspresije gena *FTO* povećava koncentraciju ATP-a u živčanim stanicama, ali smanjuje njegovu koncentraciju u masnim stanicama posredujući u mehanizmu stanica specifične kontrole pretjerane proizvodnje energije. Istraživanje na modelu miša pokazalo je da delecija gena *FTO* rezultira normalnim embrionalnim razvojem, ali visokom postnatalnom smrtnošću, znatnom retardacijom, smanjenjem masnog tkiva i pretilosti (McMurray i sur., 2013). Isto tako, uklanjanje gena *FTO* u odraslim jedinkama miševa dovelo je do smanjenja početne težine. Miševi kojima su uklonjeni geni *FTO*, tijekom cijelog svog života bili su zaštićeni od prehranom inducirane pretilosti iako im je prehrana uključivala visoke koncentracije masnoće dok je takva prehrana uzrokovala pojavu fenotipa pretilosti u miševa s povećanom ekspresijom gena *FTO* (Church i sur., 2010). Smatra se da protein FTO utječe na razinu adrenalina, iskorištenje proteina i/ili masti te potrošnju energije. Mutacije u genu *FTO* u ljudi koje uzrokuju gubitak funkcije uzrokuju složen fenotip postnatalnog usporavanja rasta, mikrocefalije, smanjenje funkcionalnosti mozga i karakterističan dizmorfizam

lica (Boissel i sur., 2009), a u nekih čak i strukturne malformacije mozga, srčane mane te genitalne anomalije.

2.2.2. Polimorfizmi gena *FTO*

Jednostruki nukleotidni polimorfizam (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) je varijacija na jednom nukleotidu na određenom mjestu u genomu, gdje je svaka varijacija prisutna u značajnoj mjeri u populaciji. Na primjer, na određenoj poziciji dušične baze u većini pojedinaca pojavljuje se jedna baza, a u nekim pojedincima prisutna je druga baza i tada kažemo da je SNP moguć u dvije varijacije. SNP-ovi su često uzročnici različitih bolesti.

Do danas je napravljen velik broj istraživanja o povezanosti polimorfizama gena *FTO* i pretilosti te je pokazano da je više od 60 polimorfizama u ovom genu statistički značajno povezano s pretilošću (Jacobsson i sur., 2012). SNP-ovi gena *FTO* povezani s pretilošću su intronski i mogu vršiti funkcionalne učinke kroz promijenjenu ekspresiju gena *FTO*. S obzirom da se SNP-ovi nalaze u intronima, manja je vjerojatnost da će uzrokovati funkcionalne mutacije gena, a veća je vjerojatnost da će imati ulogu u povećanoj ili smanjenoj transkripciji. Rizični aleli su povezani s povećanim unosom hrane, energije i masti te specifičnim sklonostima hrani s visokim udjelom masnoće (McCaffery i sur., 2012). Također, postoje dokazi da nositelji polimorfizama u genu *FTO* konzumiraju više hrane i pokazuju promjene u preferiranju određene hrane sugerirajući tako da aktivnost gena *FTO* može utjecati na centralnu osjetljivost sastava mikronutrijenata u hrani. Bez obzira na njegovu ulogu, gen *FTO* se ne može smatrati farmaceutskom metom u prevenciji ili terapiji pretilosti jer ima sveprisutnu ekspresiju i njegova delecija u odraslih ljudi rezultira gubitkom mišićne mase (Loos i Yeo, 2014).

GWAS istraživanjima pokazano je da najjaču povezanost s pretilošću imaju polimorfizmi rs9939609, rs9930506, rs1421085, rs17817449 i rs1121980. Svi ovi polimorfizmi se nalaze u prvom intronu gena *FTO*, ali njihov fiziološki učinak koji doprinosi razvoju pretilosti je još uvijek nepoznat (Frayling i Ong, 2011). Također, istraživanje u kojem su sudjelovali stanovnici Hvara, pokazalo je da 8 ispitivanih SNP-ova u genu *FTO* (rs9939973, rs1421085, rs1121980, rs17817449, rs8050136, rs3751812, rs9939609 i rs7190492) ima značajnu povezanost s tjelesnom masom, BMI-om, opsegom struka i opsegom kukova (Zhang i sur., 2010).

2.2.3. Jednostruki nukleotidni polimorfizam rs17817449 gena *FTO*

Mnoga istraživanja su pokazala značajnu povezanost polimorfizma rs17817449 s pretilošću diljem svijeta. Nerizični alel ovog polimorfizma je T, a rizični alel G. Homozigot GG za rizični alel predstavlja 1,7 puta veći rizik od pretilosti dok heterozigot TG predstavlja 1,3 puta veći rizik od pretilosti u usporedbi s normalnim homozigotom TT.

Povezanost pretilosti i polimorfizma rs17817449 gena *FTO* pronađena je u svim analiziranim populacijama Europe i Sjeverne Amerike (Price i sur., 2008; Hubacek i sur., 2008; Dina i sur., 2007; Frayling, 2007; Hunt i sur., 2008), ali nije pronađena za Afričku Ameriku (Wing i sur., 2009), Kinu (Li i sur., 2008) i Japan (Horikoshi i sur., 2007) dok su Cha i suradnici (2008) uočili značajnu povezanost s povećanim BMI-om u korejskoj populaciji.

Istraživanje Prakasha i suradnika (2011) sastojalo se od analize povezanosti polimorfizma rs17817449 gena *FTO* i pretilosti te pretilošću povezanih fenotipova u sjevernoj Indiji. Utvrđena je značajna povezanost analiziranog SNP-a s BMI-om, povišenom glukozom u krvi, rezistencijom na inzulin i postotkom masnog tkiva. Također, pokazana je povezanost s povišenim krvnim tlakom. Frekvencija rizičnog alela G bila je 47,2%, slično kao i u populacijama europskog podrijetla (44,7%). Nije pronađena povezanost s povišenim koncentracijama kolesterolom i trigliceridima.

U istraživanju u kojem su sudjelovale sestre slične dobi, ali fenotipski vrlo različite što se tiče tjelesne težine, pronađeno je da se sestre razlikuju u frekvencijama alela i genotipova te je pronađena vrlo značajna povezanost pretilosti s rizičnim alelom u SNP-u rs17817449 gena *FTO*. Sve mršave sestre su imale BMI manji od 25 kg m^{-2} i nikad tijekom života nisu bile pretile, dok su pretile sestre imale BMI veći ili jednak 35 kg m^{-2} . Unutar kontrolne skupine mršavih sestri frekvencije genotipova su bile slične dok je frekvencija rizičnog alela u skupini pretilih sestri bila 9-12% viša nego u kontrolnoj skupini (Price i sur., 2008).

Također, pronađeno je da polimorfizam rs17817449 nije povezan s raspodjelom masnog tkiva s obzirom na vrstu pretilosti, ali da povećava taloženje masti u prsnoj regiji i u području dojki u ispitivanoj populaciji Meksičkih žena (Zermeño-Rivera i ostali, 2014).

2.3. Epigenetika i utjecaj okolišnih čimbenika na razvoj pretilosti

Epigenetika je znanost o nasljednim promjenama u ekspresiji gena ili staničnom fenotipu koje nisu uzrokovane direktnim promjenama u slijedu nukleotida u molekuli DNA. Uključuje mehanizme metilacije DNA i modifikacije histone od kojih oba mehanizma pozitivno ili negativno reguliraju ekspresiju gena bez promjena u linearnoj sekvenci DNA. Genomska analiza određenih populacija ljudi, utvrdila je nekoliko genetskih lokusa koji podliježu epigenetičkim modifikacijama i povezani su s pretilošću. To upućuje na činjenicu da je indeks tjelesne mase također djelomično reguliran epigenetičkim mehanizmima koji još moraju biti do kraja razjašnjeni (Xia i Grant, 2013). Otkriveno je stotine gena s promijenjenim epigenetičkim varijacijama tkivima povezanim s pretilošću i visokokaloričnom prehranom, nedostatkom tjelesne aktivnosti i izloženošću kemijskim spojevima iz okoliša. S obzirom da se utjecajem prehrane ne očekuju promjene u sekvencama DNA, logičan izvor transkripcijskih varijacija je epigenetika koja uključuje DNA metilaciju, modifikaciju histona, remodeliranje kromatina i microRNA. Nedavne GWAS studije su pokazale da tjelesna aktivnost i prehrana s visokim udjelom masti mogu mijenjati mehanizme metilacije DNA u tkivima važnim za održavanje energetske ravnoteže kao što su skeletni mišići i masno tkivo i te epigenetičke promjene mogu utjecati na gubitak ili dobitak tjelesne težine.

Mnogim istraživanjima dokazano je da na razvoj pretilosti utječe isti skup okolišnih faktora kao što su visokokalorična prehrana, sjedilački način života i okolišni ksenobiotici. Globalni pomak modernoj prehrani s visokom razinom zasićenih masti i šećera (prvenstveno fruktoza i saharoza) pomiče metaboličku ravnotežu skladištenju energije u masnom tkivu vodeći do povećanja količine masnog tkiva i pojave pretilosti. Takva prehrana uzrokuje smetnje u metaboličkim putevima kao što je metabolizam lipida i oksidativna fosforilacija, utječe na gene uključene u neuropeptidno signaliziranje i adheziju stanica u hipotalamusu. Izloženost okolišnim spojevima koji potiču debljinu (*engl.* obesogens), posebice tijekom ranog razvoja, može pogoršati učinke pretilosti inducirane energetski bogatom prehranom i smanjenom tjelesnom aktivnošću.

Spojevi koji uzrokuju debljanje su strane kemikalije (*engl.* endocrine disrupting chemicals, EDCs) koje ometaju normalni razvoj i ravnotežu metabolizma lipida, lipogenezu i pohranu masti te se smatraju uzročnicima pretilosti i dijabetesa tipa II. Također, spojevi koji uzrokuju debljanje mogu utjecati na normalnu funkciju endokrinog sustava ometajući ravnotežu sustava hormona koji reguliraju vitalne funkcije organizma kao što je rast, odgovor na stres, ponašanje, sposobnost reprodukcije, proizvodnja inzulina i metabolička brzina. Epidemiološka istraživanja na miševima su pokazala da izloženost „obesogenima“ tijekom razvoja fetusa je povezana s povećanom

tjelesnom masom i pretilošću kasnije u životu. U skupinu „obesogena“ ubrajamo okolišna zagađivala s endokrino-ometajućim svojstvima kao što su fungicidi, pesticidi, antifungalna sredstva te bisfenol A (BPA) koji je komponenta polikarbonatne plastike i često se koristi u proizvodnji bočica za djecu i ambalaža za piće. Pokazalo se da BPA uzrokuje abnormalnosti u reproduktivnom tkivu i tkivu mliječnih žlijezda, a izlaganje miševa povišenim koncentracijama BPA tijekom prenatalnog i neonatalnog razdoblja rezultiralo je povećanjem tjelesne mase (Wetherill i sur., 2007).

2.4. Utjecaj mikrobioma usne šupljine na razvoj pretilosti

Mikrobiom usta je složeni ekološki sustav u kojem je identificirano preko 700 različitih vrsta mikroorganizama. Neke od dominantnih skupina su *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Actinomyces* i drugi obligatni anaerobi (Avila i sur., 2009). Ti mikroorganizmi održavaju mutualističke odnose s domaćinom sprječavajući patogene vrste da se vežu na površinu sluznice i nastane usnu šupljinu dok je slina koju proizvodi domaćin izvor nutrijenata posebice proteina i glikoproteina kojima se mikroorganizmi hrane. Mikroorganizmi u usnoj šupljini proizvode enzime kao što su proteaze, lipaze i glikozid hidrolaze kojima razgrađuju i koriste polimere proizvedene od strane domaćina. Oralna mikroflore može uzrokovati dentalne plakove, zubni karijes i paradontalne bolesti. Oralne bolesti u pojedinaca mogu biti uzrokovane nedostatkom oralne higijene u kombinaciji s čimbenicima koji utječu na strukturu mikrobne zajednice u ustima kao što je prehrana. Povezanost između paradontalnih bolesti i pretilosti je nedovoljno istražena, međutim utvrđena. Analiza populacije s ili bez paradontalnih bolesti je pokazala da 70% ispitanika s paradontalnim bolestima je pretilo u usporedbi s 37% zdravih pojedinaca (Socransky i Haffajee, 2005).

Slina kontrolira mikrobne zajednice imunoglobulinima i laktoferinima koji sprječavaju rast patogenih mikroorganizama, a također je važna i za tvorbu filma na zubima koji sadrži receptore za vezanje specifičnih mikroorganizama (Marsh, 2000). Fizička okolina kao što je temperatura, redoks potencijal i pH također imaju važnu ulogu u selekciji rastuće oralne mikroflore. Bakterije koriste metodu komunikacije nazvanu osjećaj grupe (*engl.* quorum sensing) koja uključuje oslobađanje posebnih signalnih molekula za komunikaciju s drugim bakterijama. To je posebice važno za rast kolonija i formiranje biofilma. Procijenjeno je da se prosječno 1 g bakterija proguta s 500-1500 mL dnevno proizvedene sline (Socransky i Haffajee, 2005). Mikrobiota sline potencijalni je dijagnostički indikator različitih bolesti. Na primjer, povećani broj bakterija *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* i *Streptococcus mitis* u slini povezan je s pojavom oralnih tumora (Mager i sur., 2005), a povišena razina bakterija *Selenomonas noxia* je povezana s pretilošću u žena (Goodson i sur., 2009). Slina može služiti

kao osjetljivo i neinvazivno mjesto za istovremeno praćenje mikrobnih i okolišnih svojstava čije su interakcije temelj zdravlja i bolesti domaćina (Yang i sur., 2014).

Nekoliko nedavnih istraživanja neizravno podupire hipotezu da su oralne bakterije povezane s pretilošću. Najveći dokazi potječu iz eksperimenata na životinjama. U jednom istraživanju, uspoređivao se utjecaj mikrobiote u crijevima miša na pretilost te je pokazano da je miš bez mikrobiote (*engl.* germ-free) jeo više, ali je manje dobivao na težini od miša inficiranog mikroflorom divljeg miša, a oba potječu iz istog legla. Odrasli inficirani miš je imao 60% više masnog tkiva nego njegov „germ-free“ duplikat. Dokazano je da su za taj efekt odgovorne bakterije iz koljena *Firmicutes*. Zanimljivo je da je jedino *S. noxia* bila značajno povišena u slini (DiBaise i sur., 2008). Iako se ova istraživanja temelje na crijevnim bakterijama, sve gastrointestinalne bakterije prolaze kroz usnu šupljinu u neko vrijeme i neke od njih se tamo mogu i zadržati. Pretpostavljeno je da namjerna manipulacija crijeвне mikrobiologije može biti korisna za kontrolu težine u pretilih pojedinaca.

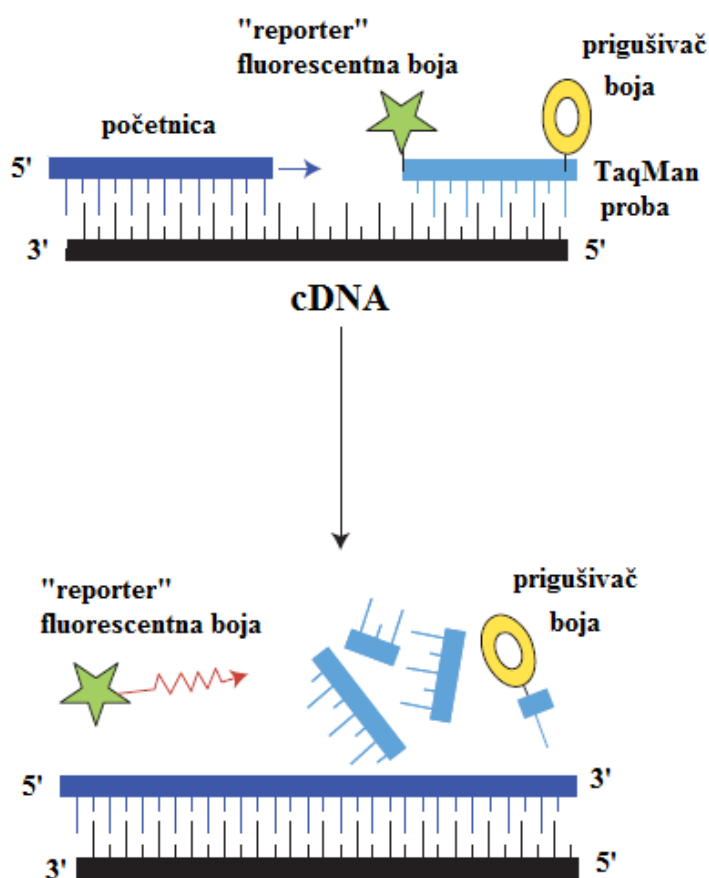
U istraživanju analize bakterija iz sline pretilih osoba BMI-a između 27 i 32 kg m⁻² i osoba normalnog BMI-a, pronađeno je 7 bakterijskih vrsta koje su se učestalije pojavljivale u slini pretilih osoba. Te bakterijske vrste su: *S. noxia*, *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces naeslundii*, *Neisseria mucosa*, *Fusobacteria periodonticum*, *Fusobacteria nucleatum ss vincentii* i *Prevotella melaninogenica*. Od analiziranih osoba, 98.4% osoba veće tjelesne mase imalo je udio bakterije *S. noxia* veći od 1,5%, a u 80,2% osoba normalne mase taj je udio bio manji od 1,5% (Goodson i sur., 2009).

Analizom brisa nosa, ustanovljena je pozitivna povezanost BMI-a i kolonizacije nosa bakterijom *Staphylococcus aureus*. Za svako povećanje BMI-a za 2,5 kg/m² opaženo je povećanje izgleda kolonizacije bakterijom *S. aureus* za 7 % (Olsen i sur., 2013).

2.5. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu ili kvantitativna lančana reakcija polimeraze (*engl.* Real-Time Polymerase Chain Reaction, RT PCR) je laboratorijska metoda u molekularnoj biologiji koja se bazira na lančanoj reakciji polimeraze (PCR). Primjenjuje se za amplifikaciju i istovremenu detekciju ili kvantifikaciju ciljane molekule DNA. Ključno obilježje ove metode je da se umnožena DNA detektira kako reakcija napreduje odnosno u „stvarnom vremenu“ u odnosu na standardnu PCR gdje se nastali proizvod detektira tek na kraju reakcije. Metoda RT PCR je relativno nova, izrazito pouzdana i precizna te se može koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju patogenog, virusnog, bakterijskog i parazitarog podrijetla. Za reakciju su potrebne vrlo male količine izolirane DNA ili RNA što ovoj metodi daje prednost u

slučajevima kada imamo na raspolaganju vrlo male količine uzorka. Na slici 4 prikazan je osnovni princip metode RT PCR. Koristi se fluorogena „TaqMan“ proba koja ima fluorescentnu glasnik (*engl.* reporter) boju vezanu na 5' kraj i prigušivač (*engl.* quencher) molekulu vezanu na 3' kraj. Ukoliko je prisutna ciljana sekvenca komplementarna fluorogenoj probi, ona se veže nizvodno od početnice. Prilikom reakcije amplifikacije pomoću polimeraze Taq koja produžuje 3' kraj početnice, dolazi do razgradnje probe 5' nukleaznom aktivnošću Taq polimeraze. Kada je proba intaktna, fluorescentna emisija „reporter“ boje je apsorbirana prigušivač bojom. Razgradnjom probe dolazi do oslobađanja fluorescentne „reporter“ boje koja se detektira. Intenzitet fluorescencije raste s brojem ciklusa umnažanja odnosno količinom nastalog produkta (Arya i sur., 2005).



Slika 4. Princip Real-time PCR metode koja se temelji na reakciji sinteze DNA pomoću polimeraze Taq. Fluorogena „TaqMan“ proba koja ima fluorescentnu „reporter“ boju vezanu na 5' kraj i boju prigušivač, vezanu na 3' kraj komplementarno se veže na ciljanu sekvenču DNA nizvodno od početnice. Prilikom sinteze DNA, polimeraza Taq 5' nukleaznom aktivnošću razgradi „TaqMan“ probu i dolazi do detekcije fluorescencije koja se povećava s količinom nastalog produkta (preuzeto i prilagođeno prema Arya i sur., 2005)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Provedeno istraživanje s hipotezom da je jednostruki nukleotidni polimorfizam rs17817449 (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) u genu *FTO* (*engl.* fat mass and obesity-associated gene) povezan s prekomjernom tjelesnom masom i $BMI \geq 30$, te da se mikrobiom usta razlikuje između pretilih i žena normalnog BMI-a Zagrebačke županije, odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovo istraživanje uključuje ukupno 66 ženskih osoba koje su podijeljene u dvije skupine: kontrolna skupina od 20 ženskih osoba indeksa tjelesne mase između $18,5 \text{ kg m}^{-2}$ i 25 kg m^{-2} te skupina pretilih od 46 ženskih osoba BMI-a većeg od 30 kg m^{-2} . Skupinu pretilih čine dobrovoljne ispitanice koje su se zbog zdravstvenih problema povezanih s pretilošću javile na Zavod za endokrinologiju Interne klinike Rebro, KBC Zagreb. Odabrane skupine čine odrasle ženske osobe između 23 i 58 godina. Potpisom informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju i ispunjavanjem priložene ankete iz kojih su dobivene informacije o dobi, BMI-u, načinu života i navikama te oboljenjima, ispitanice su dobrovoljno pristale sudjelovati u istraživanju te su prethodno upoznate s hipotezom i ciljevima istraživanja. Primjer ankete (prilog 7.2.), informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju za kontrolnu skupinu (prilog 7.3.) i skupinu pretilih osoba (prilog 7.4.) nalazi se na kraju rada. Na temelju podataka iz anketa o tjelesnoj masi i visini izračunati je antropometrijski indeks BMI koji predstavlja količnik tjelesne mase (kg) i kvadrata visine u metrima (m^2). Za potrebe eksperimentalnog postupka izolacije mikroorganizama iz usta, ispitanice su isprale usta 0,9%-tnom fiziološkom otopinom volumena 13 mL i nakon toga dale uzorak sline volumena 2 mL. Kako bi se provela Real-time PCR analiza, ispitanicama je uzet uzorak krvi volumena 2 mL.

3.1. Genotipizacija

3.1.1. Izolacija DNA iz krvi

Ispitanicama je u Internoj klinici Rebro, KBC Zagreb uzet uzorak pune krvi volumena 2 mL koji je pohranjen na -20°C u epruветama s antikoagulansom etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA).

Genomska DNA izolirana je pomoću komercijalnog kompleta DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) prema uputama proizvođača. U kivete po Eppendorfu volumena 1,5 mL stavljen je uzorak od 20 μL proteinaze K, 100 μL krvi, 4 μL Rnase A i 96 μL fosfatnog pufera (PBS). Sastav fosfatnog pufera $\text{pH}=7,2$ prikazan je u tablici 1. Sterilizacija pufera provodi se pri temperaturi od 121°C i tlaku $1,01 \times 10^5 \text{ Pa}$. Pripremljena smjesa inkubirana je na sobnoj

temperaturi dvije minute. Nakon toga, dodano je 200 μL pufera za lizu (AL)*, vorteksirano (tehtnica železnici EV -202) i inkubirano 10 minuta pri 56 °C. Ovaj korak služi da se uklone patogeni oblici mikroorganizama tako da više nisu u infektivnom obliku. Nakon inkubacije, dodano je 200 μL 96%-tnog etanola, miješano te je cijeli sadržaj prebačen na DNeasy Mini spin membranu koja je stavljena u kolekcijsku kivetu volumena 2 mL i centrifugirana 60 sekundi na 8000 x *g*. Sadržaj koji se nakon centrifugiranja skupio u kolekcijskoj kiveti je bačen, a DNeasy Mini spin membrana je prebačena u novu kolekcijsku kivetu. Dodano je 500 μL pufera za ispiranje (AW1) i centrifugirano 60 sekundi na 8000 x *g*. Kolekcijska kiveta s tekućinom koja je prošla kroz membranu tijekom centrifugiranja je bačena, a membrana je stavljena u novu kolekcijsku kivetu te je dodano 500 μL pufera za ispiranje (AW2)*. Nakon toga je sadržaj centrifugiran 5 minuta na 18300 x *g*, a kolekcijska kiveta s tekućinom koja je prošla kroz membranu je bačena. DNeasy Mini spin membrana je prebačena u kivetu po Eppendorfu i dodano je 200 μL pufera za eluciju (AE)*. Nakon inkubacije 1 minutu pri sobnoj temperaturi, sadržaj je centrifugiran na 8000 x *g* nakon čega je membrana bačena, a eluat sačuvan jer je u njemu eluirana DNA s membrane koja je prije pohrane podvrgnuta daljnjoj analizi.

Tablica 1. Sastav fosfatnog pufera (PBS).

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,15 g
K_2HPO_4	0,2 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Koncentracija izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrijski (NanoPhotometer® N60, IMPLLEN). Eluat DNA volumena 3 μL pomiješan je zajedno s 1 kb markerom (BioLabs) te je otopina analizirana gel elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu 35 minuta (Electrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Biosciences). Agarozni gel je napravljen od 0,5 g agaroze, 50 mL 1X Tris-acetat-EDTA pufera (TAE) i 2,25 μL etidijevog bromida koncentracije 10 mg mL^{-1} . Sastav Tris-acetat-EDTA pufera prikazan je u tablici 2. Izolirana DNA je pohranjena na -20 °C.

* sastav pufera zaštićen je od strane proizvođača (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Germany)

Tablica 2. Sastav 50 x koncentriranog Tris-acetat-EDTA pufera.

SASTOJAK	KOLIČINA
Tris baza (SIGMA)	242 g
Octena kiselina	57,1 ml
Prah kompleksa III (Kemika)	18,6 g
Voda	do 1000 ml

3.1.2. Metoda lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu

Kako bi odredili da li se na mjestu jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 nalazi dušična baza G ili T korištena je lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (*engl.* Real-time PCR) i metoda alelna diskriminacije polimorfizma s mješavinom *TaqMan*[™] (*engl.* TaqMan SNP Genotyping assay) C_ _ 34511515_10 koji se sastoji od dvije probe obilježene fluorescentnim bojama (alel G obilježen bojom VIC, a alel T obilježen bojom FAM) i 2 specifične početnice (1 par). Svaka proba sadrži jednu fluorescentnu boju na 5' kraju, nefluorescentni prigušivač (*engl.* nonfluorescent quencher, NFQ) koji virtualno eliminira pozadinsku fluorescenciju i MGB (*engl.* Minor Groove Binder) koji stabilizira kompleks kalupa i probe. Ključno obilježje ove metode je karakteristika da se umnožena DNA detektira kako reakcija napreduje, u "stvarnom vremenu". Temelji se na hibridizaciji ciljnog slijeda i probe komplementarne slijedu alela. polimeraza DNA umnaža ciljnu DNA sekvencu pomoću specifične početnice, a 5' nukleaznom aktivnošću cijepa probe što uzrokuje odvajanje fluorescentne boje od prigušivača i detekcije fluorescentnog signala. Ukoliko je signal posljedica cijepanja probe obilježene bojom VIC onda se radi o homozigotu za alel G. Ukoliko je signal posljedica cijepanja probe obilježene bojom FAM onda se radi o homozigotu za alel T, a ukoliko su detektirana oba signala onda se radi o heterozigotu.

Za genotipizaciju je bilo potrebno najprije prilagoditi koncentraciju DNA na 0,88 ng μL^{-1} odnosno da u 11,25 μL otopine bude 10 ng DNA. S obzirom da se radi o izrazito malim koncentracijama koje nije moguće izmjeriti, dobiveni eluat DNA od 200 μL koncentriran je na otprilike 50 μL (SpeedVac Concentrator, Thermo Electron Corporation) i potom je izmjerena koncentracija DNA te razrijeđena na 7, 14 ili 42 ng μL^{-1} . Koncentracija je izmjerena tri puta i izračunata je srednja vrijednost. Tako dobiven koncentrirani eluat DNA iskorišten je za pripremu 70 mL otopine DNA i Mili-Q vode koncentracije 0,88 ng μL^{-1} .

TaqMan[™] mješavina koncentrirana 40 x, osjetljiva je na svjetlo te je zbog toga razrijeđena 1 x koncentriranim TE puferom (QIAGEN) na 20 x radnu koncentraciju, izmiješana,

centrifugirana, podijeljena u alikvote i zamotana u aluminijsku foliju te pospremljena na tamno mjesto na - 20 °C.

Za samu reakciju lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu pomiješano je 11,25 µL otopine DNA koncentracije 0,88 ng µL⁻¹, 12,5 µL 2x koncentriranog TaqMan® Master Mix-a (Applied Biosystem) i 1,25 µL 20 x koncentriranog SNP Genotyping Assay-a (Applied Biosystem) u optičkoj kiveti. Sadržaj u optičkoj kiveti promiješan je pomoću automatske pipete, i kratko centrifugiran kako bi se smjesa potpuno homogenizirala i uklonili mjehurići koji smetaju prilikom analize. Tako pripremljene optičke kivete stavljene su na predviđeno mjesto za uzorke u uređaju 7300 real-time PCR system (Applied Biosystem) te su pomoću računala uneseni uvjeti neophodni za provođenje PCR reakcije koji su navedeni u tablici 3. Za obradu dobivenih rezultata korišten je program 7300 System SDS Software 1.4 .

Tablica 3. Uvjeti lančane reakcije polimeraze (PCR).

FAZA	TEMPERATURA	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
aktivacija enzima	95 °C	10 minuta	1
denaturacija	95 °C	15 sekundi	40
hibridizacija početnica/ produljivanje DNA	60 °C	1 minuta	

3.2. Izolacija mikroorganizama iz sline

Uzorci sline razrijeđeni su u omjeru 1:10 fosfatnim puferom (PBS) pH=7,2 čiji sastav je prikazan u tablici 1. U 4,5 mL PBS-a stavljeno je 0,5 mL sline i miješano da dobijemo homogenu mješavinu. Za što iscrpniju izolaciju mikroorganizama korišten je originalni uzorak sline i razrijeđeni uzorak koji su u volumenu od 0,5 mL nacijepljeni na kompletnu hranjivu podlogu.

3.2.1. Hranjive podloge

U radu je korištena LB kompletna hranjiva podloga u krutom i tekućem obliku koja je pogodna za uzgoj enterobakterija. Podloge su pripremljene prema uputama proizvođača i sterilizirane u autoklavu prije korištenja pri temperaturi 121°C u trajanju od 15 minuta i tlaku od $1,01 \times 10^5$ Pa. U tablici 4 naveden je sastav tekuće LB hranjive podloge. Kruta LB podloga dobivena je dodatkom 15 g L⁻¹ agara prije sterilizacije te je nakon sterilizacije razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice.

Tablica 4. Sastav LB kompletne hranjive podloge.

SASTOJAK	KOLIČINA
Bakto-tripton	10 g
Kvašćev ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
Destilirana voda	do 1000 mL

3.2.2. Izolacija čiste kulture

Sterilne Petrijeve zdjelice s krutom LB kompletnom hranjivom podlogom koje su naciepljene originalnim uzorkom i razrijeđenim uzorkom sline, inkubirane su 48 h u termostatu pri 37 °C. Između poraslih kolonija odabrane su fenotipski različite kolonije i precijepljene na novu krutu LB hranjivu podlogu metodom do iscrpljenja i stavljene u termostat na 37 °C. Kada je utvrđeno da je dobivena čista kultura izoliranog mikroorganizma iz sline, odabrana jedna kolonija je precijepljena u epruvetu s volumenom tekuće LB hranjive podloge i uzgajana 24 h pri 37 °C uz aeraciju (100 o min⁻¹). Prekonoćna porasla kultura je centrifugirana u kiveti po Eppendorfu na 4000 x *g* te je supernatant bačen, a na talog je dodan 1 mL 50%-tnog glicerola i resuspendiran te je pohranjen na -20 °C kao čista kultura mikroorganizma.

3.2.3. Laboratorijska oprema za uzgoj i praćenje rasta bakterijskih stanica

Pribor

- Aluminijska folija
- Automatske pipete (20, 200, 1000 µL)
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena
- Kivete po Eppendorfu različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Pipete različitih volumena
- Pipetni nastavci
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Propipete
- Staklene čaše
- Staklene epruvete različitih volumena

- Staklene i plastične menzure različitih volumena
- Vata za pravljenje čepova

Aparatura

- Analitička vaga model 1712 MP8, Silver edition, *Sartorius*, Velika Britanija
- Aparatura za termostatiranje BTE-S, *Termo-medicinski aparati*, Hrvatska
- Automatska tresilica X-463, *New Brunswick scientific*, SAD
- Centrifuga za kivete po Eppendorfu HC-240, *Tehnica-Železniki*, Slovenija
- Laminar, *Iskra*, Slovenija
- Vaga, *Sartorius*, Velika Britanija
- Vibromikser EV-202 i EV-100, *Tehnica-Železniki*, Slovenija
- Zamrzivač: Ultra low temperature freezer, *New Brunswick scientific*, SAD

Kemikalije

- Agar, *Kemika*, Hrvatska
- Bakto-tripton, *Kemika*, Hrvatske
- Glicerol, *Kemika*, Hrvatska
- Kvašćev ekstrakt, *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev klorid (NaCl), *Kemika*, Hrvatska

3.3. Identifikacija mikroorganizama spektrometrijom masa

Čiste kulture mikroorganizama porasle na krutoj LB hranjivoj podlozi identificirane su primjenom MALDI-TOF spektrometrije masa koristeći microflex LT spektrometar masa (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) i programsku podršku MALDI Biotyper 3.0. Na MALDI pločicu sterilnom čačalicom nanesen je uzorak (pojedinačna kolonija) i na njega dodan 1 μ L mravlje kiseline. Nakon što se uzorak posušio dodan je 1 μ L otopine MALDI matrice (otopina α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50%-tnom acetonitrilu i 2,5%-tnoj trifluorooctenoj kiselini). Snimanje biološkog materijala uz programsku podršku MALDI rezultira karakterističnim spektrima masa proteina za svaki mikroorganizam. Identifikacija mikroorganizma provodi se usporedbom snimljenog MALDI-TOF spektra uzorka s referentnim spektrima pohranjenim u bazi podataka. Algoritam izračunava korelaciju između eksperimentalno dobivenog spektra i referentnih spektra u bazi podataka i rezultate prikazuje u obliku logaritamskih vrijednosti (*engl. score*) koje mogu biti u rasponu 0 – 3,000. Prema uputama proizvođača vrijednosti od 2,000 i

više pokazuju sigurnu identifikaciju vrste, vrijednosti od 1,700 do 1,999 identifikaciju na razini roda, a za vrijednosti ispod 1,700 identifikacija nije pouzdana.

Kemikalije

- Acetonitril (ACN), LC-MS čistoće, *Fisher Chemicals*, Švicarska
- Mravlja kiselina., *Fluka*, SAD
- Trifluorooctena kiselina (TFA), *Sigma Aldrich*, Hrvatska
- Voda, LC-MS čistoće, *Fisher Chemicals*, Švicarska
- α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA), *Sigma*, SAD

3.4. Obrada podataka

Za statističku obradu rezultata anketa i identifikacije mikroorganizama iz sline dobrovoljnih ispitanica korišten je Fisherov egzaktni test, t-test o usporedbi očekivanja (GraphPad, 1984) i Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD). Prema Fisherovom egzaktnom testu postavlja se nulta hipoteza da nema statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama, a kao alternativna hipoteza da postoji statistički značajna razlika među skupinama. Kao razina značajnosti uzima se 0,05 te ukoliko je dobivena p-vrijednost manja od 0,05 odbacujemo nultu hipotezu i zaključujemo da postoji značajna razlika među ispitivanim skupinama. Prema tome, statistički značajnim rezultatima u obradi anketa i genotipizaciji smatrane su vrijednosti parametra p manjeg od 0,05, a u obradi podataka identifikacije mikroorganizama iz sline vrijednost parametra p manje od 0,2 što je dozvoljeno u preliminarnim istraživanjima.

Učestalost pojedinog alela i genotipa u osoba normalnog indeksa tjelesne mase i osoba BMI-a većeg od 30 kg m⁻² te značajnost odstupanja distribucije genotipova od očekivane (Hardy-Weinbergova distribucija) određena je X^2 -testom pomoću statističkih računalnih programa (OEGE, 2006).

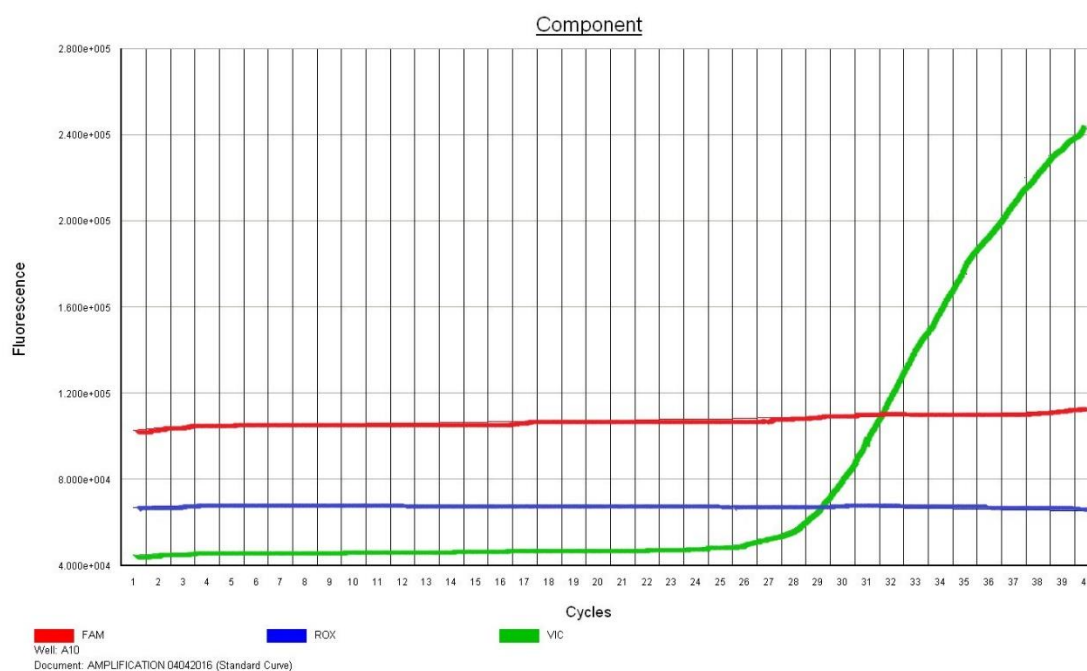
4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovo istraživanje o povezanosti jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 gena *FTO* s indeksom tjelesne mase obuhvaća genotipizaciju polimorfizma rs17817449 gena *FTO* metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu, identifikaciju mikroorganizama iz sline koji su izolirani na LB kompletnoj hranjivoj podlozi pogodnoj za rast enterobakterija spektrometrijom masa i statističku analizu anketa ženskih osoba Zagrebačke županije koje su dobrovoljno sudjelovale u ovom istraživanju. Rezultati genotipizacije prikazani su grafički gdje se može vidjeti razlika postotka učestalosti pojedinog genotipa između kontrolne skupine i skupine pretilih žena kao i razlika u učestalosti pojedinog alela. Rezultati statističke obrade anketa, identifikacije mikroorganizama iz sline i statistička značajnost pojave pojedinih genotipa unutar različitih skupina prikazana je u obliku tablica i slika.

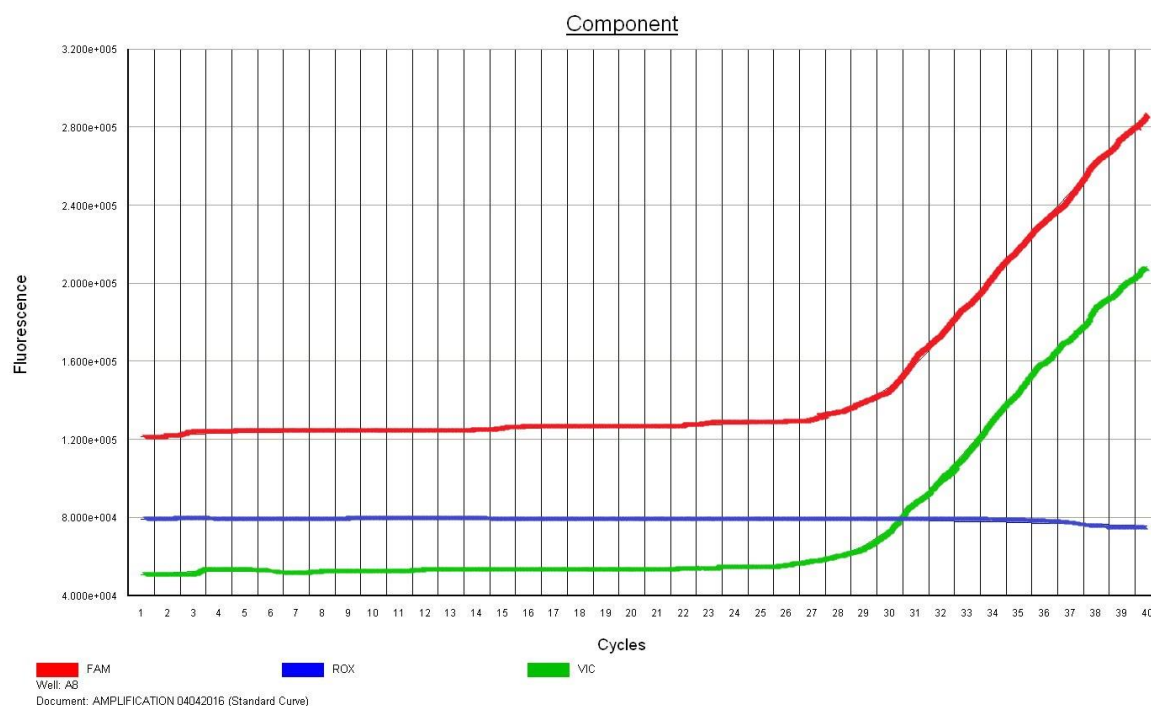
4.1. Genotipizacija polimorfizma rs17817449 u genu *FTO*

Genotipizacija jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 gena *FTO* provedena je metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu pomoću fluorescentno obilježenih proba za pojedini alel. Na slici 5 prikazan je reprezentativni grafički prikaz ovisnosti fluorescencije i broja ciklusa u kojem vidimo da s porastom broja ciklusa eksponencijalno raste fluorescencija signalne boje VIC kojom je obilježen rizični alel G što je povezano s amplifikacijskom krivuljom za homozigot GG. Na slici 6 radi se o istom grafičkom prikazu kao i na slici 5 samo što porastom broja ciklusa eksponencijalno raste fluorescencija obje signalne boje VIC i FAM što je usko povezano s amplifikacijskom krivuljom heterozigota GT.

U tablici 5 prikazane su frekvencije eksperimentalno dobivenih i očekivanih genotipova u kontrolnoj skupini i skupini pretilih žena. Dobiveni rezultati u skladu su s Hardy-Weinbergovom ravnotežom zato jer je u obje skupine p-vrijednost veća od 0,05. Na slici 7 grafički je prikazana razlika u postotku učestalosti genotipova GG, GT i TT za polimorfizam rs17817449 gena *FTO* između kontrolne skupine i skupine pretilih žena, a na slici 8 vidi se razlika u učestalosti pojedinog alela G i T za polimorfizam rs17817449 gena *FTO* u kontrolnoj skupini i skupini pretilih ispitanica. Statistički značajna je veća učestalost rizičnog alela G za pretilost u skupini pretilih osoba kao i nerizičnog alela T u kontrolnoj skupini što potvrđuje dobivena vrijednost $p = 0,0018$ za oba alela.



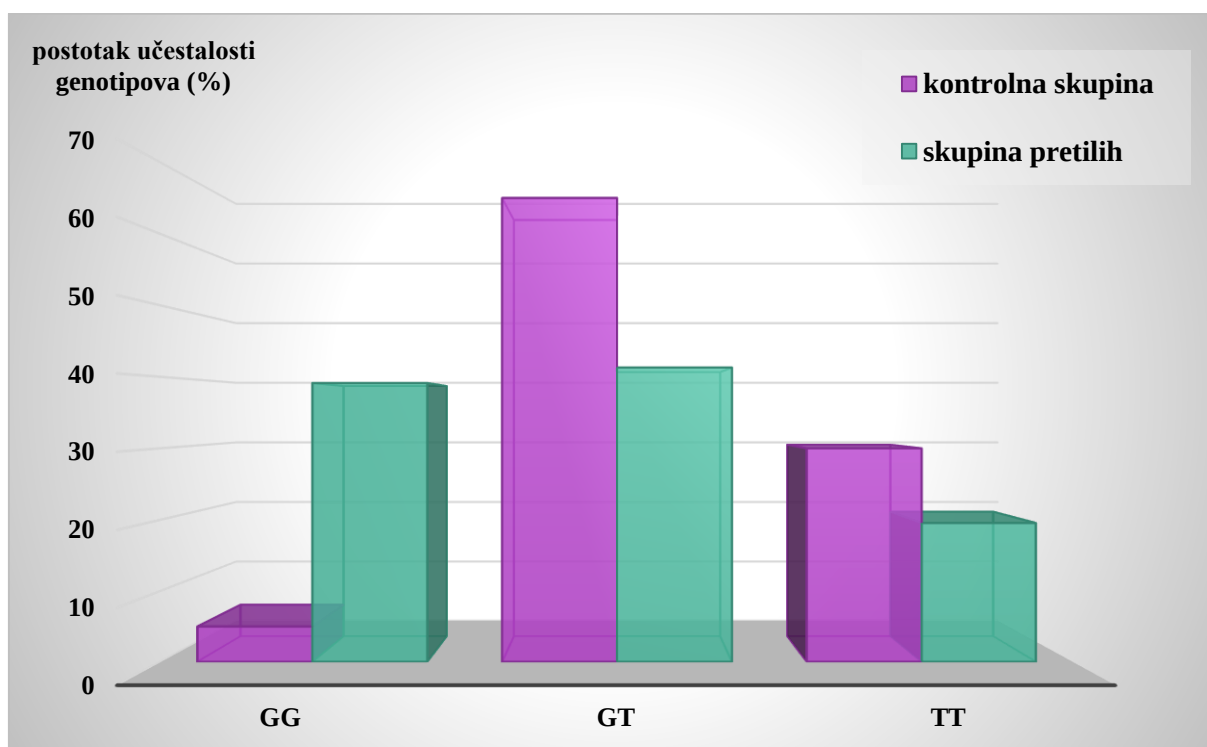
Slika 5. Reprezentativan grafički prikaz porasta fluorescencije signalne boje VIC kojom je obilježen rizični alel G jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 gena *FTO* čime se dokazuje amplifikacija genotipa homozigota GG.



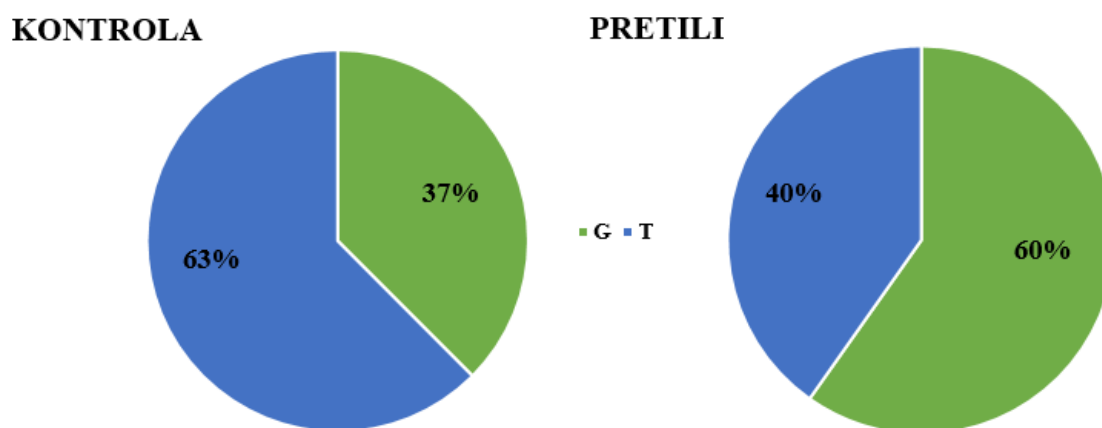
Slika 6. Reprezentativan grafički prikaz porasta fluorescencije signalne boje VIC kojom je obilježen rizični alel G i signalne FAM boje kojom je obilježen nerizični alel T jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 gena *FTO* čime se dokazuje amplifikacija genotipa heterozigota GT.

Tablica 5. Raspodjela genotipova GG, GT i TT unutar ispitivanih skupina žena Zagrebačke županije jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 gena *FTO* te dobiveni povezani parametri χ^2 i p-vrijednosti koji pokazuju statističku značajnost učestalosti pojave genotipova u ispitivanim skupinama.

		KONTROLA		PRETILI	
BROJ ISPITANIKA		20		46	
REZULTAT		dobiveno	očekivano	dobiveno	očekivano
GENOTIP	GG	1	2,81	18	16,44
	GT	13	9,38	19	21,12
	TT	6	7,81	9	7,4
X^2		2,99		0,91	
p- vrijednost		0,0838		0,3388	
* ukoliko je $p < 0,05$ rezultat nije u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom					



Slika 7. Razlika u postotku učestalosti genotipova GG, GT i TT za jednostruki nukleotidni polimorfizam rs17817449 gena *FTO* između ispitivanih skupina žena Zagrebačke županije. Genotip GG za rizični alel se statistički značajno učestalije pojavljuje u skupini pretilih žena.



Slika 8. Postotak učestalosti rizičnog alela G i nerizičnog alela T za jednostruki nukleotidni polimorfizam rs17817449 gena *FTO* u ispitivanim skupinama žena Zagrebačke županije. Statistički značajna je veća učestalost rizičnog alela G za pretilost u skupini pretilih osoba kao i nerizičnog alela T u kontrolnoj skupini što potvrđuje dobivena vrijednost parametra $p = 0,0018$ za oba alela.

Fisherov egzaktni test ne pokazuje statistički značajnu razliku u učestalosti genotipa TT ($p = 0,3584$) ni genotipa GT ($0,1087$) između kontrolne i skupine pretilih, ali pokazuje statistički značajnu razliku u učestalosti genotipa GG ($p = 0,0065$) između kontrolne skupine i skupine pretilih žena jer je p -vrijednost manja od $0,05$. Time je pokazano da se puno učestalije pojavljuje genotip GG unutar skupine pretilih i da je taj rezultat statistički značajan. Prema tome, ovo istraživanje je pokazalo da su pretile žene Zagrebačke županije češći nositelji genotipa GG za rizični alel što je u skladu s očekivanjima s obzirom na druga istraživanja u svijetu (Frayling i sur., 2007) i u Hrvatskoj na otoku Hvaru (Zhang i sur., 2010).

Unutar skupine pretilih žena, prosjek BMI-a za homozigote za rizični alele G iznosi $44,58 \pm 8,1362$, heterozigote $43,21 \pm 9,5387$, a homozigote za nerizični alel T $39,67 \pm 5,2235$. Prosjek BMI vrijednosti cijele skupine pretilih žena iznosi $43,09 \pm 8,2839$ iz čega je vidljivo da prosjek težina žena koje su homozigoti za rizični alel G premašuje prosječnu vrijednost, a žene homozigoti za nerizični alel T imaju prosjek težina manji od prosjeka cijele skupine. To je dokaz o pozitivnoj poveznosti polimorfizma rs17817449 u genu *FTO* s povišenim BMI-om.

4.2. Izolacija i identifikacije mikroorganizama iz sline

Nakon izolacije mikroorganizama osnovnim mikrobiološkim metodama na LB hranjivim kompletnim podlogama iz sline analiziranih skupina žena, identifikacijom metodom spektrometrije masa, utvrđeni su rod i vrsta izoliranih mikroorganizama te su svrstani u pripadajuće carstvo bakterija ili gljiva. Unutar carstva bakterija i gljiva napravljena je podjela po koljenima kako bi se lakše napravila statistička obrada i procijenila značajnost dobivenih rezultata. Unutar kontrolne skupine, izolirane su 23 različite vrste mikroorganizama, a unutar skupine pretilih žena, 39 različitih vrsta, ali to ne predstavlja razliku u bioraznolikosti mikrobiote između skupina jer je analizirana slina većeg broja pretilih žena. U kontrolnoj skupini izolirano je 7 vrsta, kojih nema u slini pretilih žena, dok je u skupini pretilih žena izolirano 16 vrsta koje nisu izolirane iz slina kontrolne skupine. Na slikama 9, 10 i 11 prikazane su razlike učestalosti pojedinih bakterija iz koljena *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria*, a na slici 12 razlike u učestalosti kvasaca iz roda *Candida* između kontrolne skupine i skupine pretilih žena. Kao razina značajnosti uzeta je vrijednost $p = 0,2$ jer se radi o preliminarnom istraživanju. Ukoliko je p – vrijednost manja od 0,2, taj rezultat se smatra statistički značajnim. Zbog bolje preglednosti rezultata, broj žena iz čije sline je izoliran pojedini mikroorganizam i postotak učestalosti pojedine vrste mikroorganizma u kontrolnoj i skupini pretilih žena, prikazan je u tablicama 6, 7, 8 i 9.

Tablica 6. Prikaz broja žena iz različitih ispitivanih skupina iz čije sline je izolirana pojedina vrsta bakterije iz koljena *Firmicutes* i postotak učestalosti tih bakterija u kontrolnoj i skupini pretelih žena te dobivena vrijednost parametra p za pojedinu bakteriju. Crvenom bojom su označene p vrijednosti bakterijskih vrsta koje se statistički značajno učestalije pojavljuju u pojedinoj skupini ispitivanih žena, a zelenom bojom bakterijskih vrsta koje su podjednako zastupljene u slini obje skupine.

<i>Firmicutes</i>	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH ŽENA	%	p - vrijednost
<i>Streptococcus oralis</i>	9	45,00	12	26,00	0,1568
<i>Streptococcus mitis</i>	5	25,00	4	8,69	0,1163
<i>Streptococcus salivarius</i>	6	30,00	8	17,39	0,3278
<i>Streptococcus infantis</i>	1	5,00	0	0,00	0,3030
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2	10,00	12	26,00	0,1971
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	5,00	3	6,52	1,0000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	5,00	0	0,00	0,3030
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	10,00	21	45,65	0,0053
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	5,00	5	10,87	0,6588
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	10,00	3	6,52	0,6348
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	5,00	0	0,00	0,3030
<i>Streptococcus cristatus</i>	0	0,00	4	8,70	0,3059
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0	0,00	4	8,70	0,3059
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0	0,00	2	4,35	1,0000
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Streptococcus gordonii</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00	3	6,52	0,5476
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Gemella sanguinis</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000

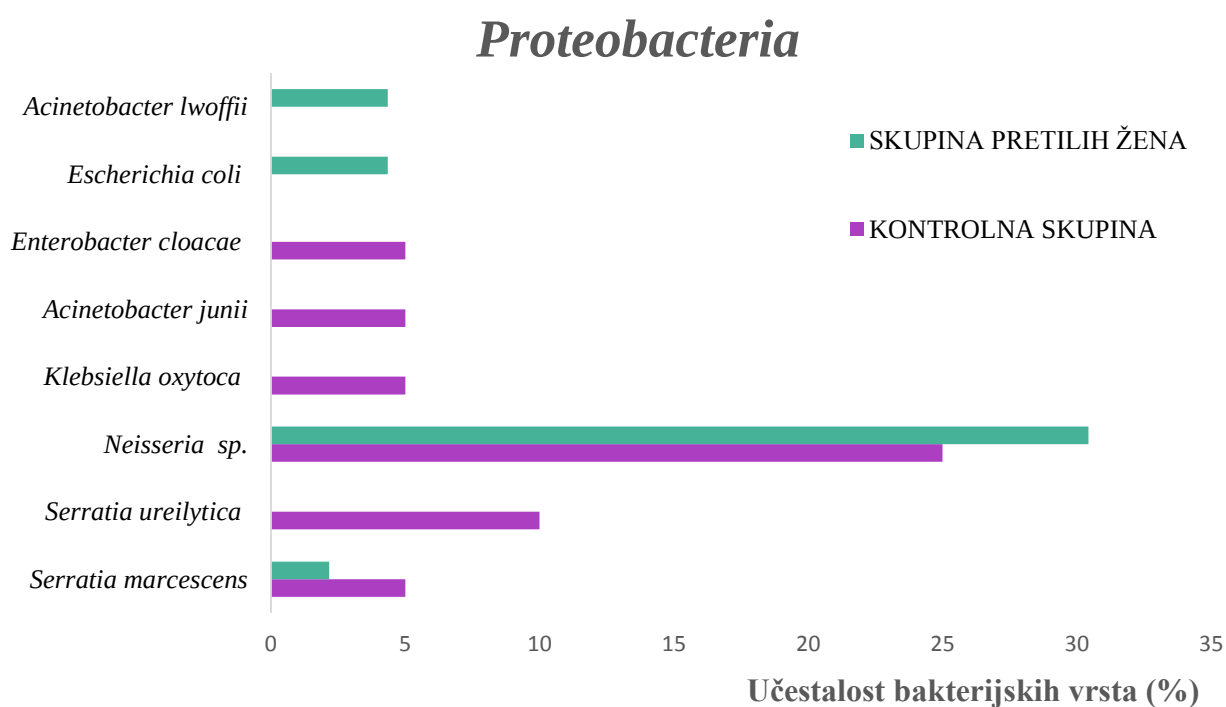
Firmicutes



Slika 9. Razlika učestalosti bakterijskih vrsta iz koljena *Firmicutes* između kontrolne skupine i skupine pretilih žena Zagrebačke županije.

Tablica 7. Prikaz broja žena iz različitih ispitivanih skupina iz čije sline je izolirana pojedina vrsta bakterije iz koljena *Proteobacteria* i postotak učestalosti tih bakterija u kontrolnoj i skupini pretilih žena te dobivena vrijednost parametra p za pojedinu bakteriju. Crvenom bojom su označene p vrijednosti bakterijskih vrsta koje se statistički značajno učestalije pojavljuju u pojedinoj skupini ispitivanih žena, a zelenom bojom bakterijskih vrsta koje su podjednako zastupljene u slini obje skupine.

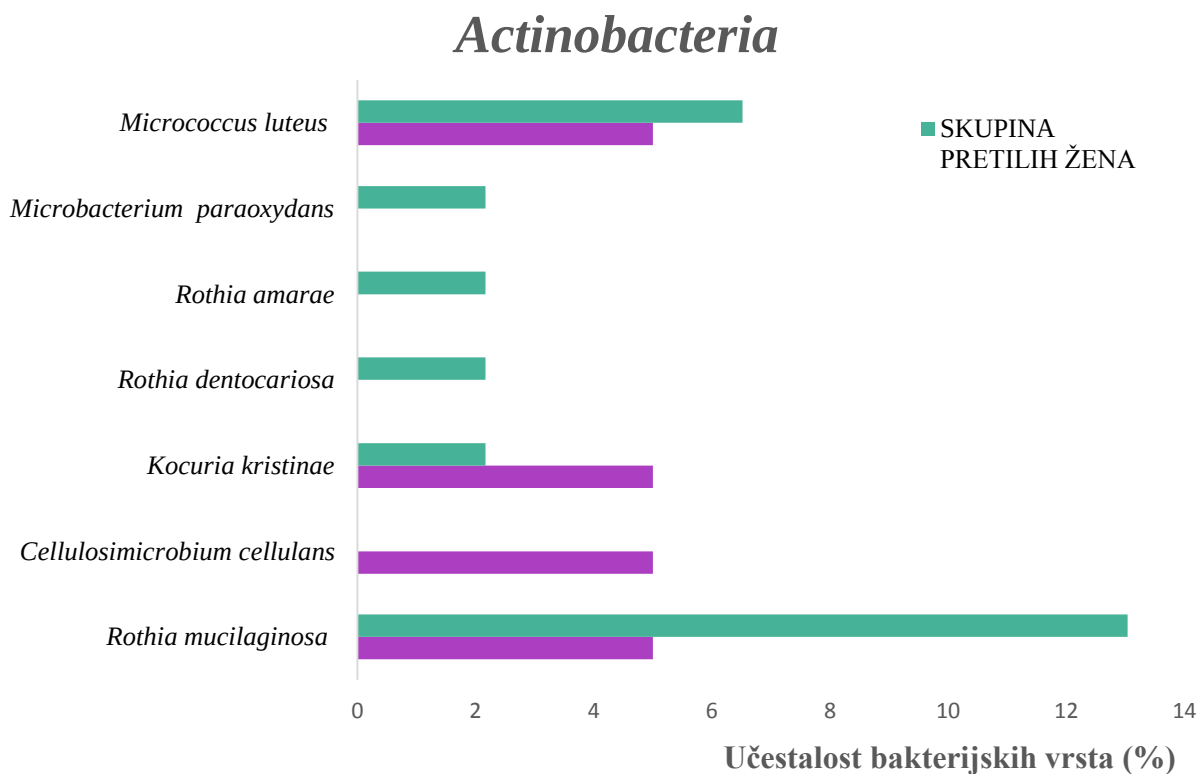
Proteobacteria	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH ŽENA	%	p – vrijednost
<i>Serratia marcescens</i>	1	5,00	1	2,17	0,5175
<i>Serratia ureilytica</i>	2	10,00	0	0,00	0,0886
<i>Neisseria</i> sp.	5	25,00	14	30,43	0,7720
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	5,00	0	0,00	0,3030
<i>Acinetobacter junii</i>	1	5,00	0	0,00	0,3030
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	5,00	0	0,00	0,3030
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00	2	4,35	1,0000
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	0,00	2	4,35	1,0000



Slika 10. Razlika učestalosti bakterijskih vrsta iz koljena *Proteobacteria* između kontrolne skupine i skupine pretilih žena Zagrebačke županije.

Tablica 8. Prikaz broja žena iz različitih ispitivanih skupina iz čije sline je izolirana pojedina vrsta bakterije iz koljena *Actinobacteria* i postotak učestalosti tih bakterija u kontrolnoj i skupini pretilih žena te dobivena vrijednost parametra p za pojedinu bakteriju. Zelenom bojom su označene p vrijednosti bakterijskih vrsta koje su podjednako zastupljene u slini obje skupine.

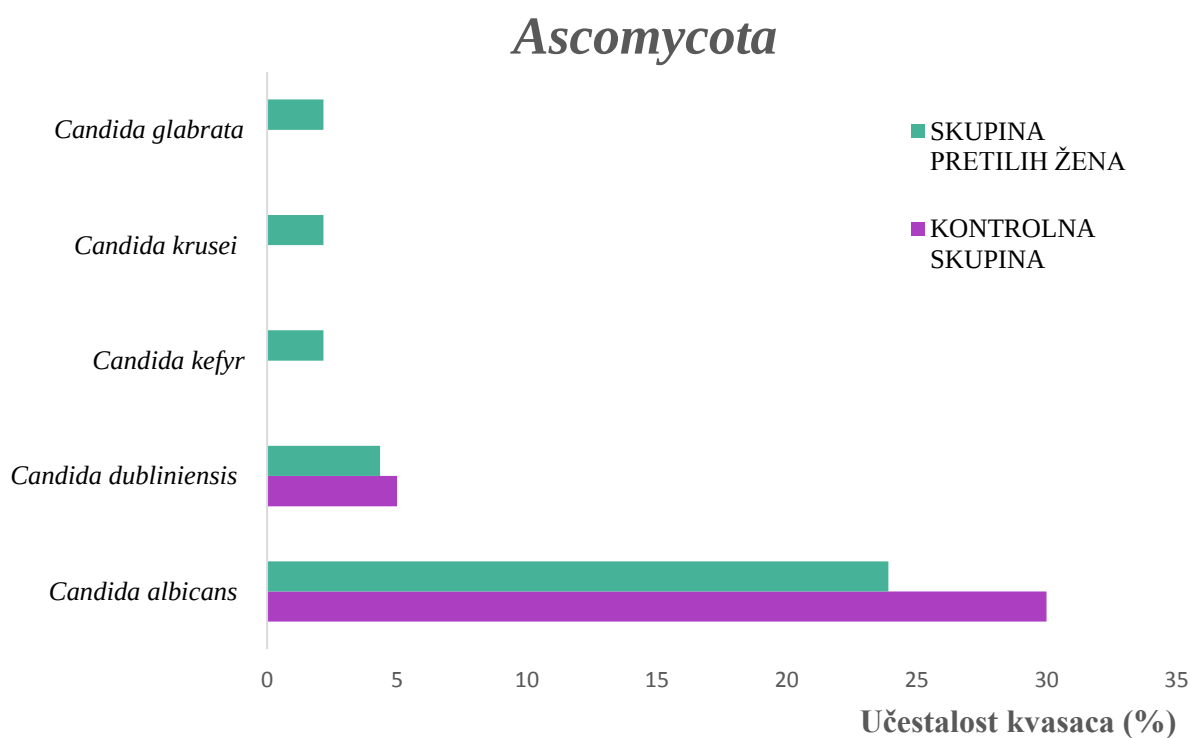
Actinobacteria	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH ŽENA	%	p – vrijednost
<i>Rothia mucilaginosa</i>	1	5,00	6	13,04	0,6656
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	1	5,00	0	0,00	0,3030
<i>Kocuria kristinae</i>	1	5,00	1	2,17	0,5175
<i>Rothia dentocariosa</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Rothia amarae</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Micrococcus luteus</i>	1	5,00	3	6,52	1,0000



Slika 11. Razlika učestalosti bakterijskih vrsta iz koljena *Actinobacteria* između kontrolne skupine i skupine pretilih žena Zagrebačke županije.

Tablica 9. Prikaz broja žena iz različitih ispitivanih skupina iz čije slinje je izolirana pojedina vrsta kvasaca iz koljena *Ascomycota* i roda *Candida* te postotak učestalosti tih kvasaca u kontrolnoj i skupini pretilih žena te dobivena vrijednost parametra p za pojedini kvasac. Zelenom bojom su označene p vrijednosti kvasaca koji su podjednako zastupljeni u slini obje skupine.

Ascomycota	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH ŽENA	%	p – vrijednost
<i>Candida albicans</i>	6	30,00	11	23,91	0,7602
<i>Candida dubliniensis</i>	1	5,00	2	4,35	1,0000
<i>Candida kefyr</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Candida krusei</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000
<i>Candida glabrata</i>	0	0,00	1	2,17	1,0000



Slika 12. Razlika učestalosti kvasaca iz koljena *Ascomycota* i roda *Candida* između kontrolne skupine i skupine pretilih žena Zagrebačke županije.

Postoji mali broj istraživanja o mikrobiomu usta pretilih osoba pa je razlika u sastavu mikroorganizama usne šupljine osoba normalnog BMI-a i pretilih osoba još uvijek velika nepoznanica. U ovom istraživanju nije pronađena povezanost pojedinih genotipova polimorfizma rs17817449 gena *FTO* s učestalijom pojavom određenog mikroorganizma u slini žena Zagrebačke županije. U skupini pretilih žena, izolirano je više bakterijskih vrsta iz koljena *Firmicutes* te se bakterijske vrste *Staphylococcus aureus* ($p = 0,0058$) i *Streptococcus parasanguinis* ($p = 0,1971$) statistički značajno učestalije pojavljuju u toj skupini. Učestalija pojava bakterije *S. aureus* bila je i za očekivati u pretilih žena s obzirom da postoji dokazana pozitivna korelacija BMI-a i kolonizacije nosa bakterijom *S. aureus* u skupini mlađih i premenopauznim ženama prema istraživanju Olsena i suradnika (2013). Unutar kontrolne skupine, izolirano je manje bakterijskih vrsta iz koljena *Firmicutes*, ali se dvije bakterijske vrste *Streptococcus mitis* ($p = 0,1163$) i *Streptococcus oralis* ($p = 0,1568$) učestalije pojavljuju. Ovaj podatak se slaže s istraživanjem Goodsona i suradnika (2009) u kojem je središnja vrijednost udjela broja bakterija *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis* u ukupnom broju bakterija u slini bila veća u osoba većeg BMI-a. Također, u kontrolnoj skupini statistički značajno učestalije se pojavljuje i bakterijska vrsta *Serratia ureilytica* ($p = 0,0886$) iz koljena *Proteobacteria*. Ova bakterija pripada skupini enterobakterija iz koje su mnogi članovi značajni proizvođači endotoksina lipopolisaharida koji je primarna strukturna komponenta membrane enterobakterija. Mnoga istraživanja su pokazala da ako taj endotoksin iz crijeva dospije u serum (krv) može uzrokovati upalu niskog stupnja što pridonosi pretilosti i inzulin rezistenciji (dijabetes tipa II; Cani i sur., 2008) pa je zato i kao podloga za izolaciju bakterija iz sline u ovom istraživanju uzeta LB kompletna hranjiva podloga koja se koristi za izolaciju enterobakterija. Isto tako u istraživanju Park i suradnika (2015) na Beagle psima, utvrđena je veća učestalost bakterijskih vrsta iz koljena *Firmicutes* u mršavih pasa, a bakterija iz koljena *Proteobacteria* odnosno enterobakterija u pretilim psima. Yasir i suradnici (2015) su u svom istraživanju mikrobiote crijeva pronašli učestaliju pojavu bakterijskih vrsta iz koljena *Proteobacteria* u populaciji pretilih osoba iz Francuske dok su u uzorcima pretilih ispitanika iz Saudijske Arabije pronašli učestaliju pojavu bakterijskih vrsta iz koljena *Firmicutes*. S obzirom na različite rezultate istraživanja mikrobiote usta, ne možemo zaključiti slažu li se dobiveni rezultati ovog istraživanja s očekivanjima. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se dobio bolji uvid u realno stanje i precizniji rezultati s obzirom da je ovaj rad bio ograničen samo na izolaciju mikroorganizama koji su rasli na LB kompletnoj hranjivoj podlozi.

4.3. Statistička obrada anketnih upitnika

Anketni upitnik korišten u ovom istraživanju sadrži 14 pitanja u kojima su ispitanice morale dati odgovor o načinu života, životnim navikama, oboljenjima, dobi i indeksu tjelesne mase kako bi se statističkom obradom pronašla moguća povezanost određenih pretpostavljenih faktora uzročnika prekomjerne tjelesne težine. U istraživanju je sudjelovalo 66 ženskih osoba koje su podijeljene u dvije skupine s obzirom na njihov BMI. Prema tome, kontrolnu skupinu je činilo 20 ženskih osoba BMI-a između $18,5 \text{ kg m}^{-2}$ i 25 kg m^{-2} , a skupinu pretilih 46 ženskih osoba BMI-a većeg od 30 kg m^{-2} . U tablici 10 su prikazani osnovni podaci o ispitanicama sa standardnim devijacijama te procjena statistički značajnih razlika u parametrima težine, visine i BMI-a kontrolne skupine i skupine pretilih žena. Korišten je t-test za usporedbu očekivanja između skupina i dobiveno je da se ispitivane skupine statistički značajno razlikuju po tjelesnoj težini i BMI-u ($2p = 0,0001$), a ne razlikuju se u tjelesnoj visini ($2p = 0,3911$). Unutar skupine pretilih žena, 10, 87% žena pripada skupini pretilosti tipa I ($\text{BMI} = 30 - 34,9 \text{ kg m}^{-2}$), 28, 26% skupini pretilosti tipa II ($\text{BMI} = 35 - 39,9 \text{ kg m}^{-2}$), a 60, 87% žena pripada skupini pretilosti tipa III ($\text{BMI} \geq 40 \text{ kg m}^{-2}$).

U tablici 11 prikazani su rezultati statističke obrade ispunjenih anketnih upitnika koji uključuju osnovne podatke i podatke o životnim navikama ispitanica, a u tablici 12 rezultati koji uključuju oboljenja ispitanica koje su sudjelovale u istraživanju. Rezultati su prikazani posebno za kontrolnu skupinu i skupinu pretilih žena kako bi se mogle utvrditi statistički značajne razlike.

Tablica 10. Osnovni prosječni podaci sa standardnim devijacijama o ženama iz ispitivanih skupina i procjena statistički značajnih razlika u pojedinim parametrima između skupina žena Zagrebačke županije

Osnovni podaci	KONTROLNA SKUPINA	SKUPINA PRETILIH
BROJ ISPITANIKA	20	46
DOB (godine)	32,85 ± 10,7483	43,67 ± 10,9969
TEŽINA (kg)	59,35 ± 7,0376	115,47 ± 22,6182
2p - vrijednost	0,0001	
VISINA (cm)	165,5 ± 6,1115	163,83 ± 7,4573
2p - vrijednost	0,3911	
BMI (kg m ⁻²)	21,65 ± 2,1502	43,09 ± 8,2839
2p - vrijednost	0,0001	
*Prema t-testu usporedbe očekivanja u dvije skupine, ako je 2p manje od 0,05 zaključujemo da se dvije skupine razlikuju po nekom svojstvu.		

Statističkom obradom anketnih upitnika, u nekoliko kategorija pronađene su statistički značajne razlike između kontrolne skupine i skupine pretilih žena. Statistički značajna razlika utvrđena je u svakodnevnoj prehrani s obzirom na p-vrijednost koja iznosi 0,0141. Svoju svakodnevnu prehranu 75% žena iz kontrolne skupine te 38,6% pretilih žena smatra uravnoteženom i raznolikom, a svakodnevnu prehranu ocjenjuje kao bogatom slatkišima i grickalicama 5% žena iz kontrolne skupina i 34,1% pretilih žena ($p = 0,0133$). Svakodnevnu prehranu bogatom mesom i mesnim prerađevinama smatra 15 % kontrolne skupine i 52,3% pretilih osoba ($p = 0,006$). U istraživanju Zganga i suradnika (2015) uočeno je da veći postotak pretilih djece preferira prehranu baziranu na mesu što je i slučaj u ovom radu uz hranu bogatu slatkišima. Isto tako, Harbron i suradnici (2014) su u svom istraživanju pokazali da osobe homozigoti za rizični alel (GG) polimorfizma rs17817449 gena *FTO* preferiraju hranu s povišenim udjelom masnoće i šećera. Ova značajna povezanost ukazuje na mogućnost da osobe s jednim ili više rizičnih alela analiziranog polimorfizma imaju visokokaloričnu prehranu. Niti jedna žena normalnog BMI-a ne spava manje od 6 sati dok 22,7% pretilih žena ima tu naviku ($p = 0,0240$) pa se ispitivane skupine statistički značajno razlikuju u vremenu provedenom spavajući. Ovakav rezultat je očekivan s obzirom na rezultate drugog istraživanja na pretilim osobama koji pokazuju da se smanjenjem noćnog sna povećava i BMI (Rontoyanni i sur., 2007).

Nema statistički značajne razlike u navikama prekomjernog korištenja soli u obrocima ni razlike između pretilih koji ne dodaju sol obroku prilikom konzumacije za stolom i imaju povećan krvni tlak i pretilih koji ne dodaju sol obroku za stolom i nemaju povećan krvni tlak ($p = 1,0000$). Ne postoji ni statistički značajna razlika između pretilih koji imaju povišen krvni tlak i dodaju sol obroku pri konzumaciji za stolom kad jelo nije dovoljno slano i pretilih koji nemaju povećan krvni tlak i dodaju sol skoro uvijek prije nego probaju pripremljeno jelo ($p = 0,3457$). Prema tome, nije uočena razlika u preferiranju zasoljene hrane između pretilih žena i žena normalnog BMI-a. To nije u skladu s očekivanjima jer je u radu Zhanga i suradnika (2015) uočeno da statistički značajno više pretile djece preferira zasoljenu hranu. No, moguće da se radi o neslaganju rezultata zbog dobnih razlika ispitanika u dva istraživanja. Sve žene u kontrolnoj skupini doručkuju redovito ili neredovito dok od pretilih 15,9% žena uopće ne doručkuje ($p = 0,0882$). Postotak pretilih žena koje uopće ne doručkuju nije statistički značajan i to je u skladu s istraživanjem (Barr i sur., 2016) koje je pokazalo da ne prakticiranje doručkovanja nije dosljedno povezano s povišenim BMI-om. Nema statistički značajne razlike u pušačkim navikama i dobi kontrolne skupine i pretilih žena kao ni u istraživanju populacije Istočne Europe (Hubacek i sur., 2008). Također, nema značajne razlike ($p = 0,1644$) u vremenu koje žene iz kontrolne skupine ili pretile žene provedu sjedeći. Samo jedna žena normalnog BMI-a i 27,3% pretilih žena provede manje od 20 minuta na dan hodajući ili baveći se nekom drugom tjelesnom aktivnošću ($p = 0,0885$). U drugim istraživanjima također nije uočena povezanost polimorfizma rs17817449 gena *FTO* s tjelesnom aktivnošću (Harbron i sur., 2014; Hubacek i sur., 2008). Nema statistički značajne razlike u broju obroka kontrolne skupine i pretilih žena što je u skladu s očekivanjima i rezultatima istraživanja da povećan broj obroka ne potiče mršavljenje više nego manji broj obroka ukoliko se radi o podjednakom broju unesenih kalorija na dan (Cameron i sur., 2010).

U skupini pretilih žena česta je pojava bolesti povezanih s pretilošću pa je tako u pretilih žena znatno češći povišeni krvni tlak ($p = 0,0005$), a značajno je manje pretilih osoba koje nemaju bolesti ($p = 0,0004$). Kada za usporedbu uzmemo samo starije žene kontrolne skupine ($41,9 \pm 8,52$ godina), visoki krvi tlak je statistički značajno učestaliji u pretilih žena ($p = 0,0335$), ali broj žena iz kontrolne skupine koje nemaju bolesti nije statistički značajno veći od broja pretilih žena bez bolesti ($p = 0,2552$). Problem s povišenim krvnim tlakom ima 53,94% nositelja genotipa GG polimorfizma rs17817449 u genu *FTO*, a 25% nositelja genotipa TT te 55,56% nositelja genotipa GT. Prema tome statistički učestalija je pojava povišenog krvnog tlaka u osoba koje nose rizični alel G ($p = 0,0112$). To je dokaz o povezanosti polimorfizma rs17817449 gena *FTO* s povišenim krvnim tlakom što se slaže s istraživanjem Prakasha i suradnika (2011) gdje je također uočena povezanost polimorfizma rs17817449 gena *FTO* s povišenim krvnim tlakom. Dijabetes ima 17,8

% pretilih žena, a niti jedna žena iz kontrolne skupine nema dijabetes ($p = 0,0510$). Isto tako, 30% nositelja genotipa GG ima dijabetes i 12,5 % nositelja genotipa TT, ali to nije statistički značajno. U istraživanju Hubaceka i suradnika (2008) pronađena je slaba povezanost polimorfizma rs17817449 gena *FTO* i dijagnosticiranog dijabetesa.

Sažetak o doprinosu istraživanja

Ovo istraživanje je prvo istraživanje na ženskoj populaciji u Hrvatskoj i može se smatrati kao istraživanje povezanosti polimorfizma rs17817449 s pretilošću koje obuhvaća kontinentalnu Hrvatsku. Dobiveni rezultati ukazuju na povezanost polimorfizma rs17817449 gena *FTO* u žena Zagrebačke županije s povišenim BMI-om i pretilošću kao i bolestima koje su povezane s pretilošću kao što je dijabetes i povišeni krvni tlak. Također, uočena je mala razlika u mikrobiomu usne šupljine, ali se ne može zaključiti da li su rezultati u skladu s očekivanjima s obzirom da postoji jako malo studija o mikrobiomu pretilih osoba i ona se ne podudaraju. Potrebna su dodatna istraživanja o povezanosti pretilosti, polimorfizma rs17817449 gena *FTO* i sastava mikroorganizama usne šupljine, ali na većem broju ispitanika, detaljnijom anketom te kvalitativnom i kvantitativnom metodom analize mikroorganizama usne šupljine neovisnom o uzgoju u kulturi.

Tablica 11. Rezultati statističke obrade podataka iz anketnog upitnika o osnovnim podacima i životnim navikama ispitanica iz kontrolne skupine i skupine pretilih žena Zagrebačke županije. Prikazani su podaci o broju i postotku žena koje su pozitivno odgovorile na određeno pitanje anketnog upitnika čiji primjerak se nalazi u prilogu ovog rada.

Statistička obrada podataka iz anketnih upitnika	NORMALAN BMI		BMI > 30 kg m ⁻²	
	BROJ	POSTOTAK (%)	BROJ	POSTOTAK (%)
UKLONJENE TONZILE	9	45,00%	7	15,60%
UKLONJENO SLIJEPO CRIJEVO	2	10,00%	2	4,40%
UKLONJENO OBOJE	0	0,00%	3	6,70%
NIŠTA NIJE UKONJENO	9	45,00%	34	75,60%
BROJ OBROKA U DANU				
1	0	0,00%	1	2,30%
2	2	10,00%	10	22,70%
3	12	60,00%	14	31,80%
4	4	20,00%	5	11,40%
6	2	10,00%	1	2,30%
DORUČAK				
NE DORUČKUJE	0	0,00%	7	15,90%
DORUČKUJE NEREDOVITO	7	36,80%	15	34,10%
DORUČKUJE REDOVITO	12	63,20%	22	50,00%
SVAKODNEVNA PREHRANA				
URAVNOTEŽENA I RAZNOLIKA	15	75,00%	17	38,60%
BOGATA MESOM	3	15,00%	23	52,30%
BOGATA SLATKIŠIMA	1	5,00%	15	34,10%
SVAKI DAN BAREM 1 MLIJEČNI PROIZVOD	8	40,00%	17	38,60%
VEGETARIJANSKA	0	0,00%	1	2,30%

DODATAK SOLI U HRANU				
NIKAD	5	25,00%	12	27,30%
KAD JELO NIJE DOVOLJNO SLANO	13	65,00%	28	63,60%
SKORO UVIJEK PRIJE DEGUSTACIJE	2	10,00%	4	9,10%
PUŠENJE				
PUŠAČ	3	15,00%	10	22,70%
POVREMENI PUŠAČ	3	15,00%	3	6,80%
BIVŠI PUŠAČ	1	5,00%	6	13,60%
NEPUŠAČ	13	65,00%	23	52,30%
VRIJEME PROVEDENO SJEDEĆI KROZ DAN				
< 1 h	0	0,00%	6	13,00%
2 h	4	20,00%	15	34,10%
3-4 h	8	40,00%	7	15,90%
8 h	8	40,00%	14	31,80%
> 8 h	0	0,00%	0	0,00%
VRIJEME PROVEDENO SPAVAJUĆI KROZ DAN				
< 6 h	0	0,00%	10	22,70%
6-7 h	11	55,00%	16	36,40%
8 h	6	30,00%	14	31,80%
> 8 h	3	15,00%	4	9,10%
RADNI STATUS				
STUDENTICA ILI UČENICA	10	50,00%	1	2,2%
ZAPOSLENA (PUNO RADNO VRIJEME)	10	50,00%	26	57,80%
ZAPOSLENA (POLA RADNOG VREMENA)	0	0,00%	1	2,20%
RAD KOD KUĆE	0	0,00%	2	4,40%
NEZAPOSLENA	0	0,00%	5	11,10%
DOMAĆICA	0	0,00%	4	8,90%
UMIROVLJENICA	0	0,00%	4	8,90%

Tablica 12. Rezultati statističke obrade podataka iz anketnog upitnika o zdravstvenom stanju ispitanica iz kontrolne skupine i skupine pretilih žena Zagrebačke županije. Prikazani su podaci o postotku žena koje su pozitivno odgovorile na određeno pitanje anketnog upitnika čiji primjerak se nalazi u prilogu ovog rada.

<i>Statistička obrada podataka iz anketnih upitnika</i>	ALERGIJA		POVIŠEN KRVNI TLAK		DIJABETES		NEKA DRUGA BOLEST	
	normalan BMI	BMI > 30 kg m⁻²	normalan BMI	BMI > 30 kg m⁻²	normalan BMI	BMI > 30 kg m⁻²	normalan BMI	BMI > 30 kg m⁻²
ALERGIJA	15%	15,60%	0%	2,20%	0%	0%	0%	4,40%
POVIŠEN KRVNI TLAK	0%	2,20%	0%	24,40%	0%	15,60%	5%	6,70%
DIJABETES	0%	0%	0%	15,60%	0%	2,20%	0%	0%
NEKA DRUGA BOLEST	0%	4,40%	5%	6,70%	0%	0%	15%	8,90%
UKUPNO	15%	22,20%	5%	48,90%	0%	17,80%	20%	20%
NEMA BOLESTI	65%	22,20%						

5. ZAKLJUČCI

1. Žene Zagrebačke županije normalnog indeksa tjelesne mase (engl. Body Mass Index, BMI) i BMI-a većeg od 30 kg m^{-2} statistički se značajno razlikuju u učestalosti genotipa GG i rizičnog alela G jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs17817449 gena *FTO* čime je potvrđena povezanost analiziranog polimorfizma s BMI-om i pretilošću.
2. Žene Zagrebačke županije normalnog BMI-a i BMI-a većeg od 30 kg m^{-2} statistički značajno se razlikuju u učestalosti bakterija *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus parasanguinis* iz koljena *Firmicutes* u skupini pretilih te bakterija *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis* iz koljena *Firmicutes* te *Serratia ureilytica* iz koljena *Proteobacteria* u kontrolnoj skupini.
3. Žene Zagrebačke županije normalnog BMI-a i BMI-a većeg od 30 kg m^{-2} statistički značajno se razlikuju u životnim navikama i bolestima koje su povezane s pretilošću kao što je krvni tlak te je uočena statistički učestalija pojava povišenog krvnog tlaka u osoba koje nose rizični alel G.

6. LITERATURA

- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn* **5**, 209–219.
- Avila, M., Ojcius, D.M., Yilmaz, O. (2009) The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* **28**, 405–411.
- Barr, S.I., DiFrancesco, L., Fulgoni, V.L. (2016) Association of breakfast consumption with body mass index and prevalence of overweight/obesity in a nationally-representative survey of Canadian adults. *Nutr. J.* (objavljeno online 31. ožujka 2016.). doi: 10.1186/s12937-016-0151-3
- Bašić, M., Butorac, A., Landeka Jurčević, I., Bačun-Družina, V. (2012) Obesity: genome and environment interactions. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **63**, 395–405.
- Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G.S.H., Meyre, D., Golzio, C., Molinari, F., Kadhon, N., Etchevers, H.C., Saudek, V., Farooqi, I.S., Froguel, P., Lindahl, T., O’Rahilly, S., Munnich, A., Colleaux, L. (2009) Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding *FTO* gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 106–111.
- Cameron, J.D., Cyr, M.-J., Doucet, E. (2010) Increased meal frequency does not promote greater weight loss in subjects who were prescribed an 8-week equi-energetic energy-restricted diet. *Br. J. Nutr.* **103**, 1098–1101.
- Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., Burcelin, R., (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* **57**, 1470–1481.
- Cha, S.W., Choi, S.M., Kim, K.S., Park, B.L., Kim, J.R., Kim, J.Y., Shin, H.D. (2008) Replication of genetic effects of *FTO* polymorphisms on BMI in a Korean population. *Obesity* **16**, 2187–2189.
- Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G.T., Teboul, L., Wells, S., Bruning, J.C., Nolan, P.M., Ashcroft, F.M., Cox, R.D. (2010) Overexpression of *FTO* leads to increased food intake and results in obesity. *Nat. Genet.* **42**, 1086–1092.

- DiBaise, J.K., Zhang, H., Crowell, M.D., Krajmalnik-Brown, R., Decker, G.A., Rittmann, B.E. (2008) Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 460–469.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L.M.S., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougneres, P., Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chevre, J.-C., Froguel, P. (2007) Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.* **39**, 724–726.
- Europe PMC Funders Goup (2014) Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet* **384**, 766–781.
- Frayling, T.M. (2007) Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 657–662.
- Frayling, T.M., Ong, K. (2011) Piecing together the *FTO* jigsaw. *Genome Biol.* (objavljeno online 24. veljače 2011.). doi: 10.1186/gb-2011-12-2-104
- Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R.B., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., Shields, B., Harries, L.W., Barrett, J.C., Ellard, S., Groves, C.J., Knight, B., Patch, A.-M., Ness, A.R., Ebrahim, S., Lawlor, D.A., Ring, S.M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M.-R., Sovio, U., Bennett, A.J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R.J.F., Barroso, I., Wareham, N.J., Karpe, F., Owen, K.R., Cardon, L.R., Walker, M., Hitman, G.A., Palmer, C.N.A., Doney, A.S.F., Morris, A.D., Smith, G.D., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I. (2007) A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* **316**, 889–894.
- Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.L., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S.H., Mcdonough, M.A., Cunliffe, S., Mcneill, L.A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A.P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I.S., Sedgwick, B., Barroso, I., Lindahl, T., Ponting, C.P., Ashcroft, F.M., Rahilly, S.O., Schofield, C.J. (2007) The Obesity-Associated *FTO* Gene Encodes a 2-Oxoglutarate – Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science* **318**, 1469–1472.

- Goodson, J.M., Groppo, D., Halem, S., Carpino, E. (2009) Is obesity an oral bacterial disease? *J Dent Res* **88**, 519–523.
- GraphPad (1984) GraphPad Software, Inc., <<http://www.graphpad.com/quickcalcs/>>. Pristupljeno 15. svibnja 2016.
- Han, Z., Niu, T., Chang, J., Lei, X., Zhao, M., Wang, Q., Cheng, W., Wang, J., Feng, Y., Chai, J. (2010) Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature* **464**, 1205–1209.
- Harbron, J., Van der Merwe, L., Zaahl, M.G., Kotze, M.J., Senekal, M. (2014) Fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene polymorphisms are associated with physical activity, food intake, eating behaviors, psychological health, and modeled change in body mass index in overweight/obese caucasian adults. *Nutrients* **6**, 3130–3152.
- Hinney, A., Hebebrand, J. (2008) Polygenic obesity in humans. *Obes. Facts* **1**, 35–42.
- Hinney, A., Vogel, C.I.G., Hebebrand, J. (2010) From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* **19**, 297–310.
- Horikoshi, M., Hara, K., Ito, C., Shojima, N., Nagai, R., Ueki, K., Froguel, P., Kadowaki, T. (2007) Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* **50**, 2461–2466.
- Hubacek, J. a, Bohuslavova, R., Kuthanova, L., Kubinova, R., Peasey, A., Pikhart, H., Marmot, M.G., Bobak, M. (2008) The *FTO* gene and obesity in a large Eastern European population sample: the HAPIEE study. *Obesity* **16**, 2764–2766.
- Hunt, S.C., Stone, S., Xin, Y., Scherer, C.A., Magness, C.L., Iadonato, S.P., Hopkins, P.N., Adams, T.D. (2008) Association of the *FTO* gene with BMI. *Obesity* **16**, 902–904.
- Jacobsson, J.A., Schioth, H.B., Fredriksson, R. (2012) The impact of intronic single nucleotide polymorphisms and ethnic diversity for studies on the obesity gene *FTO*. *Obes. Rev.* **13**, 1096–1109.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., He, C. (2011) N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated *FTO*. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 885–887.

- Lau, F.C., Bagchi, M., Sen, C., Roy, S., Bagchi, D. (2008) Nutrigenomic analysis of diet-gene interactions on functional supplements for weight management. *Curr. Genomics* **9**, 239–251.
- Li, H., Wu, Y., Loos, R.J.F., Hu, F.B., Liu, Y., Wang, J., Yu, Z., Lin, X. (2008) Variants in the fat mass- and obesity-associated (*FTO*) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* **57**, 264–268.
- Loos, R.J.F., Yeo, G.S.H. (2014) The bigger picture of *FTO*: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 51–61.
- Lu, Y., Loos, R.J. (2013) Obesity genomics: assessing the transferability of susceptibility loci across diverse populations. *Genome Med.* (objavljeno online 28. lipnja 2013.). doi: 10.1186/gm459
- Mager, D.L., Haffajee, A.D., Devlin, P.M., Norris, C.M., Posner, M.R., Goodson, J.M. (2005) The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J. Transl. Med.* (objavljeno online 7. srpnja 2005.). doi: 10.1186/1479-5876-3-27
- Marsh, P. (2000) Role of the oral microflora in health. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**, 130–137.
- McCaffery, J.M., Papandonatos, G.D., Peter, I., Huggins, G.S., Raynor, H.A., Delahanty, L.M., Cheskin, L.J., Balasubramanyam, A., Wagenknecht, L.E., Wing, R.R. (2012) Obesity susceptibility loci and dietary intake in the Look AHEAD Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 1477–1486.
- McMurray, F., Church, C.D., Larder, R., Nicholson, G., Wells, S., Teboul, L., Tung, Y.C.L., Rimmington, D., Bosch, F., Jimenez, V., Yeo, G.S.H., O’Rahilly, S., Ashcroft, F.M., Coll, A.P., Cox, R.D. (2013) Adult onset global loss of the *FTO* gene alters body composition and metabolism in the mouse. *PLoS Genet.* (objavljeno online 9. siječnja 2013.). doi: 10.1371/journal.pgen.1003166

- Meyre, D., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Vatin, V., Gutierrez-Aguilar, R., Lyon, D., Ma, M., Choquet, H., Horber, F., Van Hul, W., Van Gaal, L., Balkau, B., Visvikis-Siest, S., Pattou, F., Farooqi, I.S., Saudek, V., O'Rahilly, S., Froguel, P., Sedgwick, B., Yeo, G.S.H. (2010) Prevalence of loss-of-function *FTO* mutations in lean and obese individuals. *Diabetes* **59**, 311–318.
- Mirhosseini, N.Z., Shahr, S., Ghayour-Mobarhan, M., Parizadeh, M.-R., Yusoff, N.A.M., Shakeri, M.-T. (2012) Body fat distribution and its association with cardiovascular risk factors in adolescent Iranian girls. *Iran. J. Pediatr.* **22**, 197–204.
- OEGE (2006) Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies, <<http://www.oege.org/>>. Pristupljeno 17. svibnja 2016.
- Olsen, K., Danielsen, K., Wilsgaard, T., Sangvik, M., Sollid, J.U.E., Thune, I., Eggen, A.E., Simonsen, G.S., Furberg, A.-S. (2013) Obesity and *Staphylococcus aureus* nasal colonization among women and men in a general population. *PLoS One* (objavljeno online 7. svibnja 2013.) doi:10.1371/journal.pone.0063716
- Park, H.-J., Lee, S.-E., Kim, H.-B., Isaacson, R.E., Seo, K.-W., Song, K.-H. (2015) Association of obesity with serum leptin, adiponectin, and serotonin and gut microflora in beagle dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **29**, 43–50.
- Poritsanos, N.J., Lew, P.S., Fischer, J., Mobbs, C. V, Nagy, J.I., Wong, D., Ruther, U., Mizuno, T.M. (2011) Impaired hypothalamic *FTO* expression in response to fasting and glucose in obese mice. *Nutr. Diabetes* (objavljeno online 31. listopada 2011.) doi:10.1038/nutd.2011.15
- Prakash, J., Srivastava, N., Awasthi, S., Agarwal, C.G., Natu, S.M., Rajpal, N., Mittal, B. (2011) Association of *FTO* rs17817449 SNP with obesity and associated physiological parameters in a north Indian population. *Ann. Hum. Biol.* **38**, 760–763.
- Price, R.A., Li, W.-D., Zhao, H. (2008) *FTO* gene SNPs associated with extreme obesity in cases, controls and extremely discordant sister pairs. *BMC Med. Genet.* (objavljeno online 24. siječnja 2008.) doi:10.1186/1471-2350-9-4
- Rontoyanni, V.G., Baic, S., Cooper, A.R. (2007) Association between nocturnal sleep duration, body fatness, and dietary intake in Greek women. *Nutrition* **23**, 773–777.

- Socransky, S.S., Haffajee, A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol. 2000* **38**, 135–187.
- Tung, Y.-C.L., Ayuso, E., Shan, X., Bosch, F., O’Rahilly, S., Coll, A.P., Yeo, G.S.H. (2010) Hypothalamic-specific manipulation of FTO, the ortholog of the human obesity gene *FTO*, affects food intake in rats. *PLoS One* (objavljeno online 19. siječnja 2010.). doi:10.1371/journal.pone.0008771
- van der Pluijm, I., Garinis, G.A., Brandt, R.M.C., Gorgels, T.G.M.F., Wijnhoven, S.W., Diderich, K.E.M., de Wit, J., Mitchell, J.R., van Oostrom, C., Beems, R., Niedernhofer, L.J., Velasco, S., Friedberg, E.C., Tanaka, K., van Steeg, H., Hoeijmakers, J.H.J., van der Horst, G.T.J. (2007) Impaired genome maintenance suppresses the growth hormone--insulin-like growth factor 1 axis in mice with Cockayne syndrome. *PLoS Biol.* (objavljeno online 12. prosinca 2007.). doi:10.1371/journal.pbio.0050002
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcher, S.M. (2007) In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* **24**, 178–198.
- Wing, M.R., Ziegler, J., Langefeld, C.D., Ng, M.C.Y., Haffner, S.M., Norris, J.M., Goodarzi, M.O., Bowden, D.W. (2009) Analysis of *FTO* gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. *Hum. Genet.* **125**, 615–626.
- Xia, Q., Grant, S.F.A. (2013) The genetics of human obesity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1281**, 178–190.
- Yang, F., Ning, K., Chang, X., Yuan, X., Tu, Q., Yuan, T., Deng, Y., Hemme, C.L., Van Nostrand, J., Cui, X., He, Z., Chen, Z., Guo, D., Yu, J., Zhang, Y., Zhou, J., Xu, J. (2014) Saliva microbiota carry caries-specific functional gene signatures. *PLoS One* **9**, 1–11.
- Yasir, M., Angelakis, E., Bibi, F., Azhar, E.I., Bachar, D., Lagier, J.-C., Gaborit, B., Hassan, A.M., Jiman-Fatani, A.A., Alshali, K.Z., Robert, C., Dutour, A., Raoult, D. (2015) Comparison of the gut microbiota of people in France and Saudi Arabia. *Nutr. Diabetes* (objavljeno online 27. travnja 2015.). doi:10.1038/nutd.2015.3

- Zermeño-Rivera, J.J., Astocondor-Pérez, J.P., Valle, Y., Padilla-Gutiérrez, J.R., Orozco-Castellanos, R., Figuera, L.E., Gutiérrez-Amavizca, B.E. (2014) Association of the *FTO* gene SNP rs17817449 with body fat distribution in Mexican women. *Genet. Mol. Res.* **13**, 8561–8567.
- Zhang, D., Li, Z., Wang, H., Yang, M., Liang, L., Fu, J., Wang, C., Ling, J., Zhang, Y., Zhang, S., Xu, Y., Zhu, Y., Lai, M. (2015) Interactions between obesity-related copy number variants and dietary behaviors in childhood obesity. *Nutrients* **7**, 3054–3066.
- Zhang, G., Karns, R., Narancic, N.S., Sun, G., Cheng, H., Missoni, S., Durakovic, Z., Rudan, P., Chakraborty, R., Deka, R. (2010) Common SNPs in *FTO* gene are associated with obesity related anthropometric traits in an island population from the eastern Adriatic coast of Croatia. *PLoS One* **5**, 14–17.

7. PRILOZI

7.1. Popis i objašnjenje kratica

- 2-OG – 2-oksoglutarat
- ACN - acetonitril
- BMI – indeks tjelesne mase (*engl.* Body Mass Indeks)
- CHCA - α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina
- EDCs – obesogeni, ksenobiotičke tvari iz okoliša koje uzrokuju debljanje (*engl.* endocrine disrupting chemicals)
- *FTO* – gen povezan s pretilošću (*engl.* fat mass and obesity-associated gene)
- GWAS – istraživanje povezanosti na temelju cijelog genoma (*engl.* genome-wide association approach)
- PBS – fosfatni pufer
- PCR – lančana reakcija umnožavanja polimerazom (*engl.* The polymerase chain reaction)
- Real-time PCR – lančana reakcije polimeraze u stvarnom vremenu
- SNP – jednostruki nukleotidni polimorfizam (*engl.* single nucleotide polymorphism)
- TFA – trifluoroctena kiselina

7.2. Anketni upitnik

ANKETNI UPITNIK

Poštovani,
povjerljivost Vaših odgovora bit će zaštićena, a dobivene informacije koristit će se samo u svrhu medicinskog istraživanja.

Ime i prezime: _____ ili broj Vašeg uzorka: _____

Datum Vašeg rođenja: _____ Vaša visina / težina: _____ cm/ _____ kg

Kod više ponuđenih odgovora molim zaokružite odgovor/e!

1. Imate li uklonjeno:

- A) – tonzile
- B) – slijepo crijevo

2. Imate li bolesti:

- A) – alergiju bilo koje vrste
- B) – povišeni krvni tlak
- C) – dijabetes
- D) – neka druga _____

3. Jeste li nedavno uzeli lijek:

- A) – antibiotik
- B) – za sniženje povišenog krvnog tlaka
- C) – inzulin
- D) – protiv bolova
- E) – neki drugi. Koji je: _____
- F) – ne uzimam lijekove

4. Ukoliko ste nedavno uzeli antibiotik, koliko je prošlo od zadnje tablete:

- A) – danas sam popila antibiotik
- B) – 1 dan
- C) – 2 dana
- D) – 7 dana
- E) – 8 i više dana

5. Zaokružite tvrdnje koje se odnose na Vas:

- A) – oprala sam zube prije manje od 2 h
- B) – koristila sam antibakterijsku vodicu za ispiranje zubi prije manje od 2 h
- C) – konzumirala sam žvakaću gumu prije manje od sat vremena
- D) – trenutno imam problema u usnoj šupljini (granulom, afte, pokvareni zubi)

6. Radni status:

- A- studentica ili učenica
- B - zaposlena (puno radno vrijeme)
- C - zaposlena (pola radnog vremena)
- D – rad kod kuće
- E - nezaposlena
- F - domaćica
- G- umirovljenica

7. Koliko uobičajeno imate dnevnih obroka?

- A - jedan
- B - dva
- C - tri
- D - četiri
- E – pet ili više

8. Doručkujete li:

- A - ne
- B - da, neredovito
- C - da, redovito

9. Moja svakodnevna prehrana je:

- A – uravnotežena i raznolika
- B – bogata mesom i mesnim prerađevinama
- C – bogata slatkišima i grickalicama
- D – svakodnevno pojedem barem 1 mliječni proizvod
- E – vegetarijanska

10. Dodajete li sol svom obroku za stolom?

- A - nikada
- B - kad jelo nije dovoljno slano
- C - skoro uvijek prije nego što probam

11. Podaci o pušenju:

- A- pušač
- B- povremeni pušač
- C- bivši pušač
- D- nepušač

12. Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena sjedeći?

- A – manje od 1 sata
- C – 3 do 4 sata
- D - 8 sati
- E – više od 8 sati

13. Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena hodajući ili neka druga tjelovježba?

- A – manje od 20 minuta
- C – 1 sat
- D - 2 sata
- E – više od 2 sata

14. Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena spavajući?

- A – manje od 6 sati
- B – 6 do 7 sati
- C – 8 sati
- D - više od 8 sati

**Ovo je kraj upitnika, hvala na sudjelovanju.
Najljepše zahvaljujemo na Vašem vremenu.**

Datum ispunjavanja ankete: _____

7.3. Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju – kontrolna skupina

INFORMIRANI PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

NASLOV (NAZIV) ISTRAŽIVANJA: Povezanost odabranih jednostrukih nukleotidnih polimorfizama u ljudskom genu *FTO* s tjelesnom masom i mikrobiomom usne šupljine u žena zagrebačke županije

MJESTO ISTRAŽIVANJA: Zagreb

IME I PREZIME VODITELJA ISTRAŽIVANJA: prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina

Opći dio koji se treba nalaziti u svakom Informiranom pristanku!

Poštovani,

Pozivamo da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem se ispituje genetički profil gena *FTO* i mikroorganizmi u Vašoj usnoj šupljini. Istraživanje je otvoreno i bez novčane naknade.

Želimo da sudjelujete zato što imate indeks tjelesne mase manji od 25 kg/m^2 (Voditelj istraživanja je prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina. Istraživanje će se provesti u Zagrebu, a financiraju ga ustanove: Interna klinika Rebro, KBC Zagreb, Institut Ruđer Bošković i Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Istraživanje se provodi u svrhu izrade diplomskog rada. Molimo Vas pažljivo pročitajte ovaj Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju u kojem se objašnjava zašto se ispitivanje provodi i koji bi mogli biti rizici za Vaše zdravlje ukoliko pristanete sudjelovati.

U slučaju da ne razumijete bilo koji dio Informiranog pristanka molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču u istraživanju. Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju je dobrovoljno i možete se u bilo kojem trenutku povući. Ukoliko odlučite sudjelovati u ovom istraživanju od Vas će se tražiti da potpišete Informirani pristanak uz naznaku datuma. Informirani pristanak potpisuje i istraživač, a potpisan preslik Informiranog pristanka dobit ćete osobno prije početka navedenog istraživanja. Original Informiranog pristanka nalazi se kod istraživača ovog ispitivanja.

Istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu.

Specifični dio – oblikuje se prema naravi istraživanja

PODACI O ISTRAŽIVANJU

Istraživanje se provodi da bi se dobili podaci o genetičkoj podlozi debljine te našla povezanost sa dosadašnjim znanstvenim spoznajama. Ovo istraživanje je prvo takve vrste u Zagrebu i važno je za prezentaciju faktora rizika pojavljivanja ove bolesti.

Ispitivanje se provodi na dvije skupine ispitanika, bolesnim i zdravim osobama, da bi se moglo usporediti i utvrditi postojanje genskih promjena i učestalost mikroorganizama u usnoj šupljini što će se utvrditi iz uzoraka Vaše krvi i Vaše sline.

Ispitanici će bit podjeljeni u tri skupine prema indeksu tjelesne mase (indeks tjelesne mase $< 25 \text{ kg/m}^2$, indeks tjelesne mase $30 \text{ kg/m}^2 - 40 \text{ kg/m}^2$, indeks tjelesne mase $\geq 40 \text{ kg/m}^2$).

Postojat će samo jedan susret ispitanik- istraživač.

Od ispitanika se očekuje da iskreno popuni anketni listić, provede ispitivanja u bolnici (mjerenje krvnog tlaka), dopusti vađenje krvi i davanje 2 ml sline.

Pri jedinom susretu obaviti će se: upoznavanje s ispitivanjem i postupcima, ispunjavanje anketnog listića, mjerenje krvnog tlaka, davanje uzorka krvi, ispiranje usta s 13 ml fiziološke otopine i davanje 2 ml sline.

Vaša krv nam je potrebna kako bi iz nje izolirali molekule DNK i analizirali gen koji nose rizik za pojavu debljine te kako bi utvrditi jeste li nositelj promjene tog gena.

U vrijeme ispitivanja dovoljan je posjet bolnici Interna klinika Rebro, KBC Zagreb.

MOGUĆI RIZICI I NEUGODNOSTI! Ovo istraživanje ne uključuje nikakav rizik osim uobičajenog svakodnevnog rizika vađenja krvi.

MOGUĆE KORISTI: Rezultati istraživanja neće biti izravno i trenutno korisni za Vas, ali bit će korisni za znanstvenu zajednicu, kao podloga budućim znanstvenim istraživanjima, potencijalno buduće ciljano liječenje sličnih bolesnika i moguće buduće rano otkrivanje rizika za razvijanje težih oblika debljine.

SLUČAJNI NALAZI

Predviđenim ispitivanjima nemoguće je naći slučajne nalaze osim nalaženja odabranih genskih promjena, što se jedino i ispituje.

Ukoliko ispitanik želi biti obaviješten o rezultatima istraživanja, na vlastiti zahtjev bit će mu dostavljeni rezultati ispitivanja.

NOVI REZULTATI: ukoliko se dobiju tijekom ispitivanja, ispitanik će o njima biti obaviješten.

POVJERLJIVOST I ZAŠTITA OSOBNIH PODATAKA

Osobni medicinski podaci i biološki materijal (krv i slina) ispitanika bit će zavedeni pod brojem.

Osobni liječnik koji savjetuje pacijente dodijelit će broj po kojem će se voditi anketni listić te uzorci slina i krvi.

Osobni podaci i biološki materijal nakon završetka istraživanja neće se čuvati.

Osobne podatke i rezultate istraživanja čuvat će jedino osobni liječnik za korist pacijenata, a biološki materijal bit će uništen.

Osobni podaci i biološki materijal bit će korišteni SAMO u predloženom istraživanju i neće biti proslijeđena trećoj strani.

KORIST ZA ISTRAŽIVAČA

Rezultati istraživanja bit će korišteni u svrhu objave znanstveni radova i kongresnih priopćenja.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE

Etičko povjerenstvo zdravstvene ustanove, etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE

Sudjelovanje u ovome istraživanju je u potpunosti dobrovoljno. Ukoliko se odlučite sudjelovati u istraživanju, možete u bilo kojem trenutku prekinuti svoje sudjelovanje u njemu. O Vašoj odluci obavijestit ćete istraživača u pisanom obliku (adresa navedena u ovom ispitivanju). Odluka o prekidanju sudjelovanja u istraživanju ni na koji način neće utjecati na način, postupke i tijek Vašeg liječenja.

PITANJA O ISPITIVANJU I KONTAKT PODACI

Za dodatna pitanja o samom istraživanju možete se obratiti svom osobnom liječniku.

Ako se razbolite ili pretrpíte ozljedu tijekom ovog ispitivanja obratite se svom osobnom liječniku.

Ovaj tekst pročitajte zajedno sa istraživačem i/ili članovima obitelji.

Svojim potpisom potvrđujem da sam informirana o ciljevima, prednostima i rizicima ovog istraživanja i pristajem u njemu sudjelovati.

U Zagrebu, _____

Potpis sudionika

Potpis voditelja istraživanja
(*prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina*
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb)

Ja, liječnik istraživač potvrđujem da sam usmeno pružio potrebne informacije o ovom ispitivanju i dao preslik Informiranog pristanka potpisanog od strane ispitanika i istraživača.

Potpis voditelja istraživanja
(*prim.dr.sc. Jozo Jelčić*
Zavod za endokrinologiju
Interna klinika Rebro, KBC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb)

7.4. Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju – skupina pretilih

INFORMIRANI PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

NASLOV (NAZIV) ISTRAŽIVANJA: Povezanost odabranih jednostrukih nukleotidnih polimorfizama u ljudskom genu *FTO* s tjelesnom masom i mikrobiomom usne šupljine u žena zagrebačke županije

MJESTO ISTRAŽIVANJA: Zagreb

IME I PREZIME VODITELJA ISTRAŽIVANJA: prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina

Poštovani,

Pozivamo da u svojstvu ispitanika sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem se ispituje genetički profil gena *FTO* i mikroorganizmi u Vašoj usnoj šupljini. Istraživanje je otvoreno i bez novčane naknade.

Želimo da sudjelujete zato što imate indeks tjelesne mase veći od 30 kg/m^2 (Voditelj istraživanja je prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina. Istraživanje će se provesti u Zagrebu, a financiraju ga ustanove: Interna klinika Rebro, KBC Zagreb, Institut Ruđer Bošković i Prehrambeno-biotehnološki fakultet. Istraživanje se provodi u svrhu izrade diplomskog rada. Molimo Vas pažljivo pročitajte ovaj Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju u kojem se objašnjava zašto se ispitivanje provodi i koji bi mogli biti rizici za Vaše zdravlje ukoliko pristanete sudjelovati.

U slučaju da ne razumijete bilo koji dio Informiranog pristanka molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču u istraživanju. Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju je dobrovoljno i možete se u bilo kojem trenutku povući. Ukoliko odlučite sudjelovati u ovom istraživanju od Vas će se tražiti da potpišete Informirani pristanak uz naznaku datuma. Informirani pristanak potpisuje i istraživač, a potpisan preslik Informiranog pristanka dobit ćete osobno prije početka navedenog istraživanja. Original Informiranog pristanka nalazi se kod istraživača ovog ispitivanja.

Istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu.

Specifični dio – oblikuje se prema naravi istraživanja

PODACI O ISTRAŽIVANJU

Istraživanje se provodi da bi se dobili podaci o genetičkoj podlozi Vaše bolesti te našla povezanost s dosadašnjim znanstvenim spoznajama. Ovo istraživanje je prvo takve vrste u Zagrebu i važno je za prezentaciju faktora rizika pojavljivanja ove bolesti.

Ispitivanje se provodi na dvije skupine ispitanika, bolesnim i zdravim osobama, da bi se moglo usporediti i utvrditi postojanje genskih promjena i učestalost mikroorganizama u usnoj šupljini što će se utvrditi iz uzoraka Vaše krvi i Vaše sline.

Ispitanici će biti podjeljeni u tri skupine prema indeksu tjelesne mase (indeks tjelesne mase $< 25 \text{ kg/m}^2$, indeks tjelesne mase $30 \text{ kg/m}^2 - 40 \text{ kg/m}^2$, indeks tjelesne mase $\geq 40 \text{ kg/m}^2$).

Postojat će samo jedan susret ispitanik- istraživač.

Od ispitanika se očekuje da iskreno popuni anketni listić, provede ispitivanja u bolnici (mjerjenje krvnog tlaka), dopusti vađenje krvi i davanje 2 ml sline.

Pri jedinom susretu obaviti će se: upoznavanje s ispitivanjem i postupcima, ispunjavanje anketnog listića, mjerjenje krvnog tlaka, davanje uzorka krvi, ispiranje usta s 13 ml fiziološke otopine i davanje uzorka sline. Vaša krv nam je potrebna kako bi iz nje izolirali molekule DNK i analizirali gen koji nose rizik za pojavu debljine te kako bi utvrditi jeste li nositelj promjene gena povezanog s pojavom debljine.

U vrijeme ispitivanja dovoljan je posjet bolnici Interna klinika Rebro, KBC Zagreb.

MOGUĆI RIZICI I NEUGODNOSTI! Ovo istraživanje ne uključuje nikakav rizik osim uobičajenog svakodnevnog rizika vađenja krvi.

MOGUĆE KORISTI: Rezultati istraživanja neće biti izravno i trenutno korisni za Vas, ali bit će korisni za znanstvenu zajednicu, kao podloga budućim znanstvenim istraživanjima, potencijalno buduće ciljano liječenje sličnih bolesnika i moguće buduće rano otkrivanje rizika za razvijanje težih oblika debljine.

SLUČAJNI NALAZI

Predviđenim ispitivanjima nemoguće je naći slučajne nalaze osim nalaženja odabranih genskih promjena, što se jedino i ispituje.

Ukoliko ispitanik želi biti obaviješten o rezultatima istraživanja, na vlastiti zahtjev bit će mu dostavljeni rezultati ispitivanja.

NOVI REZULTATI: ukoliko se dobiju tijekom ispitivanja, ispitanik će o njima biti obaviješten.

POVJERLJIVOST I ZAŠTITA OSOBNIH PODATAKA

Osobni medicinski podaci i biološki materijal (krv i slina) ispitanika bit će zavedeni pod brojem.

Osobni liječnik koji savjetuje pacijente dodijelit će broj po kojem će se voditi anketni listić te uzorci slina i krvi.

Osobni podaci i biološki materijal nakon završetka istraživanja neće se čuvati.

Osobne podatke i rezultate istraživanja čuvat će jedino osobni liječnik za korist pacijenata, a biološki materijal bit će uništen.

Osobni podaci i biološki materijal biti korišteni SAMO u predloženom istraživanju i neće biti proslijeđena trećoj strani.

KORIST ZA ISTRAŽIVAČA

Rezultati istraživanja bit će korišteni u svrhu objave znanstvenih radova i kongresnih priopćenja.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE

Etičko povjerenstvo zdravstvene ustanove, etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE

Sudjelovanje u ovome istraživanju je u potpunosti dobrovoljno. Vaša odluka o tome da li želite ili ne želite sudjelovati u ovom istraživanju ni na koji način neće utjecati na način, postupke i tijek Vašeg liječenja.

Ukoliko se odlučite sudjelovati u istraživanju, možete u bilo kojem trenutku prekinuti svoje sudjelovanje u njemu. O Vašoj odluci obavijestit ćete istraživača u pisanom obliku (adresa navedena u ovom ispitivanju).

Odluka o prekidanju sudjelovanja u istraživanju ni na koji način neće utjecati na način, postupke i tijek Vašeg liječenja.

PITANJA O ISPITIVANJU I KONTAKT PODACI

Za dodatna pitanja o samom istraživanju možete se obratiti svom osobnom liječniku

Ako se razbolite ili pretrpite ozljedu tijekom ovog ispitivanja obratite se svom osobnom liječniku.

Ovaj tekst pročitajte zajedno s osobnim liječnikom i/ili članovima obitelji.

Svojim potpisom potvrđujem da sam informirana o ciljevima, prednostima i rizicima ovog istraživanja i pristajem u njemu sudjelovati.

U Zagrebu, _____

Potpis sudionika

Potpis voditelja istraživanja
(*prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina*
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb)

Ja, liječnik istraživač potvrđujem da sam usmeno pružio potrebne informacije o ovom ispitivanju i dao preslik Informiranog pristanka potpisanog od strane ispitanika i istraživača

Potpis voditelja istraživanja
(*prim.dr.sc. Jozo Jelčić*
Zavod za endokrinologiju
Interna klinika Rebro, KBC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb)