

Polimorfizmi rs4988235 i rs41380347 gena MCM6 u trima populacijama Roma Hrvatske

Poslon, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:444104>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Poslon

**Polimorfizmi rs4988235 i rs41380347 gena
MCM6 u trima populacijama Roma
Hrvatske**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Martina Poslon

**Polymorphisms rs4988235 and rs41380347
in *MCM6* gene in three Croatian Roma
populations**

Master thesis

Zagreb, 2021

Ovaj rad izrađen je u Centru za primijenjenu bioantropologiju Instituta za antropologiju pod voditeljstvom dr.sc. Matee Zajc Petranović i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Petre Korać s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Matei Zajc Petranović na ogromnom strpljenju, nesebičnoj pomoći, uloženom vremenu i stručnim savjetima tijekom pisanja ovog rada. Veliko hvala i izv. prof. dr. sc. Petri Korać za uloženi trud i podršku. Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su sa mnom prolazili kroz dobre i loše trenutke studiranja.

Ovaj rad posvećujem svojem dečku Miroslavu Modriću koji me uvijek potiče i vjeruje u mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Polimorfizmi rs4988235 i rs41380347 gena *MCM6* u trima populacijama Roma Hrvatske

Martina Poslon

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mlijeko sadrži mliječni šećer laktozu, koju u tankom crijevu ljudi razgrađuje enzim laktaza na lako probavljive monosaharide. Laktaza je kod većine ljudi aktivna do navršene pete godine života, nakon čega se postupno smanjuje ekspresija gena za laktazu, *LCT*, što dovodi do prestanka probavljanja laktoze (intolerancija), a konzumacija mliječnih proizvoda uzrokuje gastrointestinalne tegobe. Konzumacija mlijeka i mliječnih prerađevina počela je domestikacijom stoke u neolitik, a paralelno s njom došlo je do pojave varijanti u regulacijskoj regiji gena *LCT* koje omogućuju ekspresiju laktaze i razgradnju laktoze i u odrasloj dobi. U ovom radu utvrđene su učestalosti alela i genotipova varijanti rs4988235 (-13910C>T) i rs41380347 (-13915T>G) u populacijama Roma Hrvatske (n=440) te je analizirana njihova povezanost s antropometrijskim obilježjima. Romi su primjer izolirane populacije koja je prošla kroz nekoliko učinaka utemeljitelja te za koju je karakteristična endogamija. Učestalosti genotipova i alela polimorfizma rs4988235 značajno se razlikuju između triju romskih populacija Hrvatske; C alel je češći u populacijama Baranje i Zagreba, dok se T alel povezan s perzistencijom laktaze, u Međimurju javlja 2x češće nego li u Baranji i 3x češće nego li u Zagrebu. Polimorfizam rs41380347 je u romskim populacijama Hrvatske monomorfan. Analizirane genske varijante nisu pokazale povezanost s antropometrijskim pokazateljima uhranjenosti. Romi Međimurja su reproduktivno izoliraniji od preostalih dviju romskih skupina, a analiza genetičkih udaljenosti Roma u odnosu na 20 populacija svijeta potvrđuje njihovo indijsko porijeklo, kao i dijeljenje zalihe gena s populacijama koje su im geografski blizu.

(76 stranica, 3 slike, 19 tablica, 86 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: intolerancija laktoze, perzistencija laktaze, *MCM6*, genski polimorfizmi, populacija Roma

Voditelj: dr. sc. Matea Zajc Petranović

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

Ocjenitelji:

izv. prof. dr. sc. Petra Korać
prof. dr. sc. Ines Radanović
prof. dr. sc. Željka Soldin

Rad prihvaćen: 15. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Polymorphisms rs4988235 and rs41380347 in *MCM6* gene in three Croatian Roma populations

Martina Poslon

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Milk contains the milk sugar lactose, which is broken down in the small intestine by the enzyme lactase into easily digestible monosaccharides. Lactase is active in most people until the age of five, after which the expression of the lactase gene, LCT, gradually decreases, which leads to loss of the ability to digest lactose (intolerance), and the consumption of dairy products causes gastrointestinal problems. Consumption of milk and dairy products began with the domestication of livestock in the Neolithic, parallel with the appearance of variants in the regulatory region of the LCT gene, which enable lactase expression and lactose degradation in adulthood. In this paper, the frequencies of alleles and genotypes of variants rs4988235 (-13910C>T) and rs41380347 (-13915T>G) in the Roma populations in Croatia (n = 440) were determined and their association with anthropometric characteristics was examined. The Roma are an example of an isolated population that underwent through several founder effects and is characterized by endogamy. The frequencies of genotypes and alleles of the rs4988235 polymorphism differ significantly between the three Roma populations in Croatia; C allele is more frequent in the populations of Baranja and Zagreb, while T allele associated with lactase persistence, occurs in Međimurje 2x more frequently than in Baranja, and 3x more often than in Zagreb. Polymorphism rs41380347 is monomorphic in the Roma population in Croatia. The examined genetic variants showed no association with anthropometric indicators of nutrition status of Roma. Roma from Međimurje is reproductively isolated from other two investigated populations, and the analysis of the genetic distances of Roma in relation to 20 worldwide populations confirms their Indian origin, as well as sharing gene pool with populations in close geographical proximity.

(76 pages, 3 figures, 19 tables, 86 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: lactose intolerance, lactase persistence, *MCM6*, genetic polymorphisms, Roma population

Supervisor: Matea Zajc Petranović, PhD

Co-supervisor: Associate Professor Petra Korać

Reviewers:

Assoc. Prof. Petra Korać

Prof. Ines Radanović

Prof. Željka Soldin

Thesis accepted: 15. rujna 2021.

Popis kratica

dsDNA- dvolančana DNA, od eng. *double stranded DNA*

FRET- akronim od eng. *Fluorescence Resonant Energy Transfer*

HWE- Hardy-Weinbergova ravnoteža, od eng. *Hardy-Weinberg equilibrium*

IBP- akronim od eng. *International Biological Programme*

metoda IBD- akronim od eng. *Isolation By Distance*

ITM- indeks tjelesne mase, od eng. *Body Mass Index*

KASP- od eng. *Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system*

LCT- gen za laktazu, od eng. *human lactase gene*

LPH- laktazno-florizinska hidrolaza, od eng. *lactase-phlorizin hydrolase*

MCM6- gen MCM6, akronim od eng. *Minichromosome Maintenance Complex Component 6*

ns- nije statistički značajno, od eng. *non significant*

p- vrijednost- statistička mjera u postupku provjeravanja hipoteze

PCR- lančana reakcija polimerazom, akronim od eng. *Polymerase Chain Reaction*

SDS- natrij duodecil sulfat, od eng. *sodium dodecyl sulfate*

SNP- polimorfizam jednog nukleotida, akronim od eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*

SPSS- akronim od eng. *Statistical Package for Social Sciences*

TSR- omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora, od eng. *triceps/subscapular ratio*

WC- opseg struka, od eng. *waist circumference*

WHR- omjer opseg struka/opseg bokova, od eng. *waist/hip ratio*

WHtR- omjer opseg struka/tjelesna visina, od eng. *waist to height ratio*

SADRŽAJ

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Romi | 1 |
| 1.1.1. Porijeklo i obilježja populacije Roma..... | 1 |
| 1.1.2. Populacija Roma u Republici Hrvatskoj..... | 2 |
| 1.2. Neolitska revolucija - prelazak s nomadskog na sjedilački način života | 3 |
| 1.2.1. Romi kao primjer nomada..... | 4 |
| 1.3. Mlijeko i mliječni šećer laktoza | 4 |
| 1.3.1. Razgradnja laktoze enzimom laktaza..... | 6 |
| 1.3.2. Evolucija konzumacije mlijeka i laktazno perzistentnog fenotipa..... | 6 |
| 1.3.3. Gen <i>LCT</i> i njegovi polimorfizmi..... | 9 |
| 1.3.4. Fenotipovi tolerancije na laktozu u svijetu..... | 11 |
| 1.3.5. Fenotipovi tolerancije na laktozu u Republici Hrvatskoj..... | 12 |
| 1.4. Selektivna prednost laktazno perzistentnog fenotipa | 12 |
| Laktazno perzistentni fenotip i antropometrijska obilježja..... | 14 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 15 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 16 |
| 3.1. Uzorak | 16 |
| 3.2. Izolacija DNA iz pune krvi metodom isoljavanja | 17 |
| 3.2.1. Uzorci krvi..... | 17 |
| 3.2.2. Postupak izolacije DNA metodom isoljavanja..... | 17 |
| 3.3. Postupak genotipizacije uzoraka | 18 |
| 3.4. Antropometrijska mjerenja provedena u istraživanju | 20 |
| 3.4.1. Indeksi izvedeni iz izmjerenih antropometrijskih vrijednosti..... | 22 |
| 3.5. Biostatističke analize | 24 |
| 4. REZULTATI | 26 |
| 4.1. Demografski opisi ispitanika | 26 |
| 4.2. Učestalosti alela i genotipova | 27 |
| 4.3. Originalna i izvedena kvantitativna antropometrijska obilježja | 30 |
| 4.4. Indeksi uhranjenosti | 35 |
| 4.5. Analiza povezanosti polimorfizma gena <i>MCM6</i> s antropometrijskim obilježjima | 37 |
| 4.6. Međuodnosi varijacija istraživanih polimorfizama Roma i ostalih 20 svjetskih populacija | 44 |
| 5. RASPRAVA | 46 |
| 6. ZAKLJUČCI | 49 |
| 7. LITERATURA | 50 |
| 8. PRILOZI | 60 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 8.1. Ulazni dokument za analize provedene u softveru Arlequin..... | 60 |
| 8.2. Matrica Fst vrijednosti generirana u softveru Arlequin | 69 |
| 8.3. Ulazni dokument za analizu u softveru IBD | 71 |
| 9. ŽIVOTOPIS..... | 76 |

1. UVOD

1.1. Romi

1.1.1. Porijeklo i obilježja populacije Roma

Romi su najpoznatija, široko rasprostranjena transnacionalna etnička skupina koja nastanjuje brojne zemlje u Europi i svijetu. Heterogena su skupina sačinjena od puno manjih ili većih grupa koje karakteriziraju zajedničko porijeklo, običaji i obilježja jezika. Ova etnička skupina broji 15 milijuna članova od kojih najveći broj članova, otprilike 12 milijuna, živi u Europi.

Područjem s kojeg Romi potječu, smatra se područje oko rijeke Ganges u sjeverozapadnoj Indiji. Prema Čičak (1987), zbog čestih sukoba i ratovanja s Tatarima, Mongolima i Hunima, Romi oko tisućite godine napuštaju područje Gangesa i kreću u seobe. U svojim seobama najprije su dospjeli u Perziju, odakle je jedna skupina krenula prema Europi, a druga prema Egiptu i sjeveru Afrike. Prema Vojak i Kovačev (2018), migracijski valovi Roma započinju od petog stoljeća nadalje, pri čemu tijekom više migracijskih valova Romi naseljavaju balkanske zemlje u 14. stoljeću, a ostale europske zemlje naselili su u 15. i 16. stoljeću (Dragun 2000). Iako su se i u kasnijim stoljećima uglavnom selili, neki su čak dospjeli i u Sjedinjene Američke Države, danas većina Roma živi sjedilačkim životom.

Romi se tradicionalno bave glazbom, kovanjem, ocaklivanjem i prodavanjem posuđa te održavanjem sajмова (Dragun 2000). Iako žive u neposrednoj blizini drugih naroda, Romi su u velikoj mjeri zadržali svoj osebujan način života i kulturu, koju su ipak donekle izmijenili kroz doticaje s kulturama drugih naroda tijekom čestih seoba. Utjecaj drugih kultura posebice se očituje u njihovom jeziku i vjeri. Tako se, primjerice, Romi u Italiji služe srpskim izrazima za opisivanje srodstvenih odnosa, a grčkim izrazima za opisivanje bračnih odnosa iako im je jezik indijanskog porijekla (Liégeois 1994).

Naziv „Rom“ na romskom jeziku znači čovjek, kako se oni sami nazivaju, no puno ih se češće naziva drugim nazivima kao što su primjerice Cigani, Tigani (Rumunjska), Zigeuner (Njemačka), Zingari (Italija), Ciganos (Portugal), Gipsy (Engleska), Jeđupak (Dubrovnik) itd. (Hrvatić i Ivančić 2000). Položaj Roma tijekom povijesti je često bio loš zbog njihove zatvorenosti i izoliranosti, a često i diskriminacije od pripadnika drugih naroda. Iako se na poboljšanju njihove integracije u društvo radi od sredine 20. stoljeća, Romi su i dalje vrlo često

isključeni iz političkog, ekonomskog i društvenog života. Zbog nedostatka materijalnih sredstava i loših životnih uvjeta češće boluju od kroničnih bolesti, a mnoga romska djeca ne pohađaju školu što im predstavlja prepreku za zaposlenje i uključivanje na tržište rada čime bi ostvarili bolje životne uvjete.

1.1.2. Populacija Roma u Republici Hrvatskoj

Romi su naselili teritorij Republike Hrvatske u 14. stoljeću, najvjerojatnije bježeći od turskih pohoda u jugoistočnoj Europi. Na njihovu prisutnost na tlu današnje Hrvatske ukazuje i pisani dokument koji datira iz 1362. godine, a u kojem se spominju Romi na području Dubrovnika. Spisi iz 1373. godine opisuju Rome u Zagrebu kao vješte svirače i čuvare tradicionalnih zanimanja (Hrvatić i Ivančić 2000). Romi su radili kao kožari, postolari, kovači, trgovci, prorocatelji, krotitelji životinja i tome slično (Vojak i Kovačev 2018).

Popis stanovništva iz 2011. godine pokazuje da udio Roma u nacionalnoj strukturi stanovništva Republike Hrvatske iznosi 0,40% tj. u Republici Hrvatskoj živi 16975 pripadnika romske nacionalne manjine (https://www.dzs.hr/Hrv/censuses/census2011/results/htm/H01_01_05/H01_01_05.html). S obzirom na već spomenutu stigmatizaciju i marginalizaciju, procjenjuje se da su prilikom popisivanja stanovništva pribjegli etnomimikriji te da je stvarni udio Roma u Republici Hrvatskoj barem 3 puta veći. Najveći broj pripadnika romske nacionalne manjine u Republici Hrvatskoj živi na području Baranje, Međimurja i grada Zagreba.

Romi koji žive na području Baranje i Međimurja nazvani su prema starorumunjskom jeziku Ijimb d' bjaš, koji govore, Vlaškim Romima ili Romima Bajašima. Romi koji žive na području grada Zagreba i okolice govore jezikom romani chib i nazivaju se Balkanskim Romima ili „Čibašima“. Balkanski Romi potomci su Roma koji su bili pripadnici početne migratorne skupine koja se nastanila na području istočne Europe. Dio članova te početne migratorne skupine nastavio je svoj put prema zapadnoj i sjevernoj Europi pri čemu su neki pripadnici došli na područje današnje Rumunjske (Vlaške i Moldavije) gdje su bili zarobljeni i prisiljeni raditi kao robovi u rudnicima. Rome koji su bili robovi u rudnicima i njihove potomke nazivamo Vlaški Romi. U 19. stoljeću, kad se ukinulo ropstvo, Vlaški Romi su napustili Rumunjsku i krenuli prema zapadu, u Srbiju, Mađarsku, Hrvatsku i druge balkanske zemlje, gdje se zadržavaju i počinju živjeti slobodnijim životom (Škarić-Jurić i sur. 2007).

1.2. Neolitska revolucija - prelazak s nomadskog na sjedilački način života

U samim počecima evolucije ljudskog roda, naši preci su bili lovci-sakupljači. Za lovačko-sakupljačka društva karakteristično je da ljudi ne uzgajaju biljke i ne pripitomljavaju životinje, već za prehranu koriste biljne i životinjske vrste koje mogu skupiti i uloviti u svojoj bližoj okolini, zbog čega u potrazi za hranom neprestano sele i nemaju stalno boravište. Život lovaca-sakupljača naziva se još i nomadskim načinom života, a život ljudi koji su počeli proizvoditi vlastitu hranu kultiviranjem biljaka i pripitomljavanjem životinja naziva se sjedilačkim (sedentarnim) načinom života. Zbog načina života koji uključuje česte seobe, zajednice nomada broje manji broj članova u odnosu na zajednice koje žive sjedilačkim načinom života te je većina članova nomadske zajednice u srodstvu.

Velika promjena u načinu života dogodila se prije otprilike 12 tisuća godina, na početku neolitika, kada su ljudi lovačko-sakupljački način života postupno zamjenjivali sjedilačkim načinom života (Larsen 2006). Ovaj prijelaz praćen je pripitomljavanjem prvih životinja i kultiviranjem biljaka. Prema dominantnoj teoriji, ljudi su najprije počeli pripitomljivati životinje, a zatim uzgajati biljke kao hranu za životinje (Smith 1993). Pretpostavlja se kako Natufijska kultura, koja je trajala od otprilike 15000 do 11500 godina prije naše ere, predstavlja prijelaz s lovačko-sakupljačkog na sjedilački način života. Za ovu kulturu specifična je izrada oštrica sjekira koje su imale svoju praktičnu primjenu u žetvi kultiviranih biljaka (Grosman i Munro 2017). Osim toga, korištene su razne tehnike lova plijena koje su uključivale upotrebu zamki i strelica za lov životinja poput jelena, divljih svinja i planinskih gazela (Grosman i Munro 2017). Rane poljoprivredne zajednice bavile su se uzgojem ječma, pšenice, prosa i riže (Latham 2013).

Počeci kultiviranja biljaka i životinja vezani su uz dolinu Srednjeg Eufrata i Južne Palestine. Prije otprilike osam tisuća godina, ljudi su već domestificirali ovce i koze i konzumirali njihovo mlijeko (Vigne i Helmer 2006). Analize organskih ostataka na arheološkim nalazima kao što je na primjer posuđe, upućuju na to da su ljudi konzumirali mlijeko (Craig i sur. 2005). U Hrvatskoj je na arheološkom nalazištu u Vučedolu pronađen veći broj kostiju, zubi i rogova goveda, uglavnom ženki za koje se smatra da su korištene za rasplod i proizvodnju mlijeka.

1.2.1. Romi kao primjer nomada

Primjer naroda koji je kroz najveći dio svoje povijesti živio nomadskim načinom života su Romi. Česte seobe Roma su obilježje koje ih najviše razlikuje od sedentarnih, ne-romskih populacija (McCaffery 2009). Prema Hrvatić i Ivančić (2000), migracije su karakteristične za oblikovanje stila života Roma, no unatoč tome nisu svi Romi nomadi. Početkom devedesetih godina prošlog stoljeća, oko 20% europskih Roma živjelo je nomadskim načinom života, idućih 20% polunomadskim načinom života- načinom u kojem se sele tijekom jednog, određenog dijela godine, dok su tijekom drugog stacionirani na određenom području, a preostalih je 60% europskih Roma bilo trajno stacionirano (Liégeois 1994). Kao najčešći uzroci suvremenih migracija Roma, navode se pokušaji ne-romskog stanovništva da ih prisilno sedentarizira te integrira u suvremeno društvo. Čak i kad se Romi stacioniraju na nekom području, uvijek postoji mogućnost da se ponovno vrate nomadskom načinu života.

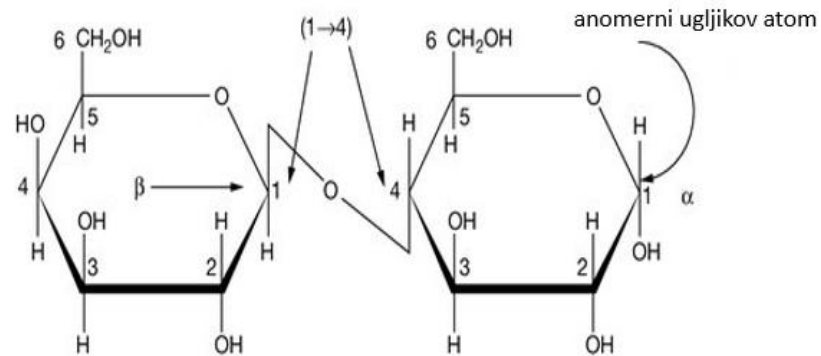
U svojim seobama Romi su najčešće putovali karavanama radi sigurnosti. Rome su na njihovim putovanjima kroničari opisivali kao tamnopute putnike koji se kreću pješice ili karavanama, s puno žena i djece na prenatrpanim kolima (Hrvatić i Ivančić 2000). Obično su putnici neke karavane naseljavali rubne dijelove grada nastojeći se držati što bliže jedni drugima (Liégeois 1994). Česte seobe Roma utjecale su na njihovo obrazovanje, životne uvjete i prehranu. Populacije Roma koje su živjele u izoliranim naseljima ili sjedilačkim načinom života u većoj su mjeri uspjele sačuvati svoj etnički identitet (Hrvatić i Ivančić 2000). U današnje vrijeme nomadska kretanja Roma ograničena su uglavnom na dnevne migracije u veće gradove ili naselja radi posla ili školovanja dok su se tijekom prošlosti seobe Roma nastojale ograničiti i spriječiti jer se smatralo kako Romi prenose razne zarazne bolesti kao što je, primjerice, kuga.

1.3. Mlijeko i mliječni šećer laktoza

Mlijeko je važna namirnica u prehrani jer sadrži bjelančevine, ugljikohidrate, masti, vitamine (originalno sadrži vitamine B kompleksa i vitamin A, a često je obogaćeno i vitaminom D), minerale (kalcij) te esencijalne aminokiseline (Bovenhuis i sur. 2013). Od ugljikohidrata prisutnih u ljudskom i životinjskom mlijeku, najzastupljeniji je disaharid laktoza koji nastaje u mliječnim žlijezdama. Laktoza se naziva još i „mliječnim šećerom“ zato što se najvećim dijelom nalazi u mlijeku. Primjerice, kozje mlijeko sadrži 4,1% laktoze, ovčje i

kravlje 4,8% laktoze, kobilje mlijeko sadrži 6,2% laktoze, a ljudsko mlijeko sadrži najviše laktoze - čak 7% (Shendurse i Khedkar 2016).

Disaharid laktoza, kemijske formule $C_{12}H_{22}O_{11}$, građen je od dvaju monosaharida: β -D-glukoze i β -D-galaktoze. Molekule galaktoze i glukoze u molekuli laktoze povezane su $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnom vezom. Haworthova projekcijska formula molekule laktoze i $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidna veza prikazane su na Slici 1. (prilagođeno i preuzeto prema Shendurse i Khedkar 2016). $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidna veza nastala je povezivanjem poluacetalne skupine na prvom ugljikovom atomu molekule galaktoze i hidroksilne skupine na četvrtom ugljikovom atomu molekule glukoze. Ovakvim načinom povezivanja na anomernom (prvom) ugljikovom atomu molekule glukoze ostala je slobodna poluacetalna skupina zbog čega je laktoza reducirajući šećer.



Slika 1. Haworthova projekcijska formula molekule laktoze; $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidna veza povezuje molekulu galaktoze i glukoze, prilagođeno i preuzeto prema Shendurse i Khedkar 2016.

Laktoza je, osim u svježem nefermentiranom mlijeku, prisutna i u fermentiranim mliječnim proizvodima kao što su primjerice jogurt i razne vrste sireva. U fermentiranim mliječnim proizvodima laktoza je prisutna u manjem postotku nego u nefermentiranom svježem mlijeku, jer se prilikom fermentacije i proizvodnje mliječnih proizvoda dio laktoze pretvara u mliječnu kiselinu, $C_3H_6O_3$. Laktoza je u malim količinama prisutna i u plodovima nekih biljaka kao što je primjerice biljka *Achras sapota* iz porodice Sapotaceae (Shendurse i Khedkar 2016).

Laktoza ima praktičnu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U slastičarstvu se koristi kao zaslađivač u proizvodnji slastica i karamela, a u farmaceutskoj industriji koristi se u proizvodnji tableta.

Laktoza koju čovjek unese u organizam razgrađuje se u tankom crijevu uz pomoć enzima laktaze.

1.3.1. Razgradnja laktoze enzimom laktaza

Enzim laktaza, β -galaktozidaza ili laktazno-florizinska hidrolaza (od eng. *lactase-phlorizin hydrolase*, LPH), prisutan je u epitelnim stanicama crijevnih resica u tankom crijevu ljudi i sisavaca (osim morskih lavova). Tanko crijevo ima važnu ulogu u procesu probave hrane jer se u njemu odvija apsorpcija hranjivih tvari u koje se ubrajaju i ugljikohidrati. Tanko crijevo sastoji se od 3 dijela: dvanaesnika (lat. *duodenum*), taštog crijeva (lat. *jejunum*) i vitog crijeva (lat. *ileum*). Aktivnost enzima laktaze uočena je već u dvanaesniku, a vrhunac aktivnosti uočen je u taštom crijevu, nakon čega se aktivnost u ostatku tankog crijeva smanjuje (Mulcare 2005).

Laktaza je enzim koji u tankom crijevu hidolizira $\beta(1\rightarrow4)$ glikozidnu vezu u molekuli laktoze pri čemu nastaju monosaharidi galaktoza i glukoza koji se, za razliku od disaharida laktoze, mogu apsorbirati kroz sluznicu tankog crijeva u krvotok (Ségurel i Bon 2017). Strukturu laktaze čine četiri identična polipeptidna lanca, svaki dugačak 1023 aminokiseline, koji su međusobno povezani nekovalentnim vezama. Laktaza ima dva aktivna mjesta, a osim što hidrolizira glikozidnu vezu u molekuli laktoze, može hidrolizirati glikozidnu vezu i u mnogim drugim β glikozidima (Swallow 2003).

Ekspresija laktaze započinje još tijekom fetalnog razvoja, u drugom tromjesečju, a povećava se tijekom trećeg tromjesečja (Doell i Kretchmer 1962). Vrhunac ekspresije laktaze slijedi odmah nakon rođenja novorođenčadi za koje je vrlo važno da mogu probaviti laktozu ukoliko im je majčino mlijeko jedini izvor hranjivih tvari. Nakon prvih nekoliko mjeseci djetetova života, ekspresija laktaze se smanjuje (Deng i sur. 2015).

1.3.2. Evolucija konzumacije mlijeka i laktazno perzistentnog fenotipa

S obzirom na aktivnost i neaktivnost enzima laktaze nakon dječje dobi, razlikujemo dva fenotipa: laktazno perzistentni i laktazno neperzistentni fenotip (hipolaktazija). Smanjenje ekspresije laktaze s vremenom dovodi do intolerancije na laktozu, odnosno do nemogućnosti probavljanja laktoze kod laktaza neperzistentnih osoba (Troelsen i sur. 2003). Kod laktaza neperzistentnih osoba, nakon dvije do tri godine života ekspresija laktaze počinje se smanjivati,

a u razdoblju od pete do desete godine života, aktivnost laktaze održava se na niskoj razini (Misselwitz i sur. 2013). Kod većine sisavaca i ljudi, aktivnost laktaze u odrasloj dobi iznosi oko 10% aktivnosti laktaze u neonatalnoj dobi (Szilagyi i Ishayek 2018). Suprotno tome, laktaza perzistentne osobe zahvaljujući varijantama u genu *MCM6* (akronim od eng. *Minichromosome Maintenance Complex Component 6*), unutar kojeg se nalazi regulacijska regija ekspresije gena za laktazu *LCT* (od eng. *human lactase gene*), zadržavaju mogućnost ekspresije laktaze, a time i mogućnost probavljanja laktoze i u kasnijim razdobljima života, nakon dječje dobi i prestanka dojenja.

Laktazno perzistentni fenotip pojavio se prije otprilike 7500-10000 godina, najvjerojatnije istovremeno u Europi, Africi i na Bliskom Istoku (Swallow 2003). Navedena korelacija često se navodi kao primjer koevolucije gena i kulture, tj. slučaja kada je neka genetska varijanta u okolišu u kojem je došlo do promjene kulture življenja, izložena selektivnoj prednosti u odnosu na druge varijante (Malmström i sur. 2010). Tako je perzistencija na laktozu postala češća u populacijama koje su se bavile stočarstvom te konzumirale mlijeko i mliječne proizvode i obratno, konzumacija mlijeka i mliječnih proizvoda postala je češća u populacijama u kojima je bio izraženiji laktazno perzistentni fenotip (Itan i sur. 2009). Procjenjuje se da koevolucija perzistencije na laktozu i konzumacije mlijeka u Europi datira otprije 6256 do 8683 godine, a pojavila se na području između središnje Europe i sjevernog Balkana (Itan i sur. 2009).

Model su prvi predstavili Feldman i Cavalli-Sforza (1989); izračunali su da bi bilo potrebno otprilike 300 naraštaja (vrijeme koje je proteklo od pojave stočarstva do sadašnjosti) da bi se učestalost alela odgovornog za sposobnost sinteze laktaze povećala, no samo u slučaju jakog, okomitog prijenosa kulture potrošnje mlijeka. Da se dogodilo da veliki broj naših predaka nije konzumirao mlijeko, alel odgovoran za sposobnost sinteze laktaze kod njihovih bi potomaka dostigao visoku učestalost samo uslijed nerealno velike selekcijske prednosti potrošnje mlijeka. Iz toga prozlazi da zemljopisna razdioba sposobnosti sinteze laktaze odražava populacijske razlike u jačini prijenosa kulture potrošnje mlijeka.

Laktazno neperzistentni fenotip javlja se u nekom trenutku života u otprilike 75% svjetske populacije, dok je u preostalih 25% svjetske populacije izražen laktazno perzistentni fenotip (Mattar i sur. 2012). Osobe koje su neperzistentne na laktozu mogu apsorbirati 42-77% od unesenih 12 grama laktoze u organizam, a osobe koje su perzistentne mogu apsorbirati i do 95% istog unosa (Bond i Levitt 1976).

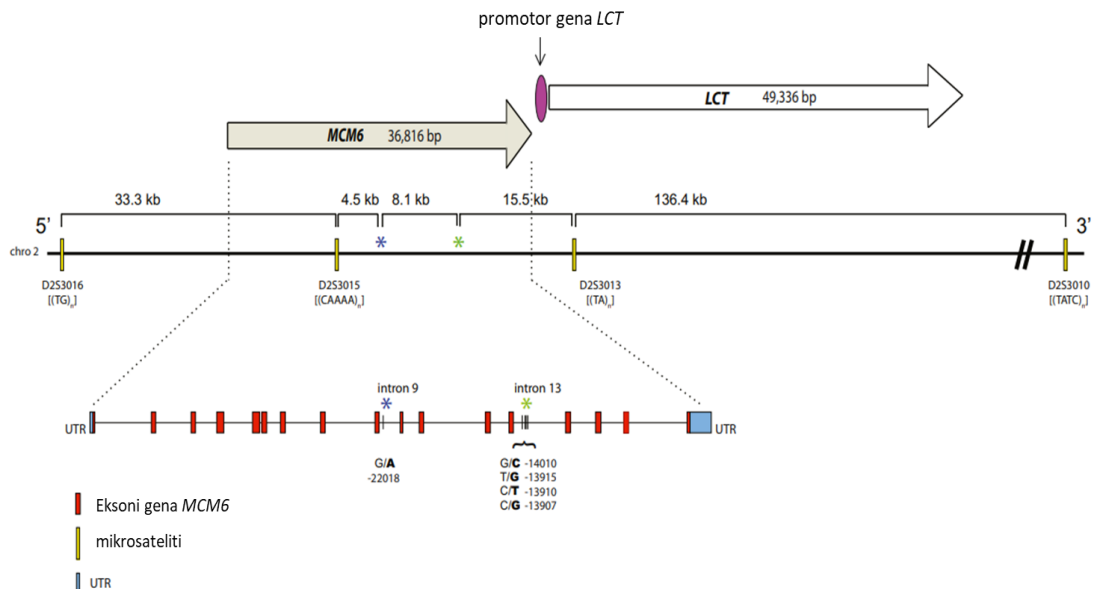
Hipolaktazija (laktazno neperzistentni fenotip) se nasljeđuje recesivno i autosomno. Osobe kod kojih je izražen laktazno neperzistentni fenotip su recesivni homozigoti jer su od svojih roditelja, koji su mogli biti heterozigoti ili homozigoti za laktazni alel s niskom aktivnošću naslijedili dvije kopije tog alela s niskom aktivnošću. Osobe kod kojih je izražen laktazno perzistentni fenotip mogu biti heterozigoti ili dominantni homozigoti za alel s većom aktivnošću, tzv. „laktaza-aktivan“ alel (Tagliaretti 2017). Istraživanja pokazuju kako je kod osoba koje su dominantni homozigoti za laktazno perzistentni fenotip aktivnost enzima laktaze čak 10 puta veća nego kod osoba koje su recesivni homozigoti i kod kojih je izražen laktazno neperzistentni fenotip. Kod osoba koje su heterozigoti, aktivnost enzima laktaze kreće se u rasponu između aktivnosti izmjerenih kod recesivnih i dominantnih homozigota (Enattah i sur. 2007).

Kada govorimo o laktozi i fenotipovima povezanima s laktozom, važno je razlikovati još dva pojma, a to su malapsorpcija laktoze i intolerancija na laktozu. Malapsorpcijom laktoze naziva se neučinkovita probava laktoze zbog toga što je ekspresija enzima laktaze smanjena ili je enzim oštećen (Misselwitz i sur. 2013). Najčešći uzrok malapsorpcije je neperzistentnost na laktozu. Zbog malapsorpcije laktoze, dio laktoze koja je unesena u organizam i razgrađena na monosaharide se ne apsorbira u tankom crijevu, već probavom dopijeva u debelo crijevo (Shaukat i sur. 2010). Malapsorpcija laktoze nije isto što i intolerancija na laktozu (Misselwitz i sur. 2013). Intolerancija na laktozu odnosi se na gastrointestinalne poteškoće koje su uzrokovane nepotpunom probavom laktoze. Do nepotpune probave laktoze dolazi zbog nedovoljne koncentracije laktaze, zbog čega se laktoza ne može u potpunosti razgraditi na galaktozu i glukozu. Nepotpuna probava laktoze dovodi do priljeva tekućine i elektrolita u unutrašnjost crijeva, s obzirom da je u crijevima veći osmotski tlak, što uzrokuje dijareju (Malik i Panuganti 2018). Osim toga, bakterije koje se nalaze u crijevima fermentiraju neapsorbiranu laktozu kako bi ju razgradile na masne kiseline pri čemu se stvaraju plinovi kao što su vodik, metan i ugljikov dioksid, što uzrokuje smetnje kao što je nadutost (Ingram i sur. 2008). Nemogućnost potpune probave laktoze očituje se simptomima kao što su: dijareja, nadutost i bol u abdomenu, flatulencija (ispuštanje vjetrova), mučnina i povraćanje. Simptomi se najčešće javljaju pola sata do dva sata nakon konzumacije mlijeka ili mliječnih proizvoda (Malik i Panuganti 2018). Osim navedenih simptoma, česti su simptomi i bolovi u mišićima i zglobovima, glavobolja, umor, alergije, srčane aritmije, gubitak koncentracije, teškoće u kratkoročnom pamćenju, upale grla, učestalo mokrenje i drugi, a intolerancija laktoze može uzrokovati i mučninu, povraćanje i konstipaciju (zatvor) (Matthews i sur. 2005).

1.3.3. Gen *LCT* i njegovi polimorfizmi

Laktazu kodira jedan gen, *LCT*, veličine 49,3 kb, koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 2; 2q21.3 (Gerbault i sur. 2017). Gen *LCT* sadrži 17 eksona i kodira ukupno 1927 aminokiselina (Anguita-Ruiz i sur. 2020). S laktazno perzistentnim fenotipom povezane su varijante polimorfizama jednog nukleotida (akronim od eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) gena *LCT*. Polimorfizam jednog nukleotida je promjena jedne baze u molekuli DNA koja se javlja u populaciji s učestalošću većom od 1% - ako je rjeđa, smatra se mutacijom.

Kod osoba perzistentnih na laktazu otkriveni su sljedeći polimorfizmi jednog nukleotida: -13.907G>C (rs41525747), -13.910C>T (rs4988235), -13.915T>G (rs41380347), -14.009T>G (rs869051967), -14.010G>C (rs145946881) te -22.018G>A (rs182549) (Enattah i sur. 2002; Imtiaz i sur. 2007; Ingram i sur. 2007, 2009; Jones i sur. 2013; Tishkoff i sur. 2006; Gerbault i sur. 2017). Većina navedenih polimorfizama smještena je otprilike 14 kb uzvodno od promotora za gen *LCT*, u intronu 13 susjednog gena *MCM6* koji djeluje kao pojačivač *LCT* gena, kao što je prikazano na Slici 2. (Gerbault i sur. 2017; slika je prilagođena i preuzeta prema Ranciaro i sur. 2014). Iznimka je polimorfizam -22.018G>A (rs182549), koji se nalazi u intronu 9 gena *MCM6* i koji se također povezuje s laktazno perzistentnim fenotipom, posebice u europskim populacijama, ali je za razliku od polimorfizma -13.910C>T pronađen i u nekim populacijama u sjevernoj i središnjoj Africi (Ségurel i Bon 2017).



Slika 2. Lokacija polimorfizama u intronima 9 i 13 gena *MCM6* na kromosomu 2q21.3 koji utječu na laktazno perzistentni fenotip, prilagođeno i preuzeto prema Ranciaro i sur. (2014).

Polimorfizam -13.910C>T (rs4988235), smješten 13,9 kb uzvodno od eksona 1 gena *LCT*, u intronu 13 susjednog gena *MCM6* (Mulcare i sur. 2004), odgovoran je za toleranciju na laktozu u odrasloj dobi u Europi i zapadnoj Euroaziji (Gallego Romero i sur. 2011). Kod laktaza neperzistentnih osoba na mjestu -13.910 prisutna je baza C (citozin), a kod laktaza perzistentnih osoba je citozin zamijenjen timinom (T). Pretpostavka je kako se ova mutacija dogodila prije otprilike 5960 godina na području današnje Ukrajine, pri čemu se alel T proširio, osim diljem Euroazije, područjem od današnjeg Kazahstana do današnje Španjolske u razdoblju prije 3500 do 4000 godina (Ségurel i sur. 2020). Polimorfizam -13.910C>T nalazi se u transkripcijskom slijedu pojačivača koji snažno potiče aktivnost *LCT* promotora. Iako obje varijante imaju ulogu pojačivača, varijanta -13.910*T djeluje 4 puta snažnije na aktivnost promotora od *C varijante (Troelsen i sur. 2003).

Većinu afričkih plemena čine populacije s visokom prevalencijom laktazno perzistentnog fenotipa, no kod njih nije utvrđena prisutnost varijante -13.910*T (Mulcare i sur. 2004). Alel -14.010*C je odgovoran za perzistentnost na laktazu populacija Kenije i Tanzanije (Enattah i sur. 2008); učestalost ovog alela u Tanzaniji je od 39% do 46%, a u Keniji oko 32% (Tishkoff i sur. 2006). Osim varijante -14.010*C, u strukturi populacija u Keniji prisutni su i aleli -13.907*C i -13.915*G, koji se javljaju s učestalošću $\geq 5\%$ (Tishkoff i sur. 2006). Osim u Keniji, alel -13.907*C prisutan je i u populacijama Sudana i Etiopije, a alel -13.915*G u populacijama Istočne i Sjeverne Afrike i Bliskog Istoka (Tagliaretti 2017). Osim alela -13.907*C, u Etiopiji su prisutni svi navedeni aleli kao i alel -14.009*G, vjerojatno zbog toga što je Etiopija u posljednjih 5000 godina, otkada je laktazno perzistentni fenotip omogućavao selektivnu prednost, bila sjecište migracija ljudi (Jones et al 2013).

Učestalosti alela mogu se mijenjati tijekom dužih vremenskih razdoblja zbog genetičkog drifta. Promjene učestalosti najčešće su spore, osim kada se radi o malim populacijama (Gerbault i sur. 2017).

1.3.4. Fenotipovi tolerancije na laktozu u svijetu

Iako je prvotno prevladavalo mišljenje kako je laktazno perzistentni fenotip prisutan globalno, istraživanja i podaci prikupljeni od 60-tih godina dvadesetog stoljeća naovamo, ukazuju na to da se tolerancija na laktozu javlja u određenim geografskim područjima, ali ne globalno, te da je perzistencija laktaze nastala kao posljedica promjena u genomu (Gallego Romero i sur. 2011). Laktazno perzistentni fenotip najmanje je izražen u onim populacijama čiji su se preci bavili ratarstvom i kultiviranjem biljaka, a ne domestifikacijom životinja, ili su pak domestificirali životinje koje ne proizvode mlijeko (Ségurel i sur. 2020). S druge strane, najveća učestalost laktazno perzistentnog fenotipa pronađena je u populacijama čiji su se preci bavili domestifikacijom stoke i konzumacijom njihovog mlijeka. Tako, primjerice, laktazno perzistentni fenotip u nekim afričkim agrikulturalnim populacijama iznosi 5-20%, dok se u afričkim populacijama koje su konzumirale mlijeko i bavile se uzgojem životinja ovaj fenotip javlja u rasponu 50-90% (Tishkoff i sur. 2006).

Učestalosti fenotipova povezanih s laktozom variraju unutar različitih zemljopisnih regija. Najveća učestalost laktazno perzistentnog fenotipa prisutna je u populacijama na Sjeveru Europe, kao i kod Beduina, zatim u nekim afričkim plemenima te u Punjabu u Indiji (Troelsen i sur. 2003). Beduini su primjer populacije koja je živjela nomadskim načinom života te su konzumirali mlijeko deva (Cook i Al-Torki 1975). Učestalost laktazno perzistentnog fenotipa u zemljama poput Švedske i Danske iznosi više od 90%, a smanjuje se prema južnoj Europi i na Bliskom Istoku, sa smanjenjem geografske širine. Tako, primjerice, u Španjolskoj i Francuskoj iznosi otprilike 50%.

Osim na sjeveru Europe, učestalost laktazno perzistentnog fenotipa visoka je i u ostatku Europe. Primjerice, u istočnoj i sjevernoj Europi učestalost laktazno perzistentnog fenotipa se kreće se u rasponu 15%-54%, a u središnjoj i zapadnoj Europi 62%-86% (Itan i sur. 2010). Na indijskom potkontinentu također postoje razlike u učestalosti laktazno perzistentnog fenotipa; veća učestalost ovog fenotipa prisutna je na sjeverozapadu potkontinenta, a manja na istoku (Ingram i sur. 2008).

Australija, Oceanija, sub-saharska Afrika, istočna i južna Azija su regije u kojima je uočena mala učestalost laktazno perzistentnog fenotipa (Holden i Mace 2009). Učestalost laktazno perzistentnog fenotipa u Kini iznosi 15%, a u Sjevernoj Koreji, Vijetnamu i Kambodži uopće nije detektiran (Anguita-Ruiz i sur. 2020).

Što se tiče Sjedinjenih Američkih Država i Meksika, situacija je specifična. Naime, učestalost laktazno perzistentnog fenotipa javlja se u rasponu 83-93% kod Amerikanaca čije je podrijetlo skandinavsko ili europsko. Nadalje, učestalost ovog fenotipa kod Amerikanaca porijeklom iz Afrike kreće se u rasponu 12-40%, a učestalost kod osoba meksičkog porijekla koje žive u ruralnim područjima iznosi 30% (Anguita-Ruiz i sur. 2020). Učestalost laktazno perzistentnog fenotipa kod Američkih Indijanaca kreće se u rasponu 81-92% (Anguita-Ruiz i sur. 2020). U Južnoj Americi učestalosti laktazno perzistentnog fenotipa su sljedeće: u Čileu 38%, u Brazilu 37%, u Urugvaju 30%, u Kolumbiji 20%, a u Peruu 6% (Anguita-Ruiz i sur. 2020).

1.3.5. Fenotipovi tolerancije na laktozu u Republici Hrvatskoj

Za Republiku Hrvatsku ne postoje precizni podaci o tome koliki je udio stanovništva intolerantan na laktozu. Pretpostavka je da se radi o 20% do 30% stanovništva, s obzirom na prevalenciju laktoza intolerantnih osoba u zemljama podneblja kojem pripada i Hrvatska (<https://bonifarm.hr/laboratorij/strucni-clanci/intolerancija-na-laktozu/>). Szilagyi i suradnici (2014) su objavili da učestalost laktazno neperzistentnog fenotipa u Hrvatskoj iznosi 35%. Rezultati studije koja je uključivala populaciju Hrvatske (koja uzima da je genetička predispozicija za intoleranciju laktoze oko 40%) potvrđuju trend smanjenja perzistencije laktaze sa smanjenjem geografske dužine u Europi (Mattar i sur. 2012; Škaro 2016).

1.4. Selektivna prednost laktazno perzistentnog fenotipa

Kao što je već navedeno, mlijeko je važan izvor hranjivih tvari, ali i kalorija, stoga su osobe tolerantne na laktozu mogle ekonomičnije iskoristiti hranjive tvari iz mlijeka, koje je u zimskom periodu kada nije bilo žitarica ili u godinama kada su urodi propali, ponekad bilo jedini alternativni izvor hrane (Gerbault i sur. 2011). Osobe koje su tolerantne na laktozu, u populacijama koje su živjele u sušnim područjima, bile su u prednosti u odnosu na osobe koje su netolerantne na laktozu zato što su mogle konzumirati mlijeko umjesto vode. Osobama koje su netolerantne na laktozu, nemogućnošću konzumacije mlijeka onda kad je voda bila nedostupna ili zbog onečišćenja štetna za zdravlje, prijetila je opasnost od dehidracije ili dijareje (Cook i Al-Torki 1975).

U populacijama na sjeveru Europe, osobe kod kojih je izražen laktazno perzistentni fenotip također su bile u selektivnoj prednosti pred osobama koje su neperzistentne na laktozu. Hipotezu koja objašnjava ovu prednost predstavili su Flatz i Rotthauwe (1973), a odnosi se na apsorpciju kalcija. Kalcij se apsorbira u crijevu uz prisutnost vitamina D. Ljudski organizam sadrži otprilike 1200 grama kalcija. Od ukupne količine kalcija u organizmu, najveća količina kalcija (98-99%) nalazi se u kostima i zubima, a ostatak (1-2%) kalcija nalazi se u krvi (Pandey 2011). Iako je kalcij u krvi prisutan u manjem postotku, on je važan za zgrušavanje krvi, prijenos impulsa, funkcioniranje enzima i mišićnu aktivnost (Pandey 2011). Kalcij koji izgrađuje kosti može se otpustiti u krv i obrnuto, kako bi se održala ravnoteža kalcija u tijelu. To je posebno izraženo prilikom rasta ljudskog organizma. Ukoliko je u krvi koncentracija kalcija niska, otpustit će se kalcij iz kostiju kako bi se koncentracija kalcija u krvi vratila na normalne vrijednosti, a specifične stanice izgradit će novu kost. Specifične stanice mogu izgraditi novu kost samo ako je u organizmu prisutna dovoljna koncentracija kalcija; ukoliko je koncentracija kalcija u organizmu niska, nije moguće izgraditi novu kost. Osim što je prilikom nedostatka kalcija u tijelu nemoguće izgraditi nove kosti, nedovoljan unos kalcija odražava se i na stanje postojećih kostiju. Naime, iz postojećih kostiju u tijelu otpušta se kalcij u krv te kosti postaju porozne, lako lomljive i krhke. Takvo stanje naziva se osteoporoza (Pandey 2011). Hrana je važan izvor kalcija, a namirnice bogate kalcijem su primjerice mlijeko, mliječni proizvodi, orašasti plodovi, leća, špinat, brokula, grah, cvjetača itd. (Pandey 2011).

Vitamin D u ljudski organizam dospijeva konzumacijom namirnica kao što su primjerice srdele, tuna, skuša, losos, žumanjak i crveno meso (Cowbrough 2015). Osim toga, vitamin D može se i sintetizirati u ljudskom organizmu djelovanjem ultraljubičastog zračenja na kemijski spoj 7-dehidrokolesterol u koži, koji se različitim metaboličkim procesima u jetri i bubrezima pretvara u aktivan oblik vitamina D. Populacije na sjeveru Europe zbog smanjenog intenziteta sunčevog zračenja stvarale su manje količine vitamina D, što je uzrokovalo smanjenu apsorpciju kalcija iz mlijeka i mliječnih proizvoda. Ljudi kod kojih je izražen laktazno perzistentni fenotip mogli su konzumirati mlijeko koje je bogato kalcijem i vitaminom D te su na taj način bili u selektivnoj prednosti pred laktazno neperzistentnim fenotipom koji zbog netolerancije nisu mogli konzumirati mlijeko, a zbog smanjenog intenziteta zračenja nisu mogli stvarati dovoljne količine vitamina D potrebne za normalnu apsorpciju kalcija.

Laktazno perzistentni fenotip i antropometrijska obilježja

Osobe koje su laktaza neperzistentne najčešće imaju restriktivniju prehranu u odnosu na laktaza perzistentne osobe jer su iz svoje prehrane izbacile mlijeko i mliječne proizvode. Restriktivnom prehranom nastoje se spriječiti ili ublažiti simptomi i gastrointestinalne poteškoće koje se javljaju kao posljedica konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda koji sadrže laktozu u većim količinama.

Gastrointestinalne poteškoće i restriktivna prehrana u odnosu na osobe s perzistencijom laktaze mogle bi utjecati na antropometrijska obilježja ljudi s intolerancijom laktoze. Restriktivna prehrana može se negativno odraziti na zdravlje čovjeka ukoliko čovjek ne nadoknađuje nedostatak kalcija i vitamina D, koji su inače prisutni u mlijeku, mineralima i vitaminima iz drugih izvora. Nedovoljan unos kalcija i vitamina D u organizam može uzrokovati smanjenu gustoću kostiju (Suchy i sur. 2010), ali i niži indeks tjelesne mase u odnosu na laktaza perzistentne osobe (Mendelian Randomization of Dairy Consumption Working Group 2018). Zbog smanjene gustoće kostiju može doći do njihovog prijeloma, a kao posljedica nedovoljnog unosa vitamina D često se razvija rahitis. Nadalje, mliječni proizvodi koji sadrže laktozu su energetske bogati te njihova konzumacija povećava dnevni unos kalorija, dok kod laktoza intolerantnih osoba gastrointestinalni problemi poput proljeva otežavaju apsorpciju nutrijenata kroz crijeva.

Često ljudi simptome različitih probavnih poremećaja i bolesti pripisuju intoleranciji na laktozu pa se izlažu restriktivnoj prehrani bez potvrde liječnika. Čak svaka treća osoba koja smatra kako je intolerantna na laktozu, zapravo nije (Škaro 2016). Adolescenti i odrasli sa dijagnosticiranom intolerancijom laktoze mogu probaviti otprilike 12 grama laktoze bez simptoma, ukoliko se ta laktoza u organizam unese tijekom jednog obroka. 12 grama laktoze količina je koja odgovara jednoj šalici mlijeka. Osobe s dijagnosticiranom intolerancijom laktoze mogu probaviti i veće količine laktoze, ako konzumiraju namirnice bogate laktozom tijekom više obroka u kombinaciji s drugim namirnicama, a ne odjednom (Suchy i sur. 2010).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je korištenjem polimorfnih markera rs4988235 i rs41380347 gena *MCM6* analizirati genetsku posebnost triju populacija Roma Hrvatske, odrediti njihovu genetsku udaljenost u odnosu na svjetske populacije te analizirati povezanost varijanti gena *MCM6* s antropometrijskim pokazateljima uhranjenosti Roma.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- Utvrditi učestalosti alela i genotipova varijanti rs4988235 (-13.910C>T) i rs41380347 (-13.915T>G) gena *MCM6* u trima populacijama Roma Hrvatske.
- Utvrditi jesu li genotipovi analiziranih varijanti u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži te odrediti jesu li tri analizirane romske skupine, s obzirom na međusobnu geografsku udaljenost i kulturološku specifičnost, ujedno i međusobno reproduktivno izolirane.
- Odrediti genetičku udaljenost (F_{ST}) i položaj Roma Hrvatske u odnosu na ostale svjetske populacije (podaci iz baze podataka 1000Genomes) na temelju polimorfizama gena *MCM6*.
- Odrediti jesu li polimorfne varijante gena *MCM6* povezane s antropometrijskim pokazateljima uhranjenosti u populaciji Roma Hrvatske.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorak

Uzorak ovog istraživanja je obuhvatio 472 osobe oba spola, pripadnike populacije Roma s područja Zagreba, Baranje i Međimurja. U sklopu projekta „Kompleksna obilježja i zdravlje stanovništva od djetinjstva do duboke starosti“ (MZOS br. 196-1962766-2747, voditeljica prof.dr.sc. Nina Smolej Narančić) i projekta „Molekularno-genetička obilježja populacija utemeljitelja- Romi kao model“ (MZOS br. 196-1962766-2763, voditeljica prof. dr. sc. Branka Janićijević) provedena su terenska istraživanja u Baranji i Međimurju 2005. i 2006. godine. Istraživanje u Zagrebu provedeno je u sklopu projekta dobrotvorne zaklade *Nutricia Research Foundation* pod naslovom „Debljina kod hrvatskih Roma: interakcija gena leptinskog sustava i biomarkera prehrambenog statusa u različitom okružju“ (voditeljica dr. sc. Tatjana Škarić-Jurić) 2012. godine. Na terenskim istraživanjima podatke su prikupljali djelatnici Instituta za antropologiju u suradnji sa Hrvatskim zavodom za javno zdravstvo, Uredom za nacionalne manjine Vlade Republike Hrvatske te uz pomoć članova udruge „Romi za Rome“. U sklopu terenskih istraživanja ispitanici su ispunili upitnik, napravljena su antropometrijska mjerenja i ultrazvučna denzitometrija te je ispitanicima izvađena krv za izolaciju DNA i provedbu biokemijskih analiza.

Istraživanja je odobrilo Etičko povjerenstvo Instituta za antropologiju. Svi ispitanici dobrovoljno su sudjelovali u istraživanjima te su dali informirani pristanak.

Uzorci prikupljeni u Zagrebu u ovom se radu vode pod nazivom „Zagreb“, a Romi koji žive na području Zagreba nazivaju još i Balkanskim Romima. Romi iz Baranje i Međimurja pripadaju Vlaškim Romima, tj. Romima Bajašima, a u radu se uzorci vode pod nazivom „Baranja“ i „Međimurje“.

3.2. Izolacija DNA iz pune krvi metodom izoljavanja

3.2.1. Uzorci krvi

Uzorci krvi ispitanicima su uzimani venepunkcijom u sterilnu Vacutainer epruvetu u kojoj se nalazila K₃EDTA (etildiamintetraoctena kiselina) kao antikoagulans. Puna krv bila je pohranjena u zamrzivaču na temperaturi -20°C prije nego što je iz nje izolirana DNA metodom izoljavanja (od eng. *salting out*), prikazanom u radu Miller, Dykes i Polesky (1988).

3.2.2. Postupak izolacije DNA metodom izoljavanja

Izolacija DNA metodom izoljavanja izvršena je prema protokolu kojeg su objavili Miller, Dykes i Polesky (1988). U ovoj metodi najprije se djelovanjem osmotskog tlaka u uzorku pune krvi razaraju crvene krvne stanice (eritrociti) i istovremeno se odvajaju bijele krvne stanice (leukociti), koje ostaju netaknute te se iz njih kasnije ekstrahira DNA. Bijele krvne stanice se liziraju djelovanjem SDS-a koji otapa lipidne membrane i uništava aktivnost proteina membrane, a enzim proteinaza razgrađuje nukleaze zbog čega DNA neoštećena izlazi iz stanice. Dodatkom vodene otopine natrijevog klorida ili neke druge soli visoke koncentracije, DNA se odvaja od proteina koji se nakon centrifugiranja talože na dnu, a DNA ostaje u supernatantu. Nakon prenošenja u novu epruvetu, iz supernatanta se dodatkom apsolutnog etanola i centrifugiranjem taloži DNA koja se dodatno ispiru u etanolu, resuspendira u TE puferu i čuva na +4°C u hladnjaku (Chacon-Cortes i Griffiths 2014).

Metoda izolacije DNA postupkom izoljavanja podijeljena je u dvije faze koje se odvijaju u razmaku od dva do pet dana. Tijekom prvog dana izolacije DNA, tri volumena pufera za hemolizu (1x) dodaju se u otprilike 7 mL uzorka periferne krvi. Sadržaj epruvete promiješa se pažljivo te se epruveta inkubira 20 minuta na ledu (-20°C). Nakon toga slijedi centrifugiranje na 4000 rpm u trajanju od 10 minuta na +4°C. Nakon centrifugiranja, odlije se supernatant, a preostalom talogu u epruveti dodaje se 10 mL pufera za hemolizu (1x). Mehaničkim lupanjem po epruveti nastoji se razmrviti talog. Nakon toga slijedi ponovno centrifugiranje na 4000 rpm u trajanju od 10 minuta na +4°C. Ponovno se nakon centrifugiranja odlije supernatant, a na talog se dodaje 3 mL SE-LIZA pufera (1x) te se sadržaj epruvete snažno promiješa u trajanju od 2 sekunde. Nakon toga u epruvetu se doda 200 µl pronaze uz lagano miješanje te se na kraju doda 400 µl 10%-tnog SDS-a.

Druga faza započinje dovanjem jednog mililitra zasićene vodene otopine NaCl u epruvetu uz snažno miješanje sadržaja epruvete 15-20 sekundi ili miješanje na vrtlogu („vortexu“) otprilike 10-15 sekundi. Nakon toga slijedi centrifugiranje sadržaja epruvete na 3000 rpm u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja uz pomoć sterilnih kapaljki, supernatant se prenese u novu plastičnu epruvetu te se na supernatant dodaju 2 volumena 96%-tnog etanola (apsolutnog etanola). Otprilike pet minuta nakon dodavanja apsolutnog alkohola, DNA ispliva na površinu u obliku bijelog precipitata koji se naziva „meduzasta DNA“. Izolirana „meduzasta DNA“ se prenese u čistu epruvetu u koju se doda 50 µl 70%-tnog etanola. Nakon toga slijedi centrifugiranje na 13000 rpm kako bi se DNA spustila na dno epruvete. Nakon centrifugiranja dio etanola se odstrani, pažljivo, uz pomoć pipete ili izlivanjem na papir koji upija višak etanola. Otklopljena epruveta se stavi na inkubaciju u termostatu na 37°C nekoliko sati, pri čemu preostali dio etanola ishlapi. Nakon što se epruveta izvadi iz termostata, na osušenu DNA doda se 250 µl vode. Tijekom noći, epruveta se stavi na inkubaciju na 37°C. Nakon inkubacije, sadržaj epruvete miješa se dva do tri dana na mješalici (*shaker*) nakon čega se izolirana DNA čuva na -20°C u zamrzivaču. Koncentracija DNA je izmjerena korištenjem flourometra Qubit 3.0.

3.3. Postupak genotipizacije uzoraka

Genotipizacija polimorfizma jednog nukleotida, SNP (od eng. *single nucleotide polymorphism*), rs4988235 i polimorfizma jednog nukleotida rs41380347 gena *MCM6* izvršena je u komercijalnom laboratoriju LGC Genomics na 440 ispitanika od ukupno 472 ispitanika u istraživanju (za 32 ispitanika nisu uzeti uzorci krvi). Točan broj uzoraka iz svake pojedine populacije naveden je u Tablici 1.

Tablica 1. Romski uzorci - genotipizirani za polimorfizme rs4988235 i rs41380347 gena *MCM6*.

| SNP | Ukupno genotipizirano | Baranja | Medimurje | Balkan | Neuspjela genotipizacija |
|------------|-----------------------|---------|-----------|--------|--------------------------|
| rs4988235 | 416 | 125 | 121 | 170 | 24 |
| rs41380347 | 420 | 127 | 123 | 170 | 20 |

Genotipovi su određeni metodom KASP (od eng. *Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system*) (Semagn i sur. 2013). Genotipizacija metodom KASP temelji se na fluorescenciji, tj. na alel-specifičnom produženju oligonukleotidne sekvence i prijenosa energije fluorescentne rezonancije kako bi se generirao fluorescentni signal (Kumpatla i sur. 2012).

Za uspješnu genotipizaciju metodom KASP potrebne su sljedeće komponente: mješavina KASP, DNA koja će se umnožiti i KASP reakcijska smjesa. Mješavinu KASP čine tri početnice: dvije početnice koje su specifične za polimorfizam jednog nukleotida od interesa-uzvodne početnice, a jedna početnica je nizvodna početnica. Svaka uzvodna početnica ima na svojem 5' kraju jedinstveni slijed nukleotida tzv. rep, eng. *tail*. KASP reakcijska smjesa sastoji se od polimeraze Taq u puferskoj otopini te od kazete FRET (akronim od eng. *Fluorescence Resonant Energy Transfer*).

Ova metoda odvija se u nekoliko koraka. Tijekom prvog koraka, jedna od uzvodnih početnica specifičnih za alel veže se za ciljani SNP u jednom lancu molekule DNA na temelju komplementarnosti, a istovremeno se nizvodna početnica veže za drugi lanac molekule DNA te ga umnožava. U prvom ciklusu nastaje produkt metode umnožavanja lančanom reakcijom polimeraze PCR (akronim od eng. *Polymerase Chain Reaction*), koji sadrži jedan lanac kalup iz početne, ciljane DNA, te drugi, njemu komplementarni lanac pri čemu je jedinstveni slijed nukleotida na 5' kraju ugrađen u produkt, ali se on ne umnožava.

U drugom koraku ove metode produkt iz prvog koraka se najprije denaturira. Na lanac koji sadrži jedinstveni slijed nukleotida s 5' kraja veže se nizvodna početnica pri čemu se stvara komplement cijelog lanca uključujući i komplement jedinstvenog slijeda nukleotida, a na drugi lanac produkta iz prvog koraka veže se uzvodna početnica. U sljedećem koraku, na lanac u kojem se nalazi komplement jedinstvenog slijeda nukleotida, s 5' kraja veže se kazeta FRET na temelju komplementarnosti. Kazete FRET obilježene su fluorescentno s dva različita fluorofora; FAM i HEX, kako bi se mogao razlikovati homozigotni i heterozigotni genotip. Prilikom vezanja kazete FRET na komplementarni dio lanca emitira se fluorescentni signal jer se fluorofor oslobađa od utišivača. Na temelju fluorescentnih signala, koji se interpretiraju nakon završetka lančane reakcije polimerazom, određuje se broj homozigota i heterozigota. Fluorescenciju FAM emitira uzorak koji je homozigotan za alel koji detektira boja FAM, fluorescenciju HEX uzorak koji je homozigotan za alel koji detektira boja HEX, a heterozigotni uzorak emitira oba signala (Kuhanec 2017).

Genotipizacija metodom KASP iščitana je sa suprotnog lanca DNA, ali smo u interpretaciji podataka koristili trenutni standard GRCh38 te naveli rezultate kao da su očitani s minus lanca DNA.

3.4. Antropometrijska mjerenja provedena u istraživanju

Antropometrijska mjerenja provedena u istraživanju uključivala su mjerenja težine i visine tijela, sjedeće visine, širine ramena (biakromijalni raspon), širine zdjelice (bikristalni raspon), bikondilarne širine nadlaktične kosti (lakta), širine ručnog zapešća, opsega struka, opsega bokova, subskapularnog kožnog nabora i kožnog nabora tricepsa koji su izmjereni na ispitanicima u sve tri regije te mjerenja kožnog nabora trbuha, potkoljenice i midaksilarnog kožnog nabora koji su izmjereni na ispitanicima iz regije Balkan. Sva mjerenja provedena su prema standardnom IBP protokolu (akronim od eng. *International Biological Programme*; Weiner i Lourie 1981). Mjerenja se prema IBP protokolu vrše na nedominantnoj strani tijela ispitanika (za većinu ispitanika nedominantna strana tijela bila je lijeva strana tijela). Kožni nabori mjere se tri puta nakon čega se izračunava srednja vrijednost koja se uzima kao konačni rezultat, a dimenzije tijela mjere se najčešće samo jednom.

Masa ispitanika mjerena je pomoću digitalne vage postavljene na vodoravnu površinu te je izražena u kilogramima s preciznošću od 0,1 kg. Prilikom mjerenja visine tijela ispitanik je stajao uspravno, skupljenih stopala, bosonog na vodoravnoj podlozi. Visina svakog ispitanika mjerena je pomoću stadiometra s rasponom mjerenja 200,0 cm.

Visina trupa ispitanika mjerena je antropometrom u sjedećem položaju na način da je stolica na kojoj je sjedio ispitanik bila ravna i prislonjena na zid. Tijekom mjerenja visine trupa ispitanik se također naslonio na zid, glavu je držao u ravnini s tijelom (tzv. frankfurtska horizontala), trup je bio ravan, noge su slobodno visile, a laktovi ispitanika bili su uz njegovo tijelo.

Kožni nabori mjereni su pomičnom mjerkom s preciznošću od 0,1 mm. Na polovici duljine stražnje strane nadlaktice mjerena je veličina kožnog nabora tricepsa, a na polovici donjeg dijela lopatične kosti, gdje je nabor bio pri kutu od 45°C, mjerena je veličina subskapularnog kožnog nabora. Osim ova dva kožna nabora koja su izmjerena kod svih ispitanika, kod Balkanskih Roma mjerena je i kožni nabor trbuha, kožni nabor midaksilarno te kožni nabor potkoljenice. Kožni nabor trbuha mjerena je na način da je ispitanik stajao uspravno,

a ispitivač je očitao vrijednost kožnog nabora trbuha tako što je vrhovima pomične mjerke obuhvatio poprečni nabor u visini pupka 2 cm lateralno od njega, kojeg je ispitivač podigao uz pomoć kažiprsta i palca slobodne ruke (one u kojoj je držao pomičnu mjerlu). Kožni nabor na potkoljenici mjeren je na način da je ispitanik sjedio sa stopalom položenim na ravnu podlogu, a noga je u koljenu bila savijena pod pravim kutem. Na najširem mjestu potkoljenice, iznad troglavog mišića (lat. *m. triceps brachii*), na unutrašnjoj strani potkoljenice, ispitivač je kažiprstom i palcem slobodne ruke podignuo kožni nabor te je pomičnom mjerkom očitao izmjerenu vrijednost. Midaksilarni kožni nabor mjeren je tako što je ispitanik stajao uspravno, a ispitivač je kažiprstom i palcem slobodne ruke podigao kožni nabor u midaksilarnoj liniji na razini ksifoidnog nastavka prsne kosti (lat. *sternum*), ispod desne ruke ispitanika.

Opsezi struka i bokova mjereni su tako da su ispitanici stajali uspravno, skupljenih nogu i i peta, a mjerna traka bila je paralelna s podom. Opseg bokova mjeren je preko najšireg dijela bokova i stražnjice ispitanika, dok je opseg struka ispitanika mjeren na polovici udaljenosti između posljednjeg rebra i vrha zdjelice kosti. Opsezi struka i bokova mjereni su nerastezljivom mjernom trakom s preciznošću od 1 mm.

Širina ramena i širina zdjelice ispitanika mjerene su pomoću pelvimetra, s točnošću od 0,1 cm, pri čemu je ispitanik stajao uspravno, na obje noge, skupljenih nogu i peta. Tijekom mjerenja širine ramena ispitivač je postavio krakove pelvimetra na vanjski dio oba akromijalna nastavka lopatice tako da se pri tome komprimira meko tkivo, a tijekom mjerenja širine zdjelice, ispitivač je postavio vrhove pelvimetra na grebene zdjelice kostiju (lat. *crista iliaca*), također komprimirajući meko tkivo.

Širina lakta i širina zapešća ispitanika mjerene su pomoću kliznog šestara, s točnošću od 0,1 cm, na način da je ispitanik stajao s flektiranom lijevom rukom u laktu pod pravim kutem. Tijekom mjerenja širine lakta, ispitivač je postavio vrhove kliznog šestara na medijalni i lateralni epikondil nadlaktične kosti tako da se komprimira meko tkivo. Tijekom mjerenja širine zapešća, dlan ispitanika bio je okrenut prema dolje, a prsti skupljeni u smjeru uzdužne osovine podlaktice. Vrhove kliznog šestara ispitivač je položio tako da se komprimira meko tkivo na najširem dijelu ručnog zgloba u području stiloidnih koštanih nastavaka (lat. *stylion ulnare* i *stylion radiale*).

3.4.1. Indeksi izvedeni iz izmjerenih antropometrijskih vrijednosti

Na temelju antropometrijskih vrijednosti izmjerenih na ispitanicima izračunati su sljedeći indeksi: ITM- indeks tjelesne mase, omjer težine u kilogramima i visine izražene u metrima kvadratnim (od eng. *body mass index*, BMI), omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora (od eng. *triceps/subscapular ratio*, TSR), omjer sjedeća visina/visina tijela (od eng. *sitting height/height ratio*, SHR), omjer opseg struka/opseg bokova (od eng. *waist/hip ratio*, WHR) te omjer opseg struka/visina tijela (od eng. *waist/height ratio*, WHtR). Na temelju vrijednosti izračunatih indeksa procjenjuje se distribucija masnog tkiva u tijelu (centralno ili periferno) te stupanj uhranjenosti ispitanika. Također je izračunat indeks omjera visine trupa odnosno sjedeće visine i visine tijela, koji je indikator poremećaja rasta.

Na temelju podataka dobivenih za masu i visinu ispitanika izračunat je indeks tjelesne mase (ITM) (često nazvan i Queteletov indeks), prema formuli:

$$\text{ITM} = \frac{\text{masa (kg)}}{\text{visina}^2 (\text{m}^2)}.$$

Kategorizacija razreda uhranjenosti na temelju vrijednosti ITM-a prema preporukama Svjetske Zdravstvene organizacije prikazana je u Tablici 2 (WHO Tech Rep Ser 1995). Indeks tjelesne mase mjera je za debljinu (Nuttall 2015) te se pomoću vrijednosti ovog indeksa procjenjuje stupanj uhranjenosti neke osobe. Indeks tjelesne mase računa se brzo i jednostavno, a može otkriti potencijalne zdravstvene probleme vezane uz prekomjernu ili nedovoljnu tjelesnu masu. Nedostatak ovog indeksa leži u tome što se prilikom njegovog izračuna za odrasle osobe u obzir ne uzima spol, starosna dob ili razina fizičke aktivnosti (<https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi>).

Tablica 2. Kategorizacija razreda uhranjenosti na temelju vrijednosti indeksa tjelesne mase (ITM), prema preporukama Svjetske Zdravstvene Organizacije (WHO Tech Rep Ser 1995).

| Raspon indeksa ITM (kg/m ²) | Razred uhranjenosti |
|-----------------------------------------|---------------------------|
| <18,50 | Pothranjenost |
| 18,50-24,99 | Normalna tjelesna masa |
| 25,00-29,99 | Prekomjerna tjelesna masa |
| ≥30,00 | Pretilost |

Omjer kožnog nabora tricepsa i subskapularnog kožnog nabora (TSR) računa se kao omjer veličine kožnog nabora tricepsa i veličine subskapularnog kožnog nabora:

$$\text{TSR} = \frac{\text{kožni nabor tricepsa (mm)}}{\text{subskapularni kožni nabor (mm)}} .$$

Vrijednosti ovog indeksa upotrebljavaju se kao pokazatelj raspodjele masnog tkiva u tijelu; manje vrijednosti ukazuju na centralnu, a veće na perifernu raspodjelu masnog tkiva u tijelu.

Omjer sjedeće visine i visine tijela računa se prema formuli:

$$\text{omjer sjedeća visina/visina tijela} = \frac{\text{sjedeća visina (mm)}}{\text{visina tijela (mm)}} .$$

Ovaj indeks upotrebljava se kao parametar za dijagnosticiranje poremećaja rasta.

Omjer opsega struka i opsega bokova (WHR) računa se prema formuli (Odenigbo i sur. 2011):

$$\text{WHR} = \frac{\text{opseg struka (cm)}}{\text{opseg bokova (cm)}} .$$

Vrijednosti indeksa WHR koriste se za procjenu abdominalne raspodjele masnog tkiva, tzv. centralne raspodjele. Prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, (WHO, 1999) granična vrijednost indeksa WHR iznad koje se dijagnosticira metabolički sindrom (uz prisutnost drugih kriterija) za muškarce iznosi >0,90, a za žene >0,85.

Omjer opseg struka i visine tijela (WHtR) računa se prema formuli:

$$\text{WHtR} = \frac{\text{opseg struka (cm)}}{\text{visina tijela (cm)}} .$$

Dobiveni omjer WHtR koristi se za procjenu rizika od razvitka kardiovaskularnih bolesti (Choi i sur. 2018), dijabetesa te hipertenzije kod oba spola (Ashwell i sur. 2011).

Osim navedenih indeksa, često se kao indikator prekomjerne tjelesne mase koristi i opseg struka, WC (od eng. *waist circumference*), ukoliko mu izmjerena vrijednost kod žena premašuje 88 cm, a kod muškaraca 102 cm (IDF– International Diabetes Federation, 2006).

3.5. Biostatističke analize

U ovom istraživanju za statističku obradu podataka korišteni su program Microsoft Excel, softverski paket Arlequin ver.3.5.2.2., softver IBD (akronim od eng. *Isolation By Distance*) ver.1.52 i statistički program SPSS 25.0 (akronim od eng. *Statistical Package for Social Sciences*). Microsoft Excel korišten je za unos i organizaciju podataka dobivenih terenskim istraživanjima. Najprije su zasebno analizirani rezultati genotipizacije i zasebno rezultati antropometrijskih mjerenja, nakon čega je biostatističkim analizama ispitana povezanost antropometrijskih vrijednosti i polimorfizama rs4988235 i rs41380347 gena *MCM6*.

Uz pomoć softverskog paketa Arlequin provedena je molekularno genetička obrada rezultata genotipizacije. Arlequin je besplatni softverski paket koji uključuje nekoliko osnovnih i naprednih metoda i statističkih testova za analizu podataka iz područja populacijske genetike. Neke od tih metoda su primjerice procjena učestalosti alela i haplotipa, izračunavanje standardnih indeksa genetske raznolikosti, odstupanja od selektivne neutralnosti i demografske ravnoteže. Cilj statističkih testova i metoda koje uključuje ovaj softver je dobivanje informacija o demografskim i genetskim značajkama populacija. Uz pomoć softverskog paketa Arlequin u ovom radu, provjerena je razlika u učestalosti genotipova između triju analiziranih populacija (Exact test) te je ispitano je li učestalost analiziranih alela bila u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (HWE, od eng. *Hardy-Weinberg equilibrium*). Također je korišten za računanje genetičke udaljenosti (F_{ST}) udaljenosti između romske populacije i 20 svjetskih populacija iz baze podataka 1000Genomes (<https://www.internationalgenome.org/data/>)

Karakteristike kvantitativnih antropometrijskih varijabli prikazane su deskriptivno statistički. Studentovim t-testom (razina značajnosti $<0,05$) testirane su razlike između srednjih vrijednosti kod muškaraca i žena. Mjere devet trudnica su izostavljene iz analiza sljedećih antropometrijskih mjerenja: tjelesne mase, opsega struka, opsega bokova, subskapularnog kožnog nabora, kožnog nabora tricepsa, midaksilarnog kožnog nabora, kožnog nabora trbuha, kožnog nabora potkoljenice te iz svih izračunatih indeksa kako tjelesne promjene povezane s njihovom trudnoćom ne bi utjecale na rezultate istraživanja. Analizom varijance (ANOVA) uz PostHoc test ispitana je povezanost genotipova s kvantitativnim vrijednostima izmjerenih antropometrijskih varijabli dok je Pearsonovim χ^2 -testom ispitana povezanost genotipova s kategorijskim varijablama (ITM, WHR, WC i WHtR). Poravnanje po spolu napravljeno je tako što je unutar svakog od dvaju spolova vrijednost svake varijable transformirana u z-vrijednost.

Rezultati oba spola združeni su te je formirana tzv. „z-varijabla“ koja pozicionira mjerenu varijablu u jedinicama standardne devijacije. Cilj poravnanja po spolu je isključivanje utjecaja spolnih razlika koje su bile prisutne u gotovo svim ciljnim varijablama, a takva intervencija omogućuje upotrebu informacija ukupnog uzorka u analizama. Za ovaj dio statističkih analiza korišten je statistički program SPSS 25.0

Test napravljen pomoću softverskog paketa IBD utvrđuje postoji li statistička značajnost korelacije matrice genetičkih udaljenosti (F_{ST}) parova populacija s matricom geografskih udaljenosti parova populacija pomoću Mantelovog testa. Vrijednost korelacije r pada u rasponu od minus jedan (-1) do plus jedan (+1); r blizu broja -1 označava snažnu negativnu korelaciju, dok r blizu broja +1 označava snažnu pozitivnu korelaciju. Vrijednost r od i blizu nule (0) ne upućuje na korelaciju. Geografska duljina i širina na kojoj se nalazi 21 analizirana populacija određene su korištenjem interaktivne web stranice <https://www.latlong.net/>, nakon čega su te mjere upisane u interaktivni web softver „Latitude/Longitude Distance Calculator“ udruženja National Hurricane Center and Central Pacific Hurricane Center, koji omogućava izračunavanje udaljenosti između točaka određenih geografskom širinom i geografskom duljinom u kilometrima (<https://www.nhc.noaa.gov/gccalc.shtml>).

4. REZULTATI

4.1. Demografski opisi ispitanika

U ovom istraživanju su sudjelovali ispitanici oba spola, njihov broj po regijama prikazan je u Tablici 3. Udio ženskih i muških ispitanika nije se statistički značajno razlikovao između tri analizirane romske skupine ($\chi^2 = 3,237$, $p = ns$).

Tablica 3. Brojnost ispitanika prema spolu u ukupnom uzorku podijeljenom na tri analizirane skupine.

| Regija | Spol N(%) | | Ukupno |
|-----------|------------|------------|-------------|
| | žene | muškarci | |
| Baranja | 69 (48,6) | 73 (51,4) | 142 (100,0) |
| Međimurje | 79 (59,4) | 54 (40,6) | 133 (100,0) |
| Zagreb | 105 (53,3) | 92 (46,7) | 197 (100,0) |
| Ukupno | 253 (53,6) | 219 (46,4) | 472 (100,0) |

Dob najmlađeg ispitanika u uzorku iznosi 18 godina, a najstarijeg 72 godine. Srednja vrijednost dobi svih ispitanika iznosila je 39,84 ($\pm 13,37$) godina, a srednja vrijednost ($\pm SD$) dobi ispitanika i ispitanica odvojeno po trima regijama prikazana je u Tablici 4.

Tablica 4. Srednja vrijednost (srednja vrijednost \pm SD) dobi ispitanica i ispitanika izražena u godinama, prikazana odvojeno za svaki spol i sve tri analizirane romske skupine.

| Regija | DOB (godine) | |
|-----------------|--------------------------------|-------------------|
| | srednja vrijednost (\pm SD) | |
| | žene | muškarci |
| Baranja | 43,54 \pm 13,86 | 44,71 \pm 14,40 |
| Međimurje | 34,13 \pm 10,75 | 34,04 \pm 10,11 |
| Zagreb | 40,62 \pm 13,38 | 40,61 \pm 13,22 |
| One-way ANOVA p | $\leq 0,001$ | $\leq 0,001$ |

SD- standardna devijacija

Rezultati analiza pokazuju da postoje statistički značajne razlike u srednjoj dobi između muškaraca iz triju analiziranih regija ($p \leq 0,001$), kao i između žena iz triju analiziranih regija ($p \leq 0,001$). Žene i muškarci iz regije Međimurje značajno su mlađi od ispitanika iz druge dvije regije (Baranja i Zagreb), dok su prosječno najstarije žene i muškarci iz Baranje.

4.2. Učestalosti alela i genotipova

U ovom istraživanju analizirani su polimorfizmi rs4988235 i rs41380347 gena *MCM6*. Usporedba frekvencija učestalosti genotipova (CC, CT i TT) i alela (C i T) navedenih polimorfizama između žena i muškaraca u tri analizirane romske skupine (Baranja, Međimurje, Zagreb) te u ukupnom uzorku prikazane su u Tablici 5 za polimorfizam rs4988235 tj. u Tablici 6 za polimorfizam rs41380347. Genotipizacijom je utvrđeno da je polimorfizam rs41380347 u analiziranim romskim subpopulacijama monomorfan tj. kod ispitanika je bio prisutan samo genotip TT.

Tablica 5. Usporedba učestalosti genotipova (CC, CT i TT) i alela (C i T) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*, testirane između žena i muškaraca unutar svake tri regije i u ukupnom uzorku, kao i između triju regija. Razlike u učestalostima između spolova i regija testirane su Chi-kvadrat testom ($p \leq 0,05$), $p = ns$ označava da razlike nisu statistički značajne.

| <i>MCM6</i> rs4988235 | Baranja | | Međimurje | | Zagreb | | ukupan uzorak | | svi Baranja | svi Međimurje | svi Zagreb |
|--------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|----------------|----------------------------------|----------------|----------------|
| | N (%) | | N (%) | | N (%) | | N (%) | | | | |
| | žene | muškarci | žene | muškarci | žene | muškarci | žene | muškarci | | | |
| CC | 52 (86,7) | 58 (87,9) | 59 (79,7) | 34 (65,4) | 85 (93,4) | 72 (90,0) | 196 (87,1) | 164 (82,8) | 110 (87,3) | 93 (73,8) | 157 (91,8) |
| CT | 8 (13,3) | 7 (10,6) | 15 (20,3) | 17 (32,7) | 6 (6,6) | 8 (10,0) | 29 (12,9) | 32 (16,2) | 15 (11,9) | 32 (25,4) | 14 (8,2) |
| TT | 0 (0,0) | 1 (1,5) | 0 (0,0) | 1 (1,9) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 2 (1,0) | 1 (0,8) | 1 (0,8) | 0 |
| ukupno | 60 (100,0) | 66 (100,0) | 74 (100,0) | 52 (100,0) | 91 (100,0) | 80 (100,0) | 225 (100,0) | 198 (100,0) | 126 (100,0) | 126 (100,0) | 171 (100,0) |
| Chi-kvadrat test | $\chi^2 = 1,111, p = ns$ | | $\chi^2 = 4,130, p = ns$ | | $\chi^2 = 0,657, p = ns$ | | $\chi^2 = 3,282, p = ns$ | | $\chi^2 = 19,909, p \leq 0,001$ | | |
| C alel | 112 (93,3) | 123 (93,2) | 133 (89,9) | 85 (81,7) | 176 (96,7) | 152 (95,0) | 421 (93,6) | 360 (90,9) | 235 (93,3) | 218 (86,5) | 328 (95,9) |
| T alel | 8 (6,7) | 9 (6,8) | 15 (10,1) | 19 (18,3) | 6 (3,3) | 8 (5,0) | 29 (6,4) | 36 (9,1) | 17 (6,7) | 34 (13,5) | 14 (4,1) |
| Chi-kvadrat test | $\chi^2 = 0,002, p = ns$ | | $\chi^2 = 3,462, p = ns$ | | $\chi^2 = 0,629, p = ns$ | | $\chi^2 = 2,080, p = ns$ | | $\chi^2 = 18,513, p \leq 0,0001$ | | |

χ^2 - rezultat Chi-kvadrat

Nisu pronađene statistički značajne razlike u učestalosti genotipova (CC, CT i TT) i alela (C i T) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6* između muškaraca i žena niti u jednoj od tri analizirane regije. Najveću učestalost u ukupnom uzorku ima genotip CC, koji je odgovoran za laktazno neperzistentni fenotip, a njegova najveća učestalost utvrđena je kod Romkinja (93,4%) i Roma (90,0%) s područja Zagreba. Najveća učestalost genotipa CT, odgovornog za laktazno perzistentni fenotip, utvrđena je kod Romkinja (20,3%) i Roma (32,7%) s područja Međimurja u odnosu na ostale dvije regije, dok je genotip TT, također odgovoran za laktazno perzistentni fenotip, pronađen kod samo dva ispitanika: jednog muškarca iz Baranje i jednog muškarca iz Međimurja.

Testiranja razlika u učestalosti genotipova i alela između regija su pokazala da u Međimurju ima značajno više heterozigota CT (25,4%), u odnosu na Baranju (11,9%) i Zagreb (8,2%) ($p \leq 0,001$), kao i nositelja T alela – u Međimurju 13,5%, naspram 6,7% u Baranji i 4,1% u Zagrebu ($p \leq 0,0001$).

Tablica 6. Učestalosti genotipa TT i alela T polimorfizma rs41380347 gena *MCM6* u uzorku populacije Roma Hrvatske.

| | Baranja N (%) | | Međimurje N (%) | | Zagreb N (%) | | ukupan uzorak | |
|---------------------------|------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | žene | muškarci | žene | muškarci | žene | muškarci | žene | muškarci |
| <i>MCM6</i> rs41380347 | | | | | | | | |
| TT | 62 (100,0) | 66 (100,0) | 75 (100,0) | 53 (100,0) | 90 (100,0) | 81 (100,0) | 227 (100,0) | 200 (100,0) |
| χ^2, p | * | | * | | * | | * | |
| T alel | 124 (100,00) | 132 (100,00) | 150 (100,00) | 106 (100,00) | 180 (100,00) | 162 (100,00) | 454 (100,00) | 400 (100,00) |
| χ^2, p | * | | * | | * | | * | |

*nije moguće izračunati vrijednosti Chi-kvadrat testa jer je polimorfizam rs41380347 monomorfan

Kao što je već navedeno, polimorfizam rs41380347 gena *MCM6* je monomorfan te je u istraživanju utvrđen samo genotip TT.

Između genotipova oba analizirana polimorfizma nema otklona od Hardy-Weinberg-a ($p = ns$). Exact test diferencijacije populacije pokazao je da je populacija Roma Međimurja značajno udaljena od Roma Baranje ($p < 0,05$), a i od Roma Zagreba ($p < 0,00001$). Potonje

dvije populacije nisu pokazale međusobnu statistički značajnu diferencijaciju. Ovaj nalaz sugerira da su Romi Međimurja više reproduktivno izolirani od ostalih dviju romskih skupina.

4.3. Originalna i izvedena kvantitativna antropometrijska obilježja

Kolmogorov-Smirnovljevim testom provjerena je normalnost distribucije antropometrijskih varijabli zasebno za žene i muškarce (Tablica 7). Otklon od normalne distribucije utvrđen je kod kožnih nabora tricepsa i subskapularnih kožnih nabora kod oba spola, a kod muškaraca i kod kožnog nabora potkoljenice, no kako se asimetrija (skewness) i kurtosis čije su vrijednosti između -2 i +2 smatraju prihvatljivima za prihvaćanje normalne univarijatne distribucije varijable (George i Mallery, 2010), sve originalne antropometrijske varijable testirane su parametrijskim testovima.

Tablica 7. Normalnost distribucije antropometrijskih varijabli izmjerenih u populaciji Roma, provjerena Kolmogorov-Smirnovljevim testom odvojeno za žene i muškarce.

| varijable | žene | | | | | |
|------------------|------|----------|-------------|----------|-------------|----------------------|
| | N | Skewness | SE skewness | kurtosis | SE kurtosis | Kolmogorov-Smirnov p |
| tjelesna masa | 253 | 0,708 | 0,153 | 1,132 | 0,305 | ns |
| tjelesna visina | 253 | 0,104 | 0,153 | 0,632 | 0,305 | ns |
| sjedeća visina | 249 | -0,025 | 0,154 | 0,112 | 0,307 | ns |
| širina ramena | 248 | -0,217 | 0,155 | 0,114 | 0,309 | ns |
| širina lakta | 249 | 0,133 | 0,154 | 0,155 | 0,307 | ns |
| širina zapešća | 249 | 0,047 | 0,154 | 0,129 | 0,307 | ns |
| širina zdjelice | 249 | 0,508 | 0,155 | 0,964 | 0,308 | ns |
| opseg trbuha | 245 | 0,530 | 0,156 | 0,089 | 0,310 | ns |
| opseg bokova | 249 | 0,625 | 0,154 | 0,758 | 0,307 | ns |
| kn tricepsa | 239 | 0,757 | 0,157 | 0,280 | 0,314 | <0,001 |
| kn subskapularno | 247 | 0,551 | 0,155 | -0,631 | 0,309 | <0,001 |
| kn trbuha | 93 | 0,253 | 0,250 | -0,460 | 0,495 | ns |
| kn midaksilarno | 95 | 0,535 | 0,247 | -0,368 | 0,490 | ns |
| kn potkoljenice | 95 | 0,392 | 0,247 | -0,662 | 0,490 | ns |

| varijable | muškarci | | | | | |
|------------------|----------|----------|-------------|----------|-------------|----------------------|
| | N | Skewness | SE skewness | kurtosis | SE kurtosis | Kolmogorov-Smirnov p |
| tjelesna masa | 214 | 0,518 | 0,166 | 0,092 | 0,331 | ns |
| tjelesna visina | 216 | 0,060 | 0,166 | -0,012 | 0,330 | ns |
| sjedeća visina | 215 | -0,004 | 0,166 | 0,035 | 0,330 | ns |
| širina ramena | 215 | 0,593 | 0,166 | 1,343 | 0,330 | ns |
| širina lakta | 215 | 0,185 | 0,166 | -0,568 | 0,330 | ns |
| širina zapešća | 215 | 0,282 | 0,166 | 1,397 | 0,330 | ns |
| širina zdjelice | 214 | 0,253 | 0,166 | 0,469 | 0,331 | ns |
| opseg trbuha | 214 | 0,351 | 0,166 | 0,013 | 0,331 | ns |
| opseg bokova | 213 | 0,453 | 0,167 | 0,433 | 0,332 | ns |
| kn tricepsa | 206 | 1,000 | 0,169 | 0,839 | 0,337 | <0,001 |
| kn subskapularno | 214 | 0,886 | 0,166 | 0,326 | 0,331 | <0,001 |
| kn trbuha | 79 | -0,351 | 0,271 | -0,188 | 0,535 | ns |
| kn midaksilarno | 79 | -0,023 | 0,271 | -0,821 | 0,535 | ns |
| kn potkoljenice | 79 | 1,805 | 0,271 | 1,924 | 0,535 | <0,001 |

kn- kožni nabor

U Tablici 8 prikazane su srednje vrijednosti antropometrijskih varijabli izmjerenih kod žena, a u Tablici 9 srednje vrijednosti antropometrijskih varijabli izmjerenih kod muškaraca iz tri analizirane regije. U daljnjim analizama, antropometrijske varijable će se promatrati odvojeno za žene i muškarce zbog spolnog dimorfizma tj. fenotipskih razlika između žena i muškaraca.

Tablica 8. Srednje vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD) antropometrijskih varijabli te indeksa uhranjenosti kod Romkinja, prikazane prema trima regija iz kojih dolaze ispitanice. Razlike između regija testirane su One-way ANOVA testom ($p \leq 0,05$), N označava veličinu uzorka, a $p = ns$ znači da nisu utvrđene statistički značajne razlike.

| srednja vrijednost \pm SD | žene | | | p |
|-----------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------|
| | Baranja N _{tot} =69 | Međimurje N _{tot} =79 | Zagreb N _{tot} =105 | |
| tjelesna masa (kg) | 62,49 \pm 13,81 | 60,60 \pm 13,02 | 67,55 \pm 16,89 | $\leq 0,01$ |
| tjelesna visina (mm) | 1530,20 \pm 61,17 | 1560,87 \pm 52,33 | 1561,50 \pm 63,89 | $\leq 0,001$ |
| sjedeća visina (mm) | 808,09 \pm 31,81 | 839,93 \pm 30,87 | 834,63 \pm 41,42 | $\leq 0,001$ |
| širina ramena (mm) | 357,50 \pm 14,29 | 353,99 \pm 30,49 | 354,50 \pm 21,52 | ns |
| širina zdjelice (mm) | 285,70 \pm 28,82 | 277,97 \pm 25,31 | 279,32 \pm 35,88 | ns |
| širina lakta (mm) | 60,19 \pm 4,56 | 62,07 \pm 4,57 | 62,20 \pm 5,41 | $\leq 0,05$ |
| širina zapešća (mm) | 48,75 \pm 3,17 | 50,48 \pm 3,18 | 47,63 \pm 3,36 | $\leq 0,001$ |
| opseg trbuha (cm) | 89,09 \pm 15,86 | 87,91 \pm 13,24 | 89,60 \pm 15,90 | ns |
| opseg bokova (cm) | 103,24 \pm 12,32 | 96,29 \pm 9,60 | 100,92 \pm 12,10 | $\leq 0,001$ |
| kožni nabori (1/10 mm) | | | | |
| triceps | 166,47 \pm 76,17 | 198,27 \pm 97,34 | 208,51 \pm 85,26 | $\leq 0,01$ |
| subskapularno | 220,34 \pm 113,19 | 202,23 \pm 106,22 | 254,32 \pm 120,98 | $\leq 0,05$ |
| ITM (kg/m ²) | 26,83 \pm 6,64 | 24,77 \pm 4,97 | 27,75 \pm 6,91 | $\leq 0,01$ |
| omjer sjedeća visina/visina | 0,53 \pm 0,01 | 0,54 \pm 0,01 | 0,53 \pm 0,02 | $\leq 0,01$ |
| omjer struk/bokovi (WHR) | 0,86 \pm 0,08 | 0,91 \pm 0,07 | 0,87 \pm 0,08 | $\leq 0,001$ |
| omjer struk/visina (WHtR) | 0,58 \pm 0,11 | 0,56 \pm 0,08 | 0,58 \pm 0,11 | ns |
| omjer kn triceps/subskapularno (TSR) | 0,81 \pm 0,30 | 1,06 \pm 0,37 | 0,91 \pm 0,29 | $\leq 0,001$ |

ITM: indeks tjelesne mase, kn: kožni nabor

Utvrđene su statistički značajne razlike između žena iz triju analiziranih regija za osam antropometrijskih varijabli: tjelesna masa, tjelesna visina, sjedeća visina, širina lakta, širina zapešća, opseg bokova, kožni nabor tricepsa i subskapularni kožni nabor. U odnosu na žene iz ostalih dviju regija, Romkinje iz Baranje su niže i imaju manju sjedeću visinu, a Međimurske Romkinje imaju veću širinu zapešća i manji opseg bokova. Romkinje iz Zagreba imaju veću srednju tjelesnu masu i subskapularni kožni nabor od Romkinja iz Međimurja, a veću širinu lakta i veličinu kožnog nabora tricepsa od Romkinja iz Baranje (Tablica 8).

Antropometrijski indeksi uhranjenosti i pokazatelj zastoja u rastu, izračunati korištenjem originalnih izmjerenih antropometrijskih vrijednosti također su uspoređeni između žena iz triju regija. Pronađene razlike između skupina žena u srednjim vrijednostima svih

indeksa uhranjenosti osim omjera WHtR. U odnosu na žene iz ostalih dviju regija, Romkinje iz Međimurja imaju veće omjere WHR i TSR, a Romkinje iz Baranje manji omjer sjedeće visine i visine tijela. Romkinje iz Zagreba imaju veći ITM od Romkinja iz Međimurja (Tablica 8).

Tablica 9. Srednje vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD) antropometrijskih varijabli te indeksa uhranjenosti kod Roma, prikazane prema trima regijama iz koje dolaze ispitanici. Razlike između regija testirane su One-way ANOVA testom ($p \leq 0,05$), N označava veličinu uzorka, a $p = ns$ znači da nisu utvrđene statistički značajne razlike.

| srednja vrijednost \pm SD | muškarci | | | p |
|-----------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------|
| | Baranja N _{tot} =73 | Međimurje N _{tot} =51 | Zagreb N _{tot} =92 | |
| tjelesna masa (kg) | 74,38 \pm 16,94 | 74,54 \pm 16,19 | 84,07 \pm 17,18 | $\leq 0,001$ |
| tjelesna visina (mm) | 1677,73 \pm 67,41 | 1684,82 \pm 59,72 | 1702,63 \pm 63,10 | $\leq 0,05$ |
| sjedeća visina (mm) | 874,49 \pm 38,07 | 874,88 \pm 44,13 | 894,88 \pm 47,20 | $\leq 0,01$ |
| širina ramena (mm) | 397,42 \pm 21,89 | 405,20 \pm 25,50 | 406,53 \pm 25,26 | $\leq 0,05$ |
| širina zdjelice (mm) | 290,52 \pm 26,57 | 285,14 \pm 22,21 | 286,42 \pm 23,07 | ns |
| širina lakta (mm) | 67,60 \pm 5,07 | 71,74 \pm 5,42 | 71,20 \pm 4,85 | $\leq 0,001$ |
| širina zapešća (mm) | 54,56 \pm 3,95 | 56,98 \pm 3,96 | 52,91 \pm 3,89 | $\leq 0,001$ |
| opseg trbuha (cm) | 95,52 \pm 14,63 | 90,73 \pm 12,62 | 99,33 \pm 13,11 | $\leq 0,01$ |
| opseg bokova (cm) | 100,70 \pm 9,54 | 96,34 \pm 9,34 | 102,07 \pm 8,85 | $\leq 0,01$ |
| kožni nabori (1/10 mm) | | | | |
| triceps | 92,64 \pm 49,11 | 120,58 \pm 63,58 | 125,61 \pm 63,69 | $\leq 0,001$ |
| subskapularno | 164,71 \pm 74,95 | 203,90 \pm 123,06 | 248,90 \pm 117,72 | $\leq 0,001$ |
| ITM (kg/m ²) | 26,38 \pm 5,55 | 26,16 \pm 5,07 | 28,93 \pm 5,26 | $\leq 0,01$ |
| omjer sjedeća visina/visina | 0,52 \pm 0,02 | 0,52 \pm 0,02 | 0,53 \pm 0,02 | ns |
| omjer struk/bokovi (WHR) | 0,94 \pm 0,08 | 0,94 \pm 0,06 | 0,97 \pm 0,08 | $\leq 0,05$ |
| omjer struk/visina (WHtR) | 0,57 \pm 0,09 | 0,54 \pm 0,07 | 0,58 \pm 0,08 | $\leq 0,01$ |
| omjer kn triceps/subskapularno (TSR) | 0,59 \pm 0,20 | 0,67 \pm 0,29 | 0,56 \pm 0,22 | $\leq 0,05$ |

ITM: indeks tjelesne mase, kn: kožni nabor

Utvrđene su statistički značajne razlike kod muškaraca i triju geografskih regija u srednjim vrijednostima svih antropometrijskih mjerenja osim za širinu širine zdjelice (Tablica 9). Također su pronađene statistički značajne razlike kod muškaraca u srednjim vrijednostima svih izračunatih indeksa.

Romi iz Zagreba, u odnosu na muškarce iz Baranje i Međimurja, imaju veće srednju težinu, sjedeću visinu i subskapularni kožni nabor. Isti ti Zagrebački Romi imaju u odnosu na Rome iz Baranje veće tjelesnu visinu i širinu ramena, a u odnosu na Rome iz Međimurja imaju veći opseg trbuha i veći opseg bokova. Romi iz Baranje imaju značajno manje kožni nabor tricepsa i širinu lakta u odnosu na ostale dvije skupine. Što se širine zapešća tiče, najveća je kod Roma iz Međimurja, najmanja kod Roma iz Zagreba, a međusobne značajne razlike postoje između svih triju skupina muškaraca.

U odnosu na muškarce iz preostalih dviju regija, Romi iz Zagreba imaju značajno veći ITM. Nadalje, Romi iz Zagreba imaju veće omjere WHR, WHtR i omjer sjedeća visina/visina tijela od Roma iz Međimurja, a situacija je obratna za omjer TSR.

Zbog statistički značajnih razlika koje su uočene između triju romskih skupina u vrijednostima izvedenih i originalnih antropometrijskih varijabli, koje su pronađene kod oba spola, u daljnjim analizama osobe istog spola nisu analizirane kao jedna romska populaciju, već kao tri subpopulacije.

4.4. Indeksi uhranjenosti

Na temelju izračunatih indeksa uhranjenosti (indeks tjelesne mase, omjer opsega struka i opsega bokova, omjer opsega struka i tjelesne visine) i izmjerenog opsega struka (WC) podijeljenih u kategorije (prema međunarodno prihvaćenim smjernicama za procjenu stanja uhranjenosti opisanima u poglavlju Materijali i metode), određena je prevalencija pothranjenih ($ITM < 18,50 \text{ kg/m}^2$), prekomjerno teških ($ITM \geq 25,00 \text{ kg/m}^2$) i pretilih ($ITM \geq 30,00 \text{ kg/m}^2$) Roma i Romkinja, prikazana odvojeno za žene, prema regiji iz koje dolaze u Tablici 10, a odvojeno za muškarce prema regiji iz koje dolaze u Tablici 11. U navedenim je tablicama prikazana i prevalencija prekomjerno teških žena i muškaraca s obzirom na granične vrijednosti opsega struka, omjera opsega struka i opsega bokova te omjera opsega struka i tjelesne visine s obzirom na spol i regiju iz koje dolaze.

Tablica 10. Prevalencija indeksa uhranjenosti žena s obzirom na tri analizirane regije. Razlike u učestalostima testirane su Chi-kvadrat testom ($p \leq 0,05$), $p=ns$ označava da razlike nisu statistički značajne.

| Indeksi uhranjenosti | žene | | | χ^2 | p |
|---------------------------------|------------------|--------------------|-----------------|------------|--------------|
| | Baranja N (%) | Međimurje N (%) | Zagreb N (%) | | |
| $ITM < 18,50 \text{ kg/m}^2$ | 7 (10,4) | 4 (5,4) | 5 (4,9) | 2,303 | ns* |
| $ITM \geq 25,00 \text{ kg/m}^2$ | 39 (58,2) | 32 (43,2) | 62 (60,2) | 5,500 | ns |
| $ITM \geq 30,00 \text{ kg/m}^2$ | 21 (31,3) | 12 (16,2) | 36 (35,0) | 7,880 | $\leq 0,05$ |
| $WC > 88 \text{ cm}$ | 34 (50,7) | 31 (44,3) | 53 (51,5) | 0,950 | ns |
| $WHR > 0,85$ | 28 (41,8) | 57 (81,4) | 56 (54,4) | 23,62 3 | $\leq 0,001$ |
| $WHtR > 0,50$ | 49 (73,1) | 54 (77,1) | 75 (72,8) | 0,459 | ns |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*), WC: opseg struka (od eng. *waist circumference*), WHR: omjer opseg struka/opseg bokova (od eng. *waist/hip ratio*), WHtR: omjer opsega struka/tjelesna visina (od eng. *waist to height ratio*), χ^2 - rezultat Chi-kvadrat testa

*kod ćelija u kojima je prevalencija manja od pet (5), Chi-kvadrat test nije pouzdan.

Utvrđene su statistički značajne razlike u broju žena koje imaju $ITM \geq 30,00 \text{ kg/m}^2$, tj. koje su pretile- najmanje ih je u Međimurju (16,2%), dok ih je u Baranji (31,3%) i Zagrebu (35,0%) praktički dvostruko više ($p \leq 0,05$). Statistički značajne razlike postoje i u broju žena koje imaju omjer opseg struka/opseg bokova (WHR) veći od definiranih graničnih vrijednosti.

U Međimurju preko 81% žena ima omjer opsega struka i bokova (WHR) iznad graničnih vrijednosti, u Zagrebu 54,4% žena, u Baranji 41,8% žena ($p \leq 0,001$).

Tablica 11. Prevalencija indeksa uhranjenosti muškaraca s obzirom na tri analizirane regije. Razlike u učestalostima testirane su Chi-kvadrat testom ($p \leq 0,05$), $p = ns$ označava da razlike nisu statistički značajne.

| Indeksi uhranjenosti | muškarci | | | χ^2 | p |
|-----------------------------|------------------|--------------------|-----------------|----------|--------|
| | Baranja N (%) | Međimurje N (%) | Zagreb N (%) | | |
| ITM<18,50 kg/m ² | 2 (2,7) | 0 | 2 (2,2) | 1,331 | ns* |
| ITM≥25,00 kg/m ² | 44 (60,3) | 26 (51,0) | 70 (76,1) | 10,066 | ≤0,01 |
| ITM≥30,00 kg/m ² | 14 (19,2) | 11 (21,6) | 36 (39,1) | 9,462 | ≤0,01 |
| WC>102 cm | 23 (31,5) | 10 (20,0) | 40 (44,0) | 8,574 | ≤0,05 |
| WHR>0,90 | 47 (65,3) | 36 (72,0) | 74 (81,3) | 5,436 | ns |
| WHtR>0,50 | 55 (75,3) | 30 (60,0) | 81 (89,0) | 15,926 | ≤0,001 |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*), WC: opseg struka (od eng. *waist circumference*), WHR: omjer opseg struka/opseg bokova (od eng. *waist/hip ratio*), WHtR: omjer opseg struka/tjelesna visina (od eng. *waist to height ratio*), χ^2 - rezultat Chi-kvadrat testa

*kod ćelija u kojima je prevalencija manja od pet (5), Chi-kvadrat test nije pouzdan.

Među Balkanskim Romima, u odnosu na druge dvije regije, ima najviše prekomjerno teških (76,1%) i pretilih muškaraca (39,1%) (Tablica 11). Prevalencije pretilosti kod Baranjskih Roma (19,2%) i kod Međimurskih Roma (21,6%) dvostruko su manje nego kod Baranjskih Roma. Prevalencija omjera opsega struka/visine (WHtR) i opsega struka (WC) većih od graničnih vrijednosti češća je kod Balkanskih Roma u odnosu na Rome iz ostale dvije regije.

Tablica 12. Usporedba prevalencije kvalitativnih antropometrijskih indeksa uhranjenosti između žena i muškaraca. Razlike u učestalostima testirane su Chi-kvadrat testom ($p \leq 0,05$), $p = ns$ označava da razlike nisu statistički značajne.

| Indeksi uhranjenosti | žene | muškarci | χ^2 | p |
|------------------------------------------|------------|------------|----------|--------------|
| ITM < 18,50 kg/m ² | 16 (6,6) | 4 (1,9) | 6,100 | $\leq 0,05$ |
| ITM $\geq 25,00$ kg/m ² | 133 (54,5) | 140 (64,8) | 5,045 | $\leq 0,05$ |
| ITM $\geq 30,00$ kg/m ² | 69 (28,3) | 61 (28,2) | 0,000 | ns |
| WC > 88 cm za žene, > 102 cm za muškarce | 118 (49,2) | 73 (34,1) | 10,520 | $\leq 0,001$ |
| WHR > 0,85 za žene, > 0,90 za muškarce | 141 (58,8) | 157 (73,7) | 11,219 | $\leq 0,001$ |
| WHtR > 0,50 | 178 (74,2) | 166 (77,6) | 0,714 | ns |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*), WC: opseg struka (od eng. *waist circumference*), WHR: omjer opseg struka/opseg bokova (od eng. *waist/hip ratio*), WHtR: omjer opseg struka/tjelesna visina (od eng. *waist to height ratio*), χ^2 - rezultat Chi-kvadrat testa

U Tablici 12 prikazana je usporedba prevalencije kvalitativnih antropometrijskih indeksa uhranjenosti između žena i muškaraca. Muškarci su češće prekomjerno teški (64,8% muškaraca, naspram 54,5% žena), dok su žene češće neuhranjene (6,6% žena, naspram 1,9% muškaraca). S obzirom da je broj muškaraca ispod donje granice Chi-kvadrat testa (ima ih 4, a granica je 5 ispitanika), pronađenu razliku trebalo bi ispitati na većem broju ispitanika. Nadalje, razlike su uočene i kod opsega trbuha te omjera WHR; žene češće imaju opseg struka iznad granične vrijednosti ($p \leq 0,0001$), dok muškarci češće imaju WHR iznad granične vrijednosti ($p \leq 0,001$) (Tablica 12).

4.5. Analiza povezanosti polimorfizma gena *MCM6* s antropometrijskim obilježjima

Prilikom usporedbe genotipova CC, CT i TT polimorfizma rs4988235 gena *MCM6* utvrđeno je kako postoje samo dva ispitanika s genotipom TT, zbog čega je odlučeno da se u daljnjim analizama genotipovi grupiraju u dvije skupine: osobe s genotipom CC i osobe s genotipovima CT i TT. Napravljene su i analize u kojima su genotipovi bili grupirani u skupine CC i CT+TT, ali analizama nisu utvrđene statistički značajne razlike između tih skupina u srednjim vrijednostima antropometrijskih varijabli zbog čega te analize nisu prikazane u ovom

radu. U Tablici 13 prikazane su srednje vrijednosti (\pm SD) antropometrijskih varijabli, a u Tablici 14 srednje vrijednosti (\pm SD) indeksa uhranjenosti za populaciju Roma, prikazane odvojeno za žene i muškarce prema dvjema skupina genotipova (CC i CT+TT) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*.

Tablica 13. Srednje vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD) antropometrijskih varijabli izmjerenih u populaciji Roma, prikazane odvojeno za žene i muškarce prema dvjema skupina genotipova (CC vs. CT+TT) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*. Razlike između skupina genotipova testirane su Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$), N označava veličinu uzorka, a $p = ns$ znači da nisu utvrđene statistički značajne razlike.

| Antropometrijske mjere | žene | | p | muškarci | | p | |
|------------------------|------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|
| | Originalne mjere | CC genotip N=196 | | genotipovi CT + TT N=29 | CC genotip N=162 | | genotipovi CT + TT N=33 |
| tjelesna masa (kg) | | 63,68 \pm 15,63 | 66,70 \pm 14,73 | ns | 78,95 \pm 18,32 | 73,88 \pm 15,68 | ns |
| tjelesna visina (mm) | | 1553,08 \pm 59,68 | 1543,55 \pm 75,08 | ns | 1694,98 \pm 63,66 | 1669,27 \pm 59,96 | $\leq 0,05$ |
| sjedeća visina (mm) | | 827,63 \pm 37,91 | 829,07 \pm 41,01 | ns | 883,54 \pm 46,53 | 880,52 \pm 39,37 | ns |
| širina ramena (mm) | | 354,32 \pm 24,38 | 358,55 \pm 18,67 | ns | 403,06 \pm 25,15 | 399,30 \pm 24,28 | ns |
| širina zdjelice (mm) | | 279,72 \pm 31,59 | 287,86 \pm 37,36 | ns | 287,29 \pm 24,90 | 283,18 \pm 22,90 | ns |
| širina lakta (mm) | | 61,67 \pm 4,96 | 61,97 \pm 5,21 | ns | 70,39 \pm 5,44 | 69,30 \pm 5,50 | ns |
| širina zapešća (mm) | | 48,83 \pm 3,56 | 49,28 \pm 2,60 | ns | 54,37 \pm 4,21 | 55,33 \pm 4,73 | ns |
| opseg trbuha (cm) | | 88,68 \pm 15,12 | 92,61 \pm 17,54 | ns | 96,11 \pm 14,85 | 91,94 \pm 11,29 | ns |
| opseg bokova (cm) | | 100,33 \pm 12,00 | 103,29 \pm 13,82 | ns | 100,55 \pm 9,79 | 97,14 \pm 8,44 | ns |
| kožni nabori (1/10 mm) | | | | | | | |
| triceps | | 188,80 \pm 87,38 | 233,97 \pm 100,86 | $\leq 0,05$ | 110,90 \pm 63,58 | 109,21 \pm 44,36 | ns |
| subskapularno | | 226,78 \pm 120,87 | 246,18 \pm 114,28 | ns | 208,15 \pm 119,50 | 199,15 \pm 94,13 | ns |
| *trbuh | | 250,59 \pm 116,56 | 258,80 \pm 134,11 | ns | 356,33 \pm 120,48 | 348,86 \pm 79,85 | ns |
| *midaksilarno | | 243,60 \pm 133,48 | 238,00 \pm 118,57 | ns | 300,70 \pm 131,09 | 265,57 \pm 102,56 | ns |
| *potkoljenica | | 199,15 \pm 84,40 | 203,20 \pm 116,10 | ns | 131,73 \pm 80,25 | 106,14 \pm 28,26 | ns |

*izmjereni samo kod Balkanskih Roma

Kod žena su utvrđene statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima kožnog nabora tricepsa ($p \leq 0,05$)- veći je kod nositeljica alela T polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*, a kod muškaraca u srednjim vrijednostima tjelesne visine- viši su muškarci koji nemaju T alel (Tablica 13).

Tablica 14. Srednje vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD) indeksa uhranjenosti u populaciji Roma, prikazane odvojeno za žene i muškarce prema dvjema skupinama genotipova (CC vs. CT+TT) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*. Razlike između skupina genotipova testirane su Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$), N označava veličinu uzorka, a $p = ns$ znači da nisu utvrđene statistički značajne razlike.

| | žene | | p | muškarci | | p |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----|-------------------------|--------------------------------|----|
| Indeksi izračunati iz originalnih vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD) | CC genotip N=196 | genotipovi CT + TT N=29 | | CC genotip N=162 | genotipovi CT + TT N=33 | |
| ITM (kg/m^2) | 26,42 \pm 6,51 | 28,16 \pm 6,91 | ns | 27,41 \pm 5,79 | 26,37 \pm 4,73 | ns |
| omjer sjedeća visina/visina | 0,53 \pm 0,02 | 0,54 \pm 0,02 | ns | 0,52 \pm 0,02 | 0,53 \pm 0,02 | ns |
| omjer struk/bokovi (WHR) | 0,88 \pm 0,08 | 0,89 \pm 0,09 | ns | 0,95 \pm 0,08 | 0,94 \pm 0,06 | ns |
| omjer struk/ tjelesna visina (WHtR) | 0,57 \pm 0,10 | 0,60 \pm 0,12 | ns | 0,57 \pm 0,09 | 0,55 \pm 0,06 | ns |
| omjer kn triceps/subskapularno (TSR) | 0,93 \pm 0,33 | 1,01 \pm 0,35 | ns | 0,59 \pm 0,22 | 0,63 \pm 0,32 | ns |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*), χ^2 - rezultat Chi-kvadrat testa

Nisu uočene statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima antropometrijskih indeksa uhranjenosti između dviju skupina genotipova (CC vs. CT+TT) kod žena i muškaraca (Tablica 14).

Tablica 15. Srednje vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD) indeksa uhranjenosti u populaciji Roma, prikazane za sve ispitanike prema dvjema skupina genotipova (CC vs. CT+TT) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*. Razlike između skupina genotipova testirane su Studentovim t-testom ($p \leq 0,05$), N označava veličinu uzorka, a $p = ns$ znači da nisu utvrđene statistički značajne razlike.

| Indeksi izračunati iz originalnih vrijednosti (srednja vrijednost \pm SD) | svi ispitanici oba spola | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|----|
| | CC genotip N=358 | genotipovi CT + TT N=62 | p |
| ITM (kg/m^2) | 26,88 \pm 6,20 | 27,21 \pm 5,87 | ns |
| omjer sjedeća visina/visina | 0,53 \pm 0,02 | 0,53 \pm 0,02 | ns |
| omjer struk/bokovi (WHR) | 0,91 \pm 0,09 | 0,92 \pm 0,08 | ns |
| omjer struk/tjelesna visina (WHtR) | 0,57 \pm 0,09 | 0,57 \pm 0,10 | ns |
| omjer kn triceps/subskapularno (TSR) | 0,77 \pm 0,33 | 0,80 \pm 0,39 | ns |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*)

Nisu uočene statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima indeksa uhranjenosti svih ispitanika podijeljenih u dvije skupine prema genotipovima CC vs. CT+TT.

U Tablici 16 prikazana je usporedba prevalencije pothranjenih ($\text{ITM} < 18,50 \text{ kg}/\text{m}^2$), prekomjerno teških ($\text{ITM} \geq 25,00 \text{ kg}/\text{m}^2$) i pretilih ($\text{ITM} \geq 30,00 \text{ kg}/\text{m}^2$) Roma i Romkinja, kao i prekomjerno teških žena i muškaraca s obzirom na granične vrijednosti opsega struka, omjera opsega struka i opsega bokova te omjera opsega struka i visine, s obzirom na spol i dvije skupine genotipova CC vs. CT+TT. Nisu utvrđene značajne razlike između skupina genotipova.

U Tablici 17. prikazana je prevalencija istih antropometrijskih indeksa uhranjenosti, tako da su međusobno uspoređeni samo žene i muškarci koji imaju genotip CC, kao i međusobno žene i muškarci koji imaju genotipove CT+TT polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*.

Tablica 16. Usporedba prevalencije kvalitativnih antropometrijskih indeksa uhranjenosti između žena i između muškaraca prema dvjema skupinama genotipova (CC vs. CT+TT) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*. Razlike u učestalostima testirane su Chi-kvadrat testom ($p \leq 0,05$), $p = ns$ označava da razlike nisu statistički značajne.

| | žene | | | | muškarci | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------------|----------|-----|---------------------|-------------------------------|----------|-----|
| | CC genotip N=196 | genotipovi CT + TT N=29 | χ^2 | p | CC genotip N=162 | genotipovi CT + TT N=33 | χ^2 | p |
| ITM \leq 18,5 kg/m ² | 15 (7,9) | 1 (3,4) | 0,754 | ns* | 3 (1,9) | 1 (3,0) | 0,189 | ns* |
| ITM \geq 25,0 kg/m ² | 102 (50,5) | 17 (58,6) | 0,220 | ns | 100 (38,3) | 21 (63,6) | 0,042 | ns |
| ITM \geq 30,0 kg/m ² | 53 (28,0) | 11 (37,9) | 1,185 | ns | 47 (29,0) | 7 (21,2) | 0,833 | ns |
| WC_k | 88 (47,6) | 17 (58,6) | 1,226 | ns | 56 (35,0) | 7 (21,2) | 2,365 | ns |
| WHR_k | 110 (59,5) | 21 (72,4) | 1,772 | ns | 116 (72,5) | 22 (66,7) | 0,457 | ns |
| WHtR_k | 136 (73,5) | 22 (75,9) | 0,072 | ns | 121 (75,6) | 24 (72,7) | 0,123 | ns |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*), WC: opseg struka (od eng. *waist circumference*), WHR: omjer opseg struka/opseg bokova (od eng. *waist/hip ratio*), WHtR: omjer opseg struka/tjelesna visina (od eng. *waist to height ratio*), χ^2 - rezultat Chi-kvadrat testa

* kod ćelija u kojima je prevalencija manja od pet (5), Chi-kvadrat test nije pouzdan

Tablica 17. Usporedba prevalencije kvalitativnih antropometrijskih indeksa uhranjenosti između žena i muškaraca genotipa koji imaju samo genotip CC te između žena i muškaraca iz skupine osoba s genotipovima CT+TT polimorfizma rs4988235 gena *MCM6*. Razlike u učestalostima testirane su Chi-kvadrat testom ($p \leq 0,05$), $p = ns$ označava da razlike nisu statistički značajne.

| N (%) | CC genotip | | | | genotipovi CT+TT | | | |
|----------------------------------|-------------------|---------------|----------|---------------|------------------|--------------|----------|-------------|
| | muškarci N=162 | žene N=196 | χ^2 | p | muškarci N=33 | žene N=29 | χ^2 | p |
| ITM \leq 18,5kg/m ² | 3 (1,9) | 15 (7,9) | 6,638 | $\leq 0,05^*$ | 1 (3,0) | 1 (3,4) | 0,009 | ns* |
| ITM \geq 25,0kg/m ² | 100 (38,3) | 102 (50,5) | 2,150 | ns | 21 (63,6) | 17 (58,6) | 0,164 | ns |
| ITM \geq 30,0kg/m ² | 47 (29,0) | 53 (28,0) | 0,040 | ns | 7 (21,2) | 11 (37,9) | 2,094 | ns |
| WC_k | 56 (35,0) | 88 (47,6) | 5,573 | $\leq 0,05$ | 7 (21,2) | 17 (58,6) | 9,104 | $\leq 0,01$ |
| WHR_k | 116 (72,5) | 110 (59,5) | 6,457 | $\leq 0,05$ | 22 (66,7) | 21 (72,4) | 0,240 | ns |
| WHtR_k | 121 (75,6) | 136 (73,5) | 0,201 | ns | 24 (72,7) | 22 (75,9) | 0,079 | ns |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*), WC: opseg struka (od eng. *waist circumference*), WHR: omjer opseg struka/opseg bokova (od eng. *waist/hip ratio*), WHtR: omjer opsega struka/tjelesna visina (od eng. *waist to height ratio*), χ^2 - rezultat Chi-kvadrat testa

** kod ćelija u kojima je prevalencija manja od pet (5), Chi-kvadrat test nije pouzdan

Usporedba žena i muškaraca koji imaju genotip CC, pokazala je da su žene čak 4 puta češće neuhranjene u odnosu na muškarce (7,9% vs. 1,9%), ali s obzirom na malen broj pothranjenih muškaraca, ovaj nalaz bi trebalo potvrditi na većem uzorku. Nadalje, statistički značajne razlike su uočene i kod opsega trbuha te omjera WHR; žene češće imaju opseg struka iznad granične vrijednosti ($p \leq 0,05$), a muškarci omjer WHR ($p \leq 0,05$) (Tablica 17).

Što se tiče osoba iz skupine genotipova CT+TT, žene također češće imaju opseg struka iznad graničnih vrijednosti ($p \leq 0,01$) u odnosu na muškarce (Tablica 17).

Tablica 18. Usporedba prevalencije kvalitativnih antropometrijskih indeksa uhranjenosti između dviju skupina genotipova (CC vs. CT+TT) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6* kod svih ispitanika oba spola. Razlike u učestalostima testirane su Chi-kvadrat testom ($p \leq 0,05$), $p = ns$ označava da razlike nisu statistički značajne.

| N (%) | svi ispitanici oba spola | | | |
|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|-----|
| | CC genotip N=358 | genotipovi CT + TT N=62 | χ^2 | p |
| ITM_18,5 kg/m ² | 18 (5,1) | 2 (3,2) | 0,414 | ns* |
| ITM_25,0 kg/m ² | 202 (57,5) | 38 (61,3) | 0,303 | ns |
| ITM_30,0 kg/m ² | 100 (28,5) | 18 (29,0) | 0,008 | ns |
| WC_k | 144 (41,7) | 24 (38,7) | 0,199 | ns |
| WHR_k | 226 (65,5) | 43 (69,4) | 0,347 | ns |
| WHtR_k | 257 (74,5) | 46 (74,2) | 0,002 | ns |

ITM: indeks tjelesne mase (od eng. *Body Mass Index*), WC: opseg struka (od eng. *waist circumference*), WHR: omjer opseg struka/opseg bokova (od eng. *waist/hip ratio*), WHtR: omjer opseg struka/tjelesna visina (od eng. *waist to height ratio*), χ^2 - rezultat Chi-kvadrat testa

* kod ćelija u kojima je prevalencija manja od pet (5), Chi-kvadrat test nije pouzdan

Usporedbom prevalencije kvalitativnih (kategorijskih) antropometrijskih indeksa uhranjenosti između dviju skupina genotipova (CC vs. CT+TT) polimorfizma rs4988235 gena *MCM6* koja je uključivala ispitanike oba spola, nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Statističke analize provedene su i za z-vrijednosti originalnih kvantitativnih mjerenja, prilikom kojih su pronađene statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima visine tijela kod muškaraca, no kako su iste utvrđene i u prethodnim analizama visine koja nije bila z-standardizirana, ti rezultati nisu ovdje prikazani.

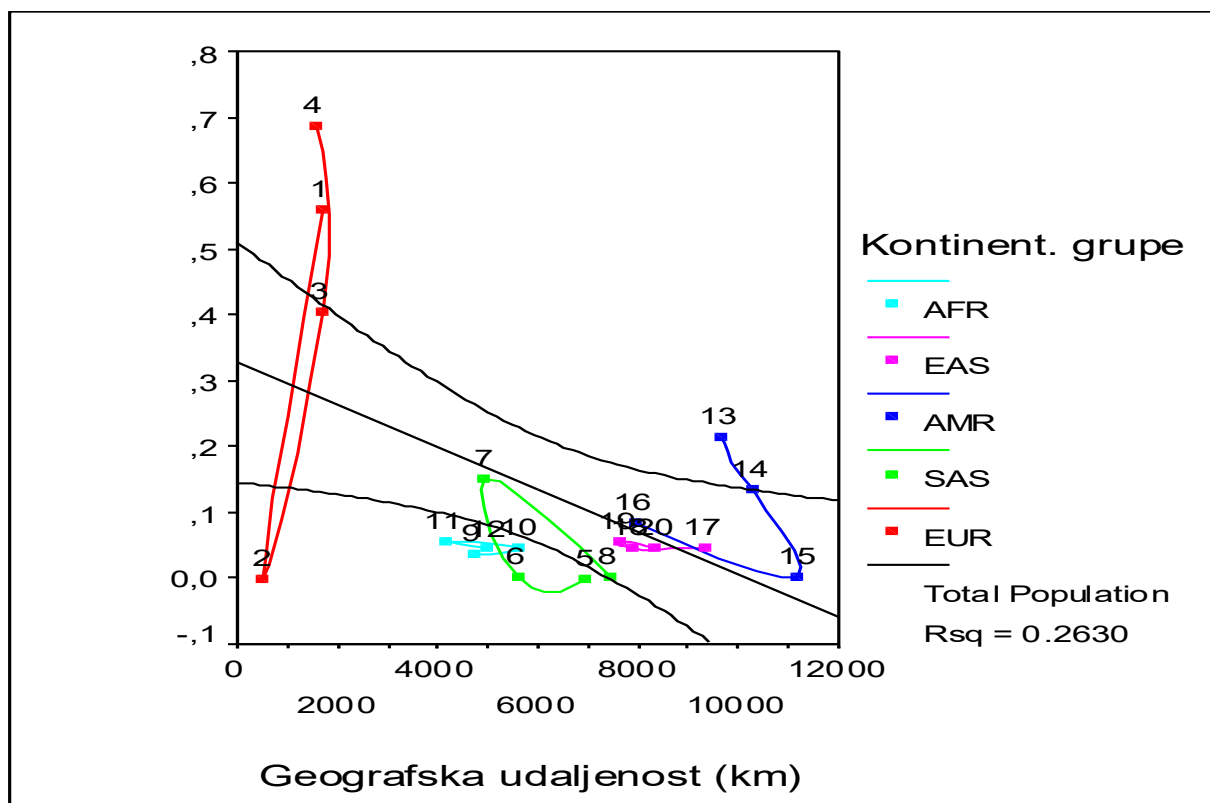
4.6. Međuodnosi varijacija istraživanih polimorfizama Roma i ostalih 20 svjetskih populacija

Međuodnosi varijacija polimorfizma rs4988235 Roma i ostalih 20 svjetskih populacija i geografske udaljenosti između tog 21 para populacija analizirani su korištenjem metode Isolation by Distance koja Mantelovim testom ispituje korelacije između matrica genetičkih (F_{ST}) i geografskih udaljenosti. Ulazni dokument za Arlequin i računanje F_{ST} udaljenosti temeljem razlika u učestalostima genotipova polimorfizma rs4988235 u 21 populaciji prikazan je u Prilogu 8.1., dok je u Prilogu 8.2. prikazana matrica F_{ST} vrijednosti koji je generirao Arlequin. Ulazni dokument za analizu i računanje u softveru IBD prikazan je u Prilogu 8.3. Korelacija nije bila statistički značajna (Tablica 19), što upućuje na zaključak da na varijante polimorfizma rs4988235 u analiziranim populacijama ne utječe njihova prostorna udaljenost na globalnoj razini.

Tablica 19. Rezultati Mantelovog testa korelacije matrica genetičkih udaljenosti (F_{ST}) i geografskih udaljenosti (km) 21 svjetske populacije.

| Mantelov test korelacije | | | |
|--------------------------------------------------------|---------------|---------|----------|
| | Z | r | $p \leq$ |
| genetička udaljenost / geografska udaljenost | 324191,7125 | -0,0474 | 0,6300 |
| genetička udaljenost / log geografske udaljenosti | 158,2624 | 0,0331 | 0,3140 |
| log genetičke udaljenosti / geografska udaljenost | -2272876,9861 | 0,0284 | 0,3440 |
| log genetičke udaljenosti / log geografske udaljenosti | -1082,7790 | 0,0958 | 0,1080 |

Nakon toga, usredotočili smo se samo na analizu korelacije genetičke udaljenosti romske populacije Hrvatske u odnosu na genetičke udaljenosti ostalih 20 populacija, prikazane na temelju njihovih geografskih udaljenosti. Rezultat je prikazan na Slici 3. Romi Hrvatske su genetički najbliži populaciji Italije, kojoj su i geografski najbliži, kao i trima južno azijskim populacijama - onima Bangladeša, Indije i Šri Lanke, unatoč njihovoj prostornoj udaljenosti od 5000 do 7500 km. Veće genetske udaljenosti postoje između Roma i prostorno udaljenijih populacija Afrike, istočne Azije, kao i prilično raspršene američke populacije. Iznenadujuće, Romi se genetički najviše razlikuju od triju europskih populacija (Španjolska, Ujedinjeno Kraljevstvo i Finska) koje su im u prosjeku geografski blizu.



Slika 3. Genetičke udaljenosti između populacije Roma Hrvatske i 20 svjetskih populacija u odnosu na njihove geografske udaljenosti.

Legenda: 1 = Finska; 2 = Italija; 3 = Španjolska; 4 = Ujedinjeno Kraljevstvo; 5 = Bangladeš; 6 = Indija; 7 = Pakistan; 8 = Šri Lanka; 9 = Kolumbija; 10 = Meksiko; 11 = Peru; 12 = Puerto Rico; 13 = Gambija; 14 = Kenija; 15 = Nigerija; 16 = Sierra Leone; 17 = Japan; 18 = Kina–Dai; 19 = Kina–Han; 20 = Vijetnam.

Kontinentalne grupe; AFR = Afrika, EAS = Istočna Azija (eng. East Asia), AMR = Amerika, SAS = Južna Azija (eng. South Asia), EUR = Europa.

5. RASPRAVA

Kod osoba perzistentnih na laktazu otkriveno je nekoliko polimorfizama jednog nukleotida gena *MCM6* koji su odgovorni za ovaj fenotip, a u ovom su istraživanju promatrana dva; rs41380347 i rs4988235, na ukupnom uzorku od 440 ispitanika, pripadnika romske nacionalne manjine iz triju geografskih regija Republike Hrvatske (Baranja, Međimurje i Zagreb). Genotipizacijom je utvrđeno da je polimorfizam rs41380347 u ispitivanim romskim subpopulacijama monomorfan tj. kod ispitanika je bio prisutan samo genotip TT, odgovoran za laktazno neperzistentni fenotip. Što se tiče polimorfizma rs4988235, najveću učestalost u ukupnom uzorku ima genotip CC (utvrđen kod 87,1% žena i kod 82,8% muškaraca), odgovoran za laktazno neperzistentni fenotip, dok je genotip CT, kod čijih je nositelja koncentracija laktaze u krvi u sredini između koncentracija izmjenjenih kod neperzistentnog CC i perzistentnog TT genotipa, drugi genotip po redu zastupljenosti (12,9% kod žena i 16,2% kod muškaraca). Genotip TT istog polimorfizma utvrđen je kod samo dva ispitanika, jednog iz Baranje i jednog iz Međimurja. Prema podacima dostupnima za Republiku Hrvatsku (<https://bonifarm.hr/laboratorij/strucni-clanci/intolerancija-na-laktozu/>) te prema radu kojeg su objavili Szilagyi i suradnici (2014), udio stanovništva intolerantnog na laktozu u Republici Hrvatskoj iznosi od 20% do 35%. Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je udio laktoza intolerantnih Roma, tj., osoba kod kojih je izražen laktazno neperzistentni fenotip, puno veći (85,0%) od pretpostavljenog udjela ovog fenotipa u populaciji Republike Hrvatske.

Rezultati učestalosti genotipova polimorfizma rs4988235 gena *MCM6* kod Roma Hrvatske u skladu su s rezultatima istraživanja učestalosti istog polimorfizma u populaciji Roma Češke koje su proveli Hubáček i suradnici (2017). Ovo istraživanje uključivalo je dvije grupe ispitanika: populaciju Čeha (neromska populacija, genotipizirano 288 ispitanika) i romsku populaciju u Češkoj (genotipizirano 300 ispitanika). Učestalost laktaza neperzistentnog genotipa CC u uzorku populacije Čeha iznosila je 23,6%, a u romskoj populaciji 73,3%. Nadalje, i rezultati studije provedene u Mađarskoj (Czeizel i sur. 1983) na uzorku od 535 Mađara i 113 mađarskih Roma, pokazali su da je učestalost laktazno neperzistentnog fenotipa u populaciji Mađara iznosila 37% i bila manja nego li u populaciji mađarskih Roma u kojoj je iznosila 56%.

Najveća učestalost laktazno perzistentnog fenotipa pronađena je u populacijama čiji su se preci bavili domestikacijom stoke i konzumacijom mlijeka. Jedan od mogućih razloga visoke učestalosti laktazno neperzistentnog fenotipa u istraživanju je činjenica da su Romi

tijekom najvećeg dijela svoje povijesti živjeli nomadskim načinom života, putujući karavanama. Romi najvjerojatnije nisu posjedovali krupne životinje jer su se obično kratko zadržavali na nekom području i stoka bi ih usporavala u njihovim migracijama, eventualno konje koji su im služili ponajviše kao transportno sredstvo prilikom seoba.

Nositelji genotipa CC polimorfizma rs4988235, zbog neperzistencije laktaze i neugodnosti koje im u svakodnevnom životu uzrokuje konzumacija mlijeka i mliječnih prerađevina, mogli bi slijediti restriktivniju prehranu u odnosu na osobe kod kojih je prisutan laktazno perzistentni fenotip. Budući da restriktivnija prehrana za laktaza neperzistentne osobe najčešće uključuje izbjegavanje mlijeka i mliječnih proizvoda koji obiluju kalcijem, može doći do nedostatka kalcija u organizmu (naravno, ukoliko se ne nadoknađuje iz drugih izvora) i razvoja bolesti kostiju poput osteopenije i osteoporoze (Facioni i sur. 2020). Ipak, neke studije nisu pronašle povezanost ovog polimorfizma i zdravlja kostiju (Yang i sur. 2017).

Također je ispitivana i utvrđena povezanost ovog polimorfizma s antropometrijskim obilježjima. Laktaza perzistentne osobe, nositelji alela T, su u odnosu na laktaza neperzistentne nositelje genotipa CC češće bile pretile (Almon i sur. 2012) ili imale veće srednje vrijednosti ITM-a (Hartwig i sur. 2016). Portugalska studija pokazala je suprotno: homozigoti CC imali su manju srednju težinu, manji srednji ITM i manji udio postotka tjelesne masti od nositelja alela T (osoba s CT i TT genotipom) (Manco i sur. 2016). Slično su pokazali rezultati španjolske studije (Corella i sur. 2010); pronađene su značajne razlike u srednjim vrijednostima tjelesne visine, opsega struka i indeksa tjelesne mase - ispitanici oba spola genotipa CC imali su niže srednje vrijednosti navedenih varijabli u odnosu na nositelje T alela. Jedno istraživanje pokazalo je da je povezanost ovog polimorfizma i antropometrijskih obilježja spolno-specifična: u odnosu na muškarce nositelje T-alela, muškarci nositelji genotipa CC imali su značajno veću širinu prsa, opseg struka i nadlaktice, kao i veću nemasnu masu tijela, no ova povezanost nije pronađena kod žena (Popandovska i Kempinska-Podhorodecka 2021).

Istraživano je i hoće li se vrijednosti antropometrijskih mjerenja i indeksa izračunatih iz originalnih vrijednosti razlikovati između Roma nositelja alela T (ispitanika s genotipovima CT i TT) polimorfizma rs4988235 i ispitanika koji su nositelji genotipa CC. Kod Romkinja smo utvrdili statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima kožnog nabora tricepsa - značajno veće vrijednosti utvrđene su kod nositeljica alela T, a kod Roma u srednjim vrijednostima tjelesne visine- značajno viši su bili muškarci koji nemaju T alel. Moguće objašnjenje ovog nalaza je da su laktaza neperzistentni Romi nadoknadili kalcij i vitamine iz mlijeka onima iz drugih izvora, što se odrazilo na veće srednje vrijednosti njihove tjelesne visine.

Razlike u srednjim vrijednostima antropometrijskih indeksa uhranjenosti između dviju skupina genotipova (CC vs. CT+TT) nisu uočene ni kod žena ni kod muškaraca. Na temelju navedenog možemo zaključiti kako polimorfizam rs4988235 nije pokazao povezanost s antropometrijskim pokazateljima uhranjenosti u populaciji Roma Hrvatske.

Romi su svoj nomadski način života započeli napuštanjem područja današnje Indije u razdoblju oko 500. (Vojak i Kovačev 2018) do oko 1000. godine (Čičak 1987). Rezultati analiza korelacije genetičkih (F_{st}) i geografskih udaljenosti također potvrđuju da su Romi u Hrvatskoj indijskog porijekla, jer su najmanje genetički udaljeni od populacija Indije, Bangladeša i Šri Lanke, unatoč tome što je između njih jako velika geografska udaljenost od više tisuća kilometara. Nadalje, rezultati istih analiza pokazuju kako nema korelacije između genetičke i geografske udaljenosti, što ide u prilog hipotezi da je perzistencija na laktazu nastala neovisno, u više različitih geografskih područja u svijetu, u populacijama koje su razvile kulturu pijenja mlijeka (Gerbault i sur. 2011).

6. ZAKLJUČCI

Zaključci ovog istraživanja su:

- Učestalosti genotipova i alela polimorfizma rs4988235 gena *MCM6* značajno se razlikuju između triju romskih populacija Hrvatske. Najčešći je genotip CC; prisutan kod 87,3% Roma iz Baranje, 73,8% Roma iz Međimurja i 91,8% Roma iz Zagreba, dok je najrjeđi genotip TT – pronađen je kod samo jedne osobe u Baranji i kod jedne u Međimurju. Učestalost C alela je veća u Baranji (93,3%) i Zagrebu (95,9%) nego li u Međimurju (86,5%), u kojem se pak alel T javlja 2x češće nego li u Baranji i 3x češće nego li u Zagrebu.
- Polimorfizam rs41380347 gena *MCM6* je monomorfan.
- Između genotipova oba analizirana polimorfizma nema otklona od Hardy-Weinberg-a ($p = ns$). Exact test diferencijacije populacije pokazao je da je populacija Roma Međimurja značajno udaljena od Roma Baranje ($p < 0,05$), a i od Roma Zagreba ($p < 0,00001$). Potonje dvije populacije nisu pokazale međusobnu statistički značajnu diferencijaciju. Ovaj nalaz sugerira da su Romi Međimurja više reproduktivno izolirani od ostalih dviju romskih skupina.
- Analiza genetičke udaljenosti pokazala je da su Romi Hrvatske u odnosu na 21 populaciju svijeta genetički najmanje udaljeni od populacije Italije, a zatim od populacija Bangladeša, Indije i Šri Lanke. Mala genetička udaljenost Roma od populacije Italije upućuje na suvremene migracije i dijeljenje zaliha gena s ovom populacijom, a mala genetička udaljenost Roma od južnoazijskih populacija potvrđuje indijsko porijeklo Roma.
- Nije utvrđena povezanost polimorfizama rs4988235 i rs41380347 gena *MCM6* s antropometrijskim pokazateljima uhranjenosti u populaciji Roma Hrvatske

7. LITERATURA

Almon R., Alvarez León L.F., Serra-Majem L. (2012): Association of the European Lactase Persistence Variant (LCT-13910 C.T Polymorphism) with Obesity in the Canary Islands. *Plos ONE* **7**8

Anguita-Ruiz A., Aguilera C.M., Gil Á. (2020): Genetics of lactose intolerance: An updated review and online interactive world maps of phenotype and genotype frequencies. *Nutrients* **12**: 2689.

Ashwell M., Gunn P., Gibson S. (2011): Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews* **13**: 275–286.

Bond J.H., Levitt M.D. (1976): Quantitative measurement of lactose absorption. *Gastroenterology* **70**: 1058–1062.

Bovenhuis H., Visker M.H.P.W., Lundén A. (2013): Selection for milk fat and milk protein composition. *Advances in Animal Biosciences* **4**: 612–617.

Chacon-Cortes D., Griffiths L. (2014): Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine* **2**: 1–9.

Choi J.R., Koh S.B., Choi E. (2018): Waist-to-height ratio index for predicting incidences of hypertension: the ARIRANG study. *BMC Public Health* **18**: 4–9.

Cook G.C., Al-Torki M.T. (1975): High intestinal lactase concentrations in adult Arabs in Saudi Arabia. *British Medical Journal* **3**: 135–136. doi: 10.1136/bmj.3.5976.135

Corella D., Arregui M., Coltell O., Portolés O., Guillem-Sáiz P., Carrasco P., Sorlí J.V., Ortega-Azorín C., González J.I., Ordovás J.M. (2010): Association of the LCT-13910C>T Polymorphism With Obesity and Its Modulation by Dairy Products in a Mediterranean Population. *Obesity* **19**: 1707–1714.

Cowbrough K. (2015): The importance of vitamin D. *British Journal of Midwifery* **23**: 3–4. doi: 10.12968/bjom.2015.23.Sup7.3

Craig O.E., Shillito L.-M., Albarella U., Viner-Daniels S., Chan B., Cleal R., Ixer R., Jay M., Marshall P., Simmons E., Wright E., Parker Pearson M. (2005): Feeding Stonehenge: cuisine and consumption at the Late Neolithic site of Durrington Walls. *Antiquity* **89**: 1096–1109.

Czeizel A., Flatz G. Flatz S.D. (1983): Prevalence of primary adult lactose malabsorption in Hungary. *Human Genetics* **64**: 398–401.

Čičak R. (1987): Rajko Đurić, Seobe Roma- krugovi pakla i venac sreće. *Migracijske i etničke teme* **3**: 233–237.

Deng Y., Misselwitz B., Dai N., Fox M. (2015): Lactose intolerance in adults: biological mechanism and dietary management. *Nutrients* **7**: 8020–8035.

Doell R.G., Kretchmer N. (1962): Studies of small intestine during development I. Distribution and activity of β -galactosidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **62**: 352–262.

Dragun M. (2000): Podrijetlo, mitologija i vjerovanja Roma. *Društvena istraživanja: časopis za opća društvena pitanja* **9**: 317–333.

Enattah N.S., Sahi T., Savilahti E., Terwilliger J.D., Peltonen L., Järvelä I. (2002): Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genetics* **30**: 233–237.

Enattah N.S., Kuokkanen M., Forsblom C., Natah S., Oksanen A., Järvelä I., Peltonen L., Savilahti E. (2007): Correlation of intestinal disaccharidase activities with the C/T-13910 variant and age. *World Journal of Gastroenterology* **13**: 3508–3512.

Enattah N.S., Jensen T.G.K., Nielsen M., Lewinski R., Kuokkanen M., Rasinpera H., El-Shanti H., Kee Seo J., Alifrangis M., Khalil I.F., Natah A., Ali A., Natah S., Comas D., Mehdi S.Q., Groop L., Vestergaard E.M., Imtiaz F., Rashed M.S., Meyer B., Troelsen J., Peltonen L. (2008): Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects

different history of adaptation to milk culture. *American Journal of Human Genetics* **82**: 57–72.

Facioni M.S., Raspini B., Pivari F., Dogliotti E., Cena H. (2020): Nutritional management of lactose intolerance: the importance of diet and food labelling. *Journal of Translational Medicine* **18**: 2–9.

Feldman, M.W., Cavalli-Sforza, L.L. (1989): On the theory of evolution under genetic and cultural transmission with application to the lactose absorption problem. U: Feldman, M.W. (ur) *Mathematical Evolutionary Theory*. Princeton, Princeton University Press, str. 145. – 173.

Flatz G., Rotthauwe H.W. (1973): Lactose nutrition and natural selection. *The Lancet* **302**: 76–77.

Gallego Romero I., Basu Mallick C., Liebert A., Crivellaro F., Chaubey G., Itan Y., Metspalu M., Easwarkhanth M., Pitchappan R., Villems R., Reich D., Singh L., Thangaraj K., Thomas M.G., Swallow D.M., Lahr M.M, Kivisild T. (2011): Herders of Indian and European cattle share their predominant allele for lactase persistence. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 249–260.

George, D., Mallery, M. (2010): *SPSS for Windows Step by Step: A Simple Guide and Reference*, 17.0 update (10a ed.) Boston: Pearson.

Gerbault P., Liebert A., Itan Y., Powell A., Currat M., Burger J., Swallow D.M., Thomas M.G. (2011): Evolution of lactase persistence: An example of human niche construction. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences* **366**: 868–877.

Gerbault P., Walker C., Brown K., Yonova-Doing E., Thomas M.G. (2017): The evolution of lactose in dairying populations. U: Lee-Thorp J., Katzenberg M.A. (ur.) *The Oxford Handbook of the Archaeology of Diet*. Oxford, Oxford University Press, str. 1111.-1120.

Grosman L., Munro N.D. (2017): *The Natufian Culture: The Harbinger of Food-*

Producing Societies. U: Enzel Y., Bar-Yosef O. (ur.) Quaternary Environments, Climate Change and Human in the Levant. Cambridge, Cambridge University Press, str. 699.–705.

Hartwig F.P., Horta B.L., Smith G.D., Loret de Mola C., Cesar Gomes V. (2016): Association of lactase persistence genotype with milk consumption, obesity and blood pressure: a Mendelian randomization study in the 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort, with a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology* **45**:1573–1587.

Holden C., Mace R. (2009): Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Human Biology* **81**: 597–619. doi: <http://dx.doi.org/10.3378/027.081.0609>

Hrvatić N., Ivančić S. (2000): Povijesno-socijalna obilježja Roma u Hrvatskoj. *Društvena istraživanja: časopis za opća društvena pitanja* **9**: 251–266.

Hubáček J.A., Adámková V., Šedova L., Olišarová V., Adámek V., Tóthová V. (2017): Frequency of adult type-associated lactase persistence LCT-13910C/T genotypes in the Czech/Slav and Czech Roma/Gypsy populations. *Genetics and Molecular Biology* **40**: 450–452.

Imtiaz F., Savilahti E., Sarnesto A., Trabzuni D., Al-Kahtani K., Kagevi I., Rashed M.S., Meyer B.F., Järvelä I. (2007): The T/G-13915 variant upstream of the lactase gene (*LCT*) is the founder allele of lactase persistence in an urban Saudi population. *Journal of Medical Genetics* doi: 10.1136/jmg.2007.051631

Ingram C.J.E., Elamin M.F., Mulcare C.A., Weale M.E. (2007): A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: Multiple causes for lactase persistence? *Human Genetics* **120**: 779–788.

Ingram C.J.E., Mulcare C.A., Itan Y., Thomas M.G., Swallow D.M. (2008): Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics* **124**: 579–591.

Ingram C.J.E., Oljira T., Tarekegn A., Browning S.L. (2009): Multiple rare variants as a cause of a common phenotype: several different lactase persistence associated alleles in a single ethnic group. *Journal of Molecular Evolution* **69**: 579–588.

International Diabetes Federation (2006): Diabetes Atlas

Itan Y., Powell A., Beaumont M.A., Burger J., Thomas M.G. (2009): The origins of lactase persistence in Europe. *PloS Computational Biology* **5**: e1000491.

Itan Y., Jones B.L., Ingram C.J.E., Swallow D.M., Thomas M.G. (2010): A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 36. doi:10.1186/1471-2148-10-36

Jones B.L., Oljira T., Liebert A., Zmarz P., Bekele E., Danielsen E.T., Krüger Olsen A., Bradman N., Troelsen J.T., Swallow D.M. (2013): Diversity of lactase persistence alleles in Ethiopia: signature of a soft selective sweep. *The American Journal of Human Genetics* **93**: 538–544.

Kuhanec A. (2017): Raspodjela alela gena *CYP2B6* u romskim populacijama Hrvatske. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Kumpatla S., Buyyarapu R., Abdurakhmonov I.Y., Mammadov J.A. (2012): Genomics-assisted plant breeding in the 21st century: technological advances and progress. U: Abdurakhmonov I. (ur.) *In Plant Breeding*. London, Intechopen, str. 131.–184.

Larsen C. (2006): The Agricultural Revolution as Environmental Catastrophe: Implications for health and lifestyle in the Holocene. *Quaternary International* **150**: 12–20.

Latham K.J. (2013): Human health and the Neolithic Revolution: an overview of impacts of the agricultural transition on oral health, epidemiology, and the human body. *Nebraska Anthropologist* **28**: 95–100.

Liégeois J. P. (1994): Roma, Gypsies, Travellers

Malik T.F., Panuganti K.K. (2018): Lactose intolerance. Stats Pears Publishing LLC

Malmström H., Linderholm A., Lidén K., Stora J., Molnar P., Holmlund G., Jakobsson M.,

Götherström A. (2010): High frequency of lactose intolerance in a prehistoric hunter – gatherer population in northern Europe. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 89. doi: 10.1186/1471-2148-10-89

Manco, L., Dias, H., Muc, M., & Padez, C. (2016): The lactase –13910C>T polymorphism (rs4988235) is associated with overweight/obesity and obesity-related variables in a population sample of Portuguese young adults. *European Journal of Clinical Nutrition* **71**: 21–24.

Mattar R., Ferraz de Campos Mazo D., Carrilho F.J. (2012): Lactose intolerance: Diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **5**: 113–21.

Matthews S.B., Waud J.P., Roberts A.G., Campbell A.K. (2005): Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate Medical Journal* **81**: 167–173.

McCaffery J. (2009): Gypsies and Travellers: literacy, discourse and communicative practices. *Compare: A Journal of Comparative and International Education* **39**: 643–657.

Mendelian Randomization of Dairy Consumption Working Group (2018): Dairy consumption and body mass index among adults: Mendelian randomization analysis of 184802 individuals from 25 studies. *Clinical Chemistry* **64**:183–191.

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

Misselwitz B., Pohl D., Frühauf H., Fried M., Vavricka S.R., Fox M. (2013): Lactose malabsorption and intolerance: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European Gastroenterology Journal* **1**: 151–159.

Mulcare C.A., Weale M.E., Jones A.L., Connell B., Zeitlyn D., Trekegn A., Swallow D.M., Bradman N., Thomas M.G. (2004): The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C513.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *The American Journal of Human Genetics* **74**: 1102–1110.

Mulcare C.A. (2005): The evolution of the lactase persistence phenotype. Doctoral Thesis. London: ProQuest LLC.

Nuttall F. (2015): Body mass index. *Nutrition Today* **50**: 117–128.

Odenigbo U.M., Odenigbo U.C., Oguejiofor O.C., Adogu P.O.U. (2011): Relationship of waist circumference, waist hip ratio and body mass index as predictors of obesity in adult Nigerians. *Pakistan Journal of Nutrition* **10**: 15–18.

Pandey G. (2011): Role of calcium in human and animal health. *Jigyasa* **5**: 61–65.

Popadowska A. Kempinska-Podhorodecka A. (2021): Relation of the C/T-13910 LCTPolymorphism with Body Composition Measures and Their Modulation by Dairy Products in a Caucasian Men. *American Journal of Men's Health* **15**: 1–15.

Ranciaro A., Campbell M.C., Hirbo J.B., Ko W-Y., Froment A., Anagnostou P., Kotze M.J., Ibrahim M., Nyambo T., Omar S.A., Tishkoff S.A. (2014): Genetics origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. *The American Journal of Human Genetics* **94**: 496–510.

Ségurel L., Bon C. (2017): On the evolution of lactase persistence in humans. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **8**: 8–23.

Ségurel L., Guarino-Vignon P., Marchi N., Lafosse S., Laurent R., Bon C., Fabre A., Hegay T., Heyer E. (2020); Why and when was lactase persistence selected for? Insights from Central Asian herders and ancient DNA. *PloS Biol* **18**: e3000742.

Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M.S. (2013): Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* **33**: 1–14.

Shaukat A., Levitt M.D., Taylor B.C., MacDonald R., Shamliyan T.A., Kane R.L., Wilt T.J. (2010): Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. *Annals of internal medicine* **152**: 797–803.

Shendurse A., Khedkar C. (2016): Lactose. U: Caballero B., Finglas P.Toldrá F. (ur.) Reference Module in Food and Health. London, Elsevier, str. 509.–516.

Smith V.L. (1993): *Humankind in prehistory: Economy, ecology and institutions*. U: Anderson T.L., Simmons R.T. (ur.) *The political economy of customs and culture*. London, Rowman & Littlefield, str. 157–184.

Suchy F.J., Brannon P.M, Carpenter T.O., Fernandez J.R., Gilsanz V., Gould J.B., Hall K., Hul L.S., Lupton J., Mennella J., Miller J.N., Osganian S.K., Sellmeyer D.E., Wolf M.A. (2010): National Institutes of Health Consensus Development Conference: lactose intolerance and health. *Annals of Internal Medicine* **152**: 792–796.

Swallow D.M. (2003): Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics* **37**: 197–219.

Szilagyi A., Leighton H., Burstein B., Xue X. (2014): Latitude, sunshine and human lactase phenotype distributions may contribute to geographic patterns of modern disease: the inflammatory bowel disease model. *Clinical Epidemiology* **6**: 183–198.

Szilagyi A., Ishayek N. (2018): Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients* **10**: 1–30.

Škarić-Jurić T., Martinović Klarić I., Smolej Narančić N., Drmić S., Peričić Salihović M., Barać Lauc L., Miličić J., Barabalić M., Zajc M., Jančićjević B. (2007): Trapped between tradition and transition- anthropological and epidemiological cross-sectional study of Bayash Roma in Croatia. *Croatian Medical Journal* **48**: 708–719.

Škaro V. (2016): Genetička predispozicija za nepodnošenje laktoze. *Paediatrica Croatica* **60**: 100–104.

Tagliaretti P. (2017): *Biokemijska podloga nepodnošenja laktoze*. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.

Tishkoff S.A., Reed F.A., Ranciaro A., Voight B.F., Babbitt C.C., Silverman J.S., Powell K., Mortensen H.M., Hirbo J.B., Osman M., Ibrahim M., Omar S.A., Lema G., Nyambo T.B., Ghori J., Bumpstead S., Pritchard J.K, Wray G.A., Deloukas P. (2006): Convergent adaptation of

human lactase persistence in Africa and Europe *Nature Genetics* **39**: 31–40.
doi:10.1038/ng1946

Troelsen J.T., Olsen J., Møller J., Sjöström H. (2003): An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* **125**: 1686–1694.

Vigne J.D., Helmer D. (2006): Was milk a „secondary product“ in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. *Anthropozoologica* **42**: 9–40.

Vojak D., Kovačev N. (2018): Sigmund Luksemburški i Romi na početku 15. stoljeća. *Cris: Časopis Povijesnog društva Križevci* **20**: 50–55.

Weiner J.S., Lourie J.A. (1981): *Practical human biology*. Academic Press, London

World Health Organization (1995): *Physical status: The use and interpretation of anthropometry*. WHO Technical Report Series 854: 1–452.

World Health Organization (1999): *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation*. Geneva: World Health Organization 1999

Yang Q., Lin S.L., Au Yeung S.L., Kwok M.K., Leung G.M., Schooling C.M. (2017): Genetically predicted milk consumption and bone health, ischemic heart disease and type 2 diabetes: a Mendelian randomization study. *European Journal of Clinical Nutrition* **71**: 1008–1012.

Internetske stranice

<https://bonifarm.hr/laboratorij/strucni-clanci/intolerancija-na-laktozu/> (pristupljeno 15.6.2021.)

<https://www.latlong.net/> (pristupljeno 6.8.2021.)

National Hurricane Center and Central Pacific Hurricane Center, web stranica:
<https://www.nhc.noaa.gov/gccalc.shtml> (pristupljeno 6.8.2021.)

https://www.dzs.hr/Hrv/censuses/census2011/results/htm/H01_01_05/H01_01_05.html
(pristupljeno 26.5.2021).

<https://www.internationalgenome.org/data/> pristupljeno (14.8.2021.)

<https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi> (pristupljeno 21.6.2021)

8. PRILOZI

8.1. Ulazni dokument za analize provedene u softveru Arlequin

[Profile]

Title="populacijska diferencijacija za gen MCM6, polimorfizam rs4988235"

NbSamples=21

GenotypicData=1

GameticPhase=0

DataType=STANDARD

LocusSeparator=TAB

MissingData='?'

#Try different epsilon value (in General Settings dialog box)

#and different values of No. of initial conditions

#(in the Diversity Indices dialog box)

#for the estimation of haplotype frequencies

#It should have an impact on the final likelihood of the sample

RecessiveAllele="null"

[Data]

[[Samples]]

SampleName="Nigerija"

SampleSize= 207

SampleData={

1a 207 G
G
}

SampleName="Gambija"

SampleSize= 113

SampleData={

2a 111 G
G

2b 2 G
A

}

SampleName="Kenija"

SampleSize= 99

SampleData={

3a 99 G
G

}

SampleName="Sijera_Leone"

SampleSize= 85

SampleData={

4a 85 G
G

}

SampleName="Kolumbija"

SampleSize= 94

SampleData={

```
5a  49  G
      G
5b  32  G
      A
5c  13  A
      A
}
```

```
SampleName="Meksiko"
```

```
SampleSize= 64
```

```
SampleData={
```

```
6a  37  G
      G
6b  23  G
      A
6c   4  A
      A
}
```

```
SampleName="Peru"
```

```
SampleSize= 85
```

```
SampleData={
```

```
7a  69  G
      G
7b  14  G
      A
7c   2  A
      A
}
```



```
SampleName="Portoriko"
SampleSize= 104
SampleData={
8a    64    G
      G
8b    37    G
      A
8c    3     A
      A
}
```

```
SampleName="Kina_Dai"
SampleSize= 93
SampleData={
9a    93    G
      G
}
```

```
SampleName="Kina_Han"
SampleSize= 208
SampleData={
10a   208   G
      G
}
```

```
SampleName="Japan"
SampleSize= 104
SampleData={
11a   104   G
      G
}
```

}

SampleName="Vijetnam"

SampleSize= 99

SampleData={

12a 99 G

G

}

SampleName="Finska"

SampleSize= 99

SampleData={

13a 14 G

G

13b 53 G

A

13c 32 A

A

}

SampleName="UK"

SampleSize= 91

SampleData={

14a 9 G

G

14b 33 G

A

14c 49 A

A

}

```
SampleName="Španjolska"
SampleSize= 107
SampleData={
15a  34  G
      G
15b  48  G
      A
15c  25  A
      A
}
```

```
SampleName="Italija"
SampleSize= 107
SampleData={
16a  90  G
      G
16b  15  G
      A
16c  2   A
      A
}
```

```
SampleName="Bangladeš"
SampleSize= 86
SampleData={
17a  76  G
      G
17b  10  G
      A
}
```

}

SampleName="Indija"

SampleSize= 205

SampleData={

18a 166 G

G

18b 37 G

A

18c 2 A

A

}

SampleName="Pakistan"

SampleSize= 96

SampleData={

19a 53 G

G

19b 36 G

A

19c 7 A

A

}

SampleName="Šri_Lanka"

SampleSize= 102

SampleData={

20a 92 G

G

20b 10 G

```

        A
    }

    SampleName="HR_Romi"
    SampleSize= 423
    SampleData={
21a  360  G
        G
21b  61   G
        A
21c  2    A
        A
    }

```

```
[[Structure]]
```

```
StructureName="Distribucija alela"
```

```
NbGroups=1
```

```
Group={
```

```
    "Nigerija"
```

```
    "Gambija"
```

```
    "Kenija"
```

```
    "Sijera_Leone"
```

```
    "Kolumbija"
```

```
    "Meksiko"
```

```
    "Peru"
```

```
    "Portoriko"
```

```
    "Kina_Dai"
```

```
    "Kina_Han"
```

```
    "Japan"
```

```
    "Vijetnam"
```

```
    "Finska"
```

"UK"

"Španjolska"

"Italija"

"Bangladeš"

"Indija"

"Pakistan"

"Šri_Lanka"

"HR_Romi"

}

8.2. Matrica Fst vrijednosti generirana u softveru Arlequin

| | Nigerija | Gambija | Kenija | Sijera_Leon | Kolumbija | Meksiko | Peru | Portoriko | Kina_Dai | Kina_Han | Japan | Vijetnam | Finska | UK | Španjolska | Italija | |
|-------------|----------|---------|---------|-------------|-----------|---------|----------|-----------|----------|----------|---------|----------|---------|---------|------------|---------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | |
| Nigerija | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gambija | 2 | 0,0091 | 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| Kenija | 3 | 0 | 0,00359 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| Sijera_Leon | 4 | 0 | 0,00262 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| Kolumbija | 5 | 0,41455 | 0,30296 | 0,31056 | 0,29419 | 0 | | | | | | | | | | | |
| Meksiko | 6 | 0,40084 | 0,2701 | 0,28472 | 0,26615 | 0,00427 | 0 | | | | | | | | | | |
| Peru | 7 | 0,16567 | 0,0888 | 0,10874 | 0,10059 | 0,11067 | 0,05892 | 0 | | | | | | | | | |
| Portoriko | 8 | 0,27787 | 0,18681 | 0,19882 | 0,18713 | 0,02194 | -0,00267 | 0,0317 | 0 | | | | | | | | |
| Kina_Dai | 9 | 0 | 0,00319 | 0 | 0 | 0,30365 | 0,27688 | 0,10528 | 0,19386 | 0 | | | | | | | |
| Kina_Han | 10 | 0 | 0,00914 | 0 | 0 | 0,41536 | 0,40174 | 0,16615 | 0,27853 | 0 | 0 | | | | | | |
| Japan | 11 | 0 | 0,0039 | 0 | 0 | 0,31622 | 0,29111 | 0,1116 | 0,2029 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| Vijetnam | 12 | 0 | 0,00359 | 0 | 0 | 0,31056 | 0,28472 | 0,10874 | 0,19882 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |
| Finska | 13 | 0,68957 | 0,58837 | 0,58883 | 0,57073 | 0,14447 | 0,21238 | 0,40035 | 0,26404 | 0,58127 | 0,69027 | 0,59493 | 0,58883 | 0 | | | |
| UK | 14 | 0,80724 | 0,72579 | 0,72694 | 0,71133 | 0,28559 | 0,36582 | 0,55424 | 0,41722 | 0,72046 | 0,80776 | 0,73211 | 0,72694 | 0,03086 | 0 | | |
| Španjolska | 15 | 0,55199 | 0,44352 | 0,44581 | 0,42816 | 0,04114 | 0,08846 | 0,25192 | 0,1283 | 0,43839 | 0,55279 | 0,45184 | 0,44581 | 0,03009 | 0,12684 | 0 | |
| Italija | 16 | 0,12201 | 0,06365 | 0,08128 | 0,07552 | 0,14028 | 0,08408 | -0,00362 | 0,04949 | 0,07883 | 0,12237 | 0,0833 | 0,08128 | 0,44076 | 0,59131 | 0,28949 | 0 |
| Bangladeš | 17 | 0,09147 | 0,03575 | 0,05714 | 0,05228 | 0,181 | 0,12782 | 0,00925 | 0,08304 | 0,05508 | 0,09177 | 0,05884 | 0,05714 | 0,47543 | 0,62472 | 0,32682 | 0,0015 |
| Indija | 18 | 0,09825 | 0,06042 | 0,07267 | 0,06904 | 0,14116 | 0,07799 | -0,00399 | 0,04378 | 0,07113 | 0,09848 | 0,07394 | 0,07267 | 0,4617 | 0,6056 | 0,30511 | -0,00284 |
| Pakistan | 19 | 0,35485 | 0,24984 | 0,25962 | 0,24503 | 0,00041 | -0,00567 | 0,07015 | 0,00305 | 0,25344 | 0,35562 | 0,26467 | 0,25962 | 0,19654 | 0,34524 | 0,07624 | 0,09474 |
| Šri_Lanka | 20 | 0,06905 | 0,02476 | 0,04357 | 0,03994 | 0,20605 | 0,15269 | 0,01778 | 0,10075 | 0,04204 | 0,06927 | 0,04484 | 0,04357 | 0,50462 | 0,65082 | 0,35507 | 0,00742 |
| HR_Romi | 21 | 0,05668 | 0,03576 | 0,04593 | 0,04429 | 0,2147 | 0,13394 | 0,00209 | 0,08367 | 0,04524 | 0,05677 | 0,04649 | 0,04593 | 0,56011 | 0,68646 | 0,40344 | -0,00195 |

| | Bangladeš | Indija | Pakistan | Šri_Lanka | HR_Romi |
|-------------|-----------|----------|----------|-----------|---------|
| | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| Nigerija | 1 | | | | |
| Gambija | 2 | | | | |
| Kenija | 3 | | | | |
| Sijera_Leoa | 4 | | | | |
| Kolumbija | 5 | | | | |
| Meksiko | 6 | | | | |
| Peru | 7 | | | | |
| Portoriko | 8 | | | | |
| Kina_Dai | 9 | | | | |
| Kina_Han | 10 | | | | |
| Japan | 11 | | | | |
| Vijetnam | 12 | | | | |
| Finska | 13 | | | | |
| UK | 14 | | | | |
| Španjolska | 15 | | | | |
| Italija | 16 | | | | |
| Bangladeš | 17 | 0 | | | |
| Indija | 18 | 0,0068 | 0 | | |
| Pakistan | 19 | 0,13353 | 0,09146 | 0 | |
| Šri_Lanka | 20 | -0,00456 | 0,01329 | 0,15563 | 0 |
| HR_Romi | 21 | -0,00094 | 0,00166 | 0,15025 | 0,00278 |

8.3. Ulazni dokument za analizu u softveru IBD

| | | | | | | | | |
|------------------|----|----------|---|----|----------|---|----|---------|
| GENETIC_DISTANCE | | | 2 | 11 | 0,58883 | 4 | 5 | 0,12684 |
| 1 | 2 | 0,56011 | 2 | 12 | 0,68957 | 4 | 6 | 0,32682 |
| 1 | 3 | -0,00195 | 2 | 13 | 0,57073 | 4 | 7 | 0,30511 |
| 1 | 4 | 0,40344 | 2 | 14 | 0,14447 | 4 | 8 | 0,07624 |
| 1 | 5 | 0,68646 | 2 | 15 | 0,21238 | 4 | 9 | 0,35507 |
| 1 | 6 | -0,00094 | 2 | 16 | 0,40035 | 4 | 10 | 0,44352 |
| 1 | 7 | 0,00166 | 2 | 17 | 0,26404 | 4 | 11 | 0,44581 |
| 1 | 8 | 0,15025 | 2 | 18 | 0,59493 | 4 | 12 | 0,55199 |
| 1 | 9 | 0,00278 | 2 | 19 | 0,58127 | 4 | 13 | 0,42816 |
| 1 | 10 | 0,03576 | 2 | 20 | 0,69027 | 4 | 14 | 0,04114 |
| 1 | 11 | 0,04593 | 2 | 21 | 0,58883 | 4 | 15 | 0,08846 |
| 1 | 12 | 0,05668 | 3 | 4 | 0,28949 | 4 | 16 | 0,25192 |
| 1 | 13 | 0,04429 | 3 | 5 | 0,59131 | 4 | 17 | 0,1283 |
| 1 | 14 | 0,2147 | 3 | 6 | 0,0015 | 4 | 18 | 0,45184 |
| 1 | 15 | 0,13394 | 3 | 7 | -0,00284 | 4 | 19 | 0,43839 |
| 1 | 16 | 0,00209 | 3 | 8 | 0,09474 | 4 | 20 | 0,55279 |
| 1 | 17 | 0,08367 | 3 | 9 | 0,00742 | 4 | 21 | 0,44581 |
| 1 | 18 | 0,04649 | 3 | 10 | 0,08128 | 5 | 6 | 0,62472 |
| 1 | 19 | 0,04524 | 3 | 11 | 0,06365 | 5 | 7 | 0,6056 |
| 1 | 20 | 0,05677 | 3 | 12 | 0,12201 | 5 | 8 | 0,34524 |
| 1 | 21 | 0,04593 | 3 | 13 | 0,07552 | 5 | 9 | 0,65082 |
| 2 | 3 | 0,44076 | 3 | 14 | 0,14028 | 5 | 10 | 0,72579 |
| 2 | 4 | 0,03009 | 3 | 15 | 0,08408 | 5 | 11 | 0,72694 |
| 2 | 5 | 0,03086 | 3 | 16 | -0,00362 | 5 | 12 | 0,80724 |
| 2 | 6 | 0,47543 | 3 | 17 | 0,04949 | 5 | 13 | 0,71133 |
| 2 | 7 | 0,4617 | 3 | 18 | 0,0833 | 5 | 14 | 0,28559 |
| 2 | 8 | 0,19654 | 3 | 19 | 0,07883 | 5 | 15 | 0,36582 |
| 2 | 9 | 0,50462 | 3 | 20 | 0,12237 | 5 | 16 | 0,55424 |
| 2 | 10 | 0,58837 | 3 | 21 | 0,08128 | 5 | 17 | 0,41722 |

| | | | | | | | | |
|---|----|----------|----|----|----------|----|----|---------|
| 5 | 18 | 0,73211 | 7 | 19 | 0,07113 | 10 | 13 | 0,00262 |
| 5 | 19 | 0,72046 | 7 | 20 | 0,09848 | 10 | 14 | 0,30296 |
| 5 | 20 | 0,80776 | 7 | 21 | 0,07267 | 10 | 15 | 0,2701 |
| 5 | 21 | 0,72694 | 8 | 9 | 0,15563 | 10 | 16 | 0,0888 |
| 6 | 7 | 0,0068 | 8 | 10 | 0,24984 | 10 | 17 | 0,18681 |
| 6 | 8 | 0,13353 | 8 | 11 | 0,25962 | 10 | 18 | 0,0039 |
| 6 | 9 | -0,00456 | 8 | 12 | 0,35485 | 10 | 19 | 0,00319 |
| 6 | 10 | 0,03575 | 8 | 13 | 0,24503 | 10 | 20 | 0,00914 |
| 6 | 11 | 0,05714 | 8 | 14 | 0,00041 | 10 | 21 | 0,00359 |
| 6 | 12 | 0,09147 | 8 | 15 | -0,00567 | 11 | 12 | 0 |
| 6 | 13 | 0,05228 | 8 | 16 | 0,07015 | 11 | 13 | 0 |
| 6 | 14 | 0,181 | 8 | 17 | 0,00305 | 11 | 14 | 0,31056 |
| 6 | 15 | 0,12782 | 8 | 18 | 0,26467 | 11 | 15 | 0,28472 |
| 6 | 16 | 0,00925 | 8 | 19 | 0,25344 | 11 | 16 | 0,10874 |
| 6 | 17 | 0,08304 | 8 | 20 | 0,35562 | 11 | 17 | 0,19882 |
| 6 | 18 | 0,05884 | 8 | 21 | 0,25962 | 11 | 18 | 0 |
| 6 | 19 | 0,05508 | 9 | 10 | 0,02476 | 11 | 19 | 0 |
| 6 | 20 | 0,09177 | 9 | 11 | 0,04357 | 11 | 20 | 0 |
| 6 | 21 | 0,05714 | 9 | 12 | 0,06905 | 11 | 21 | 0 |
| 7 | 8 | 0,09146 | 9 | 13 | 0,03994 | 12 | 13 | 0 |
| 7 | 9 | 0,01329 | 9 | 14 | 0,20605 | 12 | 14 | 0,41455 |
| 7 | 10 | 0,06042 | 9 | 15 | 0,15269 | 12 | 15 | 0,40084 |
| 7 | 11 | 0,07267 | 9 | 16 | 0,01778 | 12 | 16 | 0,16567 |
| 7 | 12 | 0,09825 | 9 | 17 | 0,10075 | 12 | 17 | 0,27787 |
| 7 | 13 | 0,06904 | 9 | 18 | 0,04484 | 12 | 18 | 0 |
| 7 | 14 | 0,14116 | 9 | 19 | 0,04204 | 12 | 19 | 0 |
| 7 | 15 | 0,07799 | 9 | 20 | 0,06927 | 12 | 20 | 0 |
| 7 | 16 | -0,00399 | 9 | 21 | 0,04357 | 12 | 21 | 0 |
| 7 | 17 | 0,04378 | 10 | 11 | 0,00359 | 13 | 14 | 0,29419 |
| 7 | 18 | 0,07394 | 10 | 12 | 0,0091 | 13 | 15 | 0,26615 |

| | | | | | | | | |
|----|----|----------|-------------------|----|-------|---|----|-------|
| 13 | 16 | 0,10059 | 18 | 21 | 0 | 2 | 8 | 4530 |
| 13 | 17 | 0,18713 | 19 | 20 | 0 | 2 | 9 | 7468 |
| 13 | 18 | 0 | 19 | 21 | 0 | 2 | 10 | 6191 |
| 13 | 19 | 0 | 20 | 21 | 0 | 2 | 11 | 6914 |
| 13 | 20 | 0 | GEOGRAPHIC_DISTAN | | | 2 | 12 | 5866 |
| 13 | 21 | 0 | CE | | | 2 | 13 | 6565 |
| 14 | 15 | 0,00427 | 1 | 2 | 1700 | 2 | 14 | 10050 |
| 14 | 16 | 0,11067 | 1 | 3 | 518 | 2 | 15 | 9847 |
| 14 | 17 | 0,02194 | 1 | 4 | 1701 | 2 | 16 | 11830 |
| 14 | 18 | 0,31622 | 1 | 5 | 1571 | 2 | 17 | 8296 |
| 14 | 19 | 0,30365 | 1 | 6 | 6957 | 2 | 18 | 7811 |
| 14 | 20 | 0,41536 | 1 | 7 | 5600 | 2 | 19 | 7124 |
| 14 | 21 | 0,31056 | 1 | 8 | 4951 | 2 | 20 | 6323 |
| 15 | 16 | 0,05892 | 1 | 9 | 7450 | 2 | 21 | 7491 |
| 15 | 17 | -0,00267 | 1 | 10 | 4721 | 3 | 4 | 1373 |
| 15 | 18 | 0,29111 | 1 | 11 | 5628 | 3 | 5 | 1443 |
| 15 | 19 | 0,27688 | 1 | 12 | 4168 | 3 | 6 | 7292 |
| 15 | 20 | 0,40174 | 1 | 13 | 5004 | 3 | 7 | 5907 |
| 15 | 21 | 0,28472 | 1 | 14 | 9641 | 3 | 8 | 5280 |
| 16 | 17 | 0,0317 | 1 | 15 | 10270 | 3 | 9 | 7620 |
| 16 | 18 | 0,1116 | 1 | 16 | 11200 | 3 | 10 | 4232 |
| 16 | 19 | 0,10528 | 1 | 17 | 7948 | 3 | 11 | 5383 |
| 16 | 20 | 0,16615 | 1 | 18 | 9336 | 3 | 12 | 3680 |
| 16 | 21 | 0,10874 | 1 | 19 | 7887 | 3 | 13 | 4495 |
| 17 | 18 | 0,2029 | 1 | 20 | 7639 | 3 | 14 | 9389 |
| 17 | 19 | 0,19386 | 1 | 21 | 8338 | 3 | 15 | 10250 |
| 17 | 20 | 0,27853 | 2 | 3 | 2203 | 3 | 16 | 10870 |
| 17 | 21 | 0,19882 | 2 | 4 | 2947 | 3 | 17 | 7736 |
| 18 | 19 | 0 | 2 | 5 | 1821 | 3 | 18 | 9846 |
| 18 | 20 | 0 | 2 | 6 | 6379 | 3 | 19 | 8256 |
| | | | 2 | 7 | 5220 | | | |

| | | | | | | | | |
|---|----|-------|---|----|-------|----|----|-------|
| 3 | 20 | 8122 | 5 | 17 | 6763 | 7 | 18 | 5839 |
| 3 | 21 | 8723 | 5 | 18 | 9551 | 7 | 19 | 2479 |
| 4 | 5 | 1262 | 5 | 19 | 8831 | 7 | 20 | 3780 |
| 4 | 6 | 8647 | 5 | 20 | 8141 | 7 | 21 | 3001 |
| 4 | 7 | 7273 | 5 | 21 | 9234 | 8 | 9 | 3061 |
| 4 | 8 | 6637 | 6 | 7 | 1420 | 8 | 10 | 9155 |
| 4 | 9 | 8968 | 6 | 8 | 2012 | 8 | 11 | 5436 |
| 4 | 10 | 3253 | 6 | 9 | 2188 | 8 | 12 | 7205 |
| 4 | 11 | 6194 | 6 | 10 | 11070 | 8 | 13 | 9145 |
| 4 | 12 | 3655 | 6 | 11 | 6422 | 8 | 14 | 14530 |
| 4 | 13 | 3679 | 6 | 12 | 8895 | 8 | 15 | 14050 |
| 4 | 14 | 8017 | 6 | 13 | 10990 | 8 | 16 | 16150 |
| 4 | 15 | 9065 | 6 | 14 | 16430 | 8 | 17 | 12780 |
| 4 | 16 | 9512 | 6 | 15 | 15100 | 8 | 18 | 5972 |
| 4 | 17 | 9179 | 6 | 16 | 18160 | 8 | 19 | 3009 |
| 4 | 18 | 10750 | 6 | 17 | 14670 | 8 | 20 | 3880 |
| 4 | 19 | 9588 | 6 | 18 | 4889 | 8 | 21 | 3509 |
| 4 | 20 | 9222 | 6 | 19 | 1085 | 9 | 10 | 10530 |
| 4 | 21 | 10040 | 6 | 20 | 3021 | 9 | 11 | 4866 |
| 5 | 6 | 7994 | 6 | 21 | 1615 | 9 | 12 | 7973 |
| 5 | 7 | 6710 | 7 | 8 | 690 | 9 | 13 | 10230 |
| 5 | 8 | 6033 | 7 | 9 | 2429 | 9 | 14 | 16850 |
| 5 | 9 | 8714 | 7 | 10 | 9661 | 9 | 15 | 17090 |
| 5 | 10 | 4483 | 7 | 11 | 5438 | 9 | 16 | 17430 |
| 5 | 11 | 6822 | 7 | 12 | 7561 | 9 | 17 | 15340 |
| 5 | 12 | 4767 | 7 | 13 | 9599 | 9 | 18 | 6855 |
| 5 | 13 | 4935 | 7 | 14 | 15210 | 9 | 19 | 2801 |
| 5 | 14 | 8497 | 7 | 15 | 14660 | 9 | 20 | 5163 |
| 5 | 15 | 8933 | 7 | 16 | 16780 | 9 | 21 | 3201 |
| 5 | 16 | 10170 | 7 | 17 | 13470 | 10 | 11 | 6113 |

| | | | | | | | | |
|----|----|-------|----|----|-------|----|----|-------|
| 10 | 12 | 2662 | 12 | 15 | 9852 | 15 | 16 | 4250 |
| 10 | 13 | 670 | 12 | 16 | 9625 | 15 | 17 | 5539 |
| 10 | 14 | 6372 | 12 | 17 | 7960 | 15 | 18 | 11300 |
| 10 | 15 | 8747 | 12 | 18 | 12960 | 15 | 19 | 14930 |
| 10 | 16 | 7243 | 12 | 19 | 9978 | 15 | 20 | 12460 |
| 10 | 17 | 5305 | 12 | 20 | 10940 | 15 | 21 | 14760 |
| 10 | 18 | 14000 | 12 | 21 | 10510 | 16 | 17 | 3595 |
| 10 | 19 | 12140 | 13 | 14 | 6734 | 16 | 18 | 15480 |
| 10 | 20 | 12350 | 13 | 15 | 9275 | 16 | 19 | 18890 |
| 10 | 21 | 12660 | 13 | 16 | 7419 | 16 | 20 | 16640 |
| 11 | 12 | 3458 | 13 | 17 | 5809 | 16 | 21 | 18970 |
| 11 | 13 | 5648 | 13 | 18 | 14340 | 17 | 18 | 13400 |
| 11 | 14 | 12340 | 13 | 19 | 12070 | 17 | 19 | 15300 |
| 11 | 15 | 14820 | 13 | 20 | 12560 | 17 | 20 | 13520 |
| 11 | 16 | 12570 | 13 | 21 | 12600 | 17 | 21 | 15540 |
| 11 | 17 | 11420 | 14 | 15 | 3171 | 18 | 19 | 4056 |
| 11 | 18 | 11260 | 14 | 16 | 1886 | 18 | 20 | 2092 |
| 11 | 19 | 7401 | 14 | 17 | 1759 | 18 | 21 | 3674 |
| 11 | 20 | 9218 | 14 | 18 | 14300 | 19 | 20 | 2479 |
| 11 | 21 | 7893 | 14 | 19 | 17000 | 19 | 21 | 531 |
| 12 | 13 | 2264 | 14 | 20 | 14940 | 20 | 21 | 23 |
| 12 | 14 | 8994 | 14 | 21 | 17160 | | | |

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 25. svibnja 1997. godine. Pohađala sam Osnovnu školu Gradec u Gradecu nakon čega sam završila opći gimnazijski smjer u Srednjoj školi Vrbovec. U srpnju 2016. godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, nastavnički smjer, na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Tijekom studija radila sam brojne studentske poslove od kojih bih istaknula posao nastavnice biologije u Privatnoj Gimnaziji Marul u Zagrebu tijekom ljetnog semestra 5. godine studija.

Aktivno se služim engleskim, a pasivno njemačkim jezikom.