

Povezanost jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 u ljudskom genu FTO s pretilošću žena Zagrebačke županije

Smolkovič, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:904619>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

Barbara Smolkovič

622/MB

**POVEZANOST JEDNOSTRUKOG
NUKLEOTIDNOG
POLIMORFIZMA rs1421085 U
LJUDSKOM GENU *FTO*
S PRETILOŠĆU ŽENA
ZAGREBAČKE ŽUPANIJE**

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

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj obitelji na nesebičnoj ljubavi i podršci koju su mi pružali tijekom cjelokupnog akademskog obrazovanja!

Zahvaljujem kolegicama Luciji Škara i Ani Huđek na veseloj i raspjevanoj radnoj atmosferi u laboratoriju i svim divnim druženjima izvan radnog vremena!

Zahvaljujem mentorici prof. dr.sc. Višnji Bačun-Družina na odličnoj višegodišnjoj suradnji koja je urodila lijepim rezultatima i mnogobrojnim uspjesima!

Zahvaljujem Luciji Nanić, dr.sc. Sandi Ravlić i izv.prof.dr.sc. Ivici Rubelju na stručnom vodstvu eksperimentalnog dijela rada koji je izrađen na Institutu Ruđer Bošković, stečenim znanjima i životnom iskustvu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

POVEZANOST JEDNOSTRUKOG NUKLEOTIDNOG POLIMORFIZMA rs1421085 U LJUDSKOM GENU *FTO* S PRETILOŠĆU ŽENA ZAGREBAČKE ŽUPANIJE

Barbara Smolkovič, 622/MB

Sažetak: Pretilost je bolest na koju najčešće utječe više čimbenika te interakcije između okolišnih, socijalnih i genetičkih čimbenika. Svrha ovog istraživanja je ispitati potencijalne razlike u sastavu mikrobioma usne šupljine te potencijalni utjecaj genetičkih faktora na razvoj pretilosti genotipizacijom jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* u pretilih žena i žena normalne težine Zagrebačke županije te analizirati njihove prehrabene navike, stil života i zdravstveno stanje. Ispitivanje povezanosti jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* s pretilošću prvo je takve vrste u sjeverozapadnoj Hrvatskoj i općenito drugo dosad u Hrvatskoj što mu daje dodatni značaj. Dobiveni rezultati pokazuju pozitivnu korelaciju između zastupljenosti visokorizičnog genotipa CC rs1421085 gena *FTO* i pretilosti žena. Također, pronađene su razlike u sastavu mikrobioma usne šupljine pri čemu je bakterijska vrsta *Staphylococcus aureus* zastupljenija u pretilih žena, dok su u žena normalne tjelesne težine zastupljenije bakterijske vrste roda *Streptococcus* (*S. infantis*, *S. mitis*, *S. oralis* i *S. salivarius*) te bakterijska vrsta *Serratia ureilytica*. Obrada anketnih upitnika ukazuje da pretile žene u povećanoj mjeri konzumiraju hranu bogatu slatkišima i grickalicama te mesom i mesnim prerađevima i učestalije boluju od povišenog krvnog tlaka u odnosu na kontrolnu skupinu žena. Ovim istraživanjem želio se dobiti uvid u postojanje genetičke podloge za povećani rizik od razvoja pretilosti te detektirati mikroorganizme koji su indikator pretilosti kod žena.

Ključne riječi: pretilost, mikrobiom usne šupljine, gen *FTO*, rs1421085, žene

Rad sadrži: 50 stranica, 9 slika, 15 tablica, 61 literaturnih navoda, 4 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof.dr.sc. Višnja Bačun-Družina

Komentor: Izv.prof.dr.sc. Ivica Rubelj

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 21. srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM rs1421085 IN HUMAN *FTO* GENE WITH OBESITY IN WOMAN FROM ZAGREB COUNTY

Barbara Smolkovič, 622/MB

Abstract: Obesity is mainly a multifactorial disease caused by interactions between environmental, social and genetic factors. The aims of this study are to investigate possible differences in composition of the oral microbiota and possible influence of the genetic factors on the obesity risk by genotyping single nucleotide polymorphism rs1421085 in the *FTO* gene in obese and lean women living in Zagreb county and to analyze their eating habits, lifestyle and health condition. This is the first research in the northwest Croatia and the second research in Croatia till now which examines the association of single nucleotide polymorphism rs1421085 in the *FTO* gene with woman obesity what gives to this research additional value. The results showed the positive correlation between frequency of the high risk genotype CC rs1421085 of the *FTO* gene and obesity. Moreover, the differences in the composition of the oral microbiota are shown whereby appearance of bacterial species *Staphylococcus aureus* is higher in obese group. On the other hand, appearances of bacterial species from genus *Streptococcus* (*S. infantis*, *S. mitis*, *S. oralis* and *S. salivarius*) and bacterial species *Serratia ureilytica* are higher in lean group. The questionnaire analysis showed that obese women prefer candy and snacks rich diet and also consume more meat and meat products and have higher hypertension rate compare to lean women. The purposes of this study are to get insight of the existence of the genetic basis of increased obesity risk and to detect the microorganisms which indicate to woman obesity.

Keywords: obesity, oral microbiota, *FTO* gene, rs1421085, women

Thesis contains: 50 pages, 9 figures, 15 tables, 61 references, 4 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Višnja, Bačun-Družina, Full professor*

Co-mentor: *PhD. Ivica, Rubelj, Associate professor*

Reviewers:

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

Thesis defended: 21 July 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Problem pretilosti	2
2.1.1. Paradoks pretilosti	2
2.1.2. Tipovi pretilosti i dijagnostika pretilosti.....	3
2.1.3. Genetska osnova pretilosti.....	3
2.1.4. Pretilost u Hrvatskoj	4
2.2. Gen <i>FTO</i>	6
2.2.1. Gen <i>FTO</i> kao prvi identificirani gen povezan s pretilošću	6
2.2.2. Biološke funkcije gena <i>FTO</i>	7
2.2.3. Jednostruki nukleotidni polimorfizmi gena <i>FTO</i>	8
2.2.4. Jednostruki nukleotidni polimorfizam rs1421085 gena <i>FTO</i>	9
2.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	11
2.4. Mikrobiom usne šupljine	13
2.4.1. Povezanost mikrobioma usne šupljine i pretilosti.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Ispitanici	15
3.2. Analiza mikrobioma usne šupljine	15
3.2.1. Uzgoj mješovitih kultura	15
3.2.2. Izolacija čistih kultura.....	16
3.2.3. Identifikacija čistih kultura	17
3.2.4. Laboratorijska oprema za analizu mikrobioma usne šupljine.....	17
3.3. Analiza jednostrukog nukleotidnog polimorfizma	19
3.3.1. Izolacija DNA iz krvi	19
3.3.2. Provjera koncentracije i kvalitete izolirane DNA iz krvi.....	20
3.3.3. Genotipizacija metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.....	20
3.4. Statistička obrada rezultata.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Rezultati identifikacije mikroorganizama iz uzoraka sline.....	23
4.2. Rezultati genotipizacije metodom lančane reakcije polimerazom.....	31
4.3. Rezultati obrade anketnih upitnika	35
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42
7. PRILOZI	51
7.1. Popis i objašnjenje kratica	51
7.2. Anketni upitnik.....	52
7.3. Informirani pristanak za sudjelovanje zdravih osoba u istraživanju	54
7.4. Informirani pristanak za sudjelovanje pretilih osoba u istraživanju	57

1. UVOD

Pretilost je postala sve učestalija bolest današnjice, a doprinosi razvoju kroničnih bolesti kao što su povišeni krvni tlak, dijabetes tipa II, kardiovaskularne bolesti (Swinburn i sur., 2011). Na razvoj pretilosti utječu interakcije između okolišnih, socijalnih i genetičkih čimbenika (Xia i Grant, 2013). Genetički faktori pokazali su izniman utjecaj na predispoziciju razvoja pretilosti (Silventoinen i sur., 2010) te je prema cjelogenomskim asocijacijskim studijama (*engl.* genome-wide associatian studies, GWAS) gen *FTO* (*engl.* fat mass and obesity associated) prvi identificirani humani gen povezan s pretilošću. Povezanost gena *FTO* s pretilošću utvrđena je detekcijom varijacija u nukleotidnim sekvencama regije introna 1 i 2 gena *FTO*. Takve varijacije unutar regija gena poznate su kao jednostruki nukleotidni polimorfizmi (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP), a služe kao markeri za detekciju gena odgovornih za nastanak određenih bolesti. Povezanost SNP-a rs1421085 gena *FTO* s pretilošću dosad je dokumentirana u brojnim svjetskim radovima (Frayling i sur., 2007, Dina i sur., 2007, Price i sur., 2008, Stuzmann i sur., 2009, Albuquerque i sur., 2013) te u Hrvatskoj na populaciji otoka Hvara (Zhang i sur., 2010), a nije pronađena u radu Solak i sur. (2014). Povezanost pretilosti s mikrobiomom usne šupljine je slabo istražena. U literaturi se navodi da su u slini pretilih ispitanika zastupljenije bakterije iz koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria*, dok su bakterije iz koljena *Proteobacteria* i *Fusobacteria* dominantnije u ispitanika normalne težine (Piombino i sur., 2014). Gledano pojedinačno, dosad dokumentirane bakterijske vrste koje su zastupljenije u pretilih osoba su *Campylobacter rectus* i *Neisseria mucosa* (Zeigler i sur., 2012) te *Selenomonas noxia* (Goodson i sur., 2009). Svrha ovog istraživanja je ispitati potencijalne razlike u sastavu mikrobioma usne šupljine na uzorku sline žena s normalnim vrijednostima indeksa tjelesne mase i žena s vrijednostima indeksa tjelesne mase većim od 30 kg m^{-2} , a koje žive na području Zagrebačke županije. Analiza mikrobioma usne šupljine provedena je uzgojem u kulturi na kompletnim podlogama MRS (*engl.* De Man, Ragosa and Sharpe, MRS) i LB (*engl.* Luria-Bertani, LB) te identifikacijom čistih kultura izoliranih vrsta metodom spektrometrije masa. Također, ispitati potencijalni utjecaj genetičkih faktora na razvoj pretilosti u žena Zagrebačke županije genotipizacijom jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Naposljetku, statističkom obradom podataka prikupljenih iz anketnih upitnika utvrditi ima li razlika u prehrambenim navikama, stilu života i zdravstvenom stanju između skupine žena s normalnim vrijednostima indeksa tjelesne mase i skupine žena s vrijednostima indeksa tjelesne mase većim od 30 kg m^{-2} s područja Zagrebačke županije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Problem pretilosti

Pretilost je postala globalni problem koji zahvaća širu populaciju, a doprinosi razvoju mnogih kroničnih bolesti kao što su povišeni krvni tlak, dijabetes tipa II, kardiovaskularne bolesti, metabolički sindrom te razvoju određenih vrsta tumora (Swinburn i sur., 2011). Pojavi pretilosti uvelike doprinosi sjedilački način života i unos visoko kalorične hrane. Podaci pokazuju da se pretilost počela širiti od 1980. godine pa sve do danas kada je postala globalna pandemija. U epidemiološkim studijama se procjenjuje da je 1989. godine u svijetu zastupljeno 857 milijuna pretilih odraslih osoba starijih od 20 godina, dok je 2013. godine brojka pretilih odraslih osoba porasla na 2,1 milijarde. Dakle, zastupljenost pretilosti kod ljudi između 1980. i 2013. godine povećala se za otprilike 41 % (Ng i sur., 2014).

Unatoč brojnim preventivnim programima za podizanje svijesti o riziku prekomjerne težine i pretilosti, naporima da se smanji unos hrane i poveća potrošnja energije kroz različite fizičke aktivnosti, postotak pretilih ljudi se u današnjem modernom društvu još uvijek povećava. Međutim, pretilost nije isključivo posljedica životnog stila, već na nju utječu brojni genetički i negenetički faktori. Pretilost je kompleksna bolest na koju utječe više čimbenika i koja se javlja kao posljedica interakcija između socijalnih, okolišnih i genetičkih faktora (Xia i Grant, 2013). Iako se pretilost danas smatra bolešću, u prijašnjim vremenima predstavljala je prednost u opstanku jer hrana nije bila lako dostupna, a kroz brojne fizičke aktivnosti, koje su bile dio dinamičkog načina života, trošilo se puno energije.

2.1.1. Paradoks pretilosti

Indeks tjelesne mase (*engl.* body mass index, BMI) najčešće se koristi kao jednostavni antropometrijski pokazatelj pretilosti. Međutim, BMI nije direktna mjera količine tjelesne masti (adipoznog tkiva) te ne može biti indikator negativnog utjecaja adipoznog tkiva. Adipozno tkivo može u organizmu imati i potencijalnu zaštitnu ulogu ili pak uzrokovati metaboličke poremećaje koji dovode do tzv. metaboličkog sindroma. Metabolički sindrom obilježavaju pojave poput rezistencije na inzulin, povišenog krvnog tlaka, dislipidemije koju karakterizira povišena razina triglicerida, niska razina "dobrog" kolesterola to jest lipoproteina visoke gustoće (*engl.* high density lipoprotein, HDL) i nakupljanje masnog tkiva u području trbuha. Pojam paradoks pretilosti odnosi se na vrijednosti BMI kao mjeru pretilosti i adipoznosti pri čemu se ne razlikuju pozitivni i negativni utjecaji adipoznog tkiva. Iz

vrijednosti BMI se ne može razaznati postotak tjelesne masti, tip tjelesne masti i gdje se mast nalazi unutar tijela niti stupanj metaboličkih promjena koje može izazvati. Paradoks pretilosti indicira da određeni pojedinci s većim vrijednostima BMI imaju manji rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti te ostalih kroničnih bolesti (Goyal i sur., 2014). Obzirom da adipozno tkivo funkcionira kao endokrini organ izlučujući različite imunomodulatorne proteine zvane adipokini, znanstvenici pokušavaju pronaći vezu između koncentracije adipokina i razvoja kardiovaskularnih bolesti. Smatra se da bi poremećaji u ravnoteži leptina i ostalih adipokina, mogli biti odgovor na paradoks pretilosti. U radu Blühera i Mantzoros iz 2015., paradoks pretilosti se pokušava objasniti na način da povišena razina leptina prisutna u određenim pretilim pojedincima može djelovati preventivno u razvoju kardiovaskularnih bolesti.

2.1.2. Tipovi pretilosti i dijagnostika pretilosti

Jedan od spomenutih pokazatelja pretilosti je indeks tjelesne mase čija se vrijednost izračunava dijeljenjem tjelesne težine osobe s kvadratom njezine visine te se izražava u jedinici kg m^{-2} . Obzirom na raspon vrijednosti indeksa tjelesne mase, pretilost možemo podijeliti u 3 stupnja. U prvi stupanj pretilosti svrstavamo osobe čije su vrijednosti indeksa tjelesne mase između 30 i 34,9 kg m^{-2} , u drugi stupanj pretilosti spadaju osobe s vrijednostima indeksa tjelesne mase između 35 i 39,9 kg m^{-2} , dok u treći stupanj spadaju osobe čije su vrijednosti indeksa tjelesne mase iznad 40 kg m^{-2} (Arrone, 2002). U dijagnostici pretilosti se osim izračunavanja indeksa tjelesne mase koriste i druge tehnike procjenjivanja tjelesne masti i distribucije masnog tkiva kao što su mjerenje opsega struka, omjera opsega struka i bokova te mjerenje kožnih nabora (Medanić i Pucarin-Cvetković, 2013).

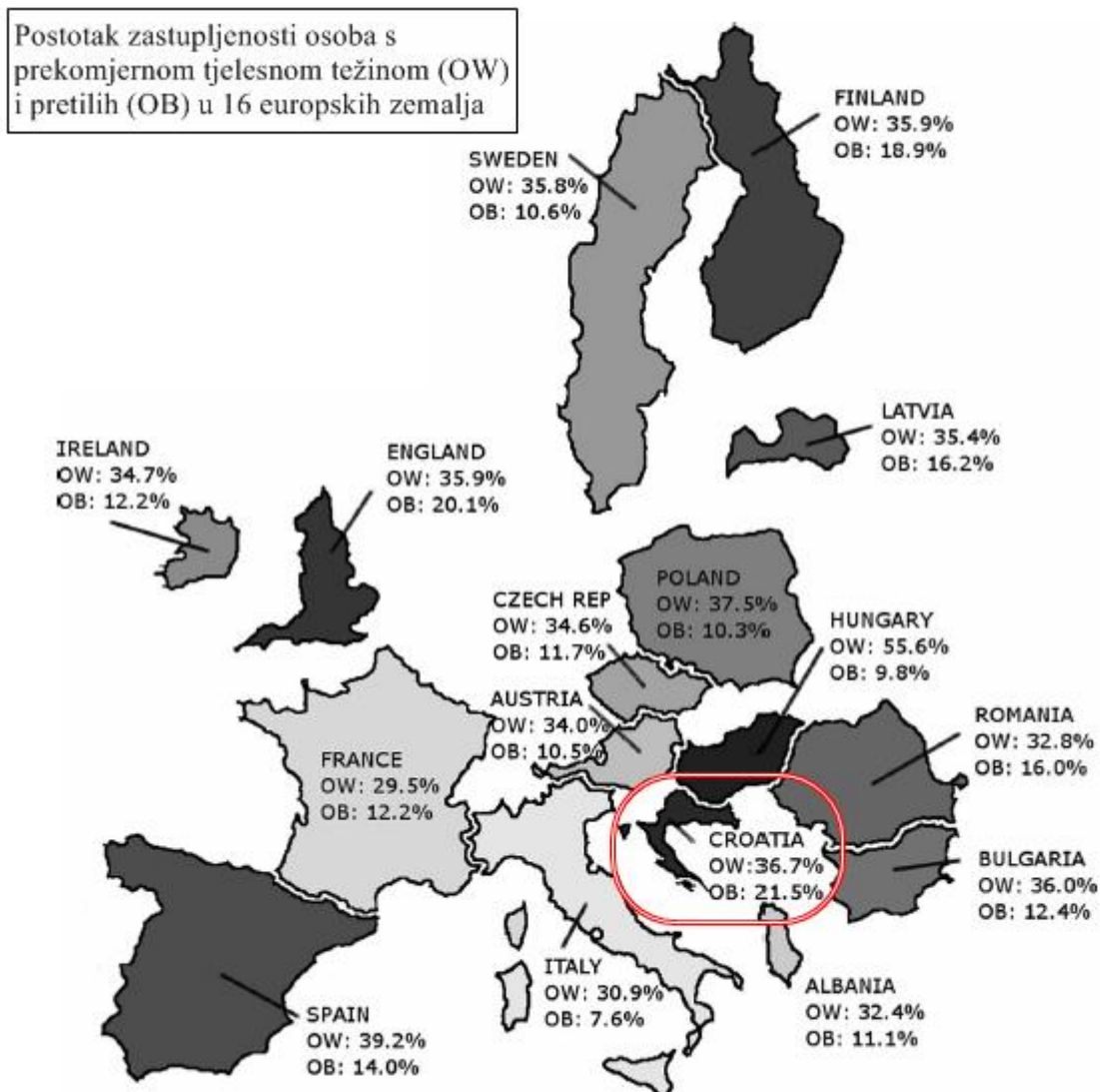
2.1.3. Genetska osnova pretilosti

Obzirom da je pojava pretilosti sve zastupljenija širom svijeta, teško je vjerovati da bi primarni uzrok pretilosti mogli biti isključivo genetički čimbenici kako je navedeno u istraživanju o blizancima i posvojenjima djece (Silventoinen i sur., 2010). Znanstvenici su proveli meta analizu 9 studija o blizancima i 5 studija o posvojenjima djece pri čemu su većinu populacije predstavljala djeca bijelaca, a kao parametar pretilosti su koristili indeks tjelesne mase. Prilikom proučavanja studije o blizancima pronađen je jak utjecaj genetičkih faktora na razlike u vrijednostima indeksa tjelesne mase kod svih uzrasta. Okolišni čimbenici pokazali su značajan utjecaj na vrijednost BMI kod djece u razdoblju srednjeg djetinjstva (9.-

13. godina), no taj efekt nije vidljiv u razdoblju adolescencije (14.-18. godina). Analiza studija o posvojenjima djece pokazala je korelaciju između tjelesne mase udomljene djece i njihovih udomiteljskih roditelja što u prilog govori o utjecajima okolišnih faktora na pretilost. Međutim, jača korelacija je otkrivena između roditelja i njihove biološke djece što dodatno potvrđuje važnost genetičkih faktora na razvoj pretilosti. Rezultati istraživanja ukazuju da i okolišni i genetički faktori utječu na razlike u vrijednostima BMI kod djece, međutim utjecaj okolišnih faktora ne dolazi do izražaja tijekom odrastanja (Silventoinen i sur., 2010).

2.1.4. Pretilost u Hrvatskoj

Hrvatska se na svjetskoj ljestvici zastupljenosti prekomjerne tjelesne težine nalazi na 13. mjestu. Istraživanja su pokazala da 61,4 % stanovništva ima prekomjernu tjelesnu težinu. Tijekom analize razdoblja između 2003. i 2008. godine zabilježen je prosječni godišnji rast zastupljenosti pretilosti odraslih osoba od 10,6 % za muškarce i 11,08 % za žene. Time se postotak zastupljenosti pretilosti do 2008. godini povisio na 65,69 % za muškarce i 69,09 % za žene (Musić i sur., 2012a). Daljnje istraživanje Musić i sur. (2012b) pokazalo je da porast srednje vrijednosti indeksa tjelesne mase od $1,31 \text{ kg m}^{-2}$ u žena te $1,41 \text{ kg m}^{-2}$ u muškaraca skraćuje očekivano trajanje života za jednu godinu. Novije istraživanje o zastupljenosti prekomjerne tjelesne težine i pretilosti u Hrvatskoj, koje je dio velikog europskog istraživanja prevedenog u 16 zemalja, također je pokazalo slične rezultate. Postotak zastupljenosti prekomjerne tjelesne težine (vrijednost BMI između 25 i $29,9 \text{ kg m}^{-2}$) i pretilosti (vrijednost BMI iznad 30 kg m^{-2}) u Hrvatskoj na uzorku od 1000 odraslih ispitanika procjenjuje se na 58,2 % ispitanika od čega je 21,5 % ispitanika pretilo, a 36,7 % ispitanika ima prekomjernu tjelesnu težinu što je prikazano na slici 1. Gledano prema spolovima, u Hrvatskoj je pretilo 23,3 % muškaraca odnosno 19,9 % žena. Kad se postotku zastupljenosti pretilosti doda i postotak zastupljenosti prekomjerne tjelesne težine, vrijednosti iznose 64,3 % za muškarce i 52,7 % za žene (Gallus i sur., 2015). S 58,2 % zastupljenosti pretilosti i prekomjerne tjelesne težine, Hrvatska zauzima drugo mjesto na listi, dok najveći udio ljudi s prekomjernom tjelesnom težinom te pretilih ima Mađarska, a zastupljenost iznosi 65,4 % (Gallus i sur., 2015).



Slika 1. Prikaz zastupljenosti postotka osoba s prekomjernom tjelesnom težinom (vrijednosti BMI između 25 i 29,9 kg m⁻²) te pretilih osoba (vrijednosti BMI veće od 30 kg m⁻²) u 16 europskih zemalja uključujući Hrvatsku. Zemlje su obojane u sivo ovisno o postotku zastupljenosti osoba s prekomjernom težinom i pretilih osoba (svijetlosivo – niski postotak zastupljenosti, tamnosivo – visoki postotak zastupljenosti). Prilagođeno prema Gallus i sur. (2015).

2.2. Gen *FTO*

2.2.1. Gen *FTO* kao prvi identificirani gen povezan s pretilošću

Gen *FTO* (*engl.* fat mass and obesity associated, *FTO*) sastoji se od 9 egzona, lociran je na kromosomu 16, a sadrži preko 400 kB te je prvi identificirani gen povezan s pretilošću prema cjelogenomskim asocijacijskim studijama (*engl.* genome-wide association studies, GWAS). Godine 2007. prvi se put izvještava o povezanosti gena *FTO* i dijabetesa tipa II (Frayling i sur., 2007). Ispitivane varijacije u nukleotidnoj sekvenci u intronu jedan gena *FTO* na uzorku 38 759 ispitanika pokazale su relativnu povezanost s rizikom nastanka dijabetesa tipa II. Međutim, kada su eksperimenti podešeni prema vrijednostima indeksa tjelesne mase ispitanika, pokazalo se da je povezanost gena *FTO* s rizikom nastanka dijabetesa tipa II posredovana preko indeksa tjelesne mase. Naredna dva istraživanja potvrdila su povezanost pretilosti i indeksa tjelesne mase genotipizacijom preko 4 000 ljudi s otoka Sardinije, a potom i uspješnom replikacijom studije na preko 3 300 Europskih Amerikanaca, Afričkih Amerikanaca i Hispanoamerikanaca (Scuteri i sur., 2007) te genotipizacijom 8 000 Europljana (Dina i sur., 2007), a na temelju tri prethodno navedena istraživanja gen *FTO* potvrđen je kao prvi identificirani gen koji je povezan s rizikom nastanka pretilosti u općoj populaciji (Loos i Yeo, 2014).

Unatoč brojnim istraživanjima o genu *FTO* koja su do danas provedena, nije poznat mehanizam utjecaja gena *FTO* na pretilost. Novije studije pokazuju da gen *FTO* nije samo povezan s debljinom u ljudi, već i s metaboličkom sindromom te nastankom tumora. Podaci sakupljeni u istraživanjima na životinjama i staničnim modelima su pokazali da nepravilnosti u enzimskoj aktivnosti *FTO* utječu na promjenu regulacije gena koji su povezani s energetske metabolizmom te uzrokuju disbalans u energetske homeostazi i homeostazi adipoznog tkiva. Miševi u kojima je uklonjen gen *FTO* imali su značajno manje adipoznog tkiva te manju tjelesnu masu. Mršavost se u miševa deficijentnim genom *FTO* javlja kao posljedica povećane energetske potrošnje i sistemske simpatičke aktivacije unatoč smanjenoj lokomotornoj aktivnosti i pojavi hiperfagije (Fisher i sur., 2009). Do pojave hiperfagije u tih miševa moglo je doći zbog niskih razina leptina. S druge strane, pojačana ekspresija gena *FTO* u miševa dovodi do povećanja tjelesne mase i masnog tkiva ovisno o dozi, ali bez obzira bili miševi na standardnoj prehrani ili visoko kaloričnoj prehrani. Nakon konzumiranja visoko kalorične prehrane u miševa s dodatnom kopijom gena *FTO* dolazi do pojave intolerancije na glukozu (Church i sur., 2010).

2.2.2. Biološke funkcije gena *FTO*

Gen *FTO* kodira za 2-oksoglutarat Fe(II) ovisnu demetilazu koja je srodna bakterijskoj DNA demetilazi AlkB, a svrstava se u obitelj dioksidogenaza Alkb. Protein sadrži vezna mjesta za osnovni supstrat i kofaktor 2-oksoglutarat te Fe(II) vezno mjesto (Zhao i sur., 2014). Protein *FTO* preferira molekulu RNA kao svoj supstrat te katalizira demetilaciju 3-metiluracila (3meU) u jednostrukoj molekuli RNA, ali i demetilaciju 3-metilimina (3meT) u dvostrukoj molekuli DNA (*engl.* deoxiribonucleic acid, DNA). Također je važno otkriće da enzim *FTO* djeluje kao N6-metil-adenozin RNA (m^6A) demetilaza (*engl.* ribonucleic acid, RNA) katalizirajući demetilaciju m^6A jednostruke molekule RNA. Može se uočiti kako *FTO* u *in vitro* uvjetima ima potencijalnu ulogu u popravku i modifikacijama nukleinskih kiselina (Loos i Yeo, 2014). Smatra se da kemijska modifikacija m^6A ima važnu ulogu u staničnom metabolizmu RNA kao što je procesiranje primarnog transkripta, transport iz jezgre, stabilnost RNA, efikasnost procesa translacije i imunotolerancija (Niu i sur., 2013). Spomenuta enzimska aktivnost ukazuje da bi reverzibilna kemijska modifikacija m^6A na RNA mogla djelovati kao novi epigenetski marker (Niu i sur., 2013).

Znanstvenici su također uočili da je protein *FTO* djelomično lokaliziran u interkromatinskom prostoru unutar jezgre (*engl.* nuclear speckles) gdje su prisutni faktori procesiranja mRNA (*engl.* messenger RNA, mRNA) što implicira na potencijalnu ulogu proteina *FTO* u regulaciju procesiranja RNA (Beruleva i sur., 2012). Također je pronađeno da puno članova aminoacil-tRNA-sintetaza (*engl.* transport RNA, tRNA) ulaze u fizičke interakcije s proteinima *FTO*. U staničnim modelima u kojima je uklonjen gen *FTO*, kao odgovor na nedostatak aminokiselina, detektirane su značajno niže razine aminoacil-tRNA sintetaza sličnih leucin-tRNA-sintetazi što je dovelo do nepravilnosti u detektiranju razina (*engl.* sensing) aminokiselina i poremećajima u regulaciji procesa translacije mRNA i staničnog rasta (Gulati i sur., 2013).

Nedavno istraživanje je pokazalo da nekodirajuća sekvenca unutar gena *FTO* ulazi u interakcije s promotorskom regijom gena *IRX₃* (*engl.* iroquois homeobox 3, *IRX₃*) u ljudi, miša i ribe zebrice. Demonstrirana je direktna veza između ekspresije gena *IRX* i regulacije tjelesne mase i njezine distribucije na primjeru miševa deficijentnim genom *IRX₃* kod kojih je zapaženo smanjenje tjelesne mase za 25 % do 30 % primarno kroz povećanu brzinu bazalnog metabolizma prilikom prijelaza bijelog adipoznog tkiva u smeđe (Smemo i sur., 2014).

2.2.3. Jednostruki nukleotidni polimorfizmi gena *FTO*

Jednostruki nukleotidni polimorfizam (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) predstavlja promjenu u samo jednom nukleotidu unutar određene regije DNA. Takva se promjena pojavljuje u prosjeku na svakih 300 nukleotida što znači da ljudski genom sadrži otprilike 10 milijuna SNP-ova. SNP-ovi djeluju kao biološki markeri koji pomažu locirati gene koji su povezani s različitim bolestima. Svakom dosad otkrivenom jednostrukom nukleotidnom polimorfizmu pridruženi su oznaka rs i jedinstveni brojevi koji su arhivirani u bazi podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*engl.* National Center for Biotechnology Information, NCBI) kako bi se podaci vezani uz pojedini SNP mogli lakše pretraživati i objavljevati. Povezanost gena *FTO* s pretilošću nedvojbeno je kod ljudi dokazana preko SNP-ova koji se nalaze unutar regija introna 1 i prvog dijela regije introna 2 gena *FTO*, a radi se o jednostrukim nukleotidnim polimorfizmima rs9939609, rs17817449, rs3751812, rs1421085, rs9930506 te rs7202116 (Zhao i sur., 2014).

Jedna od glavnih uloga gena *FTO* je regulacija unosa hrane i potrošnje energije kod ljudi i životinja. Gen *FTO* se eksprimira u svim tkiva, ali ponajviše je zastupljen u mozgu u regiji hipotalamusa koja ima ključnu ulogu u regulaciji unosa hrane. U istraživanjima je utvrđeno da su nositelji rizičnog alela A jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs9939609 unosili 505 kJ energije više nego nositelji nerizičnog alela T. Također, nositelji rizičnog genotipa AA unosili su 1 231 kJ energije više nego nositelji nerizičnog genotipa TT (Speakman, 2008). Kod SNP-a rs8050136 gena *FTO* utvrđena je povezanost rizičnog alela s povišenim unosom energije, ali ne i s potrošnjom energije (Haupt i sur., 2009). Rizični alel je povezan s višim vrijednostima parametara vezanim uz tjelesnu mast. Nije pokazan utjecaj SNP-a na potrošnju energije. Znanstvenici zaključuju da je povećana tjelesna težina kod nositelja rizičnog alela posljedica povećanog unosa hrane, a ne smanjene potrošnje energije.

Adipozno tkivo djeluje kao skladišni organ energije pa bi bilo zanimljivo analizirati ekspresiju gena *FTO* u adipoznom tkivu osoba s različitim vrijednostima indeksa tjelesne mase kako bi se otkrio mehanizam utjecaja gena *FTO* na pretilost (Zhao i sur., 2014). Dosad je pronađena pozitivna korelacija između koncentracije mRNA *FTO* u subkutanom adipoznom tkivu i indeksa tjelesne mase (Tews i sur., 2011). Viša koncentracija mRNA *FTO* detektirana je u adipoznom tkivu pretilih osoba, nego kod osoba normalnih vrijednosti indeksa tjelesne mase (Lappalainen i sur., 2010). S druge pak strane, u njemačkoj studiji na 55 ljudi normalne tjelesne težine i pretilih, pokazalo se kako koncentracija mRNA *FTO* polimorfizma rs8050136 nema poveznicu s indeksom tjelesne mase (Klötting i sur., 2008).

Pronađena je poveznica između SNP-ova rs1293392, rs1125338, rs12599672, rs12600192 i rs16953002, a koji su locirani izvan regije introna 1 gena *FTO* povezane sa debljinom, s povećanim rizikom nastanka melanoma (Li i sur., 2013). Gen *FTO* je povezivan s različitim ljudskim tumorima u pojedinačnim istraživanjima, međutim meta analiza 13 studija nije pokazala povezanost gena *FTO* s rizikom nastanka tumora, osim kod tumora gušterače (Li i sur., 2012).

2.2.4. Jednostruki nukleotidni polimorfizam rs1421085 gena *FTO*

Jednostruki nukleotidni polimorfizam rs1421085 gena *FTO* nalazi se unutar sekvence introna 1, a sadrži dvije varijante alela: rizični alel C i nerizični alel T. Nositelji visokorizičnog genotipa CC imaju $1,7 \times$ povećani rizik za razvoj pretilosti, dok nositelji niskorizičnog genotipa CT imaju $1,3 \times$ povećani rizik za razvoj pretilosti u odnosu na nositelje nerizičnog genotipa TT (SNPedia, 2016). U odjeljcima koji slijede dan je pregled nekoliko radova o jednostrukom nukleotidnom polimorfizmu rs1421085 gena *FTO* počevši od godine njegova otkrića. Broj radova o rs1421085 dovoljno ukazuje na njegovu važnost i aktualnost u znanstvenom svijetu, a najviše se povezuje s pretilošću.

Povezanost rs1421085 s pretilošću prvi je put dokazana u radu Dina i sur. (2007). Znanstvenici su proveli meta analizu koja je pokazala statistički značajno povećanu zastupljenost rizičnog alela C u pretile djece i odraslih osoba na području Europe.

Povezanost rs1421085 s pretilošću istraživana je u radu Price i sur. (2008) provedenom na 583 pretile osobe s vrijednostima BMI većim od 35 kg m^{-2} i 544 osobe kontrolne skupine s normalnim vrijednostima BMI manjim od 25 kg m^{-2} . Rezultati su pokazali jaku povezanost rs1421085 s pretilošću (p -vrijednost $< 10^{-9}$).

U meksičkoj studiji znanstvenici su dokazali povezanost pretilosti 3. stupnja i rs1421085. Također su procjenjivali razinu ekspresije gena *FTO* u adipoznom tkivu pretelih osoba i osoba normalne tjelesne težine. Pokazalo se da je razina mRNA *FTO* značajno viša u subkutanom tkivu pretelih pojedinaca koji su spadali u 3. stupanj pretilosti, nego u mršavih pojedinaca (Villalabos-Compagnon i sur., 2008).

U radu Stutzmann i sur. (2009) dokazana je povezanost rs1421085 s povećanim rizikom od razvoja pretilosti i razlikama u vrijednostima indeksa tjelesne mase. Znanstvenici su anketirali ispitanike o njihovim prehranbenim navikama te je analiza anketa pokazala da nema povezanosti između rizičnog alela C rs1421085 i prehranbenih navika ispitanika.

U radu Wangensteen i sur. (2010) provedeno je jedanaestogodišnje istraživanje utjecaja genotipova CC, CT i TT na debljanje odraslih osoba u norveškoj populaciji. Rezultati su pokazali da su se osobe normalne tjelesne težine u prosjeku udebljale 1,4 kg, dok su se ispitanici skupine pretilih u prosjeku udebljali 11,1 kg. U skupini pretilih, nositelji genotipa CC su se udebljali 11,1 kg, nositelji genotipa CT 11,3 kg, a nositelji genotipa TT 10,7 kg. Rezultati ukazuju da varijante genotipova rs1421085 nemaju poveznicu s dobivanjem dodatne mase ispitanika, ali su generalno povezani s pretilošću.

U japanskoj studiji Hotta i sur. (2011) istraživana je utjecaj 33 jednostruka nukleotidna polimorfizma u 19 gena u 1096 pacijenata s dijagnozom metaboličkog sindroma i 581 osobe koje nisu imale rizik od pojave metaboličkog sindroma. Povezanost s metaboličkim sindromom pronađena je u 4 SNP-a gena *FTO* među kojima i rs1421085.

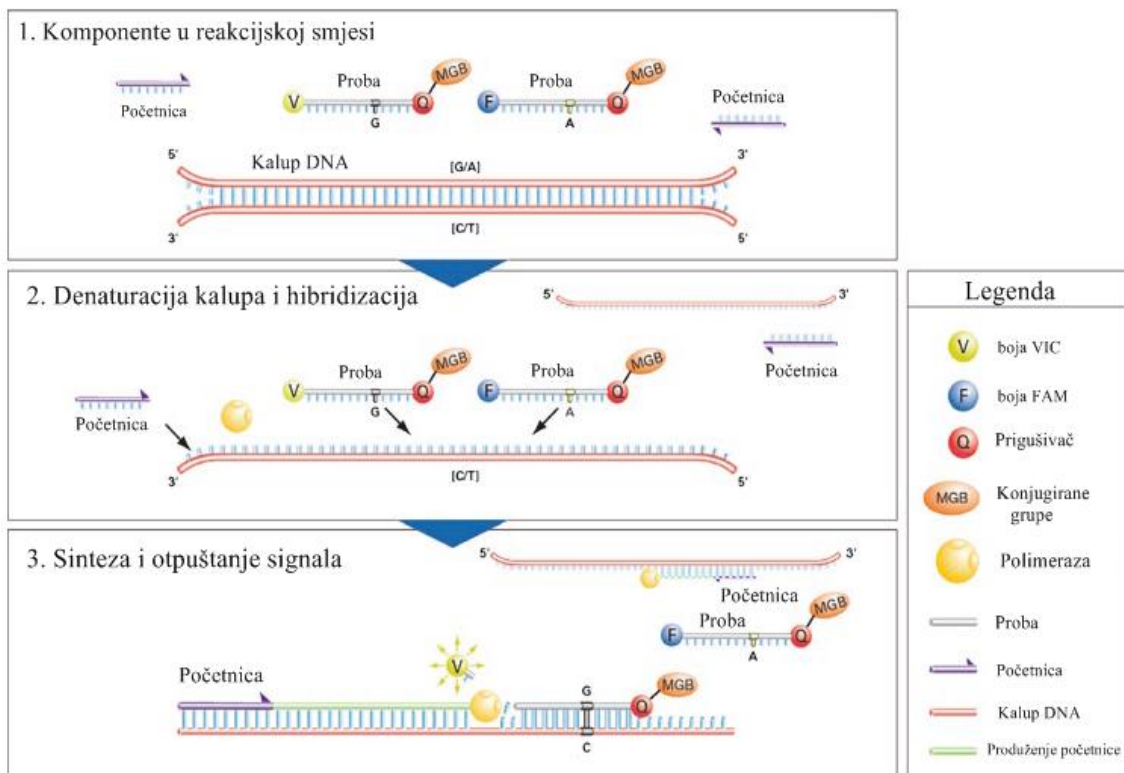
U radu Wojciechowski i sur. (2012) istraživana je utjecaj gena *FTO* na indeks tjelesne mase i težinu u pacijentica s dijagnosticiranim sindromom policističnih jajnika. U studiju je uključeno 2 548 žena od čega 762 su nositeljice genotipa TT, 1 253 genotipa CT i 533 genotipa CC. Rezultati su pokazali da je razlika između pacijentica genotipa TT i CC u porastu prosječne vrijednosti indeksa iznosila 3,3 kg m⁻² odnosno razlika u porastu prosječne tjelesne težine iznosila 9,6 kg. Time je dokazana jaka povezanost između genotipova rs1421085 i vrijednosti indeksa tjelesne mase.

U radu Albuquerque i sur. (2013) tražena je povezanost rs1421085 i vrijednosti indeksa tjelesne mase ili pretilosti u portugalske djece. Pronađena je značajna povezanost rs1421085 s težinom, indeksom tjelesne mase, opsegom struka, opsegom bokova čak i nakon prilagodbe dobi i spolova.

U radu Solak i sur. (2014) istraživana je povezanost polimorfizama gena *FTO* s pretilošću na uzorku 190 pretilih pacijenata (vrijednosti BMI veće od 30 g m⁻²) i 97 ispitanika kontrolne skupine (vrijednosti BMI između 18,5 i 29,9 kg m⁻²). Rezultati istraživanja nisu pokazali povezanost frekvencije genotipova rs1421085 sa pretilošću.

2.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu metoda TaqMan je kvantitativna metoda koja se bazira na lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (*engl.* real time polymerase chain reaction, real time PCR), a pogodna je za razlikovanje alela na mjestu jednostrukih nukleotidnih polimorfizama (*engl.* single nucleotide polymorphism, SNP) koji su prisutni u određenim regijama gena unutar genoma organizma. Detekcija jednostrukih nukleotidnih polimorfizama unutar ljudskog genoma je važna iz razloga što oni direktno ili indirektno doprinose razvoju mnogih monogenских i poligenских bolesti (Schleinitz i sur., 2012). Metoda podrazumijeva upotrebu dvije početnice kako bi se umnožio željeni fragment DNA, kalup, i dvije specifične oligonukleotidne probe obilježene različitim fluorescentnim bojama. Fluorescentna boja se nalazi na 5' kraju oligonukleotidne probe, a na 3' kraju nefluorescentni prigušivač (*engl.* quencher) i konjugirane grupe vezači za manje utore (*engl.* minor groove binder, MGB) u DNA. Probe MGB su bolje u odnosu na standardne nemodificirane probe jer tvore iznimno stabilne komplekse s ispitivanim fragmentima DNA. Konjugirane grupe MGB povećaju temperaturu taljenja probe (*engl.* melting temperature, T_M) što omogućava upotrebu kraćih proba te ujedno povećava specifičnost i olakšava izvođenje metode (Kutyani i sur., 2000). Početnice i probe su komplementarne ispitivanom fragmentu DNA, a nakon denaturacije kalupa DNA, slijedi sinteza novih lanaca DNA koju katalizira polimeraza Taq. Hibridizacija proba i kalupa DNA odvija se paralelno sa sintezom novih lanaca DNA. Ukoliko se proba veže na kalup DNA, zbog 5'-3' egzonukleazne aktivnosti polimeraze Taq, doći će do razgradnje hibridizirane probe i otpuštanja fluorescentnog signala kao posljedica razdvajanja fluorescentne boje od nefluorescentnog prigušivača. Dok je proba nepocijepana, fluorescencijska boja i nefluorescentni prigušivač su veoma blizu, te blizina prigušivača onemogućava otpuštanje fluorescencijske boje što je poznato kao mehanizam prijenosa fluorescentne rezonantne energije (*engl.* fluorescence resonance energy transfer, FRET; Maras i sur., 2002). Ukoliko fluorescencijski signal potječe od jedne boje (npr. VIC), detektiran je jedan alel, ukoliko fluorescencijski signal potječe od druge boje (npr. FAM), detektiran je drugi alel, ako pak su prisutna dva fluorescencijska signala (VIC+FAM), detektirana su oba alela. Fluorescentni signal detektira se laserskom ekscitacijom. Princip metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu za detekciju alela na mjestu jednostrukog nukleotidnog polimorfizma unutar ispitivanog fragmenta DNA prikazan je na slici 2.



Slika 2. Princip metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu TaqMan za detekciju alela na mjestu jednostrukog nukleotidnog polimorfizma unutar ispitivanog fragmenta DNA. 1) Komponente u reakcijskoj smjesi-dvije početnice, dvije probe (na 5' kraju fluorescentna boja, na 3' kraju nefluorescentni prigušivač i konjugirane grupe MGB) i kalup DNA. 2) Denaturacija kalupa DNA i sparivanje početnica na kalup DNA te hibridizacija odgovarajućih proba. 3) Enzim polimeraza katalizira produljivanje početnica, razgradnju komplementarne probe i dolazi do otpuštanja fluorescencijskog signala. Prilagođeno prema Applied Biosystems (2014).

2.4. Mikrobiom usne šupljine

Ljudska slina produkt je izlučivanja žlijezda slinovnica, a njezin se sastav razlikuje od pojedinca do pojedinca. U prosjeku se 99,5 % sline sastoji od vode, dok 0,2 % čine anorganske komponente te 0,3 % organske komponente (Choromanska i sur., 2015).

Usna šupljina sadrži preko 700 različitih bakterijskih vrsta od kojih je otprilike samo 50 % moguće uzgajati u kulturi. Upotreba modernih molekularnih tehnika poput sekvencioniranja 16S rRNA (*engl.* ribosomal RNA, rRNA) omogućava kvalitetniju i pouzdaniju analizu sastava oralne mikrobiote (Belstrøm i sur., 2014).

2.4.1. Povezanost mikrobioma usne šupljine i pretilosti

Istraživanje provedeno na 313 žena s prekomjernom tjelesnom težinom, uzimane ispitanice s vrijednostima BMI između 27 i 32 kg m⁻² te 232 zdrave osobe s normalnom tjelesnom težinom, pokazalo je razlike u sastavu mikrobioma sline između te dvije skupine. U skupini s prekomjernom tjelesnom težinom identificirano je 40 različitih bakterijskih vrsta iz 6 koljena (*lat.* phyla). U uzorku slina žena s prekomjernom tjelesnom težinom zabilježena je razlika veća od 2 % medijana u 7 bakterijskih vrsta u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistički značajno povećanje bakterijskih vrsta u osoba s prekomjernom tjelesnom težinom uključuju: vrstu *Selenomonas noxia* iz koljena *Firmicutes*, dvije vrste *Actinomyces* iz koljena *Actinobacteria* (*A. gerencseriae* i *A. naeshlundii* 2), vrstu *Neisseria mucosa* iz koljena *Proteobacteria*, dvije vrste *Fusobacterium* iz koljena *Fusobacteria* (*F. periodonticum* i *F. nucleatum ss vincentii*) i vrstu *Prevotella melaninogenica* iz koljena *Bacteroidetes* (Goodson i sur., 2009).

Provedeno je istraživanje povezanosti mikrobiote oralnog biofilma s pretilošću kod adolescenata. U istraživanju je sudjelovalo 29 pretilih adolescenata i 58 adolescenata normalne tjelesne težine te prosječne životne dobi 14,7 godina. Dobiveni rezultati pokazuju da je broj bakterijskih stanica značajno veći kod ispitanika skupine pretilih u odnosu na kontrolnu skupinu (p-vrijednost < 0,001). U prosjeku je broj bakterijskih stanica kod pretilih ispitanika trostruko veći u odnosu na kontrolnu skupinu. Izmjerena je značajno viša koncentracija stanica u ispitanika skupine pretilih u 5 (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteroides*, *Proteobacteria* i *Fusobacteria*) od ukupno 6 identificiranih koljena. Razlike nije bilo u koljenu *Spirochaetes*. Bakterije iz koljena *Proteobacteria*, vrste *Campylobacter rectus* i *Neisseria mucosa* zastupljene su u 6 × većoj koncentraciji u ispitanika skupine pretilih nego u ispitanika kontrolne skupine (Zeigler i sur., 2012).

U radu Goodson i sur. (2009) postavljene su tri različite hipoteze koje povezuju potencijalni utjecaj oralnih bakterija na povećani rizik od razvoja pretilosti. U prvoj se hipotezi pretpostavlja da oralne bakterije doprinose boljem metaboličkom iskorištavanju hrane. Prema ovoj teoriji bi čak i malo povećanje unosa broja kalorija, bez promjena u režimu prehrane te tjelovježbe, dovelo do povećanja tjelesne težine. Pretpostavlja se da bi povećanje unosa kalorija za dodatnih 100 kalorija/dan, rezultiralo godišnjim nakupljanjem 4,5 kg tjelesne masti. Iako su ova istraživanja napravljena na mikrobiomu crijeva, ona se mogu reflektirati na oralne bakterije jer većina bakterija u gastrointestinalni trakt dolazi tranzijentnim prolaskom kroz oralnu šupljinu ili se čak prethodno zadržava u oralnoj šupljini. Druga hipoteza sugerira da bi oralne bakterije mogle utjecati na poboljšanje apetita u ljudi što u konačnici rezultira debljanjem. Ova hipoteza nije potkrijepljena rezultatima istraživanja, ali indicira da bakterije stimulacijom apetita u ljudi, došle u njima pogodno okruženje bogato hranjivim tvarima. U trećoj se hipotezi navodi da oralne bakterije reguliraju energetske metabolizam na način da povećavaju nivo faktora nekroze tumora alfa (*engl.* tumor necrosis factor α , TNF α) ili smanjuju razinu adiponektina te time olakšavaju proces razvoja inzulinske rezistencije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Ispitanici

U ovom istraživanju je sudjelovalo 65 žena s područja Zagrebačke županije. Temeljem podataka o visini i težini ispitivanih osoba izračunate su vrijednosti indeksa tjelesne mase (*engl.* body mass index, BMI) koje se dobivaju dijeljenjem mase (kg) s kvadratom visine (m^2). BMI je korišten kao jednostavni antropometrijski pokazatelj u procjeni prekomjerne tjelesne težine i debljine. Kontrolna skupina sastojala se od 19 osoba čije su vrijednosti indeksa tjelesne mase između $18,5 \text{ kg m}^{-2}$ i 25 kg m^{-2} , dok se skupina pretilih sastojala od 46 osoba čija je vrijednost BMI veća od 30 kg m^{-2} . Dobni raspon ispitivanih osoba nalazi se između 21 i 61 godine. Ispitanice su, potpisom informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju, dobrovoljno pristale sudjelovati u istraživanju te su upoznate s njegovim ciljevima, prednostima i eventualnim rizicima. Primjer informiranog pristanka za sudjelovanje zdravih i pretilih ispitanika u istraživanju nalazi se u prilogima 3 i 4. Od ispitanica se očekivalo da iskreno popune priloženu anketu čime je dan uvid u njihove prehrabene navike, zdravstveno stanje te stil života. Za potrebe identifikacije mikrobioma usne šupljine, ispitanice su isprale usta s 15 mL fiziološke otopine te u epruveti skupile 2 mL uzorka sline. Kako bi se utvrdila povezanost pretilosti i odabranog jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 u ljudskom genu *FTO* metodom real-time PCR, ispitanicama je uzeto 2 mL uzorka krvi na Zavodu za endokrinologiju bolnice Interna klinika Rebro, KBC Zagreb. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Analiza mikrobioma usne šupljine

3.2.1. Uzgoj mješovitih kultura

Uzorci sline za naciepljivanje pripremljeni su miješanjem 0,5 mL originalne suspenzije sline sa 4,5 mL fosfatnog pufera (*engl.* phosphate-buffered saline, PBS) čime je dobiveno decimalno razrjeđenje 10^{-1} . Sastav pufera PBS naveden je u tablici 1. 0,1 mL dobivenog decimalnog razrjeđenja 10^{-1} i 0,1 mL originalne suspenzije sline naciepljeno je na kompletnu podlogu MRS (*engl.* De Man, Ragosa and Sharpe, MRS) i kompletnu podlogu LB (*engl.* Luria-Bertani). Podloge su pripremljene prema uputama proizvođača te sterilizirane u autoklavu pri temperaturi $121 \text{ }^\circ\text{C}$ i tlaku od $1,01 \times 10^5 \text{ Pa}$ u trajanju od 15 minuta. Sastav

tekuće podloge MRS naveden je u tablici 2, a sastav tekuće LB podloge u tablici 3. Kruta podloga dobiva se dodatkom 20 g L⁻¹ agara prije početka sterilizacije.

Tablica 1. Sastav fosfatnog pufera (PBS).

SASTOJAK	KOLIČINA
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O	1,15 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Tablica 2. Sastav tekuće podloge MRS.

SASTOJAK	KOLIČINA
Glukoza	20 g
Mesni ekstrakt	10 g
Kvašćev ekstrakt	10 g
Kazein hidrolizat	10 g
Kalijev hidrogenfosfat	5 g
Natrijev acetat	2 g
Amonijev citrat	2 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,05 g
Tween 80	1 mL
Destilirana voda	do 1 000 mL

Tablica 3. Sastav tekuće podloge LB.

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

3.2.2. Izolacija čistih kultura

Nakon što je na krute podloge MRS i LB nacijepljeno 0,1 mL decimalnog razrjeđenja 10⁻¹ i 0,1 mL originalne suspenzije sline, podloge su inkubirane 48 h u termostatu pri temperaturi 37 °C. Između poraslih kolonija odabrane su one koje su se morfološki razlikovale te su precijepljene na nove podloge MRS i LB koristeći standardnu metodu do

iscrpljenja i ponovno inkubirane u termostatu. S podloga s poraslom čistom kulturom, uzeta je jedna kolonija i stavljena u epruvetu s 3 mL tekuće podloge MRS ili LB. Aerobni uzgoj je proveden pri 100 o min^{-1} tijekom 24 h pri temperaturi $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Uzgojene prekonoćne kulture centrifugirane su u Eppendorf kivetama pri $4\,000 \times g$, a supernatanti s tekućim podlogama su bačeni. Talози biomase resuspendirani su u 1 mL 50%-tnog glicerola i pohranjeni na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ kao čiste kulture.

3.2.3. Identifikacija čistih kultura

Identifikacija čistih kultura vršena je direktnom analizom tako da stanice mikroorganizama nije potrebno prethodno razoriti. Uporabom sterilne čačkalice uzeta je odabrana kolonija od svake čiste kulture i nanescna na pločicu MALDI (*engl.* matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) te je dodan 1 μL mravlje kiseline. Nakon sušenja, uzorcima je dodan 1 μL otopine matrice α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50 % acetonitrila i 2,5 % trifluoroctene kiseline. Pločica MALDI s pripremljenim uzorcima stavljena je u spektrometar masa MALDI-TOF Microflex LT. Za snimanje biološkog materijala korišten je računalni program MALDI Biotyper 3.0. Rezultat snimanja biološkog materijala su karakteristični spektri masa proteina za svaki mikroorganizam. Dobiveni spektri masa proteina za pojedini mikroorganizam uspoređuju se s referentnim spektrima pohranjenim u bazi podataka. Između eksperimentalno dobivenih spektara i referentnih spektara u bazi podataka izračuna se korištenjem algoritma korelacija pa se rezultati prikazuju u obliku logaritamskih vrijednosti (*engl.* score value) koje mogu biti u rasponu 0 - 3,000. Prema uputama proizvođača, vrijednosti jednake ili veće od 2,000 pokazuju sigurnu identifikaciju vrste, vrijednosti od 1,700 do 1,999 pokazuju identifikaciju na razini roda, a za vrijednosti ispod 1,700 identifikacija nije pouzdana.

3.2.4. Laboratorijska oprema za analizu mikrobioma usne šupljine

Pribor:

- Aluminijska folija
- Automatske pipete (20, 200, 1000 μL)
- Erlenmeyerove tikvice različitih volumena
- Eppendorf kivete različitih volumena
- Laboratorijske žlice
- MALDI pločica, *Applied Biosystems*, SAD

- Markeri za pisanje
- Papir za vaganje i zamatanje čepova
- Pipete volumena 10 mL
- Pipetni nastavci
- Plastične Petrijeve zdjelice
- Propipete
- Staklene boce
- Staklene čaše
- Staklene epruvete
- Staklene i plastične menzure različitih volumena
- Sterilne čačkalice
- Vata za pravljenje čepova

Aparature:

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

Kemikalije:

- α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina (CHCA), *Sigma*, SAD
- Acetonitril (ACN), LC-MS čistoće, *Fisher Chemicals*, Švicarska
- Agar, *Kemika*, Hrvatska
- Bakto-tripton, *Kemika*, Hrvatska
- Glicerol, *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), *Kemika*, Hrvatska
- Kalijev klorid (KCl), *Kemika*, Hrvatska
- Kvaščev ekstrakt, *Kemika*, Hrvatska
- Man, Rogosa i Sharpe kruta hranjiva podloga (MRS), *Biolife*, Velika Britanija

- Man, Rogosa i Sharpe tekuća hranjiva podloga (MRS), *Biolife*, Velika Britanija
- Mravlja kiseina, *Fluka*, SAD
- Natrijev klorid (NaCl), *Kemika*, Hrvatska
- Natrijev hidrogenfosfat (Na₂HPO₄), *Kemika*, Hrvatska
- Trifluorocetna kiselina (TFA), *Sigma Aldrich*, Hrvatska
- Voda, LC-MS čistoće, *Fisher Chemicals*, Švicarska

3.3. Analiza jednostrukog nukleotidnog polimorfizma

3.3.1. Izolacija DNA iz krvi

Uzorci 2 ml pune krvi ispitivanih osoba sakupljeni su u epruvete, dodan je antikoagulans etilendiamintetraoctena kiselina (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) te su tako pripremljeni uzorci pohranjeni na -20 °C do postupka izolacije DNA.

Za izolaciju genomske DNA iz krvi korišten je komercijalni komplet DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) prema uputama proizvođača. U sterilne Eppendorf kivete dodano je 96 µL pufera PBS (pH=7,4), 20 µL proteinaze K, 4 µL RNaze A koncentracije 100 mg mL⁻¹ i 100 µL uzorka krvi ispitanica. Sadržaj kiveta inkubiran je 2 minute pri sobnoj temperaturi. Potom je u kivete dodano 200 µL pufera za lizu bez etanola AL¹ te su inkubirane u termobloku 10 minuta pri 56 °C. Nakon inkubacije, dodano je 200 µL 96 %-tnog etanola i kivete su vorteksirane. Sav sadržaj kiveta prebačen je u DNeasy Mini spin kolonice koje se nalaze u kolekcijskim kivetama volumena 2 mL i centrifugiran 1 minutu pri 6 000 × g. Suspenzija, koja je prošla kroz kolonicu i skupila se u kolekcijskim kivetama, je bačena, a DNeasy Mini spin kolonice su prebačene u nove kolekcijske kivete. Dodano je 500 µL pufera AW1¹ i centrifugirano pri 6 000 × g. Ponavlja se postupak s odbacivanjem kolekcijske kivete u kojoj se skupila suspenzija koja je prošla kroz kolonicu te kolonice stavljamo u nove kolekcijske kivete. Dodano je 500 µL pufera AW2¹ i centrifugirano 3 minute pri 20 000 × g. Ovaj korak osigurava sušenje kolonice i ispiranje zaostalog etanola kako ne bi interferirao u daljnjim reakcijama. Zatim su kolonice prebačene u Eppendorf kivete. Direktno iznad membrane u kolonici stavljeno je 200 µL pufera AE¹, inkubirano 1 minutu pri sobnoj temperaturi i centrifugirano 1 minutu pri 6 000 × g. DNA je eluirana u Eppendorf kivete koje su sačuvane za daljnje postupke analize jednostrukog nukleotidnog polimorfizma, a DNeasy Mini spin kolonice su odbačene.

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

3.3.2. Provjera koncentracije i kvalitete izolirane DNA iz krvi

Vrijednosti koncentracija DNA u μL^{-1} te omjeri A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} , kao pokazatelji kvalitete izolirane DNA, izmjereni su spektrofotometrijski (NanoPhotometer® N60, IMPLEN) korištenjem 1,5 μL uzorka eluirane DNA.

Dodatna provjera čistoće izolirane DNA provedena je metodom horizontalne gel elektroforeze na 1 %-tnom agaroznom gelu (Electrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Biosciences). Agarozni gel pripremljen je u tikvici dodatkom 0,5 g agaroze i 50 mL 1 \times koncentriranog pufera Tris-acetat-EDTA (TAE). Sastav 50 \times koncentriranog pufera TAE naveden je u tablici 4. Sadržaj tikvice otopljen je u mikrovalnoj pećnici, potom je ohlađen i dodano je 2,25 μL etidij bromida. Pripremljeni agarozni gel uliven je u kalup za horizontalnu gel elektroforezu, a njegov sastav je naveden u tablici 5. 3 mL pojedinog eluiranog uzorka pomiješano je na parafilmu s bojom bromfenol plavo, a kao marker molekularne mase korišten je 1 kB DNA quick Ladder koncentracije 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (BioLabs). Naposljetku su uzorci nanijeti u jažice gela i provedena je gel elektroforeza.

Tablica 4. Sastav 50 \times koncentriranog Tris-acetat-EDTA pufera (TAE).

SASTOJAK	KOLIČINA
Tris baza	242 g
Octena kiselina	57,1 mL
Prah kompleksa III	18,6 g
Destilirana voda	do 1000 mL

Tablica 5. Sastav 1 %-tnog agaroznog gela.

SASTOJAK	KOLIČINA
Agaroz	0,5 g
1 \times koncentrirani pufer TAE	50 mL
Etidij bromid	2,25 μL

3.3.3. Genotipizacija metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Na mjestu odabranog jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* mogu se pojaviti dušične baze citozin (C) ili timin (T). Kod ispitanica se očekuje pojava genotipova CC, CT ili TT. Kako bi se utvrdilo o kojem se genotipu radi, provedena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu i detekcija nastalih fragmenata metodom alelne diskriminacije. Za genotipizaciju je korišten komplet *TaqMan*® SNP Genotyping

Assay C__8917103_10 koji sadrži dvije visoko komplementarne probe obilježene različitim fluorescentnim bojama za detekciju alela (alel C obilježen je probom VIC, a alel T probom FAM) i dvije početnice za amplifikaciju željenog fragmenta gena *FTO* (izvor: <http://www.thermofisher.com/>). Svaka proba sastoji se od jedne fluorescentne boje koja se nalazi na 5' kraju, prigušivača (*engl.* quencher) koji se nalazi na 3' kraju i grupa MGB (*engl.* minor groove binder, MBG) koje stabiliziraju komplekse kalupa DNA i proba. Praćenje reakcije u realnom vremenu temelji se na komplementarnom sparivanju početnica i probe na kalup DNA od interesa. Par početnica koristi se za amplifikaciju fragmenata kalupa DNA koju provodi DNA polimeraza. 5' egzonukleazna aktivnost DNA polimeraze omogućava cijepanje sparene probe čime dolazi do razdvajanja fluorescentne boje i prigušivača te oslobađanja fluorescentnog signala koji se potom detektira. Ukoliko se proba komplementarno ne spari na kalup DNA, ne dolazi do otpuštanja fluorescentnog signala. Ukoliko je fluorescentni signal posljedica cijepanja probe VIC, radi se o homozigotu CC. U slučaju da je fluorescentni signal posljedica cijepanja probe FAM, radi se o homozigotu TT. Ukoliko su prisutni signali proba VIC i FAM radi se o heterozigotu CT. Metoda se može sumirati na nekoliko osnovnih koraka: denaturacija DNA i sparivanje početnica, hibridizacija probe i amplifikacija fragmenata DNA.

Priprema uzoraka za metodu lančane reakcije u stvarnom vremenu sastojala se od podešavanja koncentracije DNA na $0,88 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Početnih $200 \mu\text{L}$ eluata DNA upareno je na $50 \mu\text{L}$ korištenjem uređaja SpeedVac Concentrator, Thermo Electron Corporation. Zatim je izmjerena koncentracija DNA, razrijeđena na 7, 14 ili $42 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, ponovo je tri puta izmjerena koncentracija i izračunata srednja vrijednost. Tako dobiven koncentrirani eluat DNA korišten je za pripremu 70 mL otopine DNA i Mili-Q vode koncentracije $0,88 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Svaka reakcijska smjesa sastojala se od $11,25 \mu\text{L}$ otopine DNA, $12,5 \mu\text{L}$ $2 \times$ koncentriranog TaqMan® Genotyping Master Mix-a (Applied Biosystems) i $1,25 \mu\text{L}$ $20 \times$ koncentriranog TaqMan® Genotyping Assay-a (Applied Biosystems). Genotyping Assay dolazi u $40 \times$ koncentriranom obliku koji je potrebno razrijediti na $20 \times$ radnu koncentraciju sa puferom $1 \times$ TE (QIAGEN). Osim toga, Genotyping Assay je osjetljiv na svjetlo te ga treba čuvati u tami i na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ kako se ne bi izgubila njegova aktivnost tijekom stajanja. Potom je sadržaj reakcijskih smjesa, koji se nalazio u optičkim kivetima, promiješan pomoću mikropipete i kratko centrifugiran kako bi se izbjegla pojava mjehurića koji bi predstavljali smetnje pri očitavanju rezultata. Optičke kivete su potom poslagane na predviđeno mjesto u uređaju 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems). Uvjeti potrebni za provođenje reakcije su

navedeni u tablici 6, a upisani su preko računalnog programa 7300 System SDS Software 1.4. koji se koristio potom i za obradu dobivenih podataka.

Tablica 6. Uvjeti lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

FAZA	TEMPERATURA	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
Aktivacija enzima	95 °C	10 min	1
Denaturacija	95 °C	15 s	40
Hibridizacija početnica/ produljivanje DNA	60 °C	1 min	

3.4. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu podataka prikupljenih iz anketnih upitnika i rezultata dobivenih identifikacijom mikroorganizama iz sline korišten je Fisherov egzaktni test (test usporedbe varijanci dviju normalno distribuiranih populacija) dostupan putem interneta (izvor: <http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>) i Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD). Kod primjene Fisherovog egzaktnog testa statistički značajnima smatraju se p-vrijednosti $< 0,05$.

Učestalost pojedinog alela i genotipa u kontrolnoj skupini i skupini pretilih osoba te Hardy-Weinbergova distribucija (značajnost odstupanja distribucije genotipova od očekivanja) određena je X^2 -testom pomoću statističkih računalnih programa dostupnih putem interneta (izvor: <http://www.oege.org>, <http://www.had2know.com>).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom diplomskom radu istraživana je povezanost jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 ljudskog gena *FTO* s indeksom tjelesne mase (*engl.* body mass indeks, BMI) i mikrobiomom usne šupljine. Izolirane su čiste kulture mikroorganizama i identificirane metodom spektrometrije mase. Kao značajan rezultat uzimana je log vrijednost veća od 2,000, ukoliko je izmjerena log vrijednost manja od 2,000 ponavljan je postupak pročišćavanja određene kulture i ponovo vršeno mjerenje. Rezultati analize mikrobioma usne šupljine prikazani su pomoću tablica i grafičkih prikaza. Genotipizacija jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* vršena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Rezultati su prikazani pomoću tablica sa statističkim parametrima p-vrijednostima i X^2 vrijednostima te pomoću grafičkih prikaza: alelne diskriminacije obje ispitivane skupine, udjela genotipova CC, CT i TT u ispitanica kontrolne skupine i skupine pretilih te raspodjele alela C i T u kontrolnoj skupini i skupini pretilih. Mjerenje se ponavlja ukoliko iz amplifikacijske krivulje nije jasan genotip ispitivane osobe. Naposljetku su statistički obrađivani anketni upitnici koje je ispunjavalo 65 dobrovoljnih ženskih osoba s područja Zagrebačke županije. U statističkoj obradi podataka korišten je Microsoft Excel i Fisherov egzaktni test dostupan putem interneta. Podaci statističke obrade anketnih upitnika prikazani su pomoću tablica s danim vrijednostima standardnih devijacija i statističkim parametrima p-vrijednostima.

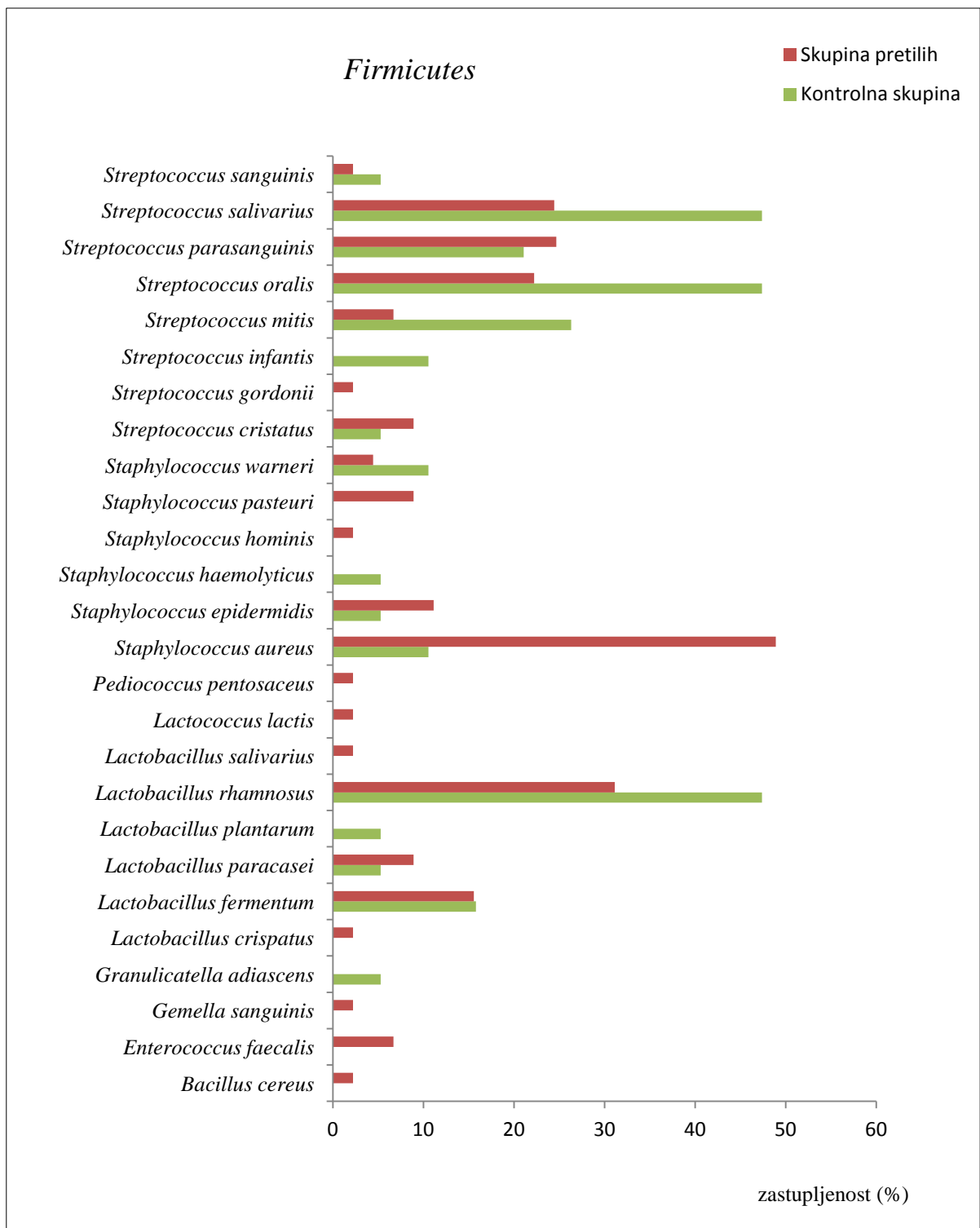
4.1. Rezultati identifikacije mikroorganizama iz uzoraka sline

Korištenjem standardnih mikrobioloških postupaka, iz uzoraka sline ispitanica kontrolne skupine i skupine pretilih, izolirane su čiste kulture mikroorganizama koje su potom identificirane analitičkom metodom spektrometrije masa. Na temelju analize identificiranih mikroorganizama obje skupine zabilježeno je ukupno 50 različitih vrsta uglavnom iz carstva *Bacteria*, a neke i iz carstva *Fungi*. Uočeno je da od 50 različitih vrsta 21 vrsta je zajednička za kontrolnu skupinu i skupinu pretilih (42 % svih vrsta). U kontrolnoj skupini pojavljuje se 9 vrsta koje nisu izolirane i identificirane u skupini pretilih (18 % svih vrsta), a u skupini pretilih se pojavljuje 20 vrsta koje nisu izolirane i identificirane u kontrolnoj skupini (40 % svih vrsta). Identificirane vrste razvrstane su u pripadajuća koljena radi lakšeg prikaza podataka. Dakle, u kontrolnoj skupini zabilježeno je 30 različitih vrsta od čega 16 vrsta iz koljena *Firmicutes* (53,33 %), 7 vrsta iz koljena *Proteobacteria* (23,33 %), 5 vrsta iz koljena

Actinobacteria (16,67 %) i 2 vrste iz koljena *Ascomycota* (6,67 %). U skupini pretelih zabilježene su 42 različite vrste od čega 22 vrste iz koljena *Firmicutes* (52,38 %), 7 vrsta iz koljena *Proteobacteria* (16,67 %), 6 vrsta iz koljena *Actinobacteria* (14,29 %) i 10 vrsta iz koljena *Ascomycota* (23,81 %). Nisu pronađene statistički značajne razlike u zastupljenosti pojedinih koljena mikroorganizama između kontrolne skupine i skupine pretelih. U tablicama 7, 8, 9 i 10 navedena su imena pojedinačnih vrsta mikroorganizama izoliranih iz uzoraka slina ispitanica, a spadaju u koljena *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Ascomycota* uz istaknuti broj osoba u čijem je slinama detektirana pojedina vrsta mikroorganizama te izračunati postotak zastupljenosti pojedinačnih vrsta mikroorganizama u kontrolnoj skupini i skupini pretelih te su prikazane još p-vrijednosti za svaki mikroorganizam. Statistički značajne vrijednosti smatraju se manje od 0,1 obzirom da se radi o preliminarnom istraživanju. Utvrđeno je da se u skupini pretelih statistički značajno češće pojavljuje vrsta *Staphylococcus aureus* (p-vrijednost jednaka 0,0044), dok se u kontrolnoj skupini statistički značajno češće pojavljuju vrste *Streptococcus infantis* (p-vrijednost jednaka 0,0849), *Streptococcus mitis* (p-vrijednost jednaka 0,0439), *Streptococcus oralis* (p-vrijednost jednaka 0,0843) i *Streptococcus salivarius* (p-vrijednost jednaka 0,0843) te *Serratia ureilytica* (p-vrijednost jednaka 0,0061). Na slikama 3, 4, 5 i 6 prikazana je usporedba postotka zastupljenosti pojedinih vrsta mikroorganizama iz koljena *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Ascomycota* između kontrolne skupine i skupine pretelih.

Tablica 7. Prikaz broja i postotka zastupljenosti bakterija iz koljena *Firmicutes* izoliranih iz uzorka sline ispitanica u kontrolnoj skupini i skupini pretelih uz istaknute parametre p-vrijednosti (p-vrijednosti koje su podebljane predstavljaju pronađenu statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine pretelih).

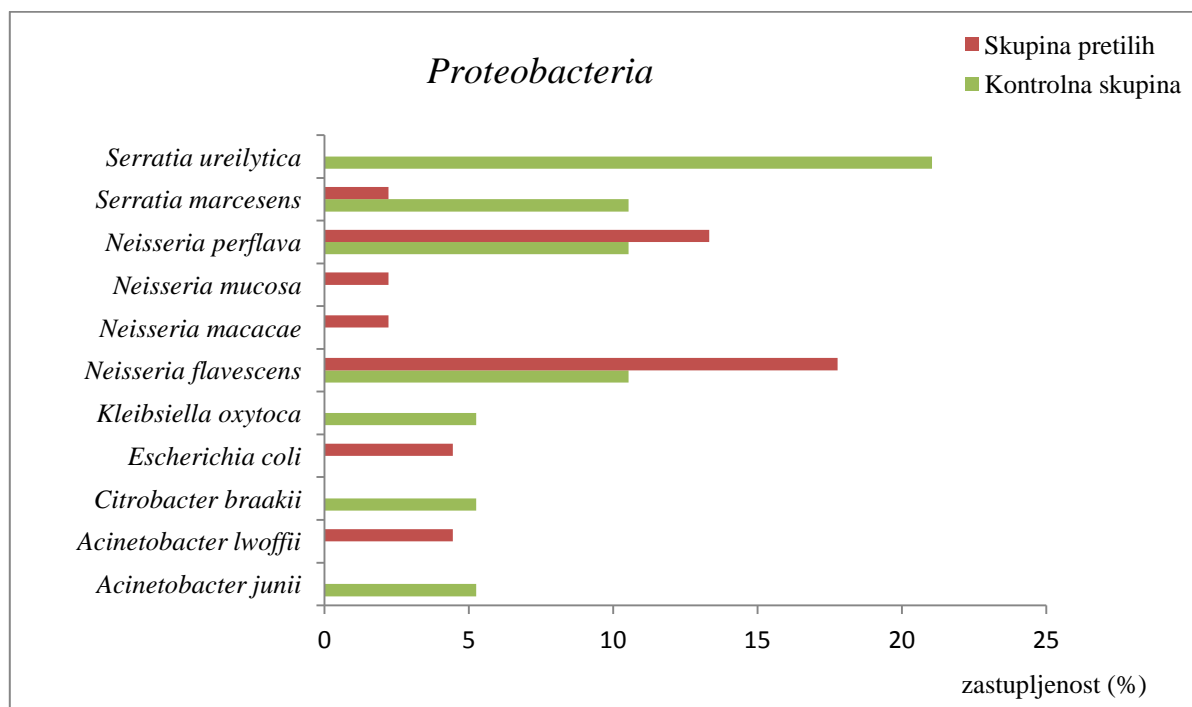
<i>Firmicutes</i>	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH	%	p-vrijednost
<i>Bacillus cereus</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0,00	3	6,67	0,5474
<i>Gemella sanguinis</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Granulicatella adiacens</i>	1	5,26	0	0,00	0,2696
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Lactobacillus fermentum</i>	3	15,79	7	15,56	1,0000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	5,26	4	8,89	1,0000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	5,26	0	0,00	0,2696
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9	47,37	14	31,11	0,2603
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	10,53	22	48,89	0,0044
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	5,26	5	11,11	0,6602
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	5,26	0	0,00	0,2969
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0	0,00	4	8,89	0,3092
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	10,53	2	4,44	0,5757
<i>Streptococcus cristatus</i>	1	5,26	4	8,89	1,0000
<i>Streptococcus gordonii</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Streptococcus infantis</i>	2	10,53	0	0,00	0,0849
<i>Streptococcus mitis</i>	5	26,32	3	6,67	0,0439
<i>Streptococcus oralis</i>	9	47,37	10	22,22	0,0843
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	4	21,05	12	24,67	0,7584
<i>Streptococcus salivarius</i>	9	47,37	11	24,44	0,0843
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	5,26	1	2,22	0,5089



Slika 3. Prikaz usporedbe postotka zastupljenosti pojedinih bakterija iz koljena *Firmicutes* u ispitanica kontrolne skupine i skupine pretilih.

Tablica 8. Prikaz zastupljenosti bakterija iz koljena *Proteobacteria* izoliranih iz uzoraka sline ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih uz izračunati parametar p-vrijednost (p-vrijednost koja je podebljana predstavlja pronađenu statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine pretilih).

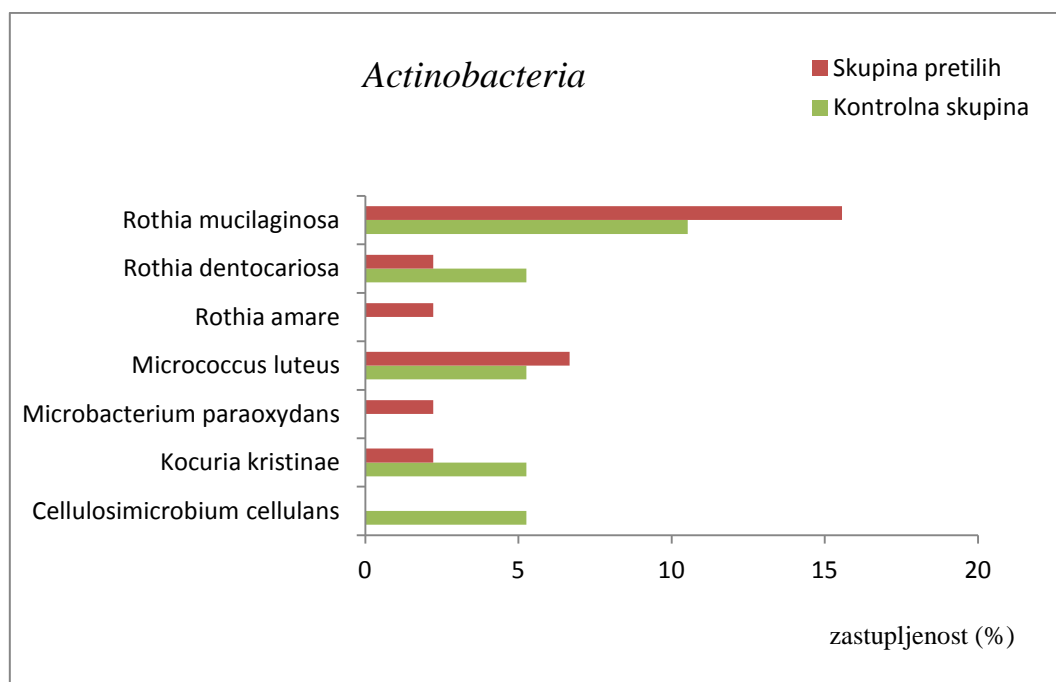
<i>Proteobacteria</i>	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH	%	P-vrijednost
<i>Acinetobacter junii</i>	1	5,26	0	0,00	0,2969
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	0,00	2	4,44	1,0000
<i>Citrobacter braakii</i>	1	5,26	0	0,00	0,2969
<i>Escherichia coli</i>	0	0,00	2	4,44	1,0000
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	5,26	0	0,00	0,2969
<i>Neisseria flavescens</i>	2	10,53	8	17,78	0,7097
<i>Neisseria macacae</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Neisseria mucosa</i>	0	0,00	2	4,44	1,0000
<i>Neisseria perflava</i>	2	10,53	6	13,33	1,0000
<i>Serratia marcescens</i>	2	10,53	1	2,22	0,2079
<i>Serratia ureilytica</i>	4	21,05	0	0,00	0,0061



Slika 4. Prikaz usporedbe postotka zastupljenosti pojedinih bakterija iz koljena *Proteobacteria* u ispitanica kontrolne skupine i skupine pretilih.

Tablica 9. Prikaz zastupljenosti bakterija iz koljena *Actinobacteria* izoliranih iz uzorka sline ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih uz istaknuti parametar p-vrijednost.

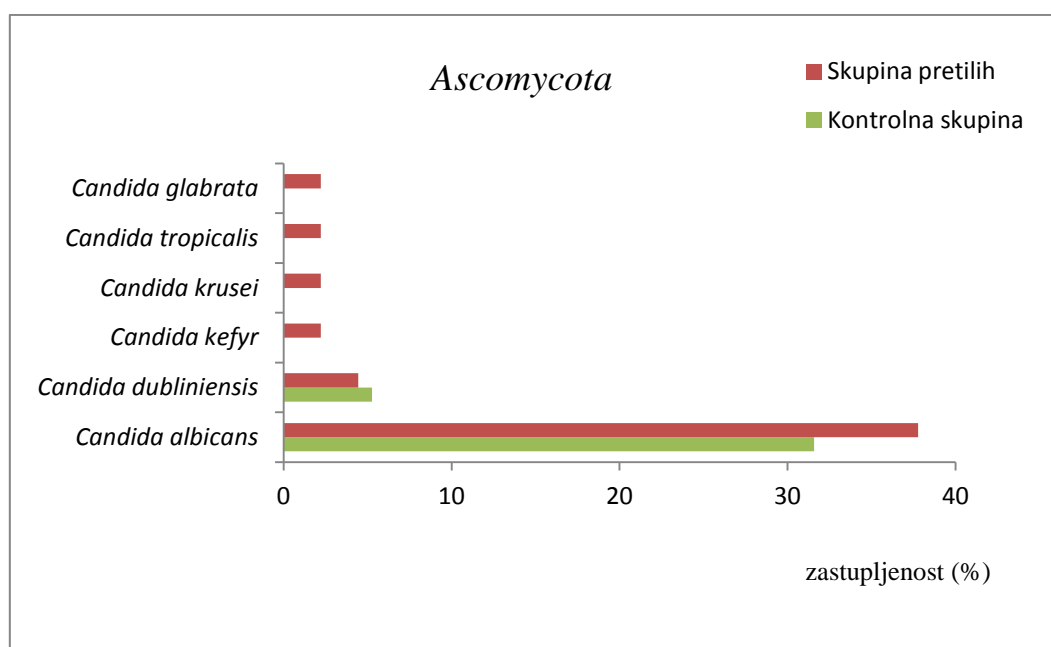
<i>Actinobacteria</i>	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH	%	p-vrijednost
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	1	5,26	0	0,00	0,2969
<i>Kocuria kristinae</i>	1	5,26	1	2,22	0,5089
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Micrococcus luteus</i>	1	5,26	3	6,67	1,0000
<i>Rothia amarae</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Rothia dentocariosa</i>	1	5,26	1	2,22	0,5089
<i>Rothia mucilaginosa</i>	2	10,53	7	15,56	0,7134



Slika 5. Prikaz usporedbe postotka zastupljenosti pojedinih bakterija iz koljena *Actinobacteria* u ispitanica kontrolne skupine i skupine pretilih.

Tablica 10. Prikaz zastupljenosti bakterija iz koljena *Ascomycota* izoliranih iz uzorka sline ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih uz istaknuti parametar p-vrijednost.

<i>Ascomycota</i>	KONTROLNA SKUPINA	%	SKUPINA PRETILIH	%	p-vrijednost
<i>Candida albicans</i>	6	31,58	17	37,78	0,7779
<i>Candida dubliniensis</i>	1	5,26	2	4,44	1,0000
<i>Candida kefyr</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Candida krusei</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Candida tropicalis</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000
<i>Candida glabrata</i>	0	0,00	1	2,22	1,0000



Slika 6. Prikaz usporedbe postotka zastupljenosti pojedinih bakterija iz koljena *Ascomycota* u ispitanica kontrolne skupine i skupine pretilih.

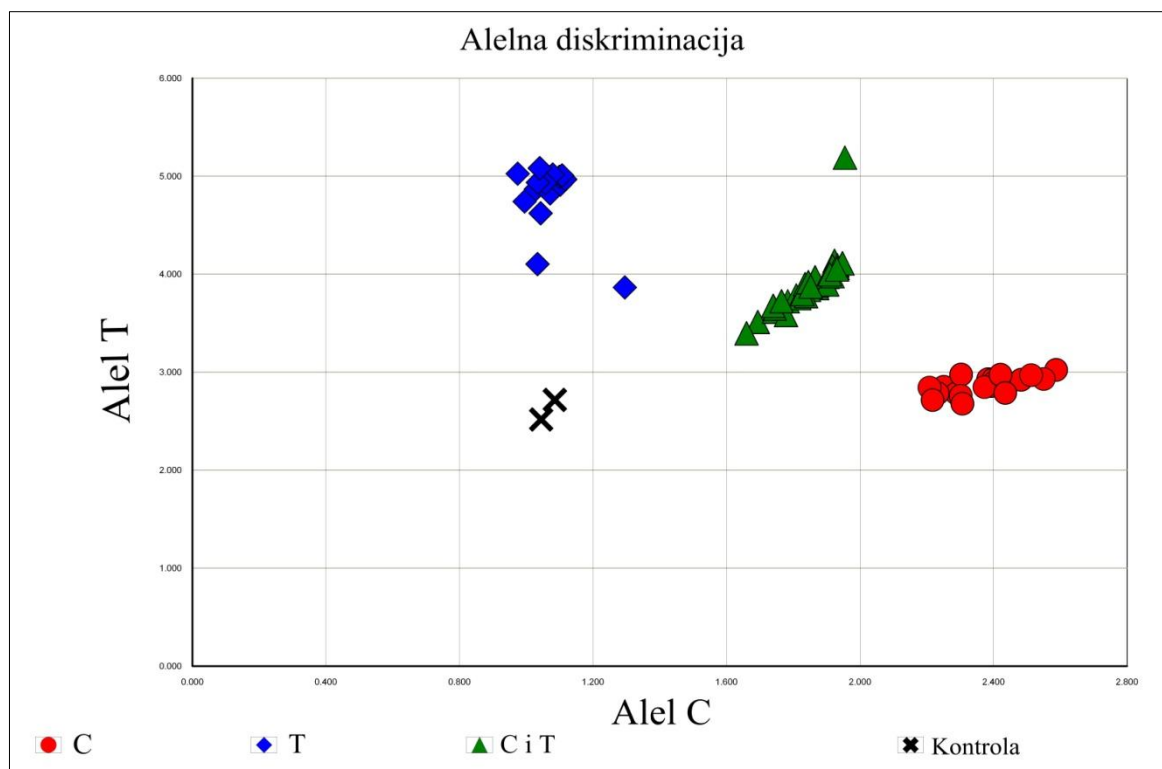
U radu Piombino i sur. (2014) istaknuto je da se mikrobna kompozicija sline razlikuje u pretilih ispitanika i ispitanika normalne tjelesne težine. Na temelju sekvencioniranja regije 16S rRNA V4 utvrđeno je da su u uzorcima sline pretilih ispitanika zastupljenije bakterije iz koljena *Firmicutes* i *Actinobacteria*, dok su bakterijske vrste iz koljena *Proteobacteria* i *Fusobacteria* dominantne u ispitanika normalne težine. Obzirom da dosad nije zabilježeno puno radova o mikrobiomu sline, spomenuti rad je uziman kao osnova. U ovom istraživanju

je detektirano kako je zastupljenost bakterijske vrste *Serratia ureilytica* ($p=0,0061$) iz koljena *Proteobacteria* statistički značajno veća u ispitanika normalne težine što je u skladu s literaturom, a rezultat je prikazan u tablici 8. U skupini pretilih opažena je statistički značajno učestalija pojava bakterijske vrste *Staphylococcus aureus* ($p=0,0044$) iz koljena *Firmicutes* što se također slaže s literaturom, a rezultat je prikazan u tablici 7. *Staphylococcus aureus* spada u komenzalne bakterije koje kod ljudi koloniziraju kožu i mukozne površine te prirodno obitavaju u nosnoj šupljini. Pozitivna korelacija između pretilosti i kolonizacije nosa ili grla sa *Staphylococcus aureus* dokazana je u brojnim studijama između njih se ističe novija studija provedena na zatvorenicima u strogo čuvanim zatvorima države New York. Zanimljiva činjenica da je povezanost indeksa tjelesne mase i kolonizacije sa *Staphylococcus aureus* opažena na ispitivanim ženama zatvorenicama, ali ne i na muškarcima (Befus i sur., 2015). Povezanost indeksa tjelesne mase i kolonizacije nosa sa *Staphylococcus aureus* dokazana je i u norveškoj studiji provedenoj na 3 878 žena i muškaraca raspona dobi 30-87 godina. Rezultati su pokazali povezanost indeksa tjelesne mase i kolonizacije *Staphylococcus aureus* samo u žena koje se nalaze u razdoblju premenopauze (Olesen i sur., 2013). Rezultati analize mikrobioma usne šupljine ovog istraživanja također su pokazali da se u kontrolnoj skupini statistički značajno učestalije pojavljuju bakterijske vrste iz roda *Streptococcus*, a radi se o vrstama *S. infantis* ($p=0,0849$), *S. mitis* ($p=0,0439$), *S. oralis* ($p=0,0843$) i *S. salivarius* ($p=0,0843$) iz koljena *Firmicutes* što je prikazano u tablici 7. Taj se podatak ne slaže s literaturom, obzirom da su vrste iz koljena *Firmicutes* općenito zastupljenije u slini pretilih osoba, no nije poznato kakav je odnos zastupljenosti pojedinačnih bakterija iz koljena *Firmicutes* između dvije promatrane skupine. U radu Goodson i sur. (2009) navodi se kako je zastupljenost bakterijskih vrsta *Streptococcus oralis* i *Streptococcus mitis* veća u osoba s većim vrijednostima indeksa BMI što potvrđuje činjenicu da su te vrste zastupljenije u pretilih osoba. Nisu pronađeni odgovarajući literaturni podaci za vrste *Streptococcus infantis* i *Streptococcus salivarius*. Nisu pronađene statistički značajne razlike između skupine pretilih i kontrolne skupine u bakterijskim vrstama iz koljena *Actinobacteria* što je prikazano u tablici 9. U literaturi se navodi da je zastupljenost vrsta iz koljena *Actinobacteria* veća u pretilih ispitanika (Piombino i sur., 2014). Također, nisu pronađene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i skupine pretilih u vrstama iz koljena *Ascomycota*, carstvo *Fungi* što je prikazano u tablici 10 te nisu pronađeni podaci za usporedbu rezultata. Vodeći računa o malom broju žena koje su sudjelovale u istraživanju, dobivene rezultate trebalo bi dodatno provjeriti i potvrditi na većem broju ispitanika te uz kvalitetnije molekularne metode analize mikrobioma usne šupljine, potencijalno tehnikom sekvencioniranja.

4.2. Rezultati genotipizacije metodom lančane reakcije polimerazom

Genotipizacija jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod 65 dobrovoljnih ispitanica provedena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Za detekciju pojedinog alela C ili T na mjestu jednostrukog nukleotidnog polimorfizma korištene su dvije fluorescentne probe VIC i FAM. Ukoliko detektirani signal u uzorku potječe od cijepanja probe VIC, radi se o visokorizičnom genotipu CC. Ukoliko detektirani signal u uzorku potječe od probe FAM, radi se o nerizičnom genotipu TT. U slučaju da detektirani signal potječe od obje probe VIC i FAM, radi se o niskorizičnom genotipu CT. Na slici 7 dan je grafički prikaz alelne diskriminacije jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica koja je dobivena računalnom obradom pomoću programa 7300 System SDS Software 1.4.

Distribucija eksperimentalno određenih genotipova: visokorizičnog CC, niskorizičnog CT i nerizičnog TT unutar kontrolne skupine i skupine pretilih ne odstupa od Hardy-Weinbergove ravnoteže obzirom da su p-vrijednosti u obje populacije veće od 0,05. Raspodjela genotipova CC, CT i TT jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih te vrijednosti statističkih parametara χ^2 vrijednost i p-vrijednost prikazane su u tablici 11. Na slici 8 prikazana je raspodjela postotka pojave pojedinih genotipova CC, CT ili TT kod ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih. Zastupljenost visokorizičnog genotipa CC u skupini pretilih iznosi 39,13 %, dok u kontrolnoj skupini iznosi 10,53 %. Prema Fisherovom egzaktnom testu, statistički je značajna povećana zastupljenost visokorizičnog genotipa CC u skupini pretilih što je potvrđuje dobivena p-vrijednost jednaka 0,0367. Zastupljenost niskorizičnog genotipa CT u skupini pretilih iznosi 41,30 %, dok u kontrolnoj skupini 63,16 %. Ovakva distribucija genotipa CT nema statistički važnu vrijednost prema Fisherovom egzaktnom testu obzirom da je p-vrijednost jednaka 0,1717. Zastupljenost normalnog genotipa TT u skupini pretilih iznosi 19,57 %, dok u kontrolnoj skupini 26,31 %. Neznatno veća zastupljenost nerizičnog genotipa TT u kontrolnoj skupini nije se pokazala kao statistički značajna na što prema Fisherovom egzaktnom testu ukazuje p-vrijednost jednaka 0,0820. Slika 9 prikazuje raspodjelu postotka pojave alela C i T jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih. Prema Fisherovom egzaktnom testu, nije pokazana statistički veća zastupljenost alela C u skupini pretilih niti statistički veća zastupljenost alela T u kontrolnoj skupini jer je izračunata p-vrijednost jednaka 0,0820.

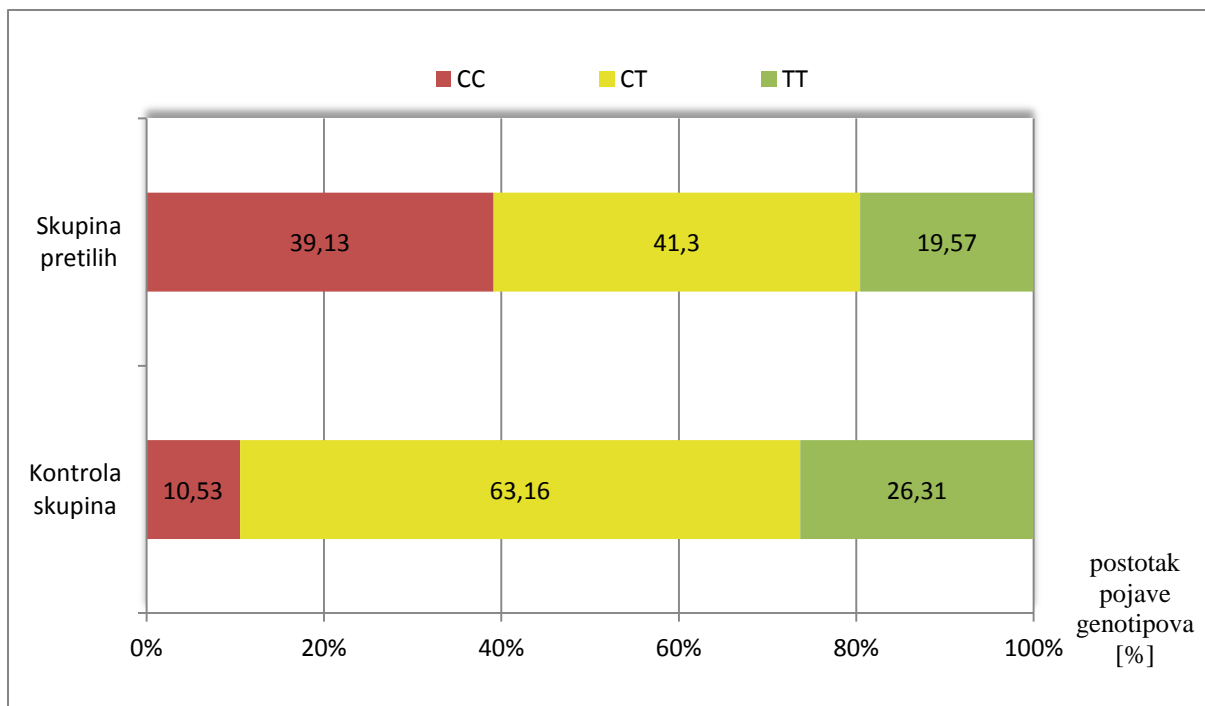


Slika 7. Alelna diskriminacija jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Crveni kružići označavaju genotip CC, plavi kvadratići genotip TT, zeleni trokutići genotip CT, a x kontrolu.

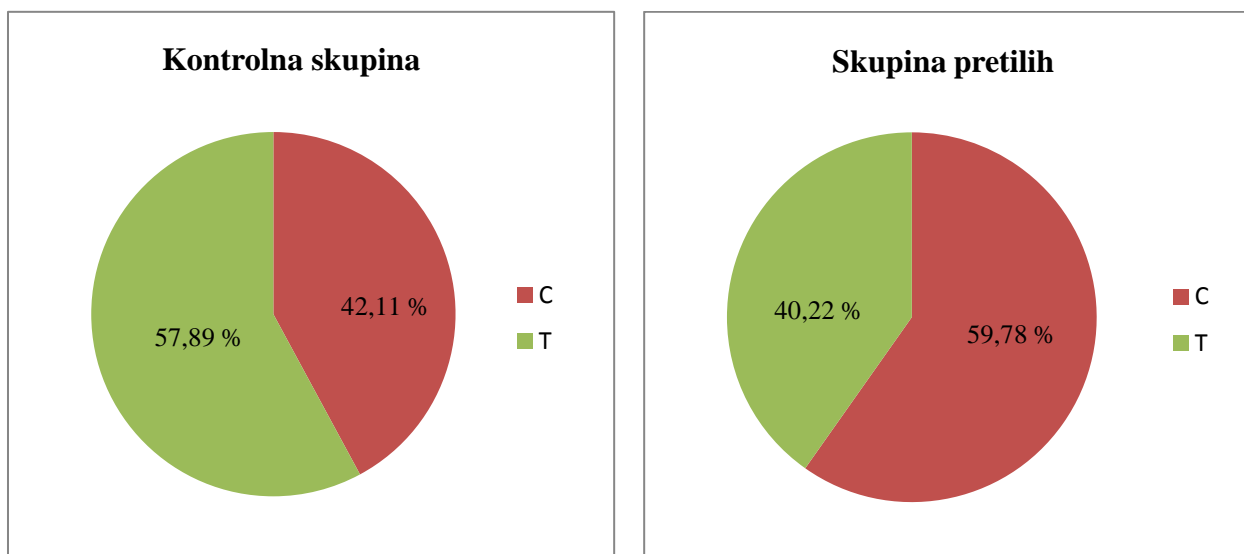
Tablica 11. Raspodjela genotipova CC, CT i TT jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih te prikaz dobivenih statističkih parametara X^2 vrijednosti i p-vrijednosti.

SKUPINA	KONTROLA			PRETILI		
BROJ SUDIONIKA	19			46		
GENOTIP	CC	CT	TT	CC	CT	TT
DOBIVENO	2	12	5	18	19	9
OČEKIVANO	3,37	9,26	6,37	16,44	22,12	7,44
X^2	1,66			0,91		
p-vrijednost*	0,1978			0,3388		

*ukoliko je p-vrijednost > 0,05 rezultat nije u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom



Slika 8. Raspodjela postotka pojave genotipa CC, CT i CC jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih.



Slika 9. Raspodjela postotka pojave alela C i T jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih.

Nakon obrade podataka ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike između zastupljenosti niskorizičnog genotipa CT ($p=0,1717$) te nerizičnog genotipa TT ($p=0,5290$) rs1421085 gena *FTO* između kontrolne skupine i skupine pretilih. Međutim, pokazana je statistički značajno učestalija zastupljenost visokorizičnog genotipa CC rs1421085 gena *FTO* u skupini pretilih. Prikaz raspodjele postotka pojave genotipova CC, CT i TT rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica vidljiv je na slici 8. U literaturi se izvještava o statistički značajnoj povezanosti sva 3 genotipa CC, CT i TT s indeksom tjelesne mase ispitanika (Price i sur., 2008). Međutim, dobiveni rezultati u ovom istraživanju pokazali su samo statistički značajnu povezanost visokorizičnog genotipa CC ($p=0,0367$) rs1421085 gena *FTO* s indeksom tjelesne mase što je gledajući pojedinačno genotip CC u skladu s navedenom literaturom. Žene nositeljice genotipa CC imaju $1,7 \times$ povećani rizik za razvoj pretilosti. Međutim, u turskoj studiji nije dokazana statistički značajna povezanost frekvencija bilo kojeg genotipa rs1421085 s indeksom tjelesne mase (Solak i sur., 2014). Neznatno viša frekvencija rizičnog alela C u skupini pretilih (59,78 %) naspram kontrolne skupine (42,11 %) nije se pokazala statistički značajnom ($p=0,0820$). Također ni neznatno viša frekvencija alela T u kontrolnoj skupini (57,89 %) naspram skupine spretilih (40,22 %) nije se pokazala statistički značajnom ($p=0,0820$). Raspodjela postotka alela C i T rs1421085 gena *FTO* kod ispitanica prikazana je na slici 9. Podaci o frekvencijama alela C i T rs1421085 odstupaju od istraživanja u svijetu (Dina i sur., 2007, Price i sur., 2008) i istraživanja provedenog u Hrvatskoj (Zhang i sur., 2010). Nije jednostavno jednoznačno odgovoriti na pitanje da li su dobiveni rezultati u skladu s očekivanjima. Potencijalno rješenje je proširiti ovo istraživanje na veći broj ispitanika pa potom ponovo provesti statističku obradu podataka. Nije utvrđena povezanost strukture mikrobioma usne šupljine s jednostrukim nukleotidnim polimorfizmom rs1421085 gena *FTO* i pretilošću.

4.3. Rezultati obrade anketnih upitnika

U istraživanju je sudjelovalo 65 dobrovoljnih ženskih osoba koje žive na području Zagrebačke županije. Ispitanice su popunjavale anketni upitnik o prehranbenim navikama, stilu života i zdravstvenom stanju kako bi se istražila korelacija između navedenih parametara i vrijednosti indeksa tjelesne mase ispitivanih osoba. Primjer anketnog upitnika nalazi se u prilogu 2, a sadrži 14 pitanja raspoređenih na dvije strane. Osnovni podaci o ispitanicama koji uključuju životnu dob, visinu i težinu te izračunate vrijednosti BMI s prikazom vrijednosti standardnih devijacija dani su u tablici 12 prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih. Kontrolna skupina obuhvaća ispitanice čije su vrijednosti BMI između 18,5 i 25 kg m⁻², a skupina pretilih ispitanice čije su vrijednosti BMI veće od 30 kg m⁻². Unutar skupine pretilih, prvom stupnju pretilosti (30 – 34,9 kg m⁻²) pripada 15,56 % ispitanica, drugom stupnju pretilosti (35 – 39,9 kg m⁻²) pripada 24,44 % ispitanica, dok trećem stupnju pretilosti (>40 kg m⁻²) pripada 60,00 % ispitanica.

Tablica 12. Osnovni podaci o 65 dobrovoljnih ispitanica razvrstani prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih s prikazom vrijednosti standardnih devijacija.

Osnovni podaci	KONTROLNA SKUPINA	SKUPINA PRETILIH
BROJ ISPITANICA	19	46
DOB (godine)	31,95 ± 10,90	43,5 ± 11,21
VISINA (cm)	165,53 ± 6,44	162,82 ± 8,95
TEŽINA (kg)	59,84 ± 7,07	114,77 ± 22,69
BMI (kg m⁻²)	21,81 ± 2,12	42,79 ± 8,22

U tablici 13 prikazani su statistički obrađeni podaci o prehranbenim navikama ispitanica prema kontrolnoj skupini (normalna vrijednost BMI) i skupini pretilih (vrijednost BMI veća ili jednaka 30 kg m⁻²). Prema Fisherovom egzaktnom testu, statistički značajne razlike u prehranbenim navikama između kontrolne skupine i skupine pretilih pronađene su u konzumaciji broja obroka na dan i ocjenjivanju svakodnevne prehrane. U kontrolnoj skupini 63,16 % ispitanica konzumira tri obroka na dan, dok u skupini pretilih tri obroka dnevno konzumira 31,82 % ispitanica što upućuje na statistički značajnu razliku (p-vrijednost jednaka 0,0273). 31,82 % ispitanica skupine pretilih konzumira četiri obroka dnevno, dok to čini 15,79 % ispitanica kontrolne skupine. Međutim, nije se pokazalo da ispitanice skupine pretilih konzumiraju statistički značajno više obroka u danu, nego kontrolna skupina. Ipak

potencijalna pretilost ispitanica kontrolne skupine možda je uzrok podcjenjivanja broja unesenih kalorija i tendencije za uzimanjem većih porcija obroka (Chandon i Wansink, 2007) što bi u ovom istraživanju trebalo dodatno istražiti. 73,68 % ispitanica kontrolne skupine ocjenjuje svoju prehranu uravnoteženom i raznolikom što je statistički značajno (p-vrijednost jednaka 0,0141) u odnosu 38,64 % ispitanica skupine pretilih. U skupini pretilih 34,09 % ispitanica ocjenjuje svoju prehranu bogatom slatkišima i grickalicama, dok samo 5,26 % ispitanica kontrolne skupine ocjenjuje to isto (p-vrijednost jednaka 0,0247). Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjem i literaturom u kojoj se navodi kako povećani unos grickalica povećava rizik od pretilosti (Aballay i sur., 2016) provedeno na populaciji žena i muškaraca u gradu Cordoba. Također, u egipatskoj studiji navodi se povezanost učestale konzumacije grickalica i slatkiša s razvojem pretilosti kod zaposlenih žena (Hassan i sur., 2015). Povezanost učestalije konzumacije slatkiša, grickalica, sladoleda i čokolade u pretilih osoba zabilježena je i u engleskoj studiji (O'Connor i sur., 2015). Također 52,57 % ispitanica skupine pretilih ocjenjuje svoju prehranu bogatu mesom i mesnim prerađevinama, dok u kontrolnoj skupini to ocjenjuje samo 10,53 % (p-vrijednost jednaka 0,0020). Ovaj rezultat je u skladu s očekivanjima te se i u literaturi navodi pozitivna povezanost konzumiranja mesa i dugotrajnog debljanja (Smith i sur., 2015). Dakle, ispitanice u skupini pretilih statistički značajno više konzumiraju hranu bogatu slatkišima i grickalicama te mesom i mesnim prerađevinama što je u skladu s očekivanjima. U preostalim prehranbenim navikama vezanim uz konzumaciju doručka i dodavanja soli hrani nisu pronađene statistički značajne razlike. Ipak 15,91 % ispitanica pretila skupine ne doručkuje, dok sve ispitanice doručkuju redovito ili neredovito. Istraživanje provedeno u američkim školama pokazalo je statistički značajno niže vrijednosti indeksa tjelesne mase u djece koja su redovito konzumirala doručak u školi (Gleason i Hedley-Dodd, 2009). Istraživanje o redukciji unosa soli kod djece je pokazalo pozitivnu korelaciju sa sniženjem indeksa tjelesne mase kroz smanjenje konzumacije zaslađenih sokova (He i sur., 2008). Navedena istraživanja o navikama konzumiranja doručka i soljenja provedena su na djeci školske dobi pa se ne mogu u potpunosti usporediti s ovim istraživanjem u kojem su sudjelovale odrasle osobe.

U tablici 14 prikazane su obrađeni podaci o stilu života ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih. Nisu pronađene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i skupine pretilih u vremenu koje ispitanice provede sjedeći kroz dan, niti statistički značajne razlike u vremenu koje ispitanice utroše na tjelovježbu ili hodanje. Očekivalo se da će ispitanice kontrolne skupine utrošiti više vremena na tjelovježbu ili hodanje obzirom da fizička aktivnost doprinosi smanjenju rizika od razvoja pretilosti (Mouissi i sur., 2015).

Također nema statistički značajnih razlika u postotku pušačica odnosno nepušačica između kontrolne skupine i skupine pretilih. Međutim, vidljivo je da niti jedna osoba iz kontrolne skupine ne spava manje od 6 sati, dok u skupini pretilih udio osoba koje spavaju manje od 6 sati iznosi 22,72 % što je statistički značajno (p-vrijednost jednaka 0,0252). Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjem, a povezanost između nedovoljnog spavanja i odmora te pretilosti dokazana je i u literaturi (Shankar i sur., 2010). Obzirom na radni status, u kontrolnoj skupini je zastupljeno 52,63 % studentica, dok je u skupini pretilih 6,67 % ispitanica studentica što je statistički značajna razlika (p-vrijednost jednaka 0,0001). Takvi podaci su dobiveni na osnovu biranja uzorka ispitanica koje je bilo najlakše regrutirati u ovo istraživanje. Ispitanice kontrolne skupine uglavnom su studentice te u manjoj mjeri zaposlenice Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

U tablici 15 dani su obrađeni podaci o zdravstvenom stanju ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih. Otkrivene su statistički značajne razlike u oboljenju od povišenog krvnog tlaka između kontrolne skupine i skupine pretilih. 44,44 % ispitanica skupine pretilih boluje od povišenog krvnog tlaka, dok u kontrolnoj skupini samo 5,26 % što je statistički značajna razlika (p-vrijednost jednaka 0,0013). Povezanost povišenog krvnog tlaka i pretilosti dosad je potvrđena u brojnim studijama (Kang, 2013). Iako u kontrolnoj skupini nema ispitanica koje boluju od dijabetesa, a u skupini pretilih su zastupljene u 15,55 %, vrijednosti se nisu potvrdile kao statistički značajne. U skupini pretilih 13,33 % ispitanica boluje od dijabetesa i povišenog krvnog tlaka, dok u kontrolnoj skupini takvih ispitanica nema. U istraživanju Bao i sur. (2014) istaknuta je pozitivna korelacija između 100-minutne umjerene tjelovježbe žena na tjedan i 47 % smanjenog rizika za razvoj dijabetesa tipa II na koju je utjecao i indeks tjelesne mase.

Tablica 13. Obradeni podaci o prehranbenim navikama ispitanica prema kontrolnoj skupini s normalnim vrijednostima BMI od 18,5 do 25 kg m⁻² i skupini pretilih s vrijednostima BMI >30 kg m⁻².

PREHRAMBENE NAVIKE	NORMALAN BMI		BMI >30 kg m ⁻²	
	BROJ	%	BROJ	%
BROJ OBROKA U DANU				
Jedan	0	0,00	1	2,27
Dva	2	10,53	10	22,73
Tri	12	63,16	14	31,82
Četiri	3	15,79	14	31,82
Pet ili više	2	10,53	5	11,36
KONZUMACIJA DORUČKA				
Ne doručuju	0	0,00	7	15,91
Doručuju neredovito	7	38,89	15	34,09
Doručuju redovito	11	61,11	22	50,00
SVAKODNEVNA PREHRANA				
Uravnotežena i raznolika	14	73,68	17	38,64
Bogata mesom i mesnim prerađevinama	2	10,53	23	52,27
Bogata slatkišima i grickalicama	1	5,26	15	34,09
Svaki dan konzumiraju barem 1 mliječni proizvod	9	47,37	18	40,91
Vegetarijanska	0	0,00	1	2,27
DODAVANJE SOLI HRANI				
Nikada	4	21,05	12	27,27
Kad jelo nije dovoljno slano	13	68,42	28	63,64
Skoro uvijek prije nego što probaju	2	10,53	4	9,09

Tablica 14. Obradeni podaci o stilu života ispitanica prema kontrolnoj skupini s normalnim vrijednostima BMI od 18,5 do 25 kg m⁻² i skupini pretilih sa vrijednostima BMI > 30 kg m⁻².

STIL ŽIVOTA	NORMALAN BMI		BMI >30 kg m ⁻²	
	BROJ	%	BROJ	%
PUŠENJE				
Pušač	3	15,79	11	26,19
Povremeni pušač	3	15,79	2	4,76
Bivši pušač	1	5,26	6	14,29
Nepušač	12	63,16	23	54,76
VRIJEME PROVEDENO SJEDUĆI KROZ DAN				
Manje od 1 sat	0	0,00	6	13,63
3 do 4 sata	5	26,32	15	34,09
8 sati	7	36,84	9	20,45
Više od 8 sati	7	36,84	14	31,82
VRIJEME PROVEDENO NA TJELOVJEŽBU KROZ DAN				
Manje od 20 minuta	2	10,53	12	27,27
1 sat	8	42,11	13	29,55
2 sata	3	15,79	7	15,91
Više od 2 sata	6	31,58	12	27,27
VRIJEME PROVEDENO SPAVAJUĆI KROZ DAN				
Manje od 6 sati	0	0,00	10	22,72
6 do 7 sati	10	52,63	17	38,64
8 sati	7	36,84	13	29,55
Više od 8 sati	2	10,53	4	9,09
RADNI STATUS				
Studentica	10	52,63	3	6,67
Zaposlena (puno radno vrijeme)	9	47,37	27	60,00
Zaposlena (pola radnog vremena)	0	0,00	1	2,22
Rad kod kuće	0	0,00	2	4,44
Nezaposlena	0	0,00	5	11,11
Domaćica	0	0,00	3	6,66
Umirovljenica	0	0,00	5	11,11

Tablica 15. Obradeni podaci o zdravstvenom statusu ispitanica prema kontrolnoj skupini i skupini pretilih.

UKLONJENO	NORMALAN BMI		BMI > 30 kg m ⁻²	
	BROJ	%	BROJ	%
Tonzile	9	47,37	10	22,22
Slijepo crijevo	2	10,53	5	11,11
Ništa navedeno	8	42,10	33	73,33
BOLESTI	NORMALAN BMI		BMI > 30 kg m ⁻²	
	DA (%)	NE (%)	DA (%)	NE (%)
Alergija	15,79	84,21	22,22	77,78
Povišeni krvni tlak	5,26	94,74	44,44	55,56
Dijabetes	0,00	100,00	15,55	84,45
Povišeni krvni tlak + dijabetes	0,00	100,00	13,33	86,67
Ostale bolesti	10,53	89,47	26,67	73,33

Sažetak o doprinosu istraživanja

Istraživanje se bavi povezanošću jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* s pretilošću u žena Zagrebačke županije što ga čini prvim takvim istraživanjem u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske. Općenito je dosad u Hrvatskoj provedeno samo jedno istraživanje na temu utjecaja jednostrukih nukleotidnih polimorfizama gena *FTO* na pretilost, a dokumentirano je u hvarskoj studiji (Zhang i sur., 2010). Rezultati genotipizacije pokazali su statistički značajno veću zastupljenost visokorizičnog genotipa CC rs1421085 gena *FTO* u pretilih žena Zagrebačke županije. Analiza mikrobioma usne šupljine na uzorku sline pretilih osoba i osoba normalne tjelesne težine pokazala je nekoliko značajnih razlika u sadržaju bakterija. Međutim, rezultate istraživanja analize mikrobiome usne šupljine na uzorku sline trebalo bi unaprijediti boljim tehnikama identifikacije mikroorganizama. Ovo je preliminarno istraživanje koje bi trebalo replicirati na puno veći broj ispitanika.

5. ZAKLJUČCI

1. Na temelju analize mikrobioma usne šupljine žena Zagrebačke županije pronađena je statistički značajno učestalija pojava bakterije *Staphylococcus aureus* iz koljena *Firmicutes* u pretilih žena s indeksom tjelesne mase većim od 30 kg m^{-2} , dok je u žena s normalnim vrijednostima indeksa tjelesne mase pronađena statistički značajno učestalija pojava bakterija *Streptococcus infantis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* i *Streptococcus salivarius* iz koljena *Firmicutes* te bakterijske vrste *Serratia ureilytica* iz koljena *Proteobacteria*.
2. Genotipizacija jednostrukog nukleotidnog polimorfizma rs1421085 gena *FTO* u žena Zagrebačke županije pokazala je statistički značajno veću zastupljenost visokorizičnog genotipa CC u pretilih žena čime je dokazana povezanost SNP-a rs1421085 s pretilošću.
3. Pokazana je statistički značajna razlika između skupine pretilih žena i žena s normalnim vrijednostima indeksa tjelesne mase Zagrebačke županije u prehrambenim navikama pri čemu je prehrana pretilih žena bogata slatkišima i grickalicama te mesom i mesnim prerađevinama te statistički značajna razlika u zdravstvenom stanju ispitivanih žena pri čemu je bolest povišenog krvnog tlaka zastupljenija u pretilih žena.

6. LITERATURA

Aballay, L. R., Osella, A. R., De La Quintana, A. G., Diaz Mdel, P. (2016) Nutritional profile and obesity: results from a random-sample population-based study in Córdoba, Argentina. *Eur. J. Nutr.* **55**, 675-685.

Albuquerque, D., Norbrega, C., Manco, L. (2013) Association of FTO polymorphisms with obesity and obesity-related outcomes in Portuguese children. *PLoS One* **8**, e54370. doi: 10.1371/journal.pone.0054370.

Arrone, LJ. (2002) Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. *Obes. Res.* **10**, 105-115.

Bao, W., Tobias, D. K., Bowers, K., Chavarro, J., Vaag, A., Groth Grunnet, L., Strøm, M., Mills, J., Liu, A., Kiely, M., Zhang; C. (2014) Physical Activity and Sedentary Behaviors Associated With Risk of Progression From Gestational Diabetes Mellitus to Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA Intern. Med.* **174**, 1047-1055.

Befus, M., Lowy, F. D., Miko, B. A., Mukherjee, D. V., Herzig, C. T., Larson, E. L. (2015) Obesity as a Determinant of Staphylococcus aureus Colonization Among Inmates in Maximum-Security Prisons in New York State. *Am. J. Epidemiol.* **182**, 494-502.

Belstrøm, D., Holmstrup, P., Nielsen, C. H., Kirkby, N., Twetman, S., Heitmann, B. L., Klepac-Ceraj, V., Paster, B. J., Fiehn, N.-E. (2014) Bacterial profiles of saliva in relation to diet, lifestyle factors, and socioeconomic status. *J. Oral Microbiol.* **6**, 23609. doi: 10.3402/jom.v6.23609.

Berulava, T., Ziehe, M., Klein-Hitpass, L., Mladenov, E., Thomale, J., Rütger, U., Horsthemke, B. (2012) FTO levels affect RNA modification and the transcriptome. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 317–323.

Blüher, M., Mantzoros, C. S. (2015) From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* **64**, 131-145.

Chandon, P., Wansink, B. (2007) Is Obesity Caused by Calorie Underestimation? A Psychophysical Model of Meal Size Estimation. *J. Marketing Res.* **44**, 84-99.

Choromańska, K., Choromańska, B., Dąbrowska, E., Bączek, W., Myśliwiec, P., Dadan, J. Zalewska, A. (2015) Saliva of obese patients – is it different? *Postepy Hig. Med. Dosw.* **69**, 1190-1195.

Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G. T., Teboul, L., Wells, S., Brüning, J. C., Nolan, P. M., Ashcroft, F. M., Cox, R. D. (2010) Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat. Genet.* **42**, 1086–1092.

Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Körner, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Kiess W., Vatin, V., Lecouer, C., Delplangue, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougneres, P, Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chevre, J. C., Froquel, P. (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.* **39**, 724-726.

Fischer J., Koch, L., Emmerling ,C., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J. C., Rütther, U. (2009) Inactivation of the *FTO* gene protects from obesity. *Nature* **458**, 894–898.

Frayling, M. T., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A.-M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M.-R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J. F., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N. A., Doney, A. S. F., Morris, A. D., Davey Smith, G., The Wellcome Trust Case Control Consortium, Hattersley, A. T., McCarthy, M. I. (2007) A Common Variant in the FTO Gene is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science* **316**, 889-894.

Gallus, S., Lugo, A., Murisic, B., Bosetti, C., Boffeta, P., La Vecchia, C. (2015) Overweight and obesity in 16 European countries. *Eur. J. Nutr.* **54**, 679-689.

Gleason, P. M., Hedley-Dodd, A. (2009) School Breakfast Program but Not School Lunch Program Participation Is Associated with Lower Body Mass Index. *J. Acad. Nutr. Diet.* **109**, 118-128.

Goodson, J. M., Groppo, D., Halem, S., Carpino, E. (2009) Is Obesity an Oral Bacterial Disease? *J. Dent. Res.* **88**, 519-523.

Goyal, A., Nimmakayala, K. R., Zonszein, J. (2014) Is There a Paradox in Obesity? *Cardiol. Rev.* **22**, 163-170.

Gulati, P., Cheung, M. K., Antrobus, R., Church, C. D., Harding, H. P., Tung, Y. C., Rimmington, D., Ma, M., Ron, D., Lehner, P. J., Ashcroft, F. M., Cox, R. D., Coll, A. P., O'Rahilly, S., Yeo, G. S. (2013) Role for the obesity-related gene in the cellular sensing of amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 2557-2562.

Hassan, N. E., Wahba, S. A., El-Masry, S. A., Abd Elhamid, E. R., Boseila, S. A. W., Ahmed, N. H., Ibrahim, T. S. (2015) Eating Habits and Lifestyles among a Sample of Obese Working Egyptian Women. *J. Med. Sci.* **3**, 12-17.

Haupt, A., Thamer, C., Staiger, H., Tschritter, O., Kirchhoff, K., Machicao, F., Häring, H.-U., Stefan, N., Fritsche, A. (2009) Variation in the FTO Gene Influences Food Intake but not Energy Expenditure. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **117**, 194-197.

He, F. J., Marrero, N. M., MacGregor, G. A. (2008) Salt intake is related to soft drink consumption in children and adolescents: a link to obesity? *Hypertension* **51**, 629-634.

Hotta, K., Kitamoto, T., Kitamoto, A., Mizusawa, S., Matsuo, T., Nakata, Y., Kamohara, S., Miyatake, N., Kotani, K., Komatsu, R., Itoh, N., Mineo, I., Wada, J., Yoneda, M., Nakajima, A., Funahashi, T., Miyazaki, S., Tokunaga, K., Masuzaki, H., Ueno, T., Hamaguchi, K., Tanaka, K., Yamada, K., Hanafusa, T., Oikawa, S., Yoshimatsu, H., Sakata, T., Matsuzawa, Y., Nakao, K., Sekine, A. (2011) Association of variations in the FTO, SGC3, and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population. *J. Hum. Genet.* **56**, 647-651.

Kang, Y. S. (2013) Obesity associated hypertension: new insights into mechanism. *Electrolyte*

Blood Press. **11**, 46-52.

Klöting, N., Schleinitz, D., Ruschke, K., Berndt, J., Fasshauer, M., Tönjes, A., Schön, M. R., Kovacs, P., Stumvoll, M., Blüher, M. (2008) Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans. *Diabetologia* **51**, 641-647.

Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S.G., Gall, A. A., Dempsy, R., Reed M. W., Meyer, R. B., Hedgpeth, J. (2000) 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* **28**, 655-661.

Lappalainen, T., Kolehmainen, M., Schwab, U., Pulkkinen, L., de Mello, V. D., Vaittinen, M., Laaksonen, D. E., Poutanen, K., Uusitupa, M., Gylling, H. Gene expression of FTO in human subcutaneous adipose tissue, peripheral blood, mononuclear cells and adipocyte cell line. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **3**, 37-45.

Li, G., Chen, Q., Wang, L., Ke, D., Yuan, Z. (2012) Association between FTO gene polymorphism and cancer risk: evidence from 16,277 cases and 31,153 controls. *Tumour Biol.* **33**, 1237-1243.

Li, X., Liang, L., Zhang, M., Song, F., Nan, H., Wang, L. E., Wei, Q., Lee, J. E., Amos, C. I., Qureshi, A. A., Han, J. (2013) Obesity-related genetic variants, human pigmentation, and risk of melanoma. *Hum. Genet.* **132**, 793-801.

Loos, R. J. F., Yeo, G. S. H. (2014) The bigger picture of *FTO* - the first GWAS-identified obesity gene. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 51-61.

Maras, S. A. E., Kramer, F. R., Tyagi, S. (2002) Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **30**, 122-130.

Medanić, D., Pucarín-Cvetković, J. (2012) Pretilost-javnozdravstveni problem i izazov. *Acta Med. Croatica* **66**, 347-355.

Mouissi, F., Torki, A., Sba, B. (2015). The impact of physical activity and exercise on obesity, *Global J. Adv. Pure Appl. Sci.* [online] 7, 130-136, < <http://www.world-education-center.org/index.php/paas>> . Pristupljeno 26. lipnja 2016.

Musić Milanović, S., Ivanković, D., Ivičević Uhernik, A., Fišter, K., Peternel, R., Vuletić, S. (2012b) Obesity – New Threat to Croatian Longevity. *Coll. Antropol.* **36**, 113-116.

Musić Milanović, S., Ivičević Uhernik, A., Fišter, K., Mihel, S., Kovač, A., Ivanković D. (2012a) Five year Cumulative Incidence of Obesity in Adults in Croatia: The CroHorty Study. *Coll. Antropol.* **36**, 71-76.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anwari, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A., Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J. C., Chowdhury, R., Courville, K. J., Criqui, M. H., Cundiff, D. K., Dabhadkar, K. C., Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D., Ding, E. L., Durrani, A. M., Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D. F., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J., Harewood, H. C., Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Husseini, A., Idrisov, B. T., Ikeda, N., Islami, F., Jahangir, E., Jassal, S. K., Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B., Kabagambe, E. K., Khalifa, S. E., Kengne, A. P., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Lotufo, P. A., Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Mokdad, A. H., Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, K. M., Nelson, E. L., Neuhouser, M. L., Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S. G., Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G. M., Singh, J. A., Skirbekk, V., Stapelberg, N. J., Sturua, L., Sykes, B. L., Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., van de Vijver, S., Vasankari, T. J., Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, J. L., Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S. J., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Gakidou, E. (2014) Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and

adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **384**, 766–781.

Niu, Y., Zhao, X., Wu, Y. S.; Li, M. M., Wang, X. J., Yang, Y. G. (2013) N6-methyladenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics. Proteomics. Bioinformatics.* **11**, 8-17.

O'Connor, L., Brage, S., Griffin, S. J., Wareham, N. J., Forouhi, N. G. (2015) The cross-sectional association between snacking behaviour and measures of adiposity: the Fenland Study, UK. *Br. J. Nutr.* **114**, 1286-1293.

Olsen, K., Danielsen, K., Wilsgaard, T., Sangvik, M., Sollid, J. U. E., Thune, I., Eggen, A. E., Simonsen, G. S., Furberg, A.-S. (2013) Obesity and *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization among Women and Men in a General Population. *PLoS ONE* **8**, e63716. doi:10.1371/journal.pone.0063716

Piombino, P., Genovese, A., Esposito, S., Moio, L., Cutolo, P. P., Chambery, A., Severino, V., Moneta, E., Smith, D. P., Owens, S. M., Gilbert, J. A., Ercollini, D. (2014) Saliva from Obese Individuals Suppresses the Release of Aroma Compounds from Wine. *PLoS ONE* **9**, e85611. doi:10.1371/journal.pone.0085611

Price, R. A., Li, W. D., Zhao, H. (2008) FTO gene SNPs associated with extreme obesity in cases, controls and extremely discordant sister pairs. *BMC Med. Genet.* **9**, 4. doi: 10.1186/1471-2350-9-4

Schleinitz, D., DiStefano, J. K., Kovacs, P. (2012) Targeted SNP Genotyping Using the TaqMan® Assay. U: Disease Gene Identification, (Di Stefano, J. K., ured.), Humana Press, New York, str. 77-87.

Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W.-M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Najjar, S., Nagaraja, R., Orru, M., Usala, G., Dei, M., Lai, S., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Ehret, G. B., Fink, A. A., Weder, A. B., Cooper, R. S., Galan, P., Chakravarti, A., Schlessinger, D, Cao, A., Lakatta, E., Abecasis, G. R. (2007) Genome-wide Associatian Scan Shows Genetic Variants

in the *FTO* Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genet.* **3**, e115. doi: 10.1371/journal.pgen.0030115

Shankar, A., Syamala, S., Kalidindi, S. (2010) Insufficient Rest or Sleep and Its Relation to Cardiovascular Disease, Diabetes and Obesity in a National, Multiethnic Sample. *PLoS ONE* **5**, e14189. doi:10.1371/journal.pone.0014189

Silventoinen, K., Rokholm, B., Kaprio, J., Sørensen, T. I. A. (2010) The genetic and environmental influences on childhood obesity: a systematic review of twin and adoption studies. *Int. J. Obes.(Lond)* **34**, 29-40.

Smemo, S., Tena, J. J., Kim, K.-H., Gamazon, E. R., Sakabe, N. J., Gomez-Martin, C., Aneas, I., Credidio, F. L., Sobreira, D. R., Wasserman, N. F., Lee, J. H., Puviindran, V., Tam, D., Shen, M., Son, J. E., Vakili, N. A., Sung, H.-K., Naranjo, S., Acemel, R. D., Manzanares, M., Nagy, A., Cox, N. J., Hui, C.-C., Gomez-Skarmeta, J. L., Nobrega, M. A. (2014) *Nature* **507**, 371-375.

Smith, J. D., Hou, T., Ludwig, D. S., Rimm, E. B., Willett, W., Hu, F. B., Mozaffarian, D. (2015) Changes in intake of protein foods, carbohydrate amount and quality, and long-term weight change: results from 3 prospective cohorts. *Am. J. Clin. Nutr.* **101**, 1216-1224.

SNPedia (2016) Rs1421085. <<http://snpedia.com/index.php/Rs1421085>>. Pristupljeno 27. lipnja 2016.

Solak, M., Ozdemir Erdogan, M., Yildiz, S. H., Ucok, K., Yuksel, S., Arikan Terzi, E. S., Bestepe, A. (2014) Association of obesity with rs1421085 and rs9939609 polymorphisms of *FTO* gene. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 7381-7386.

Speakman, J. R., Rance, K. A., Johnstone, A. M. (2008) Polymorphisms of the *FTO* gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity* **16**, 1961-1965.

Stutzman, F., Cauchi, S., Durand, E., Calvacanti-Proenca, C., Pigeyre, M., Hartikainen, A. L., Sovio, U., Tichet, J., Marre, M., Weill, J., Balkau, B., Potoczna, N., Laitinen, J., Elliot, P., Jarvelin, M. R., Horber, F., Meyre, D., Froquel, P. (2009) Common genetic variation near

MC4R is associated with eating behaviour patterns in European populations. *Int. J. Obes. (Lond)* **33**, 373-378.

Swinburn, B. A, Sacks, G., Hall, K. D., McPherson, K., Finegood, D. T., Moodie, M. L., Gortmaker, S. L. (2011) The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* **378**, 804–814.

TaqMan® SNP Genotyping Assays User Guide (2014) Applied Biosystems, Carlsbad.

Tews, D., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M. (2011) Regulation of FTO and FTM expression during human preadipocyte differentiation. *Horm. Metab. Res.* **43**, 17-21.

Villalobos-Comparán, M., Teresa Flores-Dorantes, M., Teresa Villarreal-Molina, M., Rodríguez-Cruz, M., García-Ulloa, A. C., Robles, L., Huertas-Vázquez, A., Saucedo-Villarreal, N., López-Alarcón, M., Sánchez-Muñoz, F., Domínguez-López, A., Gutiérrez-Aguilar, R., Menjivar, M., Coral-Vázquez, R., Hernández-Stengele, G., Vital-Reyes, V. S., Acuña-Alonzo, V., Romero-Hidalgo, S., Ruiz-Gómez, D. G., Riaño-Barros, D., Herrera, M. F., Gómez-Pérez, F. J., Froguel, P., García-García, E., Teresa Tusié-Luna, M., Aguilar-Salinas, C. A., Canizales-Quinteros, S. (2008) The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 2296-2301.

Wangensteen, T., Egeland, T., Akselsen, H., Holmen, J., Undlien, D., Retterstol, L. (2010) FTO genotype and weight gain in obese and normal weight adults from a Norwegian population based cohort (the HUNT study). *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **118**, 649-652.

Wojciechowski, P., Lipowska, A., Rys, P., Ewens, K. G., Franks, S., Tan, S., Lerchbaum, E., Vcelak, J., Attaoua, R., Strackowski, M., Azziz, R., Barber, T. M., Hinney, A., Obermayer-Pietsch, B., Lukasova, P., Bendlova, B., Grigorescu, F., Kowalska, I., Goodarzi, M. O.; GIANT Consortium, Strauss, J. F. 3rd, McCarthy, M. I., Malecki, M. T. (2012) Impact of FTO genotypes on BMI and weight in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* **55**, 2636-2645.

Xia, Q., Grant, S. F. (2013) The genetics of human obesity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1281**, 178-190.

Zeigler, C. C., Rutger Persson, G., Wondimu, B., Marcus, C., Sobko, T., Modeer, T. (2011) Microbiota in the Oral Biofilm Is Associated With Obesity in Adolescence. *Obesity* **20**, 157-164.

Zhang, G., Karns, R., Smolej Narancic, N., Sun, G., Cheng, H., Missoni, S., Durakovic, Z., Rudan, P., Chakraborty, R., Deka, R. (2010) Common SNPs in FTO Gene Are Associated with Obesity Related Anthropometric Traits in an Island Population from the Eastern Adriatic Coast of Croatia. *PLoS ONE* **5**, e10375. doi:10.1371/journal.pone.0010375

Zhao, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Zhao, Y.-L., Yang, Y.-G. (2014) FTO and Obesity: Mechanisms of Association. *Curr. Diab. Rep.* **14**, 486. doi: 10.1007/s11892-014-0486-0

7. PRILOZI

7.1. Popis i objašnjenje kratica

- BMI – indeks tjelesne mase (*engl.* body mass index)
- DNA – deoksiribonukleinska kiselina (*engl.* deoxyribonucleic acid)
- EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid)
- FRET –transfer fluorescentno rezonancijske energije (*engl.* fluorescence resonance energy transfer)
- FTO – gen povezan sa pretilošću (*engl.* fat mass and obesity associated gene)
- GWAS – cjelogenomske asocijacijske studije (*engl.* genome-wide association studies)
- HDL – "dobar" kolesterol (*engl.* low density lipoprotein)
- IRX₃- gen povezan s pretilošću (*engl.* irquois homeobox 3 gene)
- LB - Luria-Bertani podloga
- MALDI – matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (*engl.* matrix assisted laser desorption/ionization)
- MGB – konjugirane grupe (*engl.* minor groove binder)
- mRNA – glasnička RNA (*engl.* messenger RNA)
- MRS - De Man, Ragosa i Sharpe podloga
- NCBI – National Center for Biotechnology Information
- PBS – fosfatni pufer (*engl.* phosphate buffered saline)
- PCR – lančana reakcija polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction)
- RNA – ribonukleinska kiselina (*engl.* ribonucleic acid)
- rRNA – ribosomalna RNA (*engl.* ribosomal RNA)
- SNP – jednostruki nukleotidni polimorfizam (*engl.* single nucleotide polymorphism)
- TNF α – faktor nekroze tumora α (*engl.* tumor necrosis factor α)
- tRNA – transportna RNA (*engl.* transport RNA)

7.2. Anketni upitnik

ANKETNI UPITNIK

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

Ime i prezime: _____ ili broj Vašeg uzorka: _____

Datum Vašeg rođenja: _____ Tjelesna visina: _____ (cm) Tjelesna težina: _____ (kg)

Kod više ponuđenih odgovora molim zaokružite odgovor/e!

1. Imate li uklonjeno:

- A) – tonzile
- B) – slijepo crijevo

2. Imate li bolesti:

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

3. Jeste li nedavno uzeli lijek:

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

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

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

5. Zaokružite tvrdnje koje se odnose na Vas:

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

6. Radni status:

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

7. Koliko uobičajeno imate dnevnih obroka?

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

8. Doručkujete li:

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

9. Moja svakodnevna prehrana je:

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

10. Dodajete li sol svom obroku za stolom?

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

11. Podaci o pušenju:

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

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

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

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

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

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

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

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

Datum ispunjavanja ankete: _____

7.3. Informirani pristanak za sudjelovanje zdravih osoba u istraživanju

INFORMIRANI PRISTANAK NA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

NASLOV (NAZIV) ISTRAŽIVANJA: Povezanost jednostrukog nukleotidnog polimorfizama rs1421085 u ljudskom genu FTO s tjelesnom masom i mikrobiomom usne šupljine u žena zagrebačke županije

MJESTO ISTRAŽIVANJA: Zagreb

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

Opći dio koji se treba nalaziti u svakom Informiranom pristanku!

Poštovana,

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

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

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

Istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu.

Specifični dio – oblikuje se prema naravi istraživanja

PODACI O ISTRAŽIVANJU

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

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

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

Postojat će samo jedan susret ispitanik- istraživač.

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

Pri jedinom susretu obaviti će se: upoznavanje s ispitivanjem i postupcima, ispunjavanje anketnog listića, mjerenje krvnog tlaka, davanje uzorka krvi, ispiranje usta s 15 ml fiziološke otopine i davanje 2 ml sline.

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

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

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

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

SLUČAJNI NALAZI

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

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

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

POVJERLJIVOST I ZAŠTITA OSOBNIH PODATAKA

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

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

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

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

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

KORIST ZA ISTRAŽIVAČA

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

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE

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

DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE

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

PITANJA O ISPITIVANJU I KONTAKT PODACI

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

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

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

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

U Zagrebu, _____

Potpis sudionika

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

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

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

7.4. Informirani pristanak za sudjelovanje pretilih osoba u istraživanju

INFORMIRANI PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

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

MJESTO ISTRAŽIVANJA: Zagreb

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

Poštovani,

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

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

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

Istraživač koji provodi ovo istraživanje neće primiti nikakvu financijsku naknadu.

Specifični dio – oblikuje se prema naravi istraživanja

PODACI O ISTRAŽIVANJU

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

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

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

Postojat će samo jedan susret ispitanik- istraživač.

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

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

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

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

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

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

SLUČAJNI NALAZI

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

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

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

POVJERLJIVOST I ZAŠTITA OSOBNIH PODATAKA

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

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

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

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

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

KORIST ZA ISTRAŽIVAČA

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

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE

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

DOBROVOLJNO SUDJELOVANJE

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

PITANJA O ISPITIVANJU I KONTAKT PODACI

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

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

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

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

U Zagrebu, _____

Potpis sudionika

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

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

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