

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA ŠVIGELJ

**VPLIV IZBRANIH VARIANT GENA ZA
APOLIPOPROTEIN E NA KONCENTRACIJE
PLAZEMSKIH LIPIDOV PRI BOLNIKI S
SLADKORNO BOLEZNIJO TIPA 1**

**INFLUENCE OF SELECTED VARIANTS IN GENE
ENCODING APOLIPOPROTEIN E ON PLASMA
LIPID CONCENTRATIONS IN PATIENTS WITH
TYPE 1 DIABETES**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki, UKC Ljubljana, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

ZAHVALA

*Učenje je kot veslanje proti toku.
Takoј ko prenehaš veslati, te odnese nazaj.
~Benjamin Britten~*

Doc.dr. Katarina Trebušak Podkrajšek, spec. med. biokem., iskreno se Vam zahvaljujem, da ste me z veseljem sprejeli pod svoje mentorstvo, me spretno vodili v pravo smer in mi posredovali bogato strokovno znanje.

Mirjana Zupančič, mag. med. biokem., iskrena hvala, da ste mi omogočili izdelavo magistrske naloge v Službi specialne laboratorijske diagnostike Pediatrične klinike.

Gašper Klančar univ. dipl. bioteh., hvala za vse nasvete, strokovno pomoč, prijazno podporo in vzpodbudo, brez katerih bi težko prišla do cilja.

Dr. Tinka Hovnik, univ. dipl. biol., hvala za prijetno sodelovanje in potrpežljivost pri izdelavi magistrske naloge.

Hvala tudi vsem ostalim iz Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike, za vso velikodušno pomoč, prijazne nasvete in dobro voljo, ki je bila tekom mojega raziskovalnega dela vedno prisotna na vaših obrazih.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki ste mi skozi vsa ta leta stali ob strani in me podpirali; brez vaše pomoči, bi bilo vse težje.

Mami, oči, Žiga, vam izkazujem posebno zahvalo za vso potrpežljivost in spodbudo, ki ste mi jo dajali v času študija. Hvala, ker ste mi vedno stali ob strani in verjeli vame v vseh mojih dobrih in malo manj dobrih dneh.

Magistrsko nalogo posvečam svoji družini.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	III
KAZALO PREGLEDNIC	V
KAZALO SLIK	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	IX
1 UVOD	11
1.1 SLADKORNA BOLEZEN	11
1.1.1 Razdelitev sladkorne bolezni in statistični podatki.....	12
1.1.1.1 Sladkorna bolezen tipa 1 in tipa 2.....	12
1.1.1.2 Druge oblike sladkorne bolezni	13
1.2 SLADKORNA BOLEZEN TIP 1	14
1.2.1 Etiopatogeneza sladkorne bolezni tipa 1	14
1.2.2 Genetski dejavniki v razvoju sladkorne bolezni tipa 1	16
1.2.3 Avtoimunsko uničenje β -celic trebušne slinavke.....	18
1.3 DISLIPIDEMIJA PRI SLADKORNI BOLEZNI	19
1.4 APOLIPOPROTEINI	21
1.4.1 Zgradba, struktura in funkcija apolipoproteina E	21
1.4.2 Apolipoprotein E in sladkorna bolezen tipa 1.....	23
2 NAMEN DELA	24
3 PREISKOVANCI IN METODE	25
3.1 PREISKOVANCI.....	25
3.2 METODE.....	26
3.2.1 Osamitev genomske DNA iz levkocitov periferne krvi.....	27
3.2.2 Genotipizacija s sondami TaqMan.....	28
3.2.2.1 Potek analize	29
3.2.2.2 Profil metode.....	30
3.2.3 Statistične metode in analiza	33
4 REZULTATI	35
4.1 Osnovne klinične značilnosti bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1	35

4.2 Genotipizacija izbranih variant gena <i>APOE</i> in povezava s plazemsko koncentracijo lipidov	38
5 RAZPRAVA	44
5.1 Klinične značilnosti bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1.....	44
5.2 Opredelitev kombinacije genotipa izbranih variant gena <i>APOE</i>	47
5.3 Vpliv kombinacij genotipov <i>APOE</i> in alelov gena <i>APOE</i> na plazemske koncentracije lipidov.....	48
6 SKLEP	52
7 LITERATURA	53

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I:</i> Razlike med aleli gena <i>APOE</i> in izoproteini <i>APOE</i>	22
<i>Preglednica II:</i> Sestava kombinacije genotipov <i>APOE</i>	22
<i>Preglednica III:</i> Osnovne klinične značilnosti preiskovane populacije bolnikov s <i>SBT1</i> ...	35
<i>Preglednica IV:</i> Osnovne klinične značilnosti bolnikov s <i>SBT1</i> z vrednostjo <i>HOL</i> pod 4,4 mmol/L (skupina <i>SBT1</i> s <i>HOL</i> < 4,4 mmol/L) in bolnikov s <i>SBT1</i> z vrednostjo <i>HOL</i> nad 4,4 mmol/L (skupina <i>SBT1</i> s <i>HOL</i> ≥ 4,4 mmol/L).....	37
<i>Preglednica V:</i> Osnovne značilnosti bolnikov s <i>SBT1</i> z vrednostjo <i>TG</i> pod 1,7 mmol/L (skupina <i>SBT1</i> s <i>TG</i> < 1,7 mmol/L) in bolnikov s <i>SBT1</i> z vrednostjo <i>TG</i> nad 1,7 mmol/L (skupina <i>SBT1</i> s <i>TG</i> ≥ 1,7 mmol/L).....	38
<i>Preglednica VI:</i> Razporeditev kombinacije genotipov <i>APOE</i> in alelov gena <i>APOE</i> pri bolnikih s <i>SBT1</i>	39
<i>Preglednica VII:</i> Razporeditev kombinacij genotipov <i>APOE</i> in alelov gena <i>APOE</i> pri bolnikih s <i>SBT1</i> na podlagi vrednosti <i>HOL</i> v krvi.....	40
<i>Preglednica VIII:</i> Razporeditev kombinacij genotipov <i>APOE</i> in alelov gena <i>APOE</i> pri bolnikih s <i>SBT1</i> na podlagi vrednosti <i>TG</i> v krvi.....	41
<i>Preglednica IX:</i> Osnovne klinične značilnosti bolnikov s <i>SBT1</i> in laboratorijske vrednosti glede na kombinacijo genotipa <i>APOE</i>	42
<i>Preglednica X:</i> Post hoc <i>LSD</i> test med kombinacijo genotipa <i>APOE</i>	42
<i>Preglednica XI:</i> Osnovne klinične značilnosti bolnikov s <i>SBT1</i> in laboratorijske vrednosti glede na alele gena <i>APOE</i>	43
<i>Preglednica XII:</i> Post hoc <i>LSD</i> test med aleli gena <i>APOE</i>	43

KAZALO SLIK

<i>Slika 1:</i> Shema poteka dela.....	26
<i>Slika 2:</i> Princip genotipizacije s sondami TaqMan®.....	28
<i>Slika 3:</i> Rezultat analize s kompletom TaqMan® Genotyping Assay za detekcijo spremembe v nukleotidu c.472C>T (rs7412) v genu <i>APOE</i> na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA).....	31
<i>Slika 4:</i> Rezultat analize izbranih variant gena s kompletom TaqMan® Genotyping Assay za detekcijo spremembe v nukleotidu c.334T>C (rs429358) v genu <i>APOE</i> na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) pri prvotnih pogojih analize.....	32
<i>Slika 5:</i> Rezultat analize izbranih variant gena s kompletom TaqMan® Genotyping Assay za detekcijo spremembe c.334T>C (rs429358) v genu <i>APOE</i> na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) pri optimiziranih pogojih analize.....	33
<i>Slika 6:</i> Grafični prikaz strukture preiskovane populacije bolnikov s SBT1, razdeljene na posamezne starostne skupine. Podatki o številu bolnikov in njihovi povprečni starosti so prikazani nad vsakim stolpcem, razdeljeni posebej za moški in ženski spol.....	36

POVZETEK

Spremembe v genu za apolipoprotein E pomembno vplivajo na metabolizem lipidov in predstavljajo dejavnik tveganja za razvoj bolezni srca in ožilja pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1. Spremembi c.334T>C (rs429358) in c.472C>T (rs7412) v genu za apolipoprotein E določata tri glavne alele: e2, e3, e4 in šest pripadajočih kombinacij genotipov: e2/e2, e3/e2, e3/e3, e4/e3, e4/e2, e4/e4. Aleli kodirajo tri izoproteine, ki se med seboj razlikujejo na aminokislinskih mestih 112 in 158. Cilj raziskovalnega dela magistrske naloge je bil opredeliti vpliv variant gena za apolipoprotein E na vrednosti holesterola in trigliceridov v plazmi pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1. V raziskavo smo vključili skupno 260 otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s sladkorno boleznijo tipa 1, za katere smo iz obstoječe medicinske dokumentacije pridobili klinične in antropometrične podatke. Na podlagi priporočenih mejnih vrednosti, smo bolnike razdelili v skupino z zvišano vrednostjo holesterola ($\geq 4,4$ mmol/L) oz. trigliceridov ($\geq 1,7$ mmol/L) in skupino z normalno vrednostjo holesterola ($< 4,4$ mmol/L) oz. trigliceridov ($< 1,7$ mmol/L). Preiskovani bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1 in povišanimi koncentracijami holesterola ali trigliceridov so imeli pogosteje višji indeks telesne teže in bolj neurejeno sladkorno bolezen, bolniki s povišanimi vrednostmi holesterola pa dodatno še višjo telesno težo in povišan diastolični krvni tlak. Z genotipizacijo s sondami TaqMan smo opredelili prisotnost alelov gena za apolipoprotein E. Bolnike smo primerjali na podlagi opredeljenih alelov, kombinacij genotipa, osnovnih kliničnih značilnosti in laboratorijskih vrednosti plazemskih lipidov. Ugotovili smo, da je pri preiskovani populaciji najpogosteje zastopan alel e3 (84,8 %), najpogostejša kombinacija genotipa apolipoproteina E pa e3/e3 (71,5%). Statistični test ANOVA ni dokazal pomembnih razlik med kombinacijami genotipov oz. aleli gena za apolipoprotein E in testnimi parametri. S post hoc LSD testom smo dokazali, da imajo bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1, ki so nosilci kombinacije genotipa apolipoproteina E e4/e3, višje plazemske koncentracije holesterola. S tem dokazujemo, da na zvišano koncentracijo plazemskega holesterola bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1, poleg okolja, pomembno vpliva tudi posameznikovo genetsko ozadje. Dodatno smo dokazali še neopisano in nepojasnjeno povezavo kombinacije genotipa apolipoproteina E e3/e2 z zgodnejšim začetkom sladkorne bolezni tipa 1.

KLJUČNE BESEDE: sladkorna bolezen tipa 1, spremembe, gen za apolipoprotein E, holesterol, trigliceridi.

ABSTRACT

Variants in gene encoding apolipoprotein E have a major influence in lipid metabolism and represent a risk factor in development of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. The c.334T>C (rs429358) and c.472C>T (rs7412) polymorphisms in gene encoding apolipoprotein E determine 3 major alleles: e2, e3, e4 and 6 corresponding genotype combinations: e2/e2, e3/e2, e3/e3, e4/e3, e4/e2, e4/e4. Alleles encode 3 isoforms, which differ from each other by amino-acid substitutions at residues 112 and 158. The aim of this study was to determine the influence of variants in gene encoding apolipoprotein E on plasma concentrations of total cholesterol and triglycerides in patients with type 1 diabetes. A total of 260 children, adolescents and young adults with type 1 diabetes were included for whom we obtained clinical and anthropometric data from medical documentations. Based on recommended limit levels, the patients were divided into a group with elevated total cholesterol ($\geq 4,4$ mmol/L) or triglycerides ($\geq 1,7$ mmol/L) and a group with normal total cholesterol (< 4.4 mmol/L) or triglycerides ($< 1,7$ mmol/L). Patients with type 1 diabetes with elevated levels of total cholesterol or triglycerides more often had higher body mass index and poor glycemic control, additionally, patients with elevated total cholesterol had higher body weight and increased diastolic blood pressure. Apolipoprotein E genotyping was performed using TaqMan genotyping assay. Patients were compared on the basis of identified alleles, genotype combinations, basic clinical characteristics and plasma lipid concentrations. In the study population the most common allele was e3 (84, 8 %), the most common genotype combination was e3/e3 (71, 5 %). Statistical test ANOVA did not demonstrate significant differences between the combinations of genotype or alleles of the gene for apolipoprotein E and test parameters. Post hoc LSD test has demonstrated that type 1 diabetes patients, who are carriers of genotype combination e4/e3, have higher concentration of total plasma cholesterol. This demonstrates that elevated total plasma cholesterol in patients with type 1 diabetes is significantly influenced by individual's genetic background and not only the environmental factors. In addition, we have shown so far not described and unexplained connection between apolipoprotein E combination genotype e3/e2 and earlier onset of type 1 diabetes. **KEY WORDS:** diabetes type 1, variants, gene encoding apolipoprotein E, total cholesterol, triglycerides.

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ADA	Ameriško združenje za diabetes (angl. <i>American Diabetes Association</i>)
APOA	apolipoprotein A
APO(a)	apolipoprotein a
APOB	apolipoprotein B
APOC	apolipoprotein C
APOE	apolipoprotein E
APOE	gen za apolipoprotein E
Arg	arginin
ATS	ateroskleroza
BSO	bolezni srca in ožilja
CA-IMT	debelina intime medije (angl. <i>Carotid Artery Intima-Media Thickness</i>)
Cys	cistein
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
HDL	lipoprotein visoke gostote
HDL-C	holesterol HDL
HLA	humani histokompatibilni levkocitni sistem (angl. <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HOL	celokupni holesterol
HW	Hardy-Weinberg
IDDM	inzulinsko odvisna sladkorna bolezen (angl. <i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus</i>)
IDF	Mednarodna organizacija za sladkorno bolezen (angl. <i>International Diabetes Federation</i>)
ITM	Indeks telesne mase
LDL	lipoprotein nizke gostote

LDL-C	holesterol LDL
MODY	od inzulina neodvisna sladkorna bolezen, ki se pojavlja v mladosti (angl. <i>Maturity-onset diabetes of young</i>)
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. <i>Messenger Ribonucleic acid</i>)
NSB	nosečnostna sladkorna bolezen
OGTT	oralni glukozni tolerančni test
OR	razmerje obetov (angl. <i>Odds Ratio</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PHK	poglavitni histokompatibilni kompleks
SB	sladkorna bolezen
SBT1	sladkorna bolezen tipa 1
SBT2	sladkorna bolezen tipa 2
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
TG	trigliceridi
UV	ultravijolična svetloba (angl. <i>Ultra Violet</i>)
VLDL	lipoprotein z zelo nizko gostoto
VLDL-C	holesterol VLDL

1 UVOD

1.1 SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorno bolezen (SB) imenujemo tudi »*diabetes mellitus*«. Prvič so jo poimenovali že pred dvema tisočletjema, ko je grški zdravnik Areteus opazil, da ima urin bolnikov sladek okus (1, 2). SB zajema skupino presnovnih bolezni, katerih skupna lastnost je zvišana koncentracija glukoze v krvi, ki jo imenujemo hiperglikemija. Pri razvoju SB so udeleženi različni patološki procesi. Procesu obsegajo tako avtoimunsko uničenje β -celic Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, s posledičnim pomanjkanjem inzulina, kot tudi pojav neodzivnosti organizma na samo delovanje inzulina (3).

Simptomi hiperglikemije, ki se običajno pojavljajo, zajemajo: poliurijo (prekomerno nastajanje urina), polidipsijo (prekomerna žeja), polifagijo (povečan vnos hrane), hitro izgubo teže, motnje vida, hiperventilacijo, zmedenost in izgubo zavesti. Pri kronični obliki hiperglikemije lahko prihaja do zastoja v rasti, pojava kožnih okužb, vrtoglavice in utrujenosti. Posledica akutne oblike hiperglikemije, ki je lahko življenjsko ogrožajoča, je predvsem ketoacidoza in diabetični aketotični hiperosmolarni sindrom. Kasnejši zapleti SB vključujejo: mikrovaskularne zaplete, med katere uvrščamo retinopatijo, nefropatijo in periferno nevropatijo ter makrovaskularne zaplete, med katere uvrščamo bolezni srca in ožilja (BSO) (3).

SB je močno razširjena kronična bolezen, ki je tako v Sloveniji kot tudi po svetu v porastu in predstavlja velik javni zdravstveno-ekonomski problem. Po podatkih Mednarodne organizacije za sladkorno bolezen (IDF; angl. *International Diabetes Federation*) iz leta 2013 je na svetu že 382 milijonov bolnikov, od tega 56 milijonov v Evropi. Predvidevajo, da bo do leta 2035 celokupno število sladkornih bolnikov naraslo na kar 592 milijonov. Porast števila bolnikov je predvsem odraz neprimerne življenjskega sloga, ki vključuje prekomeren vnos visoko-kalorične hrane in premalo telesne aktivnosti (4).

Inštitut za varovanje zdravja je leta 2007, na podlagi opravljene mednarodne raziskave, podal podatke o pogostosti in razširjenosti SB v Sloveniji. Po njihovih ugotovitvah je v Sloveniji 125.000 sladkornih bolnikov, kar pomeni 6,25 % celotne populacije (5).

1.1.1 Razdelitev sladkorne bolezni in statistični podatki

Sladkorno bolezen delimo na dva osnovna tipa:

- I. *Sladkorna bolezen tipa 1 (SBT1)*, ki se običajno pojavi pri otrocih in mladostnikih ter je prisotna pri približno 5-10 % vseh bolnikov s SB. Prvotno so SBT1 poimenovali tudi inzulinsko odvisna sladkorna bolezen (IDDM; angl. *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*) (1, 6, 7).
- II. *Sladkorna bolezen tipa 2 (SBT2)*, ki je dolgo klinično asimptomatska in se običajno pojavi pri odraslih po 40. letu starosti ter je prisotna pri približno 90 % vseh bolnikov s SB (6, 7).

1.1.1.1 Sladkorna bolezen tipa 1 in tipa 2

Na svetu je v zadnjih 50 letih prisoten stalen porast pogostosti SBT1. Strokovnjaki menijo, da je intenziven 4 % letni porast bolezni, povezan z medsebojnim vplivom genetske dovzetnosti in okoljskih dejavnikov. Najhitreje, kar 6 % letno, pogostost SBT1 narašča pri otrocih mlajših od 5 let (2).

Epidemiologijo SBT1 preučuje in raziskuje več skupin. Skupina »*The Epidemiology and Prevention of Diabetes*«, ki je bila ustanovljena leta 1989, spremlja podatke za skoraj 30 milijonov otrok v starostnem obdobju od 0 do 14 let. Največja epidemiološka študija, ki se je navezovala na pojavnost SBT1, je bila izvedena v okviru projekta »*Diamond*«, v katerega so vključili 114 držav z vsega sveta. Ugotovili so, da je pojavnost SBT1 po svetu izrazito geografsko spremenljiva, največje razlike se kažejo predvsem v Evropi. Najvišjo pojavnost opazimo v skandinavskih državah, med katerimi izstopa Finska, kjer je bila leta 2005 zabeležena pojavnost 64,2/100,000 otrok in mladostnikov. Primer države z nizko pojavnostjo je Portugalska s 13,2/100,000 (2, 8).

V Sloveniji pojavnost SBT1 redno spremljamo vse od leta 1970, ko je bil vzpostavljen register za SB. Zadnja analiza, ki je zajemala obdobje med leti 1991 in 2010, kaže pojavnost 12,2/100,000 otrok in mladostnikov v starosti do 14 let. Tako kot v ostalih srednje evropskih državah, je tudi v Sloveniji opazen trend stalnega porasta pojavnosti (2).

SBT2 je najpogostejša oblika SB. Pri tej obliki bolezni je značilno relativno pomanjkanje inzulina, zaradi neodzivnosti tarčnih tkiv in posledičen pojav hiperglikemije. Značilna je močna genetska pogojenost, ki se povezuje skupaj z vplivi okolja, med katere uvrščamo: vnos hranil, debelost in pomanjkanje telesne aktivnosti. Pri SBT2 je redko potrebno nadomeščanje inzulina, značilna pa je glukozurija, poliurija, elektrolitsko neravnovesje ter dehidracija. Predvsem pri starejših ljudeh, pri katerih je funkcija osmoreceptorjev oslABLjena, prihaja do izgube občutka za žejo in hiperglikemične hiperosmolarne kome. Pojav ketoacidoze je, zaradi vsaj delnega učinka inzulina, redek. V skupino SBT2 uvrščamo tudi od inzulina neodvisno SB, ki se pojavlja v mladosti- MODY (angl. *Maturity-onset diabetes of young*). To je redka oblika SB, za katero je značilno avtosomno dominantno dedovanje in disfunkcija β -celic ob odsotnosti inzulinske neodzivnosti in debelosti (6, 7).

1.1.1.2 Druge oblike sladkorne bolezni

Motnje v metabolizmu ogljikovih hidratov se lahko pojavljajo tudi pri različnih drugih stanjih, ki jih zato uvrščamo med druge specifične oblike SB. To skupino SB povezujemo z določenimi sekundarnimi vzroki, ki vključujejo: genske okvare v funkciji β -celic ali inzulina, bolezni trebušne slinavke, endokrinopatije ter genetske sindrome, kot sta Downov in Turnerjev sindrom. Pogost vzrok pojava SB je tudi izpostavljenost nekaterim kemikalijam in jemanje določenih vrst diabetogenih zdravil (6, 7).

Nosečnostna sladkorna bolezen (NSB) se pojavlja pri približno 7 % nosečnic, zaradi metabolnih in hormonskih sprememb, ki se pojavljajo med obdobjem nosečnosti. Za preprečevanje pojava prirojenih okvar ploda in razvoja SB pri materah v kasnejšem obdobju, je potrebna optimalno urejena glikemija tekom celotne nosečnosti, kontroliran vnos hranil s priporočeno dieto ter redno spremljanje razvoja ploda (6, 9).

Vmesni stanji, kjer je glukoza v krvi povišana nad normalno vrednostjo, vendar ne na nivoju diagnostičnih meril za SB, imenujemo motena toleranca za glukozo ali mejna bazalna glikemija. V to skupino jih uvrstimo glede na raven glukoze v krvi na tešče ali rezultat glukoznega tolerančnega testa (OGTT). Obe stanji sta označeni kot »*prediabetes*« in predstavljata dejavnik tveganja za razvoj SB ter BSO (7).

1.2 SLADKORNA BOLEZEN TIPA 1

Vzrok za razvoj te oblike SB je avtoimunsko uničenje β -celic Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, ki so odgovorne za izločanje hormona inzulina. Zaradi tega prihaja do pomanjkanja oz. neučinkovitega delovanja inzulina. Ob začetku zdravljenja SBT1 je le še manj kot 10 % funkcionalnih β -celic, ki so še sposobne sinteze inzulina. Zato je potrebno redno nadomeščanje inzulina z mehanskim injiciranjem ali inzulinsko črpalko (1, 2). SBT1 sodi med avtoimunske bolezni, zato se pogosto sočasno pojavljajo tudi druge avtoimunske bolezni kot so: celiakija, Hashimotov tiroiditis in druge oblike avtoimunskih bolezni ščitnice (10).

SBT1 lahko razdelimo na dve podskupini:

- I. *Imunsko-povzročena SBT1*, ki je prisotna pri 5 do 10 % vseh bolnikov s SB in predstavlja najpogostejšo obliko bolezni pri otrocih in mladostnikih (6, 9)
- II. *Idiopatska SBT1*, ki je mnogo redkejša oblika pri kateri ni prisotno avtoimunsko uničenje β -celic. Značilna je genetska pogojenost brez povezave z antigeni HLA. Prisotno je stalno pomanjkanje inzulina, značilna je tudi povečana nagnjenost k pojavu ketoacidoze (6, 9).

1.2.1 Etiopatogeneza sladkorne bolezni tipa 1

Trebušna slinavka je organ z dvojno vlogo. Eksokrini del tvori prebavne encime, ki se preko pankreatičnega in žolčnega voda izločajo v dvanajstnik. Endokrini del pa sestavljajo β -celice Langerhansovih otočkov, ki proizvajajo inzulin in C-peptid ter α -celice, ki proizvajajo hormon glukagon (2).

Pri SBT1 zaradi pomanjkanja glavnega anabolnega hormona, inzulina, glukoza ne more vstopati v inzulinsko-odvisne celice, kot so mišične celice (miociti) in maščobne celice (adipociti). Metabolizem je zato pod nadzorom drugega hormona, glukagona. Glukagon je antagonist inzulina, ki zavre glikolizo in lipogenezo ter stimulira glikogenolizo, lipolizo, ketogenezo in glukoneogenezo. Oslabljen prenos glukoze v kombinaciji z učinki glukagona, privede do pojava hiperglikemije. Ko koncentracija glukoze v plazmi preseže ledvični prag reabsorpcije, pride tudi do pojava glukoze v urinu (glukozurija). Ker je glukoza osmotsko aktivna, njeno izločanje spremlja povečana izguba vode, ti. osmotska diureza (2, 11).

Zaradi pospešene porabe energije iz rezervnih goriv, ti. maščob in beljakovin, prihaja do sproščanja trigliceridov (TG) v maščobnem tkivu, ki se v nadaljevanju razgradijo v proste maščobne kisline. Te preko krvi potujejo v jetra, kjer nastajata glavna ketona, β -hidroksibutirat in acetoacetat, ki sta organski kislini. Prekomerno nastajanje organskih kislin v telesu povzroči padec pH krvi, kar vodi v metabolno acidozo, ki jo pri SBT1 imenujemo diabetična ketoacidoza. Telo poskuša popraviti pH na normalno raven s pospešenim dihanjem, zato pri teh bolnikih zaznamo aceton v izdihanem zraku, ki ima značilen sladek vonj po gnilem sadju. Osebe z diabetično ketoacidozo izločajo aceton tudi v urinu, kjer ga lahko določimo (11, 12).

Patogeneza SBT1 zajema veliko število različnih in kompleksnih procesov, ki potečejo pred pojavom kliničnih znakov. Razvijejo se avtoprotitelesa, ki povzročijo aktivacijo ter infiltracijo avto-reaktivnih limfocitov v trebušni slinavki. Posledično ti procesi privedejo do uničenja β -celic trebušne slinavke. Za razvoj SBT1 so tako potrebni naslednji pogoji: dejavniki tveganja, genetska nagnjenost ter avtoimunsko uničenje β -celic. Ti pogoji v končni stopnji vodijo do pojava SBT1 s posledično pogostimi akutnimi in kroničnimi zapleti, ki to bolezen spremljajo (1, 13).

O vplivu določenih dejavnikov, ki povečujejo tveganje za razvoj SBT1, je bilo opravljenih veliko raziskav (14-28). Kljub temu dokončni dokazi, ki bi natančno določili vpliv dejavnikov tveganja za razvoj avtoimunskih procesov, še niso poznani. Na voljo je veliko hipotez, večina pa govori o skupnem vplivu več dejavnikov. Tako naj bi virusne oz. bakterijske okužbe, cepljenja, določena prehrana v obdobju otroštva, toksini, kemikalije,

stres ter številni drugi dejavniki, vplivali na imunsko deregulacijo in posledičen razvoj SBT1 (15, 19, 23, 25-28). Strokovnjaki so prepričani, da lahko skupek več različnih dejavnikov, pri osebi z genetsko nagnjenostjo, vodi v razvoj SBT1. Vsi ti dejavniki vplivajo na nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki poškodujejo tkivo in povzročijo propad β -celic. Posledično to vodi do presežka glukoze v krvi, ki je lahko toksična, saj v prisotnosti prehodnih kovin poteče avtooksidacija. Vsi ti procesi v končni stopnji vodijo do nastanka SBT1 (14, 16, 19, 21, 22, 25).

1.2.2 Genetski dejavniki v razvoju sladkorne bolezni tipa 1

Imunsko povzročena SBT1 je večinoma poligenska bolezen, kar pomeni, da je za razvoj potrebna okvara več genov. Monogenska oblika, kjer je vzrok bolezni posledica mutacije določenega gena, je zelo redka. Običajno se pojavi v sklopu kompleksnih avtoimunskih bolezni, kot sta avtoimunski poliendokrini sindrom tipa 1 (APS-I; angl. *Autoimmune polyendocrine syndrome I*) in sindrom IPEX, kjer gre za X-vezano imunodisregulacijo, poliendokrinopatijo in enteropatijo (angl. *Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) (15).

Dedni dejavniki so pri razvoju SBT1 pomembni, kar dokazuje dejstvo, da se SBT1 veliko pogosteje pojavlja v družinah s prisotno boleznijo. Genetska nagnjenost k razvoju SBT1, omogoča usmerjenost primarne preventivne oskrbe za družinske člane z opredeljeno SBT1. Vendar lahko s poznavanjem genskega ozadja pojasnimo le približno polovico primerov s SBT1 (16). Kljub vsemu je tveganje za razvoj SBT1 pri bolnikih s pozitivno družinsko anamnezo, v primerjavi z osebami brez družinske anamneze, približno 10- do 15-krat večje (17).

Genetska pogojenost SB je določena z geni, ki so povezani z imunsko funkcijo (16). Trenutno so najboljše poznani genetski dejavniki v razvoju SBT1, geni poglobitnega histokompatibilnega kompleksa (PHK) (angl. MHC; *Major Histocompatibility Complex*). Pri ljudeh sestavlja gensko družino humanega histokompatibilnega levkocitnega sistema (HLA; angl. *Human Leukocyte Antigen*) več kot 200 genov, ki se nahajajo blizu drug

drugega na kromosomskem mestu 6p21 (6, 13). HLA razreda I sestavljajo zapisi za molekule vrst HLA-A, HLA-B in HLA-C, razreda II pa zapisi za molekule vrst HLA-DP, HLA-DR, HLA-DQ. HLA razreda I se nahajajo na vseh celicah z jedrom in trombocitih, njihova vloga je predstavljanje peptidov citotoksičnim limfocitom T (CD8). HLA razreda II se nahajajo na antigen predstavitvenih celicah, kot so: limfociti B, dendritične celice in makrofagi (18).

Kombinacija specifičnih antigenov HLA razreda II in prisotnost protiteles, povezanih s SBT1, ima visoko pozitivno napovedno vrednost, vendar slabo občutljivost (19). 70 % bolnikov s SBT1 ima opredeljen genotip na HLA lokusu, ki je povezan z večjim tveganjem za pojav bolezni. Kljub povečanemu tveganju se zgolj pri 3-7 % teh bolnikov razvije SBT1. Več kot 90 % posameznikov s SBT1 ima haplotip HLA-DR3-DQB1*0201 ali HLA-DR4-DQB1*0302 (20). Največje tveganje za razvoj SBT1 pa imajo heterozigoti s prisotno kombinacijo teh haplotipov (19, 21). V slovenski populaciji bolnikov s SBT1 se haplotipi HLA-DR-DQ, ki imajo visoko tveganje oz. visoko zaščito, ne razlikujejo od ostalih kavkazijskih populacij. V Sloveniji je pri bolnikih s SBT1 najpogostejši haplotip HLA – DRB1*0301 – DQA1*0501 – DQB1* 0201 (19).

Poleg genov *HLA*, ki so najpomembnejši genetski dejavniki, lahko na povečano tveganje za razvoj SBT1 vplivajo tudi drugi geni. Med najpomembnejšimi je gen *INS*, ki kodira inzulin. Variante v genu *INS* vplivajo na vzpostavljanje imunske tolerance na molekulo inzulina v obdobju zgodnjega otroštva (14, 23). Naslednji pomemben gen je *PTPN22*, pri katerem zamenjava aminokislina arginin v triptofan na mestu 620 vpliva na razvoj SBT1. Gen kodira limfoidno tirozinsko fosfatazo, ki ima pomembno vlogo v signalni kaskadi limfocitov T (14, 15, 23). Dokazan je bil tudi vpliv nekaterih drugih genov, ki so prav tako vpleteni v potencialni razvoj SBT1: *IL2RA*, *SH2B3*, *ERBB3*, *PTPN2*, *CLEC16A*, *CTLA4* (15, 24).

1.2.3 Avtoimunsko uničenje β -celic trebušne slinavke

Imunsko-povzročena SBT1 se izrazi nenadno s hudimi kliničnimi znaki, kar je običajno le končni proces večletnega prikritega avtoimunskega procesa, pri katerem počasi propadajo β -celice Langerhansovih otočkov. Ob odkritju bolezni ima 85 do 90 % bolnikov prisotna avtoprotitelesa, ki pa so lahko prisotna že veliko let pred pojavom SBT1 (9). Glavna cirkulirajoča avtoprotitelesa, prisotna pri večini bolnikov z imunsko-povzročeno SBT1, so:

- protitelesa proti celicam trebušne slinavke (ICA; angl. *Islet cell autoantibodies*),
- protitelesa proti dekarboksilazi glutaminske kisline 65 (GAD65; angl. *Glutamic acid decarboxylase autoantibodies*),
- protitelesa proti tirozinski kinazi (IA-2 oz. ICA 512; angl. *Tyrosine Phosphatase Autoantibodies*) in
- protitelesa proti inzulinu (IAA; angl. *Insulin autoantibodies*) (25).

V razvoj SBT1 so udeleženi limfociti B, ki se razvijejo v plazmatke in proizvajajo protitelesa (26). Avtoprotitelesa, ki jih proizvajajo plazmatke, predstavljajo uvod v razvoj avtoimunosti. Limfociti B so tudi aktivno udeleženi v predstavljanje lastnih antigenov celicam T pomagalkam (CD4) in celicam T zaviralkam (CD8) (1). Limfociti T CD8 uničijo β -celice Langerhansovih otočkov z aktivacijo preko PHK I, ki je izražen na površini β -celic. Dokazali so tudi, da lahko pomanjkanje β -2 mikroglobulina, ki je del PHK I kompleksa, zavre razvoj bolezni in prepreči uničenje β -celic trebušne slinavke (27). Uničenje β -celic z limfociti T CD8 lahko poteče po dveh poteh. V perforin-grancimski poti limfociti T CD8 sproščajo litične granule v svojo bližnjo okolico. Druga pot pa vključuje povezavo preko receptorja smrti Fas in Fas-liganda. Limfociti T CD4 zagotavljajo predvsem pomoč limfocitom B in limfocitom T CD8 z izločanjem citokinov, kot je interlevkin 21 (IL-21) (28).

1.3 DISLIPIDEMIJA PRI SLADKORNI BOLEZNI

Debelost, inzulinska rezistenca in glukozna intoleranca lahko vodijo do motnje v metabolizmu lipoproteinov (dislipidemija) in pojava arterijske hipertenzije. Skupek teh sindromov opisujejo kot metabolni sindrom (29). Povezan je z resnimi zapleti, ki vključujejo povečano tveganje za končno ledvično odpoved ter pojav BSO, kot so koronarna arterijska bolezen, ateroskleroza (ATS) in tromboza (30, 31). BSO so zato pri osebah s SB najpogostejši vzrok zgodnejše umrljivosti (32).

Med najpomembnejše dejavnike tveganja za nastanek ATS spadajo slabo urejena SB, povišan krvni tlak, dislipidemija, debelost in kajenje (32). Urejenost SB spremljamo z merjenjem glikiranega hemoglobina (HbA_{1C}), ki poda informacijo o povprečni koncentraciji glukoze v obdobju zadnjih dveh do treh mesecev (6). Prav tako je potrebno redno spremljanje plazemskih koncentracij lipidov, ki zajema merjenje celokupnega holesterola (HOL), holesterola HDL (HDL-C), holesterola LDL (LDL-C) in TG. V raziskavi, ki je vključevala tri starostne skupine otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s SBT1, so dokazali signifikanten trend naraščanja plazemske koncentracije HOL in LDL-C glede na starost. Vrednost HOL nad 5,2 mmol/L je bila v skupini 0,25-11 let prisotna pri 18 %, v skupini 12-16 let pri 27 % in v skupini 17-26 let pri 31% preiskovancev s SBT1. Vrednost LDL-C nad 3,4 mmol/L je bila v najmlajši skupini prisotna pri 8 %, v drugi pri 11 % in v najstarejši skupini pri 15 % preiskovancev s SBT1 (33). Povezava med slabo urejenostjo SB in pojavom dislipidemije je bila dokazana v študiji, ki je vključevala bolnike s SBT1 in bolnike s SBT2 s prisotno ali odsotno kronično boleznijo ledvic (34). Signifikanten vpliv dobre urejenosti SB na nižje vrednosti plazemskih koncentracij lipidov pri otrocih in mladostnikih s SBT1, so prikazali tudi v raziskavi, ki se je izvajala v okviru programa »*SEARCH for Diabetes in Youth*«. Dokazali so, da porast HbA_{1C} iz 8 % na 10 % vpliva na zvišanje HOL za 0,32 mmol/L, na drugi strani pa padec HbA_{1C} iz 10 % na 8 %, zniža koncentracijo HOL za 0,24 mmol/L (35).

Običajno za spremljanje bolnikov uporabljamo tudi antropometrične meritve, ki obsegajo telesno višino, telesno težo, obseg trebuha ter indeks telesne mase (ITM). Raziskave kažejo, da je življenjska doba oseb s SB v povprečju 5 do 10 let krajša v primerjavi s

populacijo brez SB. Najpogostejši vzrok zgodnje smrtnosti pri odraslih s SBT1 so spremembe velikih žil zaradi zgodnje ATS, ki jih imenujemo tudi makroangiopatije. Med makroangiopatije uvrščamo bolezni koronarnih arterij, s posledično ishemično boleznijo srca kot so: srčni infarkt, angina pektoris, srčno popuščanje in motnje srčnega ritma. V to skupino sodijo tudi cerebrovaskularne bolezni (npr. možganska kap) in periferna arterijska bolezen, ki zaradi kritične ishemije lahko vodi tudi do amputacije stopala (32). Pri otrocih s SBT1 se večinoma pojavljajo mikroangiopatije (retinopatija, nefropatija) in predstopnje razvoja ATS (36).

Nedavne raziskave so pokazale, da je ultrazvok uporabna neinvazivna tehnika odkrivanja zgodnjih aterosklerotičnih sprememb v karotidnih arterijah (37, 38, 39). Dokazali so, da je povečana debelina intime medije (CA-IMT; angl. *Carotid Artery Intima-Media Thickness*) značilno povezana s pojavom karotidnega plaka, ki predstavlja napredovano stopnjo ATS. V eni izmed študij, so dokazali povečano debelino intime medije tudi pri otrocih in mladostnikih s SBT1 (40). Kasneje je ista raziskovalna skupina dokazala, da naj bi imele za razvoj ATS pri bolnikih s SBT1 pomembno in ključno vlogo predvsem variante gena *APOE*, ki kodira apolipoprotein E (*APOE*). V zaključku raziskave so dokazali, da ima kombinacija genotipov *APOE* signifikanten vpliv na večje tveganje za razvoj ATS (41).

Na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove na Pediatrični kliniki v Ljubljani poteka redno spremljanje otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s SBT1. Lipidni status preverijo ob postavitvi diagnoze SBT1 in nato enkrat letno v sklopu rednih kontrol. To omogoča zgodnje prepoznavanje otrok s povišanimi vrednostmi lipidov in učinkovito preprečevanje kasnejših zapletov (32). Po podatkih zdravstvene in nacionalne prehranske raziskave (NHANES; angl. *National Health and Nutrition Examination Survey*) je pogostost dislipidemije pri splošni populaciji mladostnikov (12-19 let) 23 %. Ti podatki dokazujejo, da ima tudi velik delež mlade in navidezno zdrave populacije zvišane vrednosti plazemskih lipidov ter s tem večje tveganje za razvoj BSO (42).

Ker SBT1 uvrščajo v skupino bolezni in stanj z visoko stopnjo tveganja za razvoj BSO (36, 43, 44), je priporočena meja vzdrževanja nivoja lipidov v krvi pri SBT1 nizka, z namenom preventivnega preprečevanja pojava ATS in drugih zapletov. Meja vzdrževanja nivoja

HOL je 4,4 mmol/L. Vrednosti HOL nad 4,4 mmol/L uvrščamo v kategorijo zvišanih vrednosti, zato je pri teh bolnikih nujno potrebno ukrepanje z uvedbo ustrezne terapije. Priporočena meja za vrednosti TG v krvi pri SBT1 znaša 1,7 mmol/L (36, 43-48).

1.4 APOLIPOPROTEINI

Lipoproteini so po obliki okrogli delci velikosti od 10 do 1200 nm. Sestavljeni so iz lipidov in proteinov, ki jih imenujemo apolipoproteini. Glavna naloga lipoproteinov je dostava hranilnih snovi do celic. Apolipoproteini se nahajajo na površini lipoproteinskih delcev. Njihova naloga je ohranjanje strukturne integritete lipoproteinov, služijo kot ligandi za celične receptorje in imajo lastnosti aktivatorjev/inhibitorjev različnih encimov, ki spreminjajo lipoproteinske delce. Med apolipoproteine, ki se lahko nahajajo na različnih lipoproteinskih delcih uvrščamo: APOA-I, APOA-II, APOA-IV, APOB-100, APOB-48, APOC-I, APOC-II, APOC-III, APOE, APO(a) (6).

1.4.1 Zgradba, struktura in funkcija apolipoproteina E

APOE je multifunkcionalen protein, ki ima pomembno vlogo v metabolizmu lipidov in lipoproteinov, razvoju SB, debelosti, BSO, ATS ter degenerativnih sprememb živčevja (49, 50). APOE je polipeptid, sestavljen iz 299 aminokislin z molekulsko maso 34200 Da. Primarno ga sintetizirajo in izločajo hepatociti, sinteza pa poteka tudi v makrofagih, vključno z mikroglijo (50). Nahaja se na LDL, VLDL in HDL. APOE na periferiji sodeluje pri prenosu TG, fosfolipidov, HOL ter estrov HOL v celice. Služi kot ligand za LDL receptor, ki se nahaja na jetrnih in drugih celicah, ter kot ligand za receptor hilomikronskih ostankov. APOE ima zato ključno vlogo v metabolizmu plazemskih lipoproteinov in HOL (51). V centralnem živčnem sistemu je APOE glavni apolipoprotein, najdemo ga tudi v perifernem živčnem sistemu, kjer ga proizvajajo ne-mielinizirane Schwannove celice, ganglijske satelitske celice in makrofagi (52). V centralnem živčnem sistemu je potreben za prevzem in prerazporeditev HOL, podobno kot na periferiji (53).

Gen *APOE*, ki kodira APOE, je polimorfen in se nahaja na kromosomskem mestu 19q13.2. Obsega 3700 nukleotidov in je sestavljen iz štirih eksonov, ločenih s tremi introni (54). *APOE* je del genske družine, kamor uvrščamo še gene za apolipoproteine A-I, A-II, C-I, C-II in C-III. Nahaja se na lokusu v skupini skupaj z genom *APOC-I*, *APOC-II* ter psevdogenom *APOC-I'* (55). V genu *APOE* je znanih več sprememb med katerimi sta najpogostejša dva polimorfizma. Pri prvem se na aminokislinskem mestu 112 zamenja cistein z argininom (p.Cys112Arg) zaradi enonukleotidne zamenjave nukleotida T s C (c.334T>C); gre za polimorfizem, ki je v bazi dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) zaveden pod šifro rs429358. Pri drugem pride do zamenjave arginina s cisteinom in sicer na aminokislinskem mestu 158 (p.Arg158Cys) zaradi enonukleotidne zamenjave nukleotida C s T (c.472C>T) (43); v bazi dbSNP ima šifro rs7412. Spremembi se nahajata v eksonu 4 in določata tri različne alele: e2, e3, e4. Aleli kodirajo tri izoproteine APOE: E2, E3 in E4, ki se med seboj razlikujejo v eni oz. dveh aminokislinah (Preglednica I). Prisotne razlike v interakcijah s površinskimi celičnimi receptorji vplivajo na metabolizem s TG-bogatih lipoproteinov (56). Gen *APOE* ima glede na ti dve genetski spremembi šest pripadajočih kombinacij genotipa (Preglednica II). V splošni populaciji je najpogostejši alel e3, zato je sprejet kot normalni alel (57, 58).

Preglednica I. Razlike med aleli gena *APOE* in izoproteini APOE (54).

	Sprememba c.334T>C v kodonu za Cys na mestu 112 (rs429358)	Sprememba c.472C>T v kodonu za Arg na mestu 158 (rs7412)
alel e2 (APOE2)	-TGC- (cistein)	-TGC- (cistein)
alel e3 (APOE3)	-TGC- (cistein)	-CGC- (arginin)
alel e4 (APOE4)	-CGC- (arginin)	-CGC- (arginin)

Preglednica II. Sestava kombinacije genotipov APOE (54, 56).

Izoprotein APOE	Kombinacija genotipa APOE	alel 1		alel 2	
		rs429358	rs7412	rs429358	rs7412
E2	e2/e2	T	T	T	T
	e3/e2	T	C	T	T
E3	e3/e3	T	C	T	C
	e4/e2	C	C	T	T
E4	e4/e3	C	C	C	T
	e4/e4	C	C	C	C

1.4.2 Apolipoprotein E in sladkorna bolezen tipa 1

Variante gena *APOE* predstavljajo odločilen dejavnik v procesu razvoja sprememb v metabolizmu lipoproteinov in s tem dejavnik tveganja za razvoj BSO v odrasli dobi pri bolnikih s SBT1 (41, 43). V raziskavah so primerjali zdrave preiskovance s kombinacijo genotipov *APOE* e3/e3 s preiskovanci, ki so nosilci alela e2 oz. e4. Ugotovili so, da je alel e2 povezan z visokimi koncentracijami APOE in nizkimi koncentracijami LDL-C v plazmi ter nizkim tveganjem za razvoj BSO pri zdravih preiskovancih. Na drugi strani alel e4 povezujejo z nizkimi koncentracijami APOE, zvišanimi vrednostmi HOL, LDL-C in VLDL-C v plazmi ter s povečanim tveganjem za razvoj BSO v primerjavi s homozigoti e3/e3 (57, 59).

Na mišjih modelih s pomanjkanjem APOE so dokazali razvoj hude oblike dislipidemije ter pojav aterosklerotičnih lezij (60). Znana je povezava med kombinacijo genotipov *APOE* e4/e4 in povečano debelino intime medije (CA-IMT) ter razvojem koronarne bolezni arterij pri SBT1. Dokazana povezava je bila neodvisna od antropometričnih meritev in lipidnega statusa. Ugotovili so tudi, da kombinacija genotipa e4/e4 predstavlja pomemben dejavnik tveganja za povečano debelino intime medije in razvoj ATS pri otrocih s SBT1 (41). Novejše študije kažejo, da je APOE zaradi svoje vpletenosti v metabolizem lipoproteinov, lahko tudi dejavnik tveganja v razvoju treh značilnih zapletov SBT1, in sicer diabetične nefropatije, retinopatije in periferne nevropatije (58, 61). Različne študije so pokazale tudi signifikantno povezavo med aleli e4 in tveganjem za razvoj Alzheimerjeve bolezni (61, 62).

2 NAMEN DELA

Slabo urejena sladkorna bolezen in dislipidemije spadajo med najpomembnejše dejavnike tveganja za razvoj ateroskleroze. Ta vodi v razvoj bolezni srca in ožilja, ki so najpogostejši vzrok zgodnejše umrljivosti pri osebah s sladkorno boleznijo. Delež bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 in povišanimi vrednostmi celokupnega holesterola dokazano narašča od otroštva do zgodnje odrasle dobe. Možen vzrok je lahko v variantah gena *APOE*, ki predstavljajo dejavnik tveganja za razvoj sprememb v metabolizmu lipidov in lipoproteinov.

Namen dela: Namen dela je opredelitev do sedaj še neopisane povezave vpliva variant gena *APOE* na vrednosti plazemskih koncentracij lipidov v slovenski populaciji otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s sladkorno boleznijo tipa 1.

Namen dela zajema naslednje specifične cilje:

- Z uporabo analizne metode genotipizacije s sondami TaqMan® bomo določili prisotnost izbranih variant gena *APOE* v slovenski populaciji otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s sladkorno boleznijo tipa 1 in sicer:
 - ~ spremembe c.472C>T (p.Arg158Cys) v genu *APOE* (rs7412)
 - ~ spremembe c.334T>C (p.Cys112Arg) v genu *APOE* (rs429358).
- Posameznemu preiskovancu bomo določili pripadajočo kombinacijo genotipa *APOE* (e2/e2, e3/e2, e4/e2, e3/e3, e4/e3, e4/e4).
- Iz obstoječe medicinske dokumentacije bomo za posameznega bolnika pridobili klinične in antropometrične podatke. S pomočjo statističnih metod bomo skušali dokazati povezavo med posamezno kombinacijo genotipa *APOE* oz. alelom gena *APOE* in koncentracijami plazemskih lipidov pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 oz. drugimi pridobljenimi kliničnimi podatki.
- Ugotovili bomo povezave med določenim genotipom in fenotipom bolnikov.

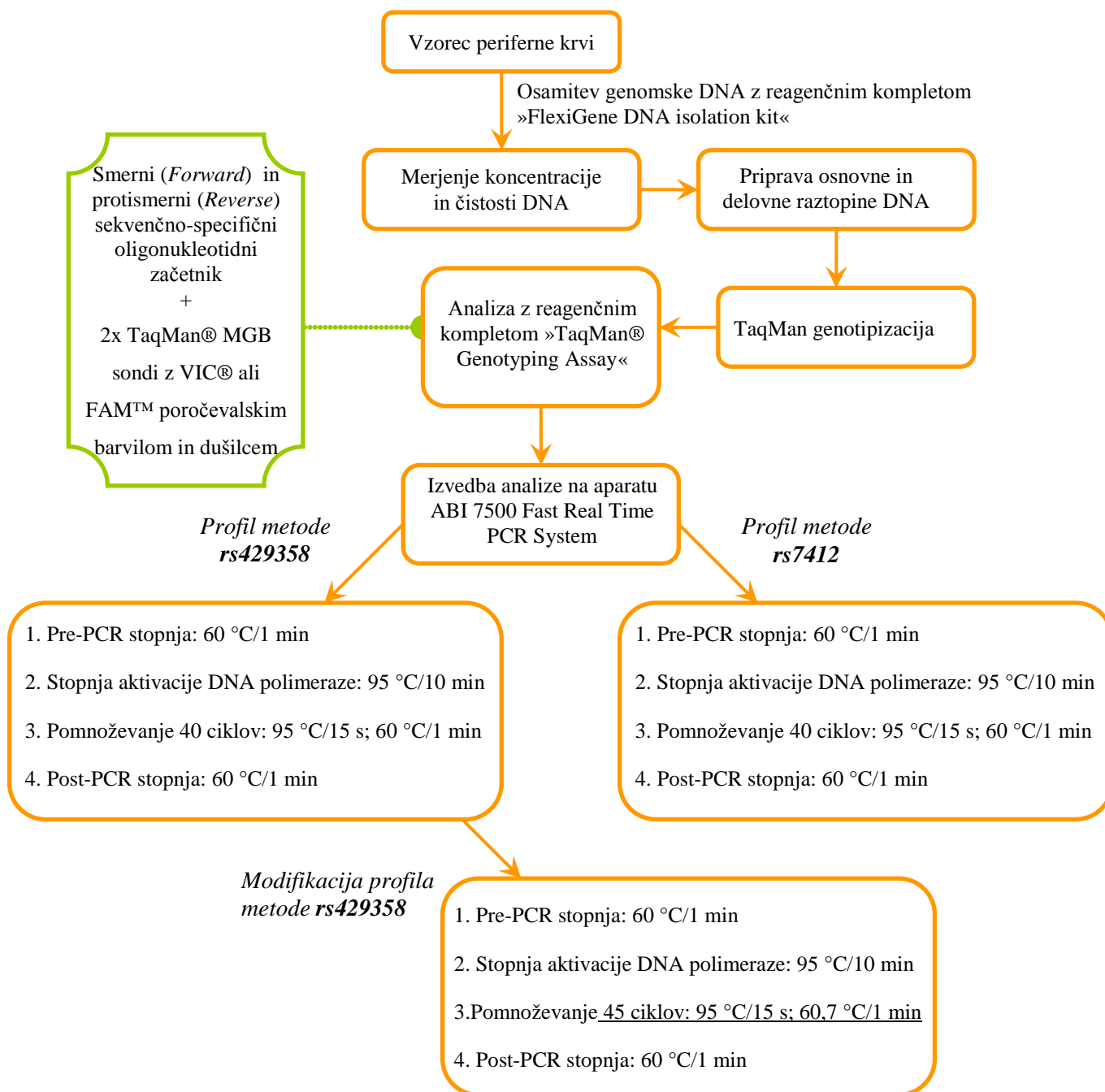
3 PREISKOVANCI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 260 bolnikov s SBT1, ki so vodeni na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove na Pediatrični kliniki v Ljubljani. Klinične in antropometrične podatke smo pridobili iz nacionalnega registra v katerega so vključeni otroci, mladostniki in mlajši odrasli s SBT1 in obstoječe medicinske dokumentacije. Za posameznega bolnika smo pridobili podatke o spolu, rojstnem datumu, letu začetka bolezni, prisotnosti zapletov SBT1, vrednosti HbA_{1C} in plazemski koncentraciji HOL in TG. Izmed antropometričnih meritev smo pridobili podatke o telesni teži in višini ter krvnem tlaku. Vsem bolnikom smo določili kombinacijo genotipa *APOE* in jih na podlagi tega razdelili v šest skupin: e2/e2, e3/e2, e4/e2, e3/e3, e4/e3, e4/e4.

3.2 METODE

Pri laboratorijskem delu smo si za lažje in bolj sistematično izvajanje metod izdelali shemo poteka dela (Slika 1).



Slika 1: Shema poteka dela.

3.2.1 Osamitev genomske DNA iz levkocitov periferne krvi

Genomsko DNA smo osamili iz levkocitov periferne krvi po uveljavljenem laboratorijskem postopku z reagenčnim kompletom FlexiGene DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). V 50 mL centrifugirko (Falcon) smo prenesli 5 mL periferne venske krvi, odvzete z inhibitorjem koagulacije krvi EDTA, dodali 12,5 mL pufru za lizo celic FG1, premešali in centrifugirali 5 min pri 2000 x g. Supernatant smo zavrgli in oborini dodali 2,5 mL pufru za denaturacijo FG2, ki vsebuje proteazo. Sledila je homogenizacija in 10-minutna inkubacija pri 65 °C. Raztopina je v stopnji inkubacije spremenila barvo iz rdeče v olivno zeleno, kar je kazalo na razpad proteinov. DNA smo oborili z dodatkom 2,5 mL 100 % izopropanola. Po 3-minutnem centrifugiranju pri 2000 x g smo supernatant zavrgli. Oborino smo sprali z 2,5 mL 70 % etanola. Sledilo je ponovno 3-minutno centrifugiranje pri 2000 x g. Oborino, kjer se je nahajala DNA smo posušili in nato raztopili v 0,5 mL pufru za hidracijo FG3 na 65 °C.

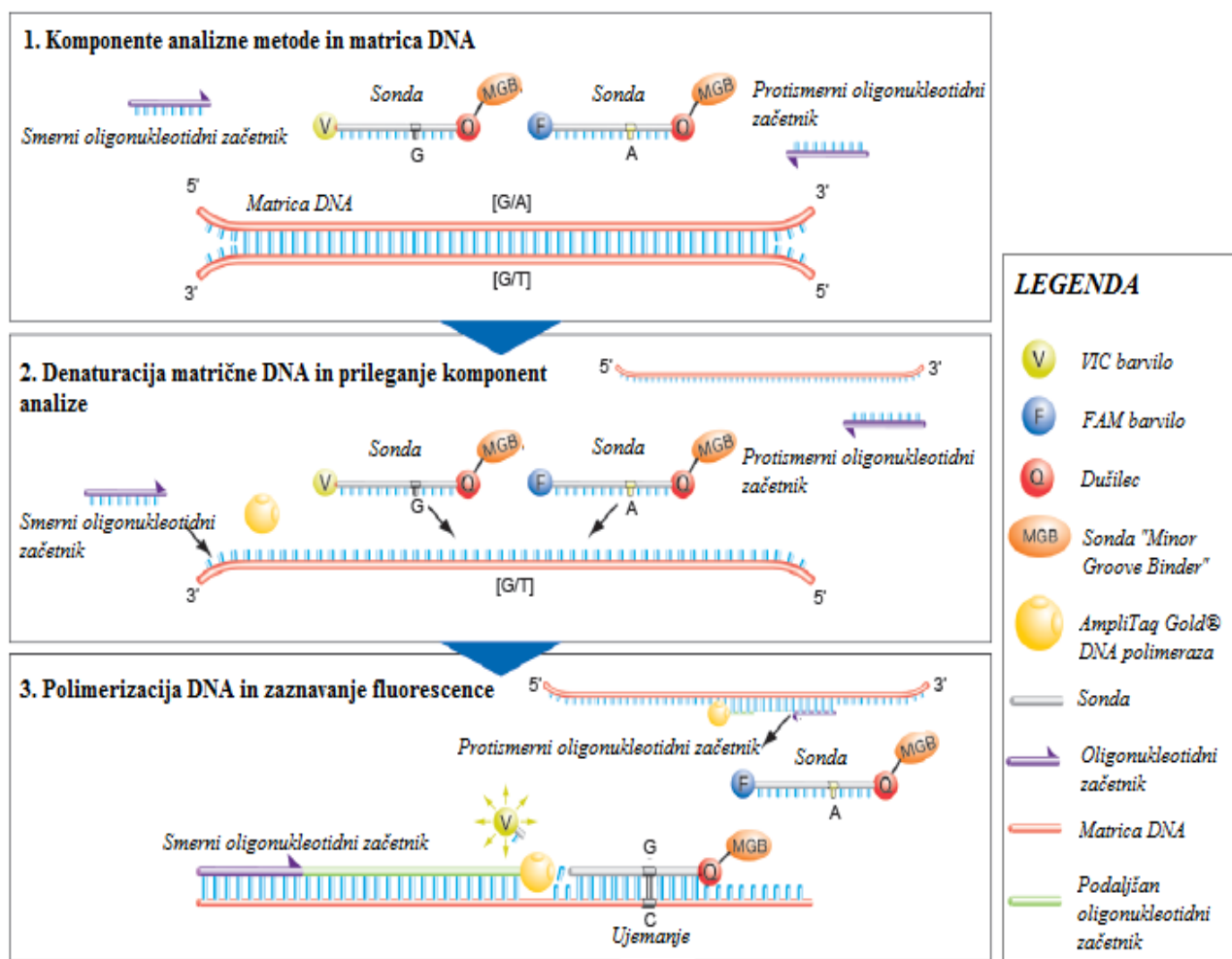
Koncentracijo in čistost DNA v vzorcih smo določili spektrofotometrično, z merjenjem absorpcije svetlobe pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm. Baze v molekuli DNA absorbirajo UV svetlobo z največjo absorbanco pri valovni dolžini 260 nm, zato je količina DNA v raztopini premosorazmerna z absorbanco pri 260 nm. Večina proteinov ima največjo absorpcijo UV svetlobe pri 280 nm. Razmerje med A_{260}/A_{280} nam pove čistost DNA oz. stopnjo kontaminacije vzorca s proteini. Vzorec je primeren za nadaljnje molekularno-genetske preiskave, če je razmerje A_{260}/A_{280} med 1,7 in 2,0.

Pred uporabo smo za vsak vzorec pripravili osnovno raztopino DNA s koncentracijo 100 ng/ μ L in pripravili delovno raztopino s koncentracijo 5 ng/ μ L.

3.2.2 Genotipizacija s sondami TaqMan

Za določanje izbranih variant gena *APOE* smo uporabili metodo genotipizacije, ki temelji na pomnoževanju specifičnih odsekov DNA z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (RT-PCR; angl. *Real-Time PCR*). Analize z genotipizacijo s sondami TaqMan® (ABI (Foster City, CA, ZDA) zagotavljajo optimizirano metodo in zelo prilagodljivo tehnologijo detekcije variant gena v različnih genomih. Predstavljajo preprost in hiter način pridobivanja podatkov genotipizacije ter zagotavljajo rezultate z visoko stopnjo zanesljivosti (63, 64).

Pri eksperimentalnem delu smo za posamezno analizirano spremembo uporabili dve komercialno dostopni alelni specifični hidrolizni sondi TaqMan.



Slika 2: Princip genotipizacije s sondami TaqMan® (povzeto po 64).

Sonda je eno-verižno oligonukleotidno zaporedje, komplementarno tarčnemu zaporedju, na 5' koncu označena s fluorescentnim poročevalskim barvilom na 3' koncu pa z dušilcem. Barvilo VIC® je vezano na 5' konec sonde za alel 1 in barvilo FAM™ na 5' konec sonde za alel 2 (Slika 2). To nam omogoča hkratno določitev dveh različnih nukleotidov na izbranem mestu tarčnega zaporedja v genu *APOE* (63). Med podaljševanje oligonukleotida in sintezo nastajajoče nove verige AmpliTaq Gold® DNA polimeraza s svojo 5' proti 3' eksonukleazno aktivnostjo, povzroči hidrolizo sonde. Pri intaktni sondi prihaja do fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz poročevalskega barvila na dušilec, zato fluorescence ne zaznamo. Ob hidrolizi sonde se poročevalsko barvilo in dušilec ločita, s tem ne prihaja več do oviranja signala in posledično zaznamo fluorescenco, ki jo povzroča fluorofor. Nastalo fluorescenco poročevalskega barvila, ki je premosorazmerna s pomnoževanjem PCR produkta, zazna senzor v napravi, ki izmeri jakost signala (64).

3.2.2.1 Potek analize

Pri analizi smo uporabili komercialno dostopen reagenčni komplet SNP TaqMan® Genotyping Assay (Applied Biosystems), ki vsebuje naslednje komponente:

- sekvenčno-specifičen oligonukleotidni začetnik, smerni (angl. *Forward*) in protismerni (angl. *Reverse*), za pomnoževanje polimorfne tarčnega zaporedja
- dve TaqMan sondi označeni z VIC® ali FAM™ barvilom za razlikovanje med dvema aleloma (63).

Analizo alelne diskriminacije smo izvedli na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA). Za detekcijo spremembe rs7412 (c.472C>T; p.Arg158Cys) v genu *APOE* smo uporabili komercialni komplet C_904973_10, za detekcijo spremembe rs429358 (c.334T>C; p.Cys112Arg) v genu *APOE* pa smo uporabili komplet z oznako C_3084793_20 (oba Applied Biosystems, Warrington, UK).

Za izvedbo analize smo pripravili reakcijsko mešanico, v katero smo za 96 analiz, dodali:

- 500 μL komercialno dostopne pred-pripravljene reakcijske mešanice TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA)
- 10 μL TaqMan® MGB (angl. *Minor Groove Binder*) sonde (VIC® ali FAM™ poročevalsko barvilo in dušilec)
- 2,9 μL destilirane vode.

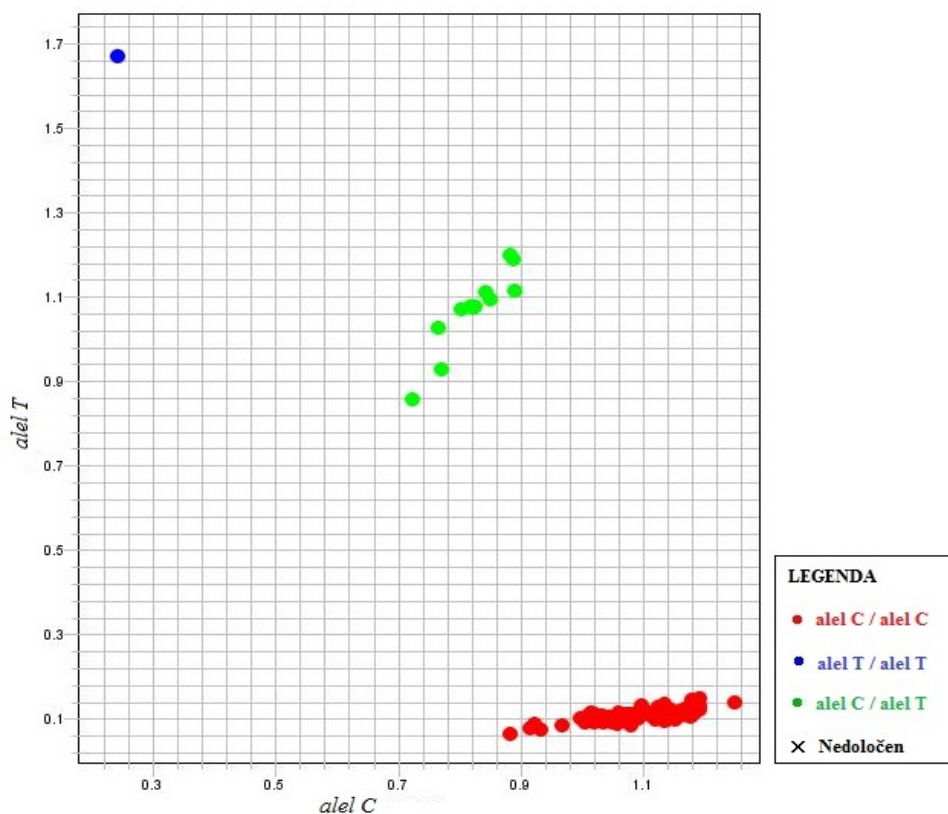
V reakcijsko ploščico s 96 vdolbinicami (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) smo nato dodali 2 μL delovne raztopine DNA (konc. 5 ng/ μL) ter 8 μL reakcijske mešanice. Končni volumen raztopine na vzorec je bil 10 μL . Ploščico smo nato zatesnili z optičnim lepilnim filmom (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA), jo vorteksirali in centrifugirali ter takoj izvedli analizo.

3.2.2.2 Profil metode

Profil metode za analizo na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System je zajemal naslednje stopnje:

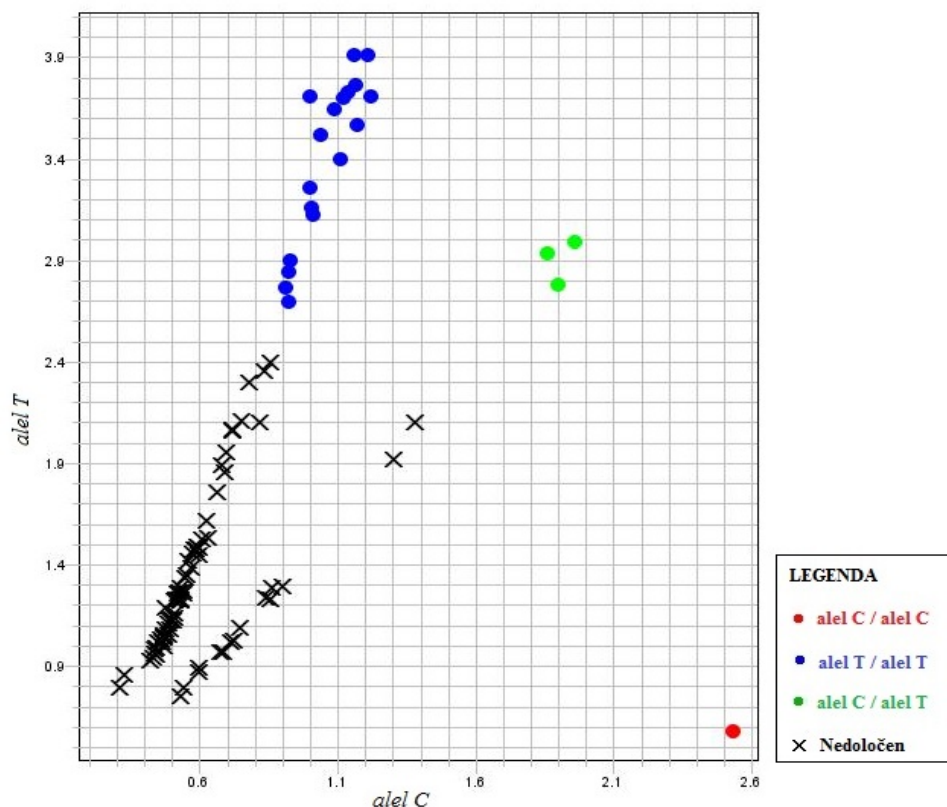
- Pre-PCR stopnja: 60 °C/1 min
- Stopnja aktivacije DNA polimeraze: 95 °C/10 min
- Pomnoževanje 40 ciklov: 95 °C/15 s; 60 °C/1 min
- Post-PCR stopnja: 60 °C/1 min.

Po končani analizi na aparatu smo pridobili podatke v obliki grafa in tabele.



Slika 3: Rezultat analize s kompletom TaqMan® Genotyping Assay za detekcijo spremembe v nukleotidu c.472C>T (rs7412) v genu APOE na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA).

Enak profil analize smo uporabili za določanje obeh analiziranih sprememb v genu *APOE*. Analiza je bila uspešna pri spremembi rs7412 (c.472C>T; p.Arg158Cys). Pri spremembi rs429358 (c.334T>C; p.Cys112Arg) so bili rezultati nezanesljivi, zato smo metodo modificirali in spremenili pogoje analize.

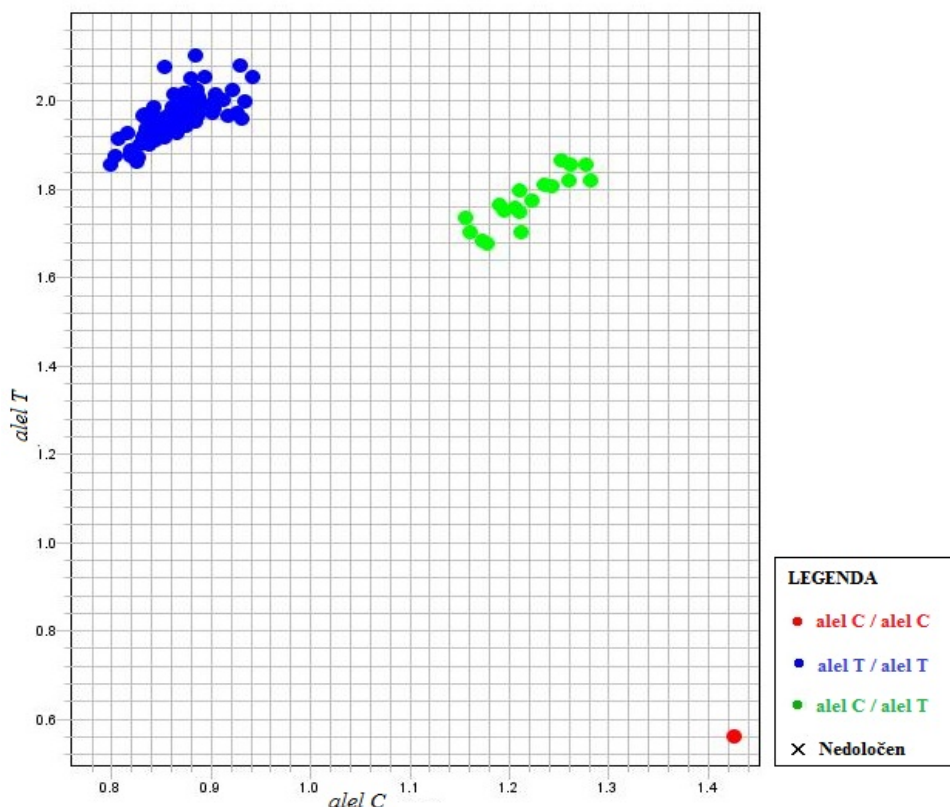


Slika 4: Rezultat analize izbranih variant gena s kompletom TaqMan® Genotyping Assay za detekcijo spremembe v nukleotidu c.334T>C (rs429358) v genu APOE na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) pri prvotnih pogojih analize.

Pri spremenjenem profilu analize na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System, za določanje spremembe rs429358 (c.334T>C; p.Cys112Arg), smo povečali število ciklov pomnoževanja in zvišali temperaturo naleganja oligonukleotidnih začetnikov in sond:

- Pre-PCR stopnja: 60 °C/1 min
- Stopnja aktivacije DNA polimeraze: 95 °C/10 min
- Pomnoževanje 45 ciklov: 95 °C/15 s; 60,7 °C/1 min
- Post-PCR stopnja: 60 °C/1 min.

Po končanem postopku smo izvedli analizo pridobljenih rezultatov po enakem principu kot pri predhodnih analizah.



Slika 5: Rezultat analize izbranih variant gena s kompletom TaqMan® Genotyping Assay za detekcijo spremembe c.334T>C (rs429358) v genu APOE na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA) pri optimiziranih pogojih analize.

3.2.3 Statistične metode in analiza

Eksperimentalno pridobljene podatke, klinične in antropometrične podatke za posameznega bolnika smo s pomočjo programske opreme Microsoft Office Excel 2010 vnesli v tabele. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program »Statistical Product and Service Solution« (SPSS) za Windows, verzija 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, ZDA).

Z uporabo Hardy-Weinbergovega (HW) ravnotežja smo preverili ter izračunali zastopanost alelov in razporeditev kombinacije genotipov v populaciji. Bistvo HW zakona je določitev ali so genotipi v ravnovesju, pri čemer morajo vrednosti P znašati nad 0,05.

V programu SPSS smo izmed možnih analiz izbrali deskriptivno statistiko ter uporabili model križnih tabel (angl. Crosstabs). S pomočjo te statistične analize smo določili razporeditev kombinacije genotipa *APOE* oz. alelov gena *APOE* pri bolnikih s SBT1 v skupini s povišanim HOL ($\geq 4,4$ mmol/L) in skupini z normalnim HOL ($< 4,4$ mmol/L). Po enakem postopku, vendar tokrat glede na vrednosti TG, smo določili razporeditev kombinacije genotipa *APOE* oz. alelov gena *APOE* v skupini s povišanimi vrednostmi TG ($\geq 1,7$ mmol/L) in skupini z normalnimi vrednostmi TG ($< 1,7$ mmol/L).

Z izbiro neodvisnega t-testa smo primerjali numerične vrednosti spremenljivk med skupino s povišanim HOL ($\geq 4,4$ mmol/L) oz. TG ($\geq 1,7$ mmol/L) in skupino z normalnim HOL ($< 4,4$ mmol/L) oz. TG ($< 1,7$ mmol/L) v krvi. Neodvisne spremenljivke pri analizi so bile spol, starost, telesna teža, telesna višina, ITM, sistolični krvni tlak, diastolični krvni tlak, starost ob začetku bolezni, trajanje SBT1 in povprečna vrednost HbA_{1C}, ki prikazuje urejenost SBT1. Spremenljivko smo opredelili kot statistično značilno, kadar je bila vrednost $P \leq 0,05$.

S parametričnim statističnim testom analize variance enega faktorja (ANOVA) in LSD post hoc testom smo opredelili razliko med posameznimi kombinacijami genotipov *APOE*. Med skupinami smo primerjali osnovne klinične značilnosti in laboratorijske vrednosti HOL, TG ter HbA_{1C} pri bolnikih s SBT1. Kombinaciji genotipa *APOE* e2/e2 in e4/e4 sta bili prisotni zgolj pri dveh bolnikih s SBT1, zato smo te dve skupini kombinacij genotipov izključili iz analize variance enega faktorja. Za oceno povezave osnovnih kliničnih značilnosti in laboratorijskih vrednosti bolnikov s SBT1 z aleli gena *APOE*, smo bolnike razdelili v tri skupine: alel e2, alel e3 in alel e4 ter izvedli test ANOVA. Statistično značilna razlika med prisotnimi kombinacijami genotipa *APOE* oz. aleli gena *APOE* je bila pri vrednosti $P \leq 0,05$.

4 REZULTATI

Pri bolnikih s SBT 1 smo z metodo genotipizacije s sondami TaqMan določali prisotnost dveh znanih sprememb gena *APOE*, in sicer rs429358 in rs7412. Glede na prisotnost alelov pri posamezni spremembi smo opredelili 6 možnih kombinacij genotipov *APOE*. V raziskavo smo vključili skupino 260 bolnikov s SBT1, ki je obsegala otroke, mladostnike in mlajše odrasle, ter jih primerjali na podlagi določene kombinacije genotipa *APOE* oz. alelov gena *APOE* in izmerjenih koncentracij plazemskih lipidov.

4.1 Osnovne klinične značilnosti bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1

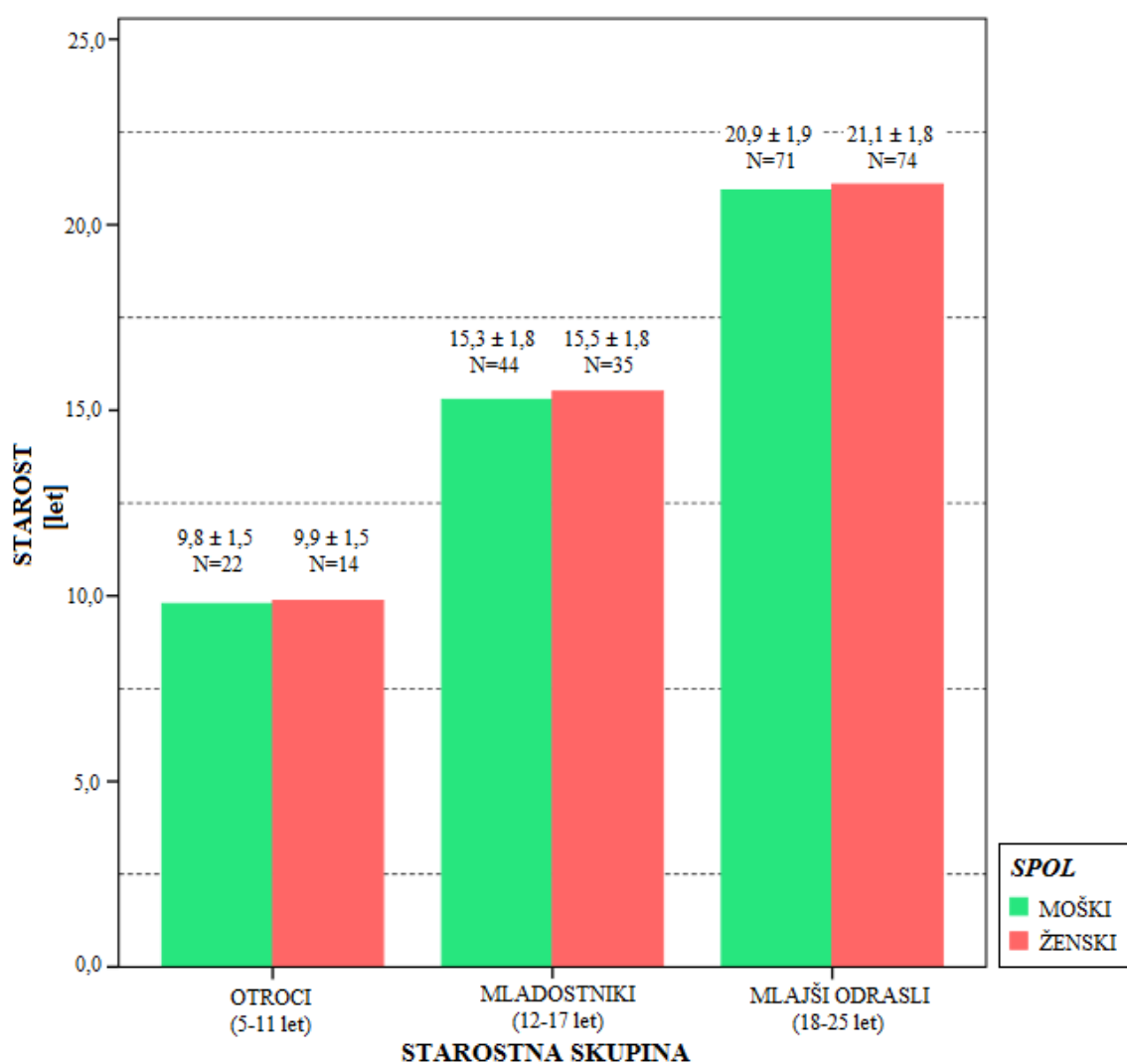
Osnovne klinične in antropometrične značilnosti bolnikov s SBT1 smo povzeli v preglednici (Preglednica III) in s pomočjo statističnega programa SPSS podali rezultate kot povprečna vrednost \pm standardna deviacija. Povprečna starost bolnikov je bila $17,8 \pm 4,4$ let, med njimi je bilo 123 žensk in 137 moških. Povprečna starost ob začetku bolezni je bila $7,5 \text{ let} \pm 4,0$, trajanje bolezni pa $10,3 \pm 4,0$ let. V povprečju je bil delež $\text{HbA}_{1\text{C}}$ $7,9 \pm 1,3$ %, koncentracija HOL $4,5 \pm 1,1$ mmol/L in TG $1,1 \pm 1,1$ mmol/L.

Preglednica III. Osnovne klinične značilnosti preiskovane populacije bolnikov s SBT1.

Spremenljivka	Vrednost (N=260)
Starost [let]	$17,8 \pm 4,4$
Spol [moški/ženski]	137/123
Telesna teža [kg]	$55,8 \pm 20,3$
Telesna višina [m]	$1,59 \pm 0,21$
ITM [kg/m^2]	$21,2 \pm 4,3$
Sistolični krvni tlak [mm Hg]	121 ± 16
Diastolični krvni tlak [mm Hg]	68 ± 10
Starost ob začetku bolezni [let]	$7,5 \pm 4,0$
Trajanje SBT1 [let]	$10,3 \pm 4,0$

Spremenljivka	Vrednost (N=260)
HbA _{1C} [%]	7,9 ± 1,3
HOL [mmol/L]	4,5 ± 1,1
TG [mmol/L]	1,1 ± 1,1

Preiskovano populacijo bolnikov s SBT1 smo razdelili v starostne skupine: otroci (5-11 let), mladostniki (12-17 let) in mlajši odrasli (18-25 let). V vsaki skupini smo prikazali podatke o številu bolnikov in njihovi povprečni starosti, razdeljeno glede na spol. Struktura skupine je prikazana v grafični obliki, z uporabo histograma (Slika 6).



Slika 6: Grafični prikaz strukture preiskovane populacije bolnikov s SBT1, razdeljene na posamezne starostne skupine. Podatki o številu bolnikov in njihovi povprečni starosti so prikazani nad vsakim stolpcem, razdeljeni posebej za moški in ženski spol.

Na podlagi priporočenih mejnih vrednosti smo bolnike razdelili v skupino z zvišano vrednostjo HOL ($\geq 4,4$ mmol/L) in skupino z normalno vrednostjo HOL ($< 4,4$ mmol/L). Osnovne klinične značilnosti bolnikov s SBT1 z zvišano oz. normalno vrednostjo HOL v krvi so podane v obliki povprečne vrednosti in standardne deviacije v Preglednici IV. Podane vrednosti *P* smo pridobili z uporabo neodvisnega t-testa. Statistično značilna razlika med obema skupinama bolnikov je prisotna pri telesni teži in ITM, diastoličnem krvnem tlaku in deležu HbA_{1C} (Preglednica IV).

Preglednica IV. Osnovne klinične značilnosti bolnikov s SBT1 z vrednostjo HOL pod 4,4 mmol/L (skupina SBT1 s HOL < 4,4 mmol/L) in bolnikov s SBT1 z vrednostjo HOL nad 4,4 mmol/L (skupina SBT1 s HOL $\geq 4,4$ mmol/L).

Spremenljivke	SBT1 s HOL < 4,4 mmol/L	SBT1 s HOL $\geq 4,4$ mmol/L	P vrednost
Starost [let]	17,3 \pm 4,6	18,2 \pm 4,3	0,092
Spol [moški/ženski]	72/52	65/71	0,098
Telesna teža [kg]	53,2 \pm 20,3	58,2 \pm 20,1	0,045
Telesna višina [m]	1,58 \pm 0,21	1,60 \pm 0,20	0,411
ITM [kg/m ²]	20,4 \pm 3,9	21,9 \pm 4,5	0,002
Sistolični krvni tlak [mm Hg]	120 \pm 15	122 \pm 17	0,353
Diastolični krvni tlak [mm Hg]	67 \pm 10	69 \pm 10	0,035
Starost ob začetku bolezni [let]	7,2 \pm 3,8	7,7 \pm 4,2	0,356
Trajanje SBT1 [let]	10,0 \pm 3,9	10,5 \pm 4,1	0,345
HbA _{1C} [%]	7,7 \pm 1,0	8,2 \pm 1,5	0,004

Na podlagi priporočenih mejnih vrednosti smo bolnike razdelili v skupino z zvišano vrednostjo TG ($\geq 1,7$ mmol/L) in skupino z normalno vrednostjo TG ($< 1,7$ mmol/L). Osnovne klinične značilnosti bolnikov s SBT1, ki imajo zvišano oz. normalno vrednost TG v krvi so podane v obliki povprečne vrednosti in standardne deviacije v Preglednici V.

Podane vrednosti *P* so rezultat neodvisnega t-testa. Statistično značilna razlika med obema skupinama bolnikov je prisotna pri ITM in deležu HbA_{1C} (Preglednica V).

Preglednica V. Osnovne značilnosti bolnikov s SBT1 z vrednostjo TG pod 1,7 mmol/L (skupina SBT1 s TG < 1,7 mmol/L) in bolnikov s SBT1 z vrednostjo TG nad 1,7 mmol/L (skupina SBT1 s TG ≥ 1,7 mmol/L).

Spremenljivke	SBT1 s TG < 1,7 mmol/L	SBT1 s TG ≥ 1,7 mmol/L	P vrednost
Starost [let]	17,7 ± 4,4	18,4 ± 4,7	0,346
Spol [moški/ženski]	120/107	17/16	0,885
Telesna teža [kg]	55,0 ± 20,0	61,4 ± 22,0	0,092
Telesna višina [m]	1,59 ± 0,20	1,60 ± 0,24	0,780
ITM [kg/m ²]	20,9 ± 4,1	23,0 ± 4,9	0,009
Sistolični krvni tlak [mm Hg]	121 ± 16	124 ± 18	0,258
Diastolični krvni tlak [mm Hg]	68 ± 10	66 ± 11	0,316
Starost ob začetku bolezni [let]	7,4 ± 4,0	7,5 ± 4,1	0,908
Trajanje SBT1 [let]	10,2 ± 4,0	10,9 ± 4,0	0,356
HbA _{1C} [%]	7,8 ± 1,2	8,8 ± 1,8	0,005

4.2 Genotipizacija izbranih variant gena *APOE* in povezava s plazemsko koncentracijo lipidov

Glede na rezultate genotipizaciji sprememb rs429358 in rs7412 smo posameznemu bolniku dodelili pripadajočo kombinacijo genotipa, kot so opisani v Preglednici II (str. 17). Z uporabo deskriptivne statistike v programu SPSS smo preiskovano populacijo razporedili v skupine z določeno kombinacijo genotipa ApoE ter podatke v Preglednici VI prikazali kot število in delež bolnikov s SBT1 z določeno kombinacijo genotipa oz. aleli gena *APOE*.

84,8 % analiziranih bolnikov s SBT1 je imelo prisoten alel e3, pri 71,5 % bolnikov v obliki kombinacije genotipa e3/e3 (Preglednica VI).

Preglednica VI. Razporeditev kombinacije genotipov APOE in alelov gena APOE pri bolnikih s SBT1.

Kombinacija genotipa APOE oz. aleli gena APOE	Bolniki s SBT1 (N)	Delež bolnikov s SBT1 (%)
e2/e2	1	0,4
e3/e2	25	9,6
e4/e2	3	1,2
e3/e3	186	71,5
e4/e3	44	16,9
e4/e4	1	0,4
alel e2	30	5,8
alel e3	441	84,8
alel e4	49	9,4

S statistično analizo podatkov z uporabo križnih tabel smo prikazali razporeditev kombinacije genotipov APOE in alelov gena APOE ločeno na dve skupini:

- vrednost HOL nad 4,4 mmol/L oz. vrednost HOL pod 4,4 mmol/L v krvi (Preglednica VII)
- vrednost TG nad 1,7 mmol/L oz. vrednost TG pod 1,7 mmol/L v krvi (Preglednica VIII).

84,7 % bolnikov s koncentracijo HOL pod 4,4 mmol/L in 84,9 % bolnikov s koncentracijo HOL nad 4,4 mmol/L je imelo prisoten alel e3, pri večini (72,6% oz. 70,6%) v obliki kombinacije genotipa e3/e3 (Preglednica VII).

Preglednica VII. Razporeditev kombinacij genotipov APOE in alelov gena APOE pri bolnikih s SBT1 na podlagi vrednosti HOL v krvi.

Kombinacija genotipa APOE oz. aleli gena APOE	Celokupni holesterol N (%)	
	< 4,4 mmol/L*	≥ 4,4 mmol/L*
e2/e2	1 (0,8)	0 (0,0)
e3/e2	14 (11,3)	11 (8,1)
e4/e2	3 (2,4)	0 (0,0)
e3/e3	90 (72,6)	96 (70,6)
e4/e3	16 (12,9)	28 (20,6)
e4/e4	0 (0,0)	1 (0,7)
alel e2	19 (7,7)	11 (4,0)
alel e3	210 (84,7)	231 (84,9)
alel e4	19 (7,7)	30 (11,0)

* HWE Hardy-Weinbergovo ravnotežje: P=0,4313 za skupino s HOL < 4,4 mmol/L in P=0,5158 za skupino s HOL ≥ 4,4 mmol/L.

85,0 % bolnikov s koncentracijo TG pod 1,7 mmol/L in 83,3 % bolnikov s koncentracijo TG nad 1,7 mmol/L je imelo prisoten alel e3, pri večini (72,2 % oz. 66,7 %) v obliki kombinacije genotipa e3/e3 (Preglednica VIII).

Preglednica VIII. Razporeditev kombinacij genotipov APOE in alelov gena APOE pri bolnikih s SBT1 na podlagi vrednosti TG v krvi.

Kombinacija genotipa APOE oz. aleli gena APOE	Trigliceridi N (%)	
	< 1,7 mmol/L *	≥ 1,7 mmol/L *
e2/e2	1 (0,4)	0 (0,0)
e3/e2	21 (9,3)	4 (12,1)
e4/e2	3 (1,3)	0 (0,0)
e3/e3	164 (72,2)	22 (66,7)
e4/e3	37 (16,3)	7 (21,2)
e4/e4	1 (0,4)	0 (0,0)
alel e2	26 (5,7)	4 (6,1)
alel e3	386 (85,0)	55 (83,3)
alel e4	42 (9,3)	7 (10,6)

* HWE Hardy-Weinbergovo ravnotežje: P=0,8508 za skupino s TG < 1,7 mmol/L in P=0,7244 za skupino s TG ≥ 1,7 mmol/L.

V Preglednici IX so navedeni rezultati analize variance enega faktorja (ANOVA), pri kateri smo bolnike s SBT1 razdelili v skupine glede na določeno kombinacijo genotipa APOE. Pri tej analizi smo dva bolnika, ki sta imela kombinacijo genotipa APOE e2/e2 oz. e4/e4, izključili iz analize zaradi zgolj enega primera kombinacije genotipa APOE v vsaki skupini. Med skupinami smo s primerjavo osnovnih kliničnih značilnosti in laboratorijskih vrednosti HOL, TG in HbA_{1C}, ugotavljali statistično značilno razliko med testno spremenljivko in kombinacijo genotipa. Pri analiziranih kliničnih značilnostih statistično pomembnih povezav nismo dokazali (Preglednica IX). Z uporabo post hoc LSD testa (Preglednica X) smo določili pri kateri kombinaciji genotipa APOE je testna spremenljivka statistično značilna (P ≤ 0,05). Statistično značilna povezava je bila dokazana za starost ob začetku bolezni, trajanje bolezni in koncentracijo HOL.

Preglednica IX. Osnovne klinične značilnosti bolnikov s SBT1 in laboratorijske vrednosti glede na kombinacijo genotipa APOE.

Spremenljivke	Kombinacija genotipa APOE				P vrednost
	e3/e2	e4/e2	e3/e3	e4/e3	
Starost [let]	17,6 ± 5,1	13,5 ± 5,0	18,0 ± 4,1	17,3 ± 5,2	0,293
Spol (moški/ženski)	11/14	0/3	106/80	19/25	0,070
Telesna teža [kg]	54,1 ± 22,3	54,0 ± 32,8	57,2 ± 19,7	51,2 ± 20,9	0,345
Telesna višina [m]	1,57 ± 0,22	1,47 ± 0,33	1,60 ± 0,20	1,54 ± 0,22	0,184
ITM [kg/m ²]	20,7 ± 4,6	22,2 ± 7,9	21,4 ± 4,2	20,6 ± 4,4	0,573
Sistolični krvni tlak [mm Hg]	123 ± 18	125 ± 21	121 ± 16	121 ± 16	0,857
Diastolični krvni tlak [mm Hg]	69 ± 8	71 ± 9	68 ± 10	68 ± 11	0,896
Starost ob začetku bolezni [let]	5,7 ± 3,7	6,9 ± 3,8	7,7 ± 4,0	7,5 ± 4,1	0,114
Trajanje SBT1 [let]	12,0 ± 4,5	6,6 ± 1,5	10,2 ± 4,0	9,8 ± 4,0	0,055
HbA _{1C} [%]	7,8 ± 0,9	8,1 ± 0,2	8,0 ± 1,3	7,9 ± 1,1	0,718
HOL [mmol/L]	4,2 ± 0,9	4,1 ± 0,2	4,5 ± 1,1	4,8 ± 0,9	0,181
TG [mmol/L]	1,3 ± 1,3	1,1 ± 0,1	1,1 ± 1,2	1,1 ± 0,6	0,848

Preglednica X. Post hoc LSD test med kombinacijo genotipa APOE.

Spremenljivka	Kombinacija genotipa APOE	P vrednost
Starost ob začetku bolezni	e3/e2 ~ e3/e3	0,015
Trajanje SBT1	e3/e2 ~ e4/e2	0,029
	e3/e2 ~ e3/e3	0,041
	e3/e2 ~ e4/e3	0,031
HOL	e3/e2 ~ e4/e3	0,046

Za oceno vpliva prisotnih alelov gena *APOE*, smo bolnike s SBT1 razdelili v tri skupine: alel e2, alel e3 in alel e4. Pri analiziranih kliničnih značilnostih s testom ANOVA ni bilo prisotnih statistično pomembnih povezav (Preglednica XI). Ponovno smo izvedli post hoc LSD test za določitev statistično značilne povezave med prisotnim alelom gena *APOE* in testno spremenljivko. Statistično značilna povezava je bila dokazana za starost ob začetku bolezni in koncentracijo HOL (Preglednica XII).

Preglednica XI. Osnovne klinične značilnosti bolnikov s SBT1 in laboratorijske vrednosti glede na alele gena *APOE*.

Spremenljivke	Aleli gena <i>APOE</i>			P vrednost
	e2	e3	e4	
Starost [let]	17,2 ± 5,0	17,9 ± 4,3	17,0 ± 5,1	0,312
Spol (moški/ženski)	13/17	242/199	19/30	0,058
Telesna teža [kg]	54,8 ± 22,2	56,4 ± 20,0	50,7 ± 21,1	0,169
Telesna višina [m]	1,57 ± 0,22	1,60 ± 0,21	1,53 ± 0,22	0,101
ITM [kg/m ²]	21,1 ± 4,8	21,3 ± 4,2	20,4 ± 4,6	0,421
Sistolični krvni tlak [mm Hg]	125 ± 18	121 ± 16	121 ± 16	0,425
Diastolični krvni tlak [mm Hg]	69 ± 8	68 ± 10	68 ± 11	0,762
Starost ob začetku bolezni [let]	5,9 ± 3,6	7,6 ± 4,0	7,2 ± 4,1	0,070
Trajanje SBT1 [let]	11,3 ± 4,5	10,3 ± 4,0	9,8 ± 4,0	0,240
HbA _{1c} [%]	7,8 ± 0,8	8,0 ± 1,3	7,9 ± 1,0	0,511
HOL [mmol/L]	4,2 ± 0,8	4,5 ± 1,1	4,7 ± 0,8	0,102
TG [mmol/L]	1,2 ± 1,2	1,1 ± 1,1	1,1 ± 0,6	0,784

Preglednica XII. Post hoc LSD test med aleli gena *APOE*.

Spremenljivka	Aleli gena <i>APOE</i>	P vrednost
Starost ob začetku bolezni	e2 ~ e3	0,024
HOL	e2 ~ e4	0,034

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo želeli z analizo gena *APOE* opredeliti vpliv izbranih variant gena na vrednosti plazemskih koncentracij HOL in TG pri populaciji otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s SBT1. Študije, v katerih so do sedaj preučevali vpliv variant gena *APOE* na lipidni status, so se nanašale predvsem na populacijo odraslih bolnikov s SBT2 (49, 53). V raziskavi smo se osredotočili na mlajšo populacijo bolnikov s SBT1. V tej skupini bolnikov je namreč vpliv dejavnikov okolja manj izražen. Prav tako je pri njih prisotnih pomembno manj zapletov osnovne bolezni in dodatnih spremljevalnih bolezni, kar omogoča jasnejšo interpretacijo rezultatov.

5.1 Klinične značilnosti bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1

V raziskavo smo vključili 260 otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s SBT1, ki so vodeni na Kliničnem oddelku za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove na Pediatrični kliniki v Ljubljani. To populacijo bolnikov s SBT1 smo izbrali, ker še niso imeli uvedene terapije za zniževanje HOL (npr. statini). Če bi izbrali bolnike z uvedeno terapijo, bi posledično lahko bile koncentracije plazemskih lipidov v krvi normalne. S tem bi napačno interpretirali vpliv izbranih variant gena *APOE* na lipidni status. Ob izbiri starejše populacije bolnikov bi na vsebnost lipidov v krvi imeli večji vpliv tudi dejavniki okolja, kot so stres, prehrana, telesna aktivnost, kar bi ponovno lahko pomenilo nezanesljivo oz. napačno interpretacijo rezultatov (5). Porast pojavnosti BSO je sicer dokazan tudi pri skupini otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s SBT1 in ne zgolj pri bolnikih s SBT2 (43). To predstavlja utemeljen in smiseln razlog za preučevanje možnih povezav z razvojem BSO tudi pri tej, sicer manj številni populaciji.

V raziskavi, ki je med leti 2001 in 2009 v Sloveniji spremljala zdrave 5-letne otroke, so bile povprečne vrednosti HOL pri deklicah 4,2-4,5 mmol/L, pri dečkih pa 4,1-4,3 mmol/L (65). Pri naši preiskovani populaciji bolnikov s SBT1 je bila povprečna vrednost HOL pri ženskem spolu 4,3 mmol/L, pri moškem spolu pa 4,2 mmol/L, kar sicer sovпада z

objavljenimi rezultati. Slabost te primerjave je v neprimerljivi starosti, kajti naša skupina obsega večji starostni razpon bolnikov in ne zajema zgolj ene starostne skupine, kot pri študiji, ki je zajemala le 5-letne otroke.

Pri bolnikih s SBT1 je opazen velik porast pojavnosti BSO, zato to obliko SB, skupaj s SBT2, uvrščamo v skupino z visokim tveganjem za razvoj BSO (43). Zaradi preventivnega ukrepanja se je priporočena meja za vzdrževanje nivoja lipidov v krvi pri bolnikih s SBT1 precej zaostrila (43, 45, 46, 48). Nacionalni inštitut za srce, pljuča in kri (NHLBI; angl. *National Heart, Lung and Blood Institute*) navaja zadnje podatke priporočenih vrednosti lipidov pri mlajši populaciji, pridobljene iz študij, ki so se izvajale med leti 2010-2013 (54). Navedeni priporočeni meji, za HOL 4,4 mmol/L in za TG 1,7 mmol/L, smo pri interpretaciji dobljenih rezultatov tudi upoštevali. Priporočeni meji sta neodvisni od spola in veljata za mlajše bolnike s SBT1. Pri zdravi populaciji so priporočene meje plazemske koncentracije lipidov opredeljene posebej za odrasle in otroke, saj je pri starejših vpliv dejavnikov okolja večji. Pri odrasli populaciji so priporočene meje dodatno razdeljene tudi glede na spol, saj na plazemske koncentracije lipidov vpliva tudi hormonsko ravnovesje (34, 36, 43-48).

Za določanje vpliva lipidnega statusa na določene parametre smo bolnike s SBT1 razdelili glede na priporočeno mejo za vrednosti HOL v dve skupini: skupina SBT1 s $HOL < 4,4$ mmol/L in skupina SBT1 s $HOL \geq 4,4$ mmol/L. Starejši bolniki s SBT1 imajo sicer dokazano pogosteje višje koncentracije HOL, saj je bil dokazan signifikanten ($P < 0,0001$) trend naraščanja vrednosti HOL v različnih starostnih skupinah bolnikov, v skupini 0,25-11 let so bile koncentracije HOL 4,5 mmol/L, v skupini 12-16 let 4,7 mmol/L, v skupini 17-26 let pa 4,8 mmol/L (65). Vendar med našima skupinama preiskovancev s HOL nižjim oz. višjim od 4,4 mmol/L ni bilo statistično značilne razlike v starosti ($P = 0,092$; Preglednica IV), da bi lahko trdili, da je vzrok razliki izključno v vplivu dejavnikov okolja, kot so prehrana, telesna aktivnost in stres, ki so pri starejših izrazitejši. Z uporabo neodvisnega t-testa smo med skupinama primerjali osnovne klinične značilnosti bolnikov s SBT1 (Preglednica IV). Signifikantna razlika ($P \leq 0,05$) se je med skupinama pokazala pri telesni teži, ITM, diastoličnem krvnem tlaku in HbA_{1C} . Tako lahko trdimo, da imajo preiskovani bolniki s SBT1 in povišanimi vrednostmi HOL pogosteje tudi povišano telesno težo in bolj neurejeno SB. Telesna teža je bila večja pri skupini SBT1 s $HOL \geq 4,4$ mmol/L

(58,2 kg), kot pri skupini s $HOL < 4,4$ mmol/L (53,2 kg). Posledično imajo bolniki v skupini SBT1 s $HOL \geq 4,4$ mmol/L višje vrednosti ITM ter diastoličnega krvnega tlaka. Signifikantna razlika med skupinama s $HOL < 4,4$ mmol/L in $HOL \geq 4,4$ mmol/L se je izrazila tudi pri vrednosti HbA_{1C} ($P=0,004$). Vrednost HbA_{1C} je bila pri skupini SBT1 s $HOL < 4,4$ mmol/L 7,7 %, pri skupini SBT1 s $HOL \geq 4,4$ mmol/L pa 8,2 %. Vrednost HbA_{1C} predstavlja podatek o povprečni koncentraciji glukoze za obdobje zadnjih dveh do treh mesecev in s tem omogoča spremljanje urejenosti SB pri bolnikih. To pomeni, da so imeli bolniki z zvišanimi koncentracijami plazemskega HOL pogosteje slabo urejeno SB. Pomemben vpliv dobre urejenosti SBT1 na koncentracije HOL je bil pred tem že dokazan pri moških in ženskah s SBT1 (66) in tudi v raziskavi, ki je vključevala bolnike s SBT1 ali SBT2 s prisotno ali odsotno kronično boleznijo ledvic (34). Skupina, ki je delovala v okviru programa »*SEARCH for Diabetes in Youth*«, je primerjala plazemske koncentracije HOL med skupinami mladostnikov brez SB, mladostnikov z urejeno SBT1 ($HbA_{1C} < 7,5$ %) in mladostnikov z neurejeno SBT1 ($HbA_{1C} \geq 7,5$ %). Vrednosti HOL nad 5,2 mmol/L je imelo 15,6 % mladostnikov z neurejeno SBT1 in 7,4 % mladostnikov z urejeno SBT1 (67). Druga raziskava je primerjala koncentracije plazemskih lipidov pri otrocih s SBT1 in zdravo populacijo otrok. Skupino s SBT1 so razdelili na dve skupini: otroci z vrednostjo $HbA_{1C} \leq 8,0$ % in otroci z vrednostjo $HbA_{1C} > 8,0$ %. V skupini z nižjo vrednostjo HbA_{1C} je bila koncentracija HOL 4,0 mmol/L in LDL-C 2,3 mmol/L. V drugi skupini so bile koncentracije plazemskih lipidov višje, in sicer HOL 4,6 mmol/L in LDL 2,7 mmol/L (68).

Preiskovano populacijo bolnikov s SBT1 smo razdelili tudi glede na vrednost TG v krvi na dve skupini: SBT1 s $TG < 1,7$ mmol/L in skupina SBT1 s $TG \geq 1,7$ mmol/L (Preglednica V). Tudi med tema dvema skupinama preiskovancev ni bilo statistično značilne razlike v starosti ($P=0,346$; Preglednica V). Osnovne klinične značilnosti smo med skupinama primerjali z neodvisnim t-testom. Signifikantna razlika med skupinama se je pokazala pri ITM in vrednosti HbA_{1C} , preiskovanci z višjimi koncentracijami TG so imeli tako pogosteje neurejeno SBT1. ITM je pričakovano višji v skupini SBT1 s $TG \geq 1,7$ mmol/L ($23,0$ kg/m²). Najverjetnejši vzrok so dejavniki okolja, predvsem nepravilna prehrana, ki prispeva k zvišanju telesne teže in TG v krvi. Vrednost HbA_{1C} ($P=0,005$) je bila pri skupini SBT1 s $TG < 1,7$ mmol/L 7,8 %, pri skupini SBT1 s $TG \geq 1,7$ mmol/L pa 1 % višja. Vpliv urejenosti SB na koncentracije plazemskih TG je bil predhodno že dokazan pri moških in ženskah s SBT1 (66) in pri bolnikih s SBT1 ali SBT2 s prisotno ali odsotno

kronično boleznijo ledvic (34). Skupina, ki je delovala v okviru programa »*SEARCH for Diabetes in Youth*«, je primerjala tudi plazemske koncentracije TG med skupinami mladostnikov brez SB, mladostnikov z urejeno SBT1 ($HbA_{1C} < 7,5 \%$) in mladostnikov z neurejeno SBT1 ($HbA_{1C} \geq 7,5 \%$). Podobno kot pri HOL, se je razlika pokazala tudi pri TG, kjer je imelo vrednosti TG nad 1,7 mmol/L 8,7 % mladostnikov z neurejeno SBT1 in 1,3 % mladostnikov z urejeno SBT1 (67). V raziskavi, kjer so primerjali koncentracije TG pri otrocih s SBT1 in zdravo populacijo otrok, so ugotovili razliko med skupinami. V skupini otrok s SBT1 in vrednostjo $HbA_{1C} \leq 8,0 \%$, je bila vrednost TG 0,8 mmol/L, pri skupini s $HbA_{1C} > 8,0 \%$ pa 0,9 mmol/L (68).

5.2 Opredelitev kombinacije genotipa izbranih variant gena *APOE*

V raziskovalnem delu magistrske naloge smo uporabili metodo genotipizacije s sondami TaqMan, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo v realnem času. Omogoča hitro in natančno pomnoževanje izbranega odseka DNA in s tem tudi natančno ter točno določitev kombinacije genotipa (63, 64). Vsem bolnikom smo na podlagi analize dveh izbranih variant gena *APOE* (rs7412 in rs429358) določili kombinacijo genotipa *APOE*.

Med potekom analizne metode na aparatu ABI 7500 Fast Real Time PCR System smo na podlagi dobljenih rezultatov ugotovili, da s prvotnim profilom metode ne dobimo ustreznih rezultatov genotipizacije za spremembo rs429358 gena *APOE* (Slika 4). Pri analizi podatkov ni bilo mogoče zanesljivo označiti skupin glede na prisotno fluorescenco poročevalskega barvila VIC® oz. FAM™, zato bi lahko bila določitev kombinacije genotipa *APOE* pri posameznih bolnikih napačna. To je bil utemeljen razlog za spremembo profila metode, pri katerem smo povečali število ciklov iz prvotnih 40 na 45 ciklov in hkrati tudi povišali temperaturo združenega koraka naleganja oligonukleotidnih začetnikov in izgradnje nove verige za 0,7 °C, tako da je bila končna temperatura 60,7 °C. Za spremembo teh dveh parametrov smo se odločili zato, ker s tem povečamo končno količino amplikonov in vplivamo na bolj specifično naleganje oligonukleotidnih začetnikov. Ponovno smo pripravili reakcijsko mešanico in jo skupaj z vzorci DNA nanесли na reakcijsko ploščico ter izvedli analizo po spremenjenem postopku (Slika 5).

Modifikacija metode je bila uspešna, saj smo lahko skupine, glede na prisotno fluorescenco poročevalskega barvila, med seboj nedvoumno ločili.

Bolnike smo po določitvi kombinacije genotipa *APOE* razdelili v šest skupin: e2/e2, e3/e2, e4/e2, e3/e3, e4/e3 in e4/e4 (Preglednica VI). V preiskovani populaciji bolnikov s SBT1 je bilo prisotnih vseh šest kombinacij genotipov *APOE*, vendar sta bili kombinaciji e2/e2 oz. e4/e4 prisotni le pri enem bolniku. Najpogostejša kombinacija genotipov je bila e3/e3 (71,5 %), sledila je e4/e3 (16,9 %), e3/e2 (9,6 %) ter e4/e2 (1,2 %). Bolnike smo razdelili tudi v tri skupine glede na prisoten alel e2, e3 oz. e4. Najbolj razširjen alel je bil e3 (84,8 %), sledil je e4 (9,4 %), najmanj razširjen pa je bil alel e2 (5,8 %). Za evropsko kavkazijsko populacijo se frekvence alelov gena *APOE* zelo razlikujejo glede na geografsko lego in opazimo lahko velik razpon frekvenc: alel e2 4-12%, alel e3 64-89% in alel e4 5-21%. Zelo očiten je frekvenčni gradient alela e4, ki je veliko pogostejši v Severni Evropi (14-19 %) v primerjavi z Južno Evropo (7-12 %) (69). Če primerjamo te podatke s prisotnostjo alelov pri naši preiskovani populaciji, opazimo, da so pričakovano primerljive s frekvencami južnoevropskih držav.

5.3 Vpliv kombinacij genotipov *APOE* in alelov gena *APOE* na plazemske koncentracije lipidov

Pojav BSO pri bolnikih s SBT1 močno narašča in s tem predstavlja velik zdravstveni problem. Razvoj BSO in posledični zapleti se začnejo razvijati že v zgodnjem življenjskem obdobju in so povezani z zvišanimi vrednostmi plazemskih lipidov (41). Za preprečevanje kasnejših zapletov pri SBT1 so pomembne raziskave, ki iščejo povezavo individualnih razlik v zgodnji stopnji razvoja BSO z napredovanjem potencialnih dejavnikov tveganja. V primerjavi z odraslo populacijo je lipidni status pri mlajši populaciji bolnikov s SBT1 odvisen predvsem od genetskih dejavnikov in s tem manj podvržen dejavnikom okolja, kot so prehrana, stres, kajenje in telesna aktivnost (5, 41, 36, 43-48). Številne raziskave so preučevale gen *APOE*, kot pomemben kandidatni gen pri razvoju dislipidemij (41, 49, 51, 53, 57, 59, 60). Večina raziskav, ki preučujejo vpliv variant gena *APOE* na lipidni status so bile narejene na odrasli populaciji (41, 45, 49, 51, 53, 57). Zaradi slabo raziskanega vpliva variant gena *APOE* na lipidni status pri mlajši populaciji bolnikov s SBT1 ter naraščanju

pojavnosti BSO v tej skupini bolnikov, smo se v magistrski nalogi osredotočili na preučevanje izključno te populacije.

Vpliv kombinacije genotipa *APOE* in alelov gena *APOE* na koncentracije HOL in TG v plazmi smo ovrednotili z uporabo različnih statističnih testov. Preiskovano populacijo smo razdelili v dve skupini glede na vrednost HOL < 4,4 mmol/L oz. ≥ 4,4 mmol/L in z uporabo križnih tabel v programu SPSS prikazali razporeditev kombinacije genotipov *APOE* in alelov gena *APOE* (Preglednica VII). Razporeditev kombinacije genotipov in alelov ni odstopala od HW ravnotežja (skupina HOL < 4,4 mmol/L: $\chi^2=2,7396$, $P=0,4313$; skupina HOL ≥ 4,4 mmol/L: $\chi^2=2,2749$, $P=0,5158$). Kombinacija genotipa e3/e3 je bila najpogostejša tako v skupini s HOL < 4,4 mmol/L (72,6 %) kot tudi v skupini s HOL ≥ 4,4 mmol/L (70,6 %). Precej manj pogosta je bila kombinacija genotipa e4/e3, ki je bila pogostejša pri skupini s HOL ≥ 4,4 mmol/L (20,6 %), kot pri skupini s HOL < 4,4 mmol/L (12,9 %). Kombinacija e4/e4 v skupini s HOL < 4,4 mmol/L ni bila prisotna, v skupini s HOL ≥ 4,4 mmol/L pa zgolj v enem primeru (0,7 %). Nasprotno je bila kombinacija genotipa e2/e2 z nizkim deležem prisotna samo v skupini s HOL < 4,4 mmol/L (0,8 %). Alel e3 je bil najpogostejši tako v skupini s HOL < 4,4 mmol/L (84,7 %), kot tudi v skupini s HOL ≥ 4,4 mmol/L (84,9 %). V skupini s HOL ≥ 4,4 mmol/L je bil delež alela e2 nižji (4,0 %), nasprotno pa je bil delež alela e4 višji (11,0 %), kot v skupini s HOL < 4,4 mmol/L.

Bolnike s SBT1 smo z uporabo križnih tabel razdelili tudi glede na kombinacijo genotipa *APOE* in alele gena *APOE* na skupino z vrednostjo TG < 1,7 mmol/L oz. skupino s TG ≥ 1,7 mmol/L (Preglednica VIII). Razporeditev kombinacije genotipov in alelov je bila skladna s HW ravnotežjem (skupina TG < 1,7 mmol/L: $\chi^2=0,7936$, $P=0,8508$; skupina TG ≥ 1,7 mmol/L: $\chi^2=1,3165$, $P=0,7244$). Najpogostejša kombinacija genotipa je bila e3/e3, tako v skupini s TG < 1,7 mmol/L (72,2 %), kot tudi v skupini s TG ≥ 1,7 mmol/L (66,7 %). Sledila je kombinacija e4/e3, ki je bila v skupini s TG ≥ 1,7 mmol/L v večjem deležu (21,2 %), v primerjavi z nasprotno skupino (16,3 %). Kombinacije genotipov e2/e2 (0,4 %), e4/e2 (1,3 %) in e4/e4 (0,4 %) so bile v zelo nizkem deležu prisotne zgolj v skupini s TG < 1,7 mmol/L. Najpogostejši alel v obeh skupinah je bil e3. Sledil je alel e4, ki je bil v skupini TG < 1,7 mmol/L nižji (9,3 %), v primerjavi s skupino s TG ≥ 1,7 mmol/L (10,6

%). Prav tako je bil alel e2 manj pogost v skupini s TG < 1,7 mmol/L (5,7 %), kot v skupini s TG ≥ 1,7 mmol/L (6,1 %).

Primerjavo med posamezno kombinacijo genotipa *APOE* in osnovnimi kliničnimi značilnostmi bolnikov s SBT1 ter koncentracijami plazemskih lipidov smo izvedli z uporabo statističnega testa variance enega faktorja (ANOVA) (Preglednica IX). Testne spremenljivke, ki smo jih primerjali s kombinacijo genotipa *APOE* so bile: starost, spol, telesna teža, telesna višina, ITM, sistolični in diastolični krvni tlak, starost ob začetku SBT1, trajanje SBT1 ter laboratorijske vrednosti HbA_{1C}, HOL in TG. Pri tem smo iz analize izključili kombinaciji genotipa e2/e2 (N=1) in e4/e4 (N=1) zaradi premajhnega števila posameznikov in s tem posledično nezanesljivih rezultatov. Med posameznimi kombinacijami genotipov *APOE* pri testnih spremenljivkah nismo določili signifikantne razlike ($P \leq 0,05$). Uporabili smo post hoc LSD test (Preglednica X) s katerim smo primerjali vse možne kombinacije spremenljivk s posamezno kombinacijo genotipa. Pri tem smo določili signifikantno povezavo ($P=0,046$) med kombinacijo genotipa e4/e3 in zvišano koncentracijo plazemskega HOL. Tako lahko sklepamo, da v skupini bolnikov s SBT1 na zvišano koncentracijo plazemskega HOL poleg okolja pomembno vpliva tudi posameznikovo genetsko ozadje. Ta zaključek in povezavo lahko delno primerjamo z dvema raziskavama, kjer so prav tako dokazali signifikanten vpliv kombinacije genotipa *APOE* e4/e4 na lipidni status pri zdravih posameznikih in preiskovancih. Vendar v teh dveh raziskavah preiskovanci niso imeli SB, imeli pa so določeno obliko oz. predstopnjo BSO (57, 59).

Prav tako smo preverjali povezavo testne spremenljivke s trajanjem SBT1 in starostjo ob začetku SBT1. Starost ob začetku SBT1 je bila signifikantno nižja pri bolnikih s prisotno kombinacijo genotipa e3/e2 ($P=0,015$). V primeru trajanja SBT1 se je kombinacija genotipa e3/e2 izkazala kot signifikantna v primerjavi s preostalimi tremi kombinacijami (e4/e2, e3/e3, e4/e3), kjer je bilo trajanje bolezni krajše. Končni rezultat analize je pokazal, da je kombinacija genotipa e3/e2 pomembno povezana z zgodnejšim začetkom SBT1 oz. zgodnejšim pojavom kliničnih znakov SBT1. Potencialna povezava med kombinacijo genotipa *APOE* ali alelom gena *APOE* in starostjo ob začetku SBT1 oz. trajanjem SBT1, do sedaj še ni bila raziskana in predstavlja dobro izhodišče za nadaljnja preučevanja na bolj opredeljenih skupinah bolnikov. Znano je tudi dejstvo, da debelost pri otrocih,

mladostnikov in mlajših odraslih predstavlja dejavnik tveganja za hitrejši razvoj SBT1 (36, 43), vendar povezava s spremembami v lipidnem metabolizmu še ni znana. Pri naših bolnikih s kombinacijo genotipov *APOE* e3/e2 je bila povprečna vrednost ITM 20,7 kg/m² in povprečna telesna teža 54,1 kg, kar je manj od celotne skupine, kjer je bila povprečna vrednost ITM 21,2 kg/m² in povprečna telesna teža 55,8 kg. To pomeni, da v tej skupini bolnikov debelost verjetno ni bila vzrok za zgodnji začetek bolezni. Za natančnejšo opredelitev povezave kombinacije genotipa *APOE* e3/e2 z zgodnejšim začetkom SBT1, bi bilo potrebno vključiti večje število preiskovancev in jih primerjati z zdravo populacijo.

Osnovne značilnosti bolnikov s SBT1 in laboratorijske vrednosti bolnikov smo primerjali tudi glede na posamezne alele gena *APOE* (Preglednica XI). Testne spremenljivke so bile enake, kot pri primerjavi s skupinami kombinacij genotipov *APOE*. Pri analizi podatkov nismo dokazali signifikantne razlike med aleli in spremenljivkami. Ponovno smo uporabili enak post hoc LSD test (Preglednica XII), kjer smo upoštevali vse možne kombinacije testnih spremenljivk s posameznimi aleli gena *APOE*. Signifikantna povezava ($P=0,034$) je prisotna med koncentracijo HOL in prisotnostjo alela e4 in kaže na to, da je alel e4 povezan z višjimi vrednostmi HOL pri bolnikih s SBT1. Enako povezavo so prikazali tudi v raziskavi, ki je vključevala splošno populacijo zdravih posameznikov in posameznikov z določeno stopnjo BSO. Dokazali so, da imajo nosilci alela e2 20 % manjše tveganje za razvoj BSO v primerjavi s posamezniki, ki so nosilci alela e3 (59). Signifikantnost se je pokazala ($P=0,024$) tudi v primeru prisotnosti alela e2 v povezavi s starostjo ob začetku SBT1. Rezultat post hoc testa prikazuje, da je alel e2 povezan z zgodnejšim začetkom SBT1. Povezava, med kombinacijo genotipa *APOE* e3/e2 oz. prisotnim alelom e2 gena *APOE* in zgodnejšim začetkom SBT1 v literaturi do sedaj še ni bila opisana (32, 41, 49, 51-53, 56-61) in s tem predstavlja novo poglavje in nov cilj v raziskavah vpliva variant gena *APOE* na različne parametre pri SBT1.

BSO so najpogostejši vzrok umrljivosti pri bolnikih s SBT1, zato je ključna učinkovita strategija preprečevanja teh bolezni. Pri tem je pomemben zdrav življenjski slog, redno spremljanje lipidnega statusa in ustrezna terapija. Pri odločitvi o preventivni strategiji pa bi lahko imela v prihodnosti ključno vlogo tudi opredelitev kombinacije genotipa *APOE*, s katero bi lahko predvideli zgodnejši pojav BSO.

6 SKLEP

Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo:

- ~ Prisotnost variant rs7412 (c.472C>T; p.Arg158Cys) in rs429358 (c.334T>C; p.Cys112Arg) gena *APOE* v slovenski populaciji otrok, mladostnikov in mlajših odraslih s SBT1 in pripadajoča kombinacija genotipa *APOE* sledi HW ravnotežju. V preiskovani skupini je najpogosteje zastopan alel e3 (84,8 %), najpogostejša kombinacija genotipa *APOE* pa e3/e3 (71,5 %).
- ~ Preiskovani bolniki s SBT1 in povišanimi vrednostmi HOL ali TG imajo pogosteje višji ITM in bolj neurejeno SB, bolniki s povišanimi vrednostmi HOL pa dodatno še višjo telesno težo in povišan diastolični krvni tlak.
- ~ Bolniki s SBT1, ki so nosilci kombinacije genotipov *APOE* e4/e3, imajo višje plazemske koncentracije HOL v primerjavi s kombinacijami genotipov e3/e2, e3/e3, e4/e2.
- ~ Prisotnost alela e4 pri bolnikih s SBT1 je povezana z višjimi vrednosti plazemskih koncentracij HOL v primerjavi s prisotnostjo alela e2 ali e3.
- ~ Bolniki s kombinacijo genotipov *APOE* e3/e2 imajo zgodnejši začetek SBT1.
- ~ Obstaja statistično značilna odvisnost med prisotnostjo alela e2 in nižjo starostjo ob začetku SBT1.

S temi ugotovitvami potrjujemo predpostavljeno hipotezo, da variante gena *APOE* vplivajo na koncentracije plazemskih lipidov pri bolnikih s SBT1. Dokazali smo, da je kombinacija genotipov *APOE* e4/e3 povezana z zvišanimi vrednostmi plazemskega HOL pri otrocih, mladostnikih in mlajših odraslih s SBT1. S tem dokazujemo, da na zvišano koncentracijo plazemskega HOL bolnikov s SBT1, poleg okolja pomembno vpliva tudi posameznikovo genetsko ozadje. Dodatno smo dokazali še neopisano in nepojasnjeno povezavo genotipa *APOE* e3/e2 z zgodnejšim začetkom SBT1.

7 LITERATURA

1. Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011;91(1):79-118.
2. Bratina N, Bratanič N, Žerjav Tanšek M, Kotnik P, Avbelj Stefanija M, Battelino T. Zakaj se razvije sladkorne bolezni. In: Bratina N. *Sladkorčki: vse, kar ste želeli vedeti o sladkorni bolezni.* Ljubljana: Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2012: 24-28.
3. International Diabetes Federation. Dostop: 28-4-2014.
<http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>.
4. Nacionalni program za obvladovanje sladkorne bolezni 2010-2020. Povzeto po nacionalnem programu za obvladovanje sladkorne bolezni. Strategija razvoja 2010-2020. Dostop: 15-5-2014.
http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/javno_zdravje_2010/Nacionalni_program_za_obvladovanje_sladkorne_bolezni_2010-2020.pdf
5. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36 Suppl 1:S67-74.
6. Bishop M, Fody E, Schoeff L. *Clinical chemistry techniques, principles, correlations,* Sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins 2010: 314-317, 330-351.
7. Ravnik Oblak M. Epidemiologija, opredelitev, razvrstitev, klinična slika in diagnoza sladkorne bolezni. In: Vujičić S, Poljanec Bohnec M, Žargaj B. *Sladkorna bolezen: priročnik za zdravstvene delavce.* Ljubljana: Slovensko osteološko društvo, 2013: 26-31.
8. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet.* 2009;373(9680):2027-2033.
9. Ravnik Oblak M. Etiopatogeneza in etiologija sladkorne bolezni. In: Vujičić S, Poljanec Bohnec M, Žargaj B. *Sladkorna bolezen: priročnik za zdravstvene delavce.* Ljubljana: Slovensko osteološko društvo, 2013: 11-17.

- 10.** Bratanič N. HashimotoV tiroiditis. In: Bratina N. Sladkorčki: vse, kar ste želeli vedeti o sladkorni bolezni. Ljubljana: Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2012: 242-243.
- 11.** Baynes J, Dominiczak MH. Medical biochemistry, Fourth edition. SAUNDERS ELSEVIER 2014: 912-950, 720-782.
- 12.** Kotnik P. Ketoacidoza. In: Bratina N. Sladkorčki: vse, kar ste želeli vedeti o sladkorni bolezni. Ljubljana: Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2012: 86-87.
- 13.** Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001;358(9277):221-229.
- 14.** Avbelj Stefanija M. Genetika sladkorne bolezni. In: Bratina N. Sladkorčki: vse, kar ste želeli vedeti o sladkorni bolezni. Ljubljana: Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2012: 29-31.
- 15.** Barker JM. Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1210-7.
- 16.** Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K. Robust associations of four new chromosome regions from genome wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007;39(7):857-864.
- 17.** Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2: S25–31.
- 18.** Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1994; 331:1428-1436.
- 19.** Battelino T, Ursic Bratina N, Dolzan V, Stopar Obreza M, Pozzilli P, Krzisnik C, Vidan-Jeras B. The HLA-DRB, -DQB polymorphism and anti-insulin antibody response in Slovenian patients with type 1 diabetes. *Eur J Immunogenet*. 2003;30(3):223-227.
- 20.** Jabbour S, Stephens EA, Hirsch IB, editors. Type 1 diabetes in adults: principles and practice. New York: Informa Healthcare 2008: 1-29.
- 21.** Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(38):14074-14079.
- 22.** Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families. *Diabetes*. 2008; 57(4):1084-1092.
- 23.** Moran MP, Omenn GS, Pietropaolo M. Immunology and genetics of type 1 diabetes. *Mt Sinai J Med*. 2008;75(4):314-27.

- 24.** Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med.* 2009;360(16):1646-54.
- 25.** International Diabetes Federation, 2011. Global IDF/ISPAD Guideline for Diabetes in Childhood and Adolescence. <http://www.idf.org/sites/default/files/Diabetes-in-Childhood-and-Adolescence-Guidelines.pdf>. Dostop: 5-5-2014.
- 26.** Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med.* 2009; 361(22):2143-2152.
- 27.** Hamilton-Williams EE, Palmer SE, Charlton B, Slattery RM. Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(11):6688-6693.
- 28.** Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. Translational mini-review series on type 1 diabetes: systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2007; 148(1):1-16.
- 29.** Prado Momesso D, Bussade I, Balarini Lima GA, Pereira Coelho Fonseca L, Tavares Russo LA, Kupfer R. Body composition, metabolic syndrome and insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011; 55(3):189-193.
- 30.** Thorn LM, Forsblom C, Fegerudd J, Thomas MC, Petterson-Fernholm K, Saraheimo M, et al. Metabolic syndrome in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2005; 28(8):2019-24.
- 31.** Kilpatrick ES1, Rigby AS, Atkin SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care.* 2007; 30(3):707-712.
- 32.** Šmigoc Schweiger D. Maščobe v krvi pri sladkorni bolezni. In: Bratina N. Sladkorčki: vse, kar ste želeli vedeti o sladkorni bolezni. Ljubljana: Društvo za pomoč otrokom s presnovnimi motnjami, 2012: 292-293.
- 33.** Schwab KO1, Doerfer J, Hecker W, Grulich-Henn J, Wiemann D, Kordonouri O, Beyer P, Holl RW; DPV Initiative of the German Working Group for Pediatric Diabetology. Spectrum and prevalence of atherogenic risk factors in 27,358 children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: cross-sectional data from the German diabetes documentation and quality management system (DPV). *Diabetes Care.* 2006;29(2):218-225.
- 34.** Slinin Y, Ishani A, Rector T, Fitzgerald P, MacDonald R, Tacklind J, Rutks I, Wilt TJ. Management of hyperglycemia, dyslipidemia, and albuminuria in patients with diabetes

and CKD: a systematic review for a KDOQI clinical practice guideline. *Am J Kidney Dis.* 2012;60(5):747-769.

35. Maahs DM, Dabelea D, D'Agostino RB Jr, Andrews JS, Shah AS, Crimmins N, Mayer-Davis EJ, Marcovina S, Imperatore G, Wadwa RP, Daniels SR, Reynolds K, Hamman RF, Dolan LM; SEARCH for Diabetes in Youth Study. Glucose control predicts 2-year change in lipid profile in youth with type 1 diabetes. *J Pediatr.* 2013;162(1):101-107.

36. National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents. Full Report. Dostop: 25-5-2014. https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/peds_guidelines_sum.pdf.

37. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation.* 1986;74(6):1399-1406.

38. Pujia A, Gnasso A, Iraace C, Colonna A, Mattioli PL. Common carotid arterial wall thickness in NIDDM subjects. *Diabetes Care.* 1994; 17(11):1330-1336.

39. Lehmann ED, Riley WA, Clarkson P, Gosling RG. Non-invasive assessment of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Lancet.* 1997; 350 Suppl 1:S114-9.

40. Atabek ME, Kurtoğlu S, Demir F, Baykara M. Relation of serum leptin and insulin-like growth factor-1 levels to intima-media thickness and functions of common carotid artery in children and adolescents with type 1 diabetes. *Acta Paediatr.* 2004;93(8):1052-1057.

41. Atabek ME, Özkul Y, Selver Eklioğlu B, Kurtoğlu S, Baykara M. Association between apolipoprotein E polymorphisms and sublinic atherosclerosis in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2012;4(1):8-13.

42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of abnormal lipid levels among youths --- United States, 1999-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010;59(2):29-33.

43. Bamba V. Update on Screening, Etiology, and Treatment of Dyslipidemia in Children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;1-11.

44. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents; National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert panel on

integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics*. 2011 Dec;128 Suppl 5:213-256.

45. Orchard TJ, Forrest KY, Kuller LH, Becker DJ; Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. Lipid and blood pressure treatment goals for type 1 diabetes: 10-year incidence data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. 2001;24(6):1053-1059.

46. American Diabetes Association. Management of dyslipidemia in children and adolescents with diabetes. *Diabetes Care*. 2003; 26(7):2194-2197.

47. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren WM, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012) : the fifth joint task force of the European society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Int J Behav Med*. 2012;19(4):403-488.

48. Wadwa RP, Kinney GL, Maahs DM, Snell-Bergeon J, Hokanson JE, Garg SK, Eckel RH, Rewers M. Awareness and treatment of dyslipidemia in young adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1051-1056.

49. Tabatabaei-Malazy O, Fakhrzadeh H, Qorbani M, Amiri P, Larijani B, Tavakkoly-Bazzaz J, Amoli MM. Apolipoprotein E gene polymorphism and its effect on anthropometric measures in normoglycemic subjects and type 2 diabetes. *J Diabetes Metab Disord*. 2012; 11(1):18.

50. Rall SC, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem*. 1982;257(8):4171-4178.

51. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2002;155(6):487-495.

52. Boyles J, Pitas R, Wilson E, Mahley R, Taylor J. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with non myelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1501-1513.

53. Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sunram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, Gandy SE, Martins RN. Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk

factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Mol Psychiatry*.

2006;11(8):721-736.

54. Nyholt DR, Yu CE, Visscher PM. On Jim Watson's APOE status: genetic information is hard to hide. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(2):147-149.

55. Siest G1, Bertrand P, Herbeth B, Vincent-Viry M, Schiele F, Sass C, Visvikis S. Apolipoprotein E polymorphisms and concentration in chronic diseases and drug responses. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(9):841-852.

56. Mannila MN, Mahdessian H, Franco-Cereceda A, Eggertsen G, de Faire U, Syvänen AC, Eriksson P, Hamsten A, van 't Hooft FM. Identification of a functional apolipoprotein E promoter polymorphism regulating plasma apolipoprotein E concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(5):1063-1069.

57. Song Y, Stampfer MJ, Liu S: Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*. 2004;141(2):137-147.

58. Singh PP, Singh M, Mastana SS: APOE distribution in world population with new data from India and the UK. *Ann Hum Biol*. 2006; 33(3):279-308.

59. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-1311.

60. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(1):133-140.

61. Qiu C, Winblad B, Fastbom J, Fratiglioni L. Combined effects of APOE genotype, blood pressure, and antihypertensive drug use on incident AD. *Neurology*. 2003; 61(5):655-660.

62. Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes*. 2002;51(4):1256-1262.

63. Life Technologies Corporation. Applied Biosystems®. TaqMan® SNP Genotyping Assays. Dostop: 15-5-2014.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042998.pdf.

- 64.** Life Technologies Corporation. TaqMan® Life technologies. TaqMan® SNP Genotyping Assays. Dostop: 15-5-2014.
https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.
- 65.** Sedej K, Kotnik P, Avbelj Stefanija M, Grošelj U, Širca Čampa A, Lusa L, Battelino T, Bratina N. Decreased prevalence of hypercholesterolaemia and stabilisation of obesity trends in 5-year-old children: possible effects of changed public health policies. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(2):293-300.
- 66.** Idzior-Walus B, Mattock MB, Solnica B, Stevens L, Fuller JH; EURODIAB IDDM Complications Study Group. Factors associated with plasma lipids and lipoproteins in type 1 diabetes mellitus: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabet Med.* 2001;18(10):786-796.
- 67.** Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, D'Agostino R Jr, Marcovina S, Dabelea D. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care.* 2009;32(3):416-420.
- 68.** Erciyas F, Taneli F, Arslan B, Uslu Y. Glycemic control, oxidative stress, and lipid profile in children with type 1 diabetes mellitus. *Arch Med Res.* 2004;35(2):134-140.
- 69.** Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 1999;63(4):301-310.