

## INVESTIGATION OF THE ASSOCIATION OF PRO12ALA POLYMORPHISM IN THE *PPARG* GENE WITH THE OCCURENCE OF OBESITY AND METABOLIC SYNDROME IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

### ISPITIVANJE UDRUŽENOSTI POLIMORFIZMA PRO12ALA U GENU *PPARG* SA POJAVOM GOJAZNOSTI I METABOLIČKOG SINDROMA KOD ŽENA U POSTMENOPAUZI

Aleksandra Pucar<sup>1</sup>, Ana Milanović<sup>1</sup>, Nela Maksimović<sup>2</sup>, Tamara Filipović<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za humanu genetiku, Beograd, Srbija

<sup>3</sup> Institut za rehabilitaciju, Beograd, Srbija

**Correspondence:** anjajpucar@gmail.com

#### Abstract

**Introduction:** During menopause, the prevalence of metabolic disorders in women increases significantly. Postmenopausal women have increased waist circumference, high blood pressure, hypertriglyceridemia, hyperglycemia and low HDL cholesterol, which leads to an increased risk of cardiovascular events. Gamma gene *PPAR-γ* belongs to the family of nuclear receptors and plays a significant role in lipid and glucose metabolism. Polymorphism Pro12Ala is present within the *PPARG* gene. The presence of the Ala allele leads to a 30 to 50% reduction in *PPAR-γ* activity.

**Aim:** The aim of the research is to determine the association between the genotype Pro12Ala polymorphism genotype in the *PPAR-γ* gene and the metabolic syndrome, hypertension, as well as the biochemical parameters of obesity in postmenopausal women.

**Material and methods:** Total of 98 female postmenopausal patients were included in the study. The analysis of Pro12Ala genotype of *PPAR-γ* gene was done by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).

**Results:** In the examined group of patients, CC (Pro/Pro) genotype was found in 81 patients (82.7%), while the CG (Pro/Ala) genotype was present in 17 patients (17.3%). Analysis of the association of Pro12Ala genotypes with the occurrence of metabolic syndrome, hypertension and type II diabetes showed that women carriers of CC genotype were statistically significantly more likely to have hypertension than carriers of CG genotype ( $p = 0.030$ ). Analysis of the association of Pro12Ala polymorphisms with biochemical parameters (total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides and glycaemia) did not show statistical significance.

**Conclusion:** The results of this study indicate a possible association of the Pro/Pro genotype of the Pro12Ala polymorphism with the risk of developing hypertension in postmenopausal women.

#### Keywords:

*PPAR-γ*,  
Pro12Ala  
polymorphism,  
metabolic syndrome,  
postmenopause,  
hypertension

## Sažetak

**Uvod:** U periodu menopauze prevalencija metaboličkih poremećaja kod žena se značajno povećava. Kod žena u postmenopauzi povećava se obim struka, javljaju se povišen krvni pritisak, hipertrigliceridemija, hiperglikemija i snižene vrednosti HDL holesterola, što dovodi do povećanog rizika od kardiovaskularnih događaja. Gama receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (PPAR- $\gamma$ ) pripada familiji nuklearnih receptora i ima značajnu ulogu u metabolizmu lipida i glukoze. U okviru gena za PPAR- $\gamma$  prisutan je polimorfizam Pro12Ala. Prisustvo alela Ala dovodi do smanjenja aktivnosti PPAR- $\gamma$  30 - 50%.

**Cilj:** Cilj rada je ispitivanje povezanosti između Pro12Ala polimorfizma u *PPARG* genu i metaboličkog sindroma, hipertenzije, kao i biohemijskih parametara gojaznosti kod žena u postmenopauzi.

**Materijal i metode:** U studiju je uključeno 98 pacijentkinja u postmenopauzi, prosečne starosti  $64,5 \pm 5,8$  godina. Genotipizacija je vršena reakcijom lančane polimerizacije i analizom polimorfizama dužine restrikcioni fragmenta (PCR-RFLP).

**Rezultati:** U ispitivanoj grupi pacijentkinja CC (Pro/Pro) genotipa bilo je njih 81 (82,7%), dok je CG (Pro/Ala) genotipa bilo 17 (17,3%). Analiza udruženosti Pro12Ala genotipova sa pojavom metaboličkog sindroma, hipertenzije i tipa 2 dijabetesa pokazala je da žene nosioci CC genotipa statistički značajno češće imaju hipertenziju u odnosu na nosioce CG genotipa ( $p = 0,030$ ). Analiza udruženosti Pro12Ala polimorfizma sa biohemijskim parametrima (ukupan holesterol, HDL, LDL, trigliceridi i glikemija) nije pokazala statističku značajnost.

**Zaključak:** Rezultati naše studije ukazuju na moguću udruženost Pro/Pro genotipa polimorfizma Pro12Ala u *PPAR- $\gamma$*  genu sa rizikom za pojavu hipertenzije kod žena u postmenopauzi.

### Ključne reči:

PPAR- $\gamma$ ,  
Pro12Ala  
polimorfizam,  
metabolički sindrom,  
postmenopauza,  
hipertenzija

## Uvod

Epidemija gojaznosti i njena povezanost sa insulinom rezistencijom, intolerancijom na glukozu, hipertenzijom i dislipidemijom, poznata kao metabolički sindrom, jedan je od najizazovnijih zdravstvenih problema sa kojima se suočavaju industrijalizovane zemlje (6). Ovi faktori su nesumnjivo povezani sa povećanim rizikom od razvoja hroničnih stanja, kao što su tip 2 dijabetesa i kardiovaskularne bolesti. Prekomerna i neuravnotežena ishrana, kao i sedentarizam imaju ključnu ulogu u njegovom razvoju (1).

Kod žena su metabolički poremećaji češći tokom menopauze. Žene u postmenopauzi imaju veći obim struka, povišen krvni pritisak, hipertrigliceridemiju, hiperglikemiju i snižene vrednosti HDL (engl. *High Density Lipoprotein* - HDL) holesterola, što dovodi do povećanog rizika od kardiovaskularnih događaja (2).

Promena životnog stila, tj. izmene u ishrani i češća fizička aktivnost može pružiti pomoć malom broju pacijenata, ali uzimanje određenih lekova koji utiču na sistem receptora aktiviranih proliferatorom peroksizoma (PPAR sistem) češće dovodi do boljeg lečenja ovog stanja (4). Time se uviđa značaj poznavanja PPAR sistema.

Receptori aktivirani proliferatorom peroksizoma (engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* - PPAR) predstavljaju porodicu nesteroidnih nuklearnih receptora. U njih spadaju PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$ , PPAR- $\delta$ , PPAR- $\gamma$  i njihova uloga je u metabolizmu lipida i glukoze (4, 6). Gama receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (PPAR- $\gamma$ ) nalazi se u četiri izoforme ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$  i  $\gamma_2$ ), a kodiran je jednim genom koji se nalazi na kratkom kraku trećeg hromozoma (3p25.2) (7). Najčešći polimorfizam ovog gena

u ljudi je zamena prolina alaninom (Pro12Ala) u egzonu B, (rs1801282, C > G), sa frekvencijom alela između 2% i 23% u različitim etničkim grupama. Zamena prolina alaninom na poziciji 12. aminokiseline smanjuje aktivnost samog proteina za 30 - 50% (8).

Cilj istraživanja je utvrđivanje povezanosti između genotipa Pro12Ala polimorfizma u *PPAR- $\gamma$*  genu i metaboličkog sindroma, gojaznosti, hipertenzije, dislipidemije, glikemije i tipa 2 dijabetesa.

## Materijal i metode

### Ispitanice

Istraživanje je obuhvatilo 98 žena prosečne starosne dobi  $64,5 \pm 5,8$  godina u postmenopauzi, koja je definisana prestankom menstrualnih ciklusa u periodu od najmanje godinu dana. Sve ispitanice su bile pregledane i praćene u Institutu za rehabilitaciju, Sokobanjska, Beograd. Prikupljeni su podaci o starosti, visini, težini, obimu struka, profilu lipida i glukozi naše. Sve ispitanice dale su saglasnost za učestvovanje u ovoj studiji, koju je odobrila Etička komisija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Korišćenjem standardizovanih upitnika i kliničkih pregleda (visina, telesna masa) izračunava se indeks telesne mase (ITM) korišćenjem formule težina (kg)/visina ( $m^2$ ), na osnovu čega se pacijentkinje dalje klasifikuju prema uhranjenosti. Normalna težina podrazumeva  $ITM \leq 24,9$   $kg/m^2$ , prekomerna težina  $25$   $kg/m^2 \leq ITM \leq 29,9$   $kg/m^2$  i gojazne  $ITM \geq 30$   $kg/m^2$ . Obim struka meren je postavljanjem merne trake na sredini između krivine

donjeg rebra i gornje ivice kuka, čime procenjujemo potencijalni rizik od kardiovaskularnih bolesti. Upitnikom i fizikalnim pregledom ustanovljeno je postojanje, odnosno nepostojanje hipertenzije. Hipertenzija je definisana kao sistolni krvni pritisak  $>140$  mmHg i/ili dijastolni krvni pritisak  $> 90$  mmHg ili upotreba antihipertenziva.

Da bi se definisalo da pacijent ima metabolički sindrom mora da budu zadovoljena tri ili više od sledećih kriterijuma: (1) obim struka  $> 88$  cm, (2) povišeni trigliceridi ( $\geq 1,7$  mmol/L) ili terapija lekovima za povišene trigliceride, (3) smanjen HDL holesterol ( $< 1,30$  mmol/L kod žena) ili terapija lekovima za snižen HDL holesterol (4), povišen krvni pritisak (SP  $\geq 130$  mmHg i/ili DP  $\geq 85$  mmHg) ili lečenje antihipertenzivnim lekovima (5), povišena glukoza našte ( $\geq 6,1$  mmol/L) ili lečenje lekovima za povišeni nivo glukoze.

### Molekularno - genetička analiza

Molekularno - genetičke analize su sprovedene na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Genomska DNK izolovana je isoljavanjem (engl. *salting out*), primenom modifikovane metodologije po Mileru (*Miller*) (9). Analiza polimorfizma *PPAR- $\gamma$*  gena vršena je metodom reakcije lančane polimerizacije i analizom polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (engl. *Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism* - PCR-RFLP). Za umnožavanje odgovarajućeg regiona u PCR reakciji korišćeni su prajmeri sekvence:

*Forward* prajmer: 5' CAA GCC CAG TCC TTT CTG TG3'

*Reverse* prajmer: 5' CAG AAA GCG ATT CCT TCA CTG3.

Reakciona smeša za svaki uzorak se sastojala od: 17,7  $\mu$ l vode, 2,5  $\mu$ l pufera, 2  $\mu$ l rastvora magnezijum-hlorida, 0,25  $\mu$ l nukleotida, po 0,5  $\mu$ l svakog prajmera (*forward* i *reverse*), 0,1  $\mu$ l Taq polimeraze. Uslovi PCR reakcije izvedene u aparatu *Thermal Cycler 2720* (*Applied Biosystems, USA*), za smešu od 25  $\mu$ l bili su: 35 ciklusa denaturacije 94°C/30 sec, hibridizacija prajmera 63°C/30 sec i elongacija 72°C/45 sec. Proizvod PCR je imao dužinu 247 bp. Po završetku amplifikacije vršena je restrikcija PCR produkta Msp I restrikcionim enzimom na 37°C tokom 120 minuta. Elektroforeza je urađena na 8% poliakrilamidnom gelu i vršena je u 1 x TBE puferu pri naponu od 230 V. Za bojenje gela korišćena je *Syber safe DNA* boja (*Life Technologies, USA*). Gelovi su vizuelizovani na transiluminatoru (*ETX-F20.M, Vilber*). Uočene dve trake od 217 bp i 30 bp odgovarale su genotipu CC, tri trake od 247, 217 i 30 bp označavale su genotip CG. Prisustvo jedne trake od 247 bp odgovaralo bi genotipu GG, ali on nije detektovan na ispitivanom uzorku.

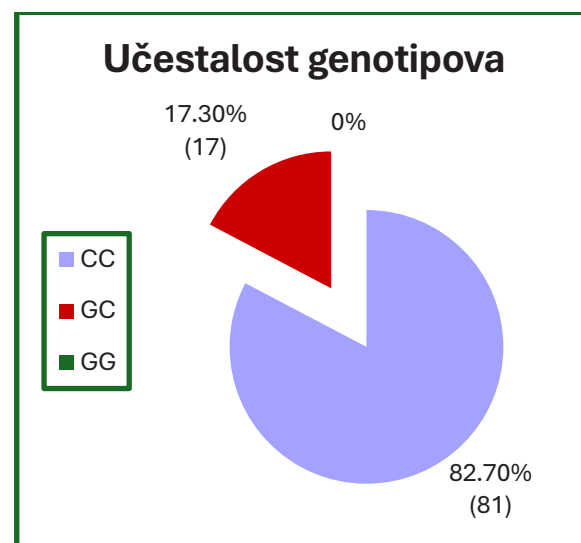
### Statistička obrada podataka

Statistička analiza je sprovedena pomoću SPSS 20 programskog paketa. Numerički podaci iskazani su kao srednja vrednost ( $\bar{x}$ )  $\pm$  standardna devijacija (SD). Analitičke metode primenjene u statističkoj obradi

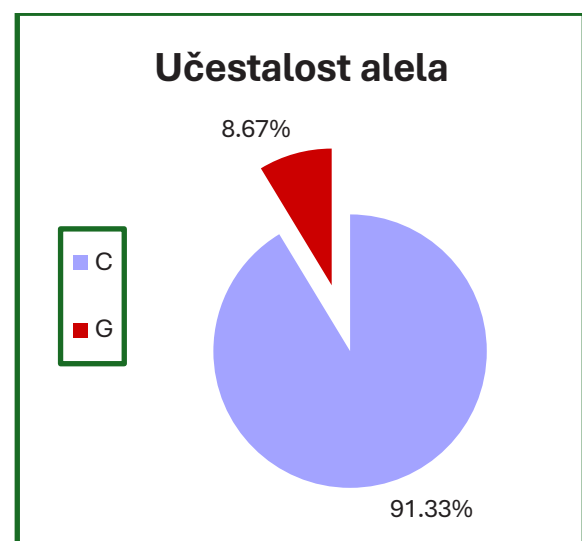
podataka su Studentov t-test ili Man-Vitnijev (*Mann-Whitney*) test, u zavisnosti od tipa raspodele. Za ispitivanje varijabli sa binarnom raspodelom korišćeni su Hi kvadrat test, odnosno Fišerov (*Fisher*) test tačne verovatnoće kada uslovi za koršćenje Hi kvadrat testa ne bi bili ispunjeni ( $< 5$  ispitanika). Kao dopunska analiza urađena je i multipla logistička regresiona analiza. P-vrednosti  $< 0,05$  smatrane su statistički značajnim.

## Rezultati

Molekularno-genetičkom analizom utvrđeno je prisustvo Pro/Ala (CG genotipa) kod 17 ispitanica (17,3%), dok je Pro/Pro (CC genotip) bio prisutan kod njih 81 (82,7%). Homozigoti genotipa GG nisu detektovani (**grafikon 1**). Učestalost češćeg C-alela je iznosila 91,33%, a ređeg G 8,67% (**grafikon 2**).



**Grafikon 1.** Učestalost genotipova polimorfizma Pro12Ala u ispitivanom uzorku.



**Grafikon 2.** Učestalost alela polimorfizma Pro12Ala u ispitivanom uzorku.

U **tabeli 1** prikazane su srednje vrednosti analiziranih parametara (ITM, odnos struka i kuka, ukupnog, LDL i HDL holesterola, triglicerida i glukoze) u zavisnosti od

**Tabela 1.** Srednje vrednosti analiziranih parametara u zavisnosti od *PPAR-γ* genotipa.

	Genotip rs1801	Ukupno	p	ITM < 25	p	ITM ≥ 25	p
ITM kg/m <sup>2</sup>	CC	26,00 ± 4,34	0,496	22,51 ± 1,63	0,580	29,07 ± 3,59	0,276
	CG	26,75 ± 2,91		22,97 ± 0,63		27,91 ± 2,22	
Obim kuk-struk	CC	0,87 ± 0,11	0,482	0,85 ± 0,12	0,921	0,89 ± 0,09	0,185
	CG	0,85 ± 0,06		0,84 ± 0,06		0,85 ± 0,05	
Glukoza mmol/L	CC	5,56 ± 0,83	0,722	5,45 ± 0,88	0,619	5,66 ± 0,78	0,899
	CG	5,64 ± 0,86		5,67 ± 0,64		5,63 ± 0,94	
Trigliceridi mmol/L	CC	1,87 ± 0,97	0,258	2,01 ± 1,08	0,557	1,76 ± 0,86	0,470
	CG	1,59 ± 0,74		1,68 ± 0,75		1,56 ± 0,77	
Ukupni holesterol mmol/L	CC	5,77 ± 0,96	0,752	5,65 ± 0,85	0,070	5,87 ± 1,05	0,164
	CG	5,68 ± 1,15		5,67 ± 1,60		5,41 ± 0,89	
HDL-holesterol mmol/L	CC	1,51 ± 0,36	0,394	1,53 ± 0,37	0,728	1,50 ± 0,36	0,491
	CG	1,43 ± 0,33		1,46 ± 0,49		1,42 ± 0,30	
LDL-holesterol mmol/L	CC	3,39 ± 1,04	0,397	3,29 ± 0,87	0,176	3,47 ± 1,18	0,892
	CG	3,62 ± 1,00		3,95 ± 1,31		3,52 ± 0,93	

genotipa. Povezanost genotipa sa srednjim vrednostima analiziranih parametara ispitivana je ukupno kod svih ispitanica i odvojeno, u zavisnosti od indeksa telesne mase. Dobijeni rezultati nisu bili statistički značajni ni za jedan od analiziranih parametara. Analizirali smo i udruženost genotipa Pro12Ala sa pojavom metaboličkog sindroma, tipom 2 dijabetesa i hipertenzije (**tabela 2**). Dobijeni rezultati pokazuju da je u grupi preuhranjenih i gojaznih žena, nosilaca CC genotipa, pojava hipertenzije statistički značajno češća nego u grupi žena CG genotipa ( $p = 0,044$ ). Kada je primenjena multipla logistička regresiona analiza, u kojoj su kao kovarijante korišćene starost i ITM ispitanica, statistički značajna udruženost sa pojavom hipertenzije uočena je i ukupno kod svih ispitanica ( $p = 0,030$ , OR = 0,260, 95% CI = 0,077 - 0,879). Udruženost ispitivanih genotipova sa pojavom tipa 2 dijabetesa i metaboličkog sindroma nije pokazana.

## Diskusija

Brojne studije su pokazale da *PPAR-γ* modulira ekspresiju gena uključenih u skladištenje i korišćenje energije i igra ključnu ulogu u regulaciji diferencijacije adipocita, lipogeneze, insulinske rezistencije, inflamatornog odgovora, angiogeneze i ateroskleroze (4,6,18). To ukazuje na njegovu moguću korelaciju sa metaboličkim sindromom. U našoj studiji nismo uočili udruženost polimorfizma

Pro12Ala i metaboličkog sindroma. Do sada je nekoliko studija pronašlo povezanost *PPAR-γ* varijanti sa povećanim rizikom za razvijanje metaboličkog sindroma (6), dok druge, u skladu sa našim rezultatima, nisu otkrile značajnu povezanost (10). Mogući razlozi za postojanje kontradiktornih rezultata jesu različita starost i pol ispitanika, etnička pripadnost, veličina ispitivanog uzorka, kao i uključivanje različitih negenetičkih faktora koji utiču na pojavu metaboličkog sindroma. Još jedan od mogućih razloga je i to što studije sa negativnim rezultatima ređe budu objavljene (18). Naša studija je imala ograničenu moć da otkrije moguće male efekte zbog nedovoljne veličine uzorka. Takođe, metabolički sindrom predstavlja veoma složenu i heterogenu bolest, što dodatno otežava tumačenje rezultata studija asocijacije (11).

Rezultati određenih studija pokazali su da su nosioci Ala alela imali značajno niži ITM, kao i manji obim struka u poređenju sa homozigotima divljeg tipa (10).

Jedna finska studija prijavljuje povezanost Pro12Ala sa poboljšanom osetljivošću na insulin kod osoba sa normalnom težinom i blago prekomernom težinom, čime se opisuje zaštitni efekat alela Ala kod tipa 2 dijabetesa (12). Umereno smanjenje aktivnosti *PPAR-γ* kod heterozigotnih miševa smanjuje sadržaj triglicerida u belom masnom tkivu, skeletnim mišićima i jetri zbog povećane ekspresije leptina, povećanja sagorevanja masnih kiselina i smanjenja lipogeneze. Smanjena lipogeneza u belom masnom

**Tabela 2.** Udruženost *PPAR-γ* genotipova sa pojavom dijabetesa, metaboličkog sindroma i hipertenzije.

		Ukupno			ITM < 25			ITM ≥ 25		
		CC	CG	P	CC	CG	P	CC	CG	P
Metabolički sindrom	ne	47 (58,0)	11 (64,7)	0,610	29 (76,3)	3 (75,0)	1,000	18 (41,9)	8 (61,5)	0,213
	da	34 (42,0)	6 (35,3)		9 (32,1)	1 (25,0)		25 (58,1)	5 (38,5)	
Hipertenzija	ne	28 (34,6)	9 (52,9)	0,155	20 (52,6)	3 (75,0)	0,613	8 (18,6)	6 (46,2)	0,044
	da	53 (65,4)	8 (47,1)		18 (47,4)	1 (25,0)		35 (81,4)	7 (53,8)	
Dijabetes	ne	69 (85,2)	15(88,2)	1,000	35 (92,1)	4 (100,0)	1,000	34 (79,1)	11 (84,6)	1,000
	da	12 (14,8)	2(11,8)		3 (7,9)	0 (0,0)		9 (20,9)	2 (15,4)	



tkivu sprečava hipertrofiju adipocita, koja je povezana sa ublažavanjem insulinske rezistencije (13).

Studija odrađena u Bosni i Hercegovini pokazuje povezanost Ala alela sa nižim nivoom ukupnog i LDL holesterola kod kontrolnih subjekata (10). Prethodne studije, koje su analizirale povezanost Pro12Ala sa lipidima u krvi, objavile su suprotne rezultate (10). Međutim, Pro12Ala se češće povezuje sa nižim nivoima triglicerida (12, 14) i višim nivoima HDL holesterola (12, 14), što je potvrđeno nedavnom metaanalizom (15). Kako smanjeni HDL holesterol i povećani nivoi triglicerida predstavljaju dve komponente metaboličkog sindroma, ovi nalazi podržavaju hipotezu da Pro alel može biti jedan od genetičkih faktora koji doprinose metaboličkom sindromu.

Ranijim studijama su dokazani pozitivni efekti Pro12Ala polimorfizma. Povezan je sa povoljnim profilom lipida (16) i smanjenim rizikom od bolesti koronarnih arterija (17) i teškom aterogenezom (16).

U našoj studiji genotip Pro/Pro (CC) statistički je značajno povezan sa nastankom hipertenzije kod žena u postmenopauzi. Kliničke i eksperimentalne studije su pokazale da bi aktivacija PPAR- $\gamma$  mogla da smanji verovatnoću nastanka hipertenzije indukovane angiotenzinom II (19). Gama receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma je prvi bio prepoznat kao antiinflamatorni agens, a zapaljenje dovodi do velikih oštećenja u hipertenzivnoj bolesti. Na osnovu toga se zaključuje da aktivacija PPAR- $\gamma$  ima uticaj na regresiju ateroskleroznih lezija. Pokazano je da njegovom aktivacijom dolazi do smanjene akumulacije makrofaga u lezijama, kao i slabljenja ekspresije proaterogenih agensa. Prema tome, aktivacijom PPAR- $\gamma$  se, zbog antiinflamatornog i direktnog dejstva na endotel poboljšava vaskularna funkcija kod pacijenata sa aterosklerozom i hipertenzijom, sa ili bez dijabetesa melitusa. Nažalost, agonisti PPAR- $\gamma$  mogu dovesti do povećanja telesne težine, zadržavanja tečnosti i povećanog rizika od srčane insuficijencije (3).

## Zaključak

Dobijeni rezultati sugerišu da bi Pro/Pro genotip polimorfizma Pro12Ala u genu za PPAR- $\gamma$  mogao biti udružen sa pojavom hipertenzije kod žena u postmenopauzi. Kako bi se dobijeni rezultati potvrdili potrebne su studije na većem broju ispitanica koje će uključiti veći broj polimorfizama *PPAR- $\gamma$*  gena, kao i faktore spoljašnje sredine.

## Literatura

1. Bovolini A, Garcia J, Andrade MA, Duarte JA. Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int J Sports Med*. 2021; 42(3):199-214.
2. Bobescu E, Bălan A, Moga MA, Teodorescu A, Mitrică M, Dima L. Are There Any Beneficial Effects of Spirulina Supplementation for Metabolic Syndrome Components in Postmenopausal Women? *Mar Drugs*. 2020; 18(12):651.
3. Usuda D, Kanda T. Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. *World J Cardiol*. 2014; 6(8):744-54.
4. Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori CR, Mitro N, Ruscica M.

5. PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? *Int J Mol Sci*. 2018; 19(4):1197.
6. De Carvalho Vidigal F, Bressan J, Babio N, Salas-Salvadó S. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. *BMC Public Health*. 2013; 13(1):1198.
7. Mansour M. The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014; 121:217-66.
8. Moore-Carrasco R, Poblete Bustamante M, Gonzalez Guerra O, Leiva Madariaga E, Mujica Escudero V, Aranguéz Arellano C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: Targets for the treatment of metabolic illnesses (Review). *Mol Med Rep*. 2008; 1(3):317-24.
9. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPAR $\gamma$  Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000; 26(1):76-80.
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3):1215.
11. Dujić T, Bego T, Mlinar B, Semiz A, Malenica M, Prnjavorac B, et al. Effects Of The PPAR $\gamma$  Gene Polymorphisms On Markers Of Obesity And The Metabolic Syndrome In Bosnian Subjects, *J Med Biochem*. 2014; 33(4):323-32.
12. Simundic AM. Methodological issues of genetic association studies. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48 (Suppl 1):S115-8.
13. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998; 20(3):284-7.
14. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) deficiency and PPAR $\gamma$  agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem*. 2001; 276(44):41245-54.
15. Pihlajamaki J, Miettinen R, Valve R, Karjalainen L, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. The Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator activated receptor gamma2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in nondiabetic elderly subjects with dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2000; 151(2):567-74.
16. Huang X, Zhao J, Zhao T. Effects of peroxisome proliferator activated receptor-gamma 2 gene Pro12Ala polymorphism on fasting blood lipids: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2011; 215(1):136-44.
17. Wan J, Xiong S, Chao S, Xiao J, Ma Y, Wang J, et al. PPAR $\gamma$  gene C161T substitution alters lipid profile in Chinese patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2010; 9:13.
18. Liu Y, Yuan Z, Liu Y, Zhang J, Yin P, Wang D, et al. PPAR $\gamma$  gene C161T substitution is associated with reduced risk of coronary artery disease and decreased proinflammatory cytokine expression. *Am Heart J*. 2007; 154(4):718-24.
19. Cai G, Zhang X, Weng W, Shi G, Xue S, Zhang B. Associations between PPAR $\gamma$  polymorphisms and the risk of essential hypertension. *PLoS One*. 2017; 12(7):e0181644.
20. Yu Y, Xue BJ, Wei SG, Zhang ZH, Beltz TG, Guo F, et al. Activation of central PPAR- $\gamma$  attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2015; 66(2):403-11.