

UDK 616.12:577.112  
613.25  
COBISS.SR-ID 234142732

ISSN 0350-2899. - God. 42, br. 1 (2017), str. 42-47

## RETINOL-VEZUJUĆI PROTEIN 4 I HIPERINSULINEMIJA KAO VEZA IZMEĐU GOJAZNOSTI I KARDIOVASKULARNIH BOLESTI

### RETINOL-BINDING PROTEIN 4 AND HYPERINSULINEMIA-THE LINK BETWEEN OBESITY AND CARDIOVASCULAR DISEASE

Aleksandra Klisić (1), Milovan Jovanović (1), Nebojša Kavarić (1), Verica Škerović (2)

(1) DOM ZDRAVLJA PODGORICA, CRNA GORA, (2) KLINIČKI CENTAR CRNE GORE

**Sažetak:** Kardiovaskularne bolesti (KVB) su vodeći uzrok smrtnosti u svetu, a gojaznost predstavlja jedan od glavnih faktora rizika za ove bolesti. Poremećena sekrecija adipokina [npr., visoke koncentracije retinol-vezujućeg proteina 4 (RBP4), rezistina, leptina, a niske koncentracije adiponektina], inflamacija niskog stepena, kao i povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika, dovode do poremećaja niza signalnih puteva, insulinske rezistencije (IR), kao i KVB. RBP4 je skoro otkriven adipokin za koji se pretpostavlja da je usko povezan sa IR. Uprkos oprečnim rezultatima brojnih studija, pretpostavlja se da je ovaj protein značajan kardiometabolički faktor rizika, čije visoke koncentracije dovode do nastanka metaboličkog sindroma, tipa 2 dijabetesa i KVB. Bolje poznavanje patofizioloških mehanizama koji dovode do povećanja RBP4 i insulina u krvi mogu dovesti do pronalaska adekvatne terapijske strategije u cilju smanjenja kardiovaskularnog rizika, pa samim tim i bolesti srca i krvnih sudova kod osoba sa viškom telesne mase.

**Ključne reči:** kardiovaskularne bolesti, retinol-vezujući protein 4, insulinska rezistencija, gojaznost.

**Summary:** Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death in the world and obesity is one of the main risk factors. Irregular secretion of adipokines [e.g. high retinol binding protein 4 (RBP4), resistin, leptin, respectively, but low adiponectin], low-grade inflammation, as well as an increased production of reactive oxygen species, may lead to impaired insulin signalling, insulin resistance (IR) and CVD. RBP4 is a recently discovered adipokine which is supposed to be closely related to IR. Despite contradictory results obtained from a large number of studies, it is assumed to be a significant cardiometabolic risk factor, leading to metabolic syndrome, type 2 diabetes and CVD development. Better understanding of the pathophysiological mechanisms of increased RBP4 and hyperinsulinemia in circulation may lead to a discovery of new target therapy in prevention of CVD, especially in those people who are overweight/obese.

**Key words:** cardiovascular disease, retinol-binding protein 4, insulin resistance, obesity

#### UVOD

Kardiovaskularne bolesti (KVB) su vodeći uzrok smrtnosti u svetu, čineći ukupno oko 30% svih smrtnih slučajeva. Prema procenama Svetske zdravstvene organizacije, oko 17,3 miliona ljudi u svetu umire od posledica KVB, a smatra se kako će do 2030. godine više od 23 miliona ljudi godišnje umirati zbog istih [1].

Gojaznost je jedan od glavnih faktora rizika za KVB [2-4, 5]. Poremećena sekrecija adipokina [npr., visoke koncentracije retinol-vezujućeg proteina 4 (RBP4), rezistina, leptina, a niske koncentracije adiponektina], inflamacija

niskog stepena, kao i povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika, dovode do poremećaja niza signalnih puteva, insulinske rezistencije (IR), kao i KVB [5]].

#### Masno tkivo i insulinska rezistencija

Gojaznost je jedan od vodećih faktora rizika za nastanak insulinske rezistencije (IR) i tip 2 dijabetesa. Visceralno masno tkivo je izvor adipocitokina koji putem vene porte stižu do jetre i vrše direktni uticaj na hepatičnu insulinsku senzitivnost, sa progresivnim porastom IR, kako u jetri, tako i u samom masnom tkivu i skeletnim mišićima, sa

posledičnim metaboličkim poremećajima, kao što je smanjena tolerancija glukoze, dislipidemija i hipertenzija [6].

Naime, stanje hronične inflamacije niskog stepena, usko povezano sa visceralnom gojaznošću [7, 8], može uticati na signalne puteve insulina putem supresije insulinskih receptora [9]. U fiziološkim uslovima, vezivanje insulina za receptore na endotelnim ćelijama dovodi do aktivacije intraćelijskih puteva fosfatidil-inozitol (PI) 3-kinaze i mitogen aktivisane protein (MAP) kinaze, produkcije azot monoksida (NO) i ravnoteže u vazodilataciji i vazokonstrikciji. Fiziološki, neto efekat favorizuje produkciju NO i usmerava protok krvi i nutrijente u kapilare, povećavajući iskoristivost glukoze u mišićima. U mišićnim ćelijama, aktivacija PI3-kinaze puta vodi translokaciji glukoznog transportera (GLUT4, engl. insulin responsive glucose transporter-4) i aktivaciji metaboličkih puteva glukoze.

Usled inhibicije signalnog puta PI3-kinaze, koji posreduje metaboličke efekte insulina, kompenzatorna hiperinsulinemija stimuliše drugi signalni put-MAP kinazu, koji posreduje mitogeni, prokoagulantni i proaterogeni efekat insulina, a takođe reguliše i sekreciju vazokonstriktora endotelina (ET-1) u samom endotelu [9].

Kako metabolički i hemodinamski efekti insulina dele zajedničke intraćelijske signalne puteve, inflamacija može simultano doprineti i IR i vaskularnoj disfunkciji (aktivaciji renin angiotenzin-aldosteron sistema).

Insulinska rezistencija je pokazatelj većeg rizika mikro (nefropatija, neuropatija i retinopatija) i makrovaskularnih komplikacija (koronarna arterijska bolest i periferna vaskularna bolest) kod obolelih od dijabetesa [10].

Takođe, istraživanja pokazuju da pacijenti sa koronarnom srčanom bolešću često imaju nedijagnostikovan tip 2 dijabetesa, smanjenu toleranciju glukoze, kao i povećanu glikemiju našte [11].

#### **Masno tkivo kao izvor sekrecije retinol-vezujućeg proteina 4**

Retinol-vezujući protein 4 je negativan reaktant akutne faze koji pripada familiji lipokalina, a transportuje retinol iz jetre do perifernih tkiva. Iako je primarno mesto sinteze jetra, 20% RBP4 u krvi vodi poreklo iz masnog tkiva. Prvobitne studije na animalnim modelima

pokazuju povezanost ovog proteina sa IR. Insulinska rezistencija je praćena smanjenjem transportera 4 za glukozu-GLUT4 što je, pretpostavlja se, signal za sekreciju RBP4 od strane masnog tkiva, sa posledičnim razvojem sistemske IR [12].

Podaci iz literature pokazuju povećane vrednosti RBP4 u stanjima smanjene tolerancije glukoze [13], kod gojaznih osoba [14], kod dijabetičara [15], kod osoba sa sindromom policističnih ovarijuma [16], tj. u svim stanjima koja su usko povezana sa IR. Rezultati našeg istraživanja [14] pokazuju veće vrednosti RBP4 u grupi gojaznih ispitanica, u poređenju sa kontrolnom grupom normalno uhranjenih žena, što je u skladu sa ranijim istraživanjima Grahama i sar. [17]. S druge strane, neki istraživači nalaze niže vrednosti RBP4 kod gojaznih dijabetičara i onih bez dijabetesa u poređenju sa normalno uhranjenim ispitanicima [18] ili ne nalaze razliku u vrednostima RBP4 između normalno uhranjenih i predgojaznih/gojaznih žena u postmenopauzi [19].

Moguće objašnjenje za ovakva neslaganja u rezultatima je relativno mala grupa ispitanika u pojedinim studijama, različita metodologija merenja RBP4, efekat menopauze, koji nije isključen u brojnim studijama. Takođe, inicijalne studije nisu uzimale u razmatranje i bubrežnu funkciju, imajući u vidu da je ovaj protein relativno male molekulske mase (21,1kDa) i da se lako filtrira kroz glomerule i potom reapsorbuje u tubulima, tako da smanjena bubrežna funkcija, takođe, uzrokuje porast serumskih vrednosti RBP4 [20].

Rezultati našeg istraživanja [14] u populaciji gojaznih žena u postmenopauzi ne pokazuju povezanost RBP4 sa antropometrijskim parametrima, ni sa indeksom telesne mase, ni sa obimom struka, što je u suprotnosti sa rezultatima Janke i sar. [19] koji su utvrdili korelaciju između ovog proteina i obima struka. Dobijeni rezultati mogu biti objašnjeni činjenicom da u našem istraživanju nisu korišćene precizne imaging tehnike za merenje visceralnog masnog tkiva (CT, MR). S druge strane, vezu između RBP4 i visceralne gojaznosti potvrdio je Lee sa sar. [21], pokazavši da su gojazni ispitanici bez visceralne gojaznosti imali niže vrednosti RBP4 nego normalno uhranjeni ispitanici sa visceralnom gojaznošću.

**Retinol-vezujući protein 4 – metabolički faktor rizika**

Retinol-vezujući protein 4 se smatra i značajnim metaboličkim faktorom rizika [22]. Veće vrednosti ovog proteina su zabeležene kod pacijenata sa metaboličkim sindromom (MetS) [23]. Takođe, zabeležen je porast vrednosti RBP4 paralelno sa povećanjem broja komponenti MetS-a [24]. Studije u dečijoj i adolescentnoj populaciji, takođe, pokazuju povezanost između RBP4 s jedne strane, i gojaznosti, insulinske rezistencije i MetS, s druge [25], dok neke pokazuju tu vezu kod dečaka, ali ne i kod devojčica [26].

Međutim, ova povezanost nije potvrđena od strane nekih studija. Naime, prospektivna studija Choi i sar. [27], koja je pratila kohortu od 159 dečaka tokom 3 godine, pokazala je da se bazalne koncentracije RBP4 nisu značajno razlikovale između dece koja su razvila MetS i zdrave dece.

Studije beleže značajan pad vrednosti RBP4 nakon aerobnih vežbi kod gojaznih žena [28]. Smanjenje vrednosti ovog proteina u serumu uočeno je i nakon hirurške redukcije visceralnog masnog tkiva, a raspon ovih promena je korelirao sa težinom MetS-a [29]. Li i sar. [30] su zabeležili negativnu korelaciju između serumskih vrednosti RBP4 i vrednosti estradiola u kohorti gojaznih žena, pokazujući da estradiol može imati uticaj na vezu između gojaznosti i RBP4. Nadalje, Jung i sar. [31] su pokazali da estrogen značajno povećava ekspresiju ovog proteina u masnom tkivu, sugerišući da estrogen može biti medijator metabolizma retinoične kiseline putem regulacije ekspresije RBP4 u masnom tkivu. Deficit estrogena može aktivirati specifične regulatorne procese i, na taj način, može indukovati prekomernu ekspresiju RBP4 u ćelijama visceralnog masnog tkiva, čime se jednim delom mogu objasniti veće vrednosti ovog proteina u menopauzi, nego kod žena u reproduktivnom periodu.

Povezanost RBP4 sa lipidnim parametrima, pre i nakon smanjenja telesne mase, kao i značajan pad RBP4 nakon smanjenja telesne mase hirurškom intervencijom (dok insulinska senzitivnost i stepen inflamacije nisu imali uticaja), utvrdili su i Broch sa sar. [32]. Međutim, studija Huang i sar. [33] pokazuje da je RBP4 korelirao jedino sa vrednostima triglicerida, dok korelacije sa ostalim

kardiometaboličkim faktorima rizika nisu utvrđene.

Značajna povezanost RBP4 sa nivoom triglicerida [14, 33] sugeriše da RBP4 može biti i marker intrahepatičkog lipidnog sadržaja, na šta ukazuju rezultati Stefana i sar. [34], koji pronalaze povezanost RBP4 sa masnom jetrom, a ne sa generalizovanom gojaznošću. I neke druge studije, takođe, potvrđuju povezanost RBP4 sa nivoom triglicerida [35], sugerišući na mogućnost da na korelaciju RBP4 sa IR utiče, zapravo, nivo slobodnih masnih kiselina i triglicerida.

Insulinska rezistencija i kompenzatorna hiperinsulinemija doprinose povećanoj lipogenezi u jetri i doprinose nastanku nealkoholne steatoze jetre [36]. Premda hepatociti i adipociti predstavljaju mesto sinteze RBP4, i premda ovaj biomarker korelira sa IR [37], ne postoji jasna veza između RBP4 i nealkoholne steatoze jetre [38, 39]. U skorijoj studiji koja je obuhvatila 150 zdravih žena u postmenopauzi, pokazali smo da je RBP4 prediktor masne jetre [izražene indeksom masne jetre, engl. Fatty Liver Index (FLI)], nezavisno od IR [40]. Slične rezultate pokazala su istraživanja i u pedijatrijskoj populaciji [41].

**Retinol-vezujući protein 4 – faktor rizika za kardiovaskularne bolesti**

Novije studije pokazuju i da povišene vrednosti RBP4 mogu biti faktor rizika za KVB [3, 4, 42, 43]. Istraživanja beleže veće vrednosti ovog proteina kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću, u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika, kao i porast ovog proteina paralelno sa povećanjem broja stenotičnih krvnih sudova [44]. Rezultati naše prethodne studije [4] pokazuju značajnu povezanost između RBP4 i KV rizika izraženog Framingham Risk Skor-om (FRS), kod zdravih žena u postmenopauzi, kao i da ovaj protein, pored tradicionalnih faktora rizika, kao što su indeks telesne mase i nivo triglicerida u krvi, može značajno doprineti većem KV riziku. Slične rezultate je pokazala i studija Won i sar. [45] koja je vezu između RBP4 i FRS potvrdila kod oba pola, pretpostavljajući da RBP4 može biti medijator između visceralne gojaznosti i povećanog KV rizika, nezavisno od tradicionalnih faktora rizika.

Feng i sar. [46] su pokazali pozitivnu korelaciju između RBP4 i ateroskleroze karotidnih arterija kod obolelih od dijabetesa tip

2. Takođe, studije beleže veće serumske vrednosti ovog biomarkera kod ispitanika sa stenozom karotidnih arterija visokog stepena, kod dilatativne kardiomiopatije, koronarne arterijske bolesti, kao i uznapredovale srčane insuficijencije [42].

Jasno je da su IR i kompenzatorna hiperinsulinemija glavni faktori rizika za KVB [47]. Insulin je visoko potentan ćelijski faktor rasta koji može stimulisati proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, igrajući značajnu ulogu u stvaranju aterosklerotskog plaka [48]. Kako je RBP4 usko povezan sa IR, pretpostavlja se da upravo ovaj mehanizam može objasniti ulogu RBP4 u nastanku i progresiji ateroskleroze i KVB [47].

S druge strane, studija Huanga i sar. [33] u grupi zdravih žena u postmenopauzi pokazuje suprotno, sugerišući da i niske i visoke vrednosti RBP4 mogu biti povezane sa supkliničkom aterosklerozom, te da ovaj protein ne može biti značajan faktor KV rizika.

I druge studije ne pronalaze razliku u serumskoj koncentraciji RBP4 između ispitanika sa koronarnom arterijskom bolešću i kontrolne grupe zdravih ispitanika [49, 50]. U velikoj prospektivnoj šestogodišnjoj studiji koja je obuhvatila oko 1000 ispitanika, Mallat i sar. [51] su pokazali da je KV rizik rastao paralelno sa porastom vrednosti RBP4 u serumu. Međutim, nakon prilagođavanja za ostale faktore, pomenuta korelacija je nestala, sugerišući da ovaj protein ne može biti dobar prediktor KVB.

U našoj studiji koja je obuhvatila predgojazne/gojazne adolescentkinje [3], RBP4 u serumu je rastao paralelno sa povećanjem KV rizika. Međutim, ova veza nije nezavisna, već je abdominalna gojaznost [merena obimom struka] medijator ove povezanosti, što je još jedna potvrda povezanosti gojaznosti i KV rizika, čak i u adolescentnoj populaciji, iako se manifestne KVB retko prezentuju pre adultnog doba.

#### ZAKLJUČAK

Bolje poznavanje patofizioloških mehanizama koji dovode do stanja insulinske rezistencije, kompenzatorne hiperinsulinemije, kao i povećanja serumskih vrednosti retinol-vezujućeg proteina 4 može dovesti do razvijanja adekvatne terapijske strategije u cilju smanjenja kardiovaskularnog rizika, pa samim tim i bolesti srca i krvnih sudova kod osoba sa viškom telesne mase.

#### LITERATURA

- Banjari I, Bajraktarović-Labović S, Misir A, Huzjak B. Mediteranska prehrana i kardiovaskularne bolesti. *Timoč med glas.* 2013; 38(4): 188–95.
- Klasic A, Kavarić N, Soldatović I, Bjelaković B, Kotur-Stevuljević J. Relationship between cardiovascular risk score and traditional and nontraditional cardiometabolic parameters in obese adolescent girls. *J Med Biochem.* 2016; 35(3): 282–92.
- Klasic A, Kavarić N, Bjelaković B, Soldatović I, Martinović M, Kotur-Stevuljević J. The association between retinol-binding protein 4 and cardiovascular risk score is mediated by waist circumference in overweight/obese adolescent girls. *Acta Clin Croat.* 2017; 56: 1–7.
- Klasic A, Kotur-Stevuljević J, Kavarić N, Matic M. Relationship between cystatin C, retinol-binding protein 4 and Framingham risk score in healthy postmenopausal women. *Arch Iran Med.* 2016; 19 (12): 845–851.
- Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* 2014; 220: T47–T59.
- Martinac M, Pehar D, Karlović D, Babić D, Marčinko D, Jakovljević M. Metabolic syndrome, activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and inflammatory mediators in depressive disorder. *Acta Clin Croat.* 2014; 53: 55–71.
- Klasic A, Kotur-Stevuljević J, Kavarić N, Jovanović M, Škerović V. Correlation between fibrinogen level and cardiometabolic risk factors in overweight/obese postmenopausal women. *Timoč med glas.* 2016; 41 (2): 83–90.
- Klasic AN, Vasiljević ND, Simić TP, Djukić TI, Maksimović MZ, Matic MG. Association between C-reactive protein, anthropometric and lipid parameters among healthy normal weight and overweight postmenopausal women in Montenegro. *LabMed.* 2014; 45 (1): 12–6.
- Tesaro M, Canale MP, Rodia G, Di Daniele N, Lauro D, Scuteri A, et al. Metabolic syndrome, Chronic Kidney, and Cardiovascular Diseases: Role of Adipokines. *Card Res Pract.* 2011; 653182: 1–11.
- Bulum T, Duvnjak L. Insulin resistance in patients with type 1 diabetes: relationship with metabolic and inflammatory parameters. *Acta Clin Croat.* 2013; 52: 43–51.
- Altabas V, Altabas K, Berković-Cigrovski M, Maloševo S, Vrkljan M, Nikolić Heitzler V. Glucose metabolism disorders in patients with acute coronary syndromes. *Acta Clin Croat.* 2011; 51: 71–7.
- Wolf G. Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr Rev.* 2007; 65 (5): 251–6.
- Chavez AO, Colleta DK, Kamath S, Cromack DT, Monroy A, Folli F, et al. Retinol-binding protein 4 is associated with impaired glucose tolerance but not with whole body or hepatic insulin resistance in Mexican Americans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296: E758E764.
- Klasic A, Gouri A, Skerović V, Jovanović M, Kavarić N. Retinol-binding protein 4 in obese and obese-diabetic postmenopausal women in Montenegro. *Journal of Health Sciences.* 2015; 5 (3): 78–84.
- Budhitresna AAG, Suastika K, Budhiarta AAG, Anwar Santoso A. High Plasma RetinolBinding Protein 4 Levels as Risk Factor of Type 2 Diabetes Mellitus in Abdominal Obesity. *J Asian Fed Endocrin Soc.* 2013; 28 (2): 129–33.
- Chan TF, Tsai YC, Chiu PR, Chen YL, Lee CH, and Tsai EM. Serum retinol-binding protein 4 levels in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2010; 93 (3): 869–73.

17. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-Binding Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese, and Diabetic Subjects. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2552–63.
18. Comucci EB, Vasques ACJ, Geloneze B, Calixto AR, Pareja JC, Tambascia MA. Serum levels of retinol binding protein 4 in women with different levels of adiposity and glucose tolerance. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014; 58 (7): 709–14.
19. Janke J, Engeli S, Boschmann M, Adams F, Bohnke J, Luft FC, et al. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes.* 2006; 55 (10): 2805–10.
20. Mahfouz MH, Assiri AM, Mukhtar MH. Assessment of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Retinol-Binding Protein 4 (RBP4) in Type 2 Diabetic Patients with Nephropathy. *Biomark Insights.* 2016; 11: 31–40.
21. Lee JW, Im JA, Lee HR, Shim JY, Youn BS, Lee DC. Visceral Adiposity Is Associated with Serum Retinol Binding Protein-4 Levels in Healthy Women. *Obesity.* 2007; 15: 2225–32.
22. Kadoglou NPE, Lambadiari V, Gastouniotti A, Gkekas C, Giannakopoulos TG, Koulia K, et al. The relationship of novel adipokines, RBP4 and omentin-1, with carotid atherosclerosis severity and vulnerability. *Atherosclerosis.* 2014; 235 (2): 606–12.
23. Liu Y, Wang D, Li D, Sun R, Xia M. Associations of retinol-binding protein 4 with oxidative stress, inflammatory markers, and metabolic syndrome in a middle-aged and elderly Chinese population. *Diabetol Metab Syndr.* 2014; 6: 25.
24. Qi Q, Yu Z, Ye X, Zhao F, Huang P, Hu FB, et al. Elevated retinol-binding protein 4 levels are associated with metabolic syndrome in Chinese people. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92 (12): 4827–34.
25. Robberecht H, Hermans N. Biomarkers of metabolic syndrome: biochemical background and clinical significance. *Metab Syndr Relat D.* 2016; 14 (2): 47–93.
26. Lin CJ, Chu NF, Hung YJ, Chang JB, He CT, Hsiao FC, et al. The association of retinol-binding protein 4 with metabolic syndrome and obesity in adolescents: the effects of gender and sex hormones. *Clin Pediatr (Phila).* 2013; 52: 16–23.
27. Choi KM, Yannakoulia M, Park MS, Cho GJ, Kim JH, Lee SH, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein, retinol-binding protein 4, and adiponectin concentrations in relation to the development of the metabolic syndrome in Korean boys: a 3-y prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2011; 9: 1926.
28. Taghian F, Zolfaghari M, Hedayati M. Effects of Aerobic Exercise on Serum Retinol Binding Protein 4, Insulin Resistance and Blood Lipids in Obese Women. *Iran J Public Health.* 2014; 43 (5): 658–65.
29. Tschner A, Sturm W, Engl J, Kaser S, Laimer M, Laimer E, et al. Retinol-binding protein 4, visceral fat, and the metabolic syndrome: Effects of weight loss. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16: 2439–44.
30. Li Q, Wu W, Lin H, Chang X, Bian H, Xia M, et al. Serum retinol binding protein 4 is negatively related to estrogen in Chinese women with obesity: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* 2016; 15: 52.
31. Jung US, Jeong KJ, Kang JK, Yi K, Shin J, Seo HS, et al. Effects of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  on the expression of visfatin and retinol-binding protein 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Mol Med* 2013; 32: 723–8.
32. Broch M, Gómez JM, Auguet MT, Vilarrasa N, Pastor R, Elio I, et al. Association of retinol-binding protein-4 (RBP4) with lipid parameters in obese women. *Obes Surg.* 2010; 20 (9): 1258–64.
33. Huang G, Wang D, Khan UI, Zeb I, Manson JE, Miller V, et al. Associations between retinol-binding protein 4 and cardiometabolic risk factors and subclinical atherosclerosis in recently postmenopausal women: cross-sectional analyses from the KEEPS study. *Cardiovasc Diabetol.* 2012; 11: 52.
34. Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Schleicher E. High Circulating Retinol-Binding Protein 4 Is Associated With Elevated Liver Fat but Not With Total, Subcutaneous, Visceral, or Intramyocellular fat in Humans. *Diabetes Care.* 2007; 30: 1173–1178.
35. Flehmig G, Scholz M, Klötting N, Fasshauer M, Tönjes A, Stumvoll M, et al. Identification of Adipokine Clusters Related to Parameters of Fat Mass, Insulin Sensitivity and Inflammation. *PLoS ONE.* 2014; 9 (6): e99785.
36. Vassilatou E. Nonalcoholic fatty liver disease and polycystic ovary syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014; 20 (26): 8351–63.
37. Papaetis GS, Papakyriakou P, Panagiotou TN. Central obesity, type 2 diabetes and insulin: exploring a pathway full of thorns. *Arch Med Sci.* 2015; 11 (3): 463–82.
38. Terra X, Auguet T, Broch M, et al. Retinol binding protein-4 circulating levels were higher in nonalcoholic fatty liver disease vs. histologically normal liver from morbidly obese women. *Obesity (Silver Spring).* 2013; 21: 170–7.
39. Cengiz C, Ardicoglu Y, Bulut S, Boyacioglu S. Serum retinol-binding protein 4 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: does it have a significant impact on pathogenesis? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010; 22: 813–9.
40. Klisic A, Kavaric N, Jovanovic M, Soldatovic I, Gligorovic-Barhanovic N, Kotur-Stevuljevic J. Bioavailable testosterone is independently associated with fatty liver index in postmenopausal women. *Arch Med Sci.* 2017; 5 (3).
41. Huang SC, Yang YJ. Serum retinol-binding protein 4 is independently associated with pediatric NAFLD and fasting triglyceride level. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 56 (2): 145–50.
42. Zabetian-Targhi F, Mahmoudi MJ, Rezaei N, Mahmoud M. Retinol binding protein 4 in relation to diet, inflammation, immunity, and cardiovascular diseases. *Adv Nutr.* 2015; 6: 748–62.
43. Kadoglou NPE, Lambadiari V, Gastouniotti A, Gkekas C, Giannakopoulos TG, Koulia K, et al. The relationship of novel adipokines, RBP4 and omentin-1, with carotid atherosclerosis severity and vulnerability. *Atherosclerosis.* 2014; 235 (2): 606–12.
44. Lambadiari V, Kadoglou NP, Stasinou V, Maratou E, Antoniadis A, Kolokathis F, et al. Serum levels of retinol-binding protein-4 are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2014; 13: 121.
45. Won JC, Park CY, Oh SW, Park SW. Increased plasma levels of retinol-binding protein 4 with visceral obesity is associated with cardiovascular risk factors. *J Diabetes Invest.* 2012; 3 (5): 457–63.
46. Feng S, Zhu Y, Yan C, Wang Y, Zhang Z. Retinol binding protein 4 correlates with and is an early predictor of carotid atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus patients. *J Biomed Res.* 2015; 29 (6): 451–5.
47. Li F, Xia K, Sheikh MS, Cheng J, Li C, Yang T. Retinol binding protein 4 promotes hyperinsulinism induced proliferation of rat aortic smooth muscle cells. *J Mol Med Rep.* 2014; 9 (5): 1634–40.

- 
48. Faries PL, Rohan DI, Wyers MC, Marin ML, Hollier LH, Quist WC, et al. Vascular smooth muscle cells derived from atherosclerotic human arteries exhibit greater adhesion, migration, and proliferation than venous cells. *J Surg Res.* 2002; 104: 22–8.
  49. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Vanhoutte PM, Krishnaswamy S, Xu A. Serum retinol-binding protein 4 as a marker for cardiovascular disease in women. *PLoS One* 2012; 7: e48612.
  50. Mahmoudi MJ, Mahmoudi M, Siassi F, Hedayat M, Pasalar P, Chamari M, et al. Circulating retinol-binding protein 4 concentrations in patients with coronary artery disease and patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 2012; 32: 105–10.
  51. Mallat Z, Simon T, Benessiano J, Clement K, Taleb S, Wareham NJ, et al. Retinol-binding protein 4 and prediction of incident coronary events in healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 255–60.