

Procjena kardiovaskularnog rizika mjerenjem omega-3 indeksa kod oboljelih od nealkoholne masne bolesti jetre

Hok, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:367382>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Marija Hok
823/N

**PROCJENA
KARDIOVASKULARNOG RIZIKA
MJERENJEM OMEGA-3 INDEKSA
KOD OBOLJELIH OD
NEALKOHOLNE MASNE
BOLESTI JETRE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za znanost o prehrani na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Odjelu za kliničku prehranu Kliničkog bolničkog centra Zagreb te na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Darije Vranešić Bender, docentice u naslovnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Od srca zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Dariji Vranešić Bender na pomoći i konstruktivnim savjetima pri izradi ovog rada, ali i povjerenju koje mi je pružila uključivši me u studiju iz koje sam toliko toga naučila.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Ivančici Delaš s Medicinskog fakulteta na uloženom vremenu, strpljenju i nesebičnoj pomoći prilikom laboratorijskog rada, kao i tehničkom suradniku Goranu Kapustiću. Zahvaljujem i dr. med. Viktoru Domisloviću na pomoći i savjetima prilikom izrade statističke analize.

Najveću zahvalu upućujem roditeljima i sestri na svemu što su učinili za mene tijekom mog školovanja, na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i žrtvi... sva moja postignuća - i vaša su! Veliko hvala svim prijateljima i rodbini, koji su bili uz mene kada je bilo najpotrebnije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za znanost o prehrani

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

PROCJENA KARDIOVASKULARNOG RIZIKA MJERENJEM OMEGA-3 INDEKSA KOD OBOLJELIH OD NEALKOHOLNE MASNE BOLESTI JETRE

Marija Hok, 823/N

Sažetak: Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) najčešći je uzrok kroničnih bolesti jetre u zapadnim zemljama. Posljednjih desetak godina objavljen je veći broj studija koje govore o povezanosti NAFLD-a i kardiovaskularnih bolesti, a pokazalo se da su kardiovaskularne bolesti uz samu bolest jetre najčešći uzrok povećanog mortaliteta u bolesnika s NAFLD-om. Cilj ovog rada bio je procijeniti kardiovaskularni rizik 14 ispitanika oboljelih od NAFLD-a mjerenjem *omega-3 indeksa*, te odrediti postoji li korelacija omega-3 indeksa s ostalim pokazateljima kardiovaskularnog rizika - antropometrijskim parametrima, koncentracijom lipida u krvi, jetrenim enzimima i vrijednošću *Indeksa masne jetre*. Korištene su antropometrijske metode, ekstrakcija ukupnih lipida i plinska kromatografija. Rezultati procjene kardiovaskularnog rizika pokazuju da je omega-3 indeks kod ispitanika ženskog spola bio $3,25 \pm 1,14$ %, dok je kod ispitanika muškog spola bio $3,74 \pm 0,97$ %. Dobivene vrijednosti su veoma male, te prema njima ispitanici oba spola spadaju u skupinu s velikim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

Ključne riječi: Nealkoholna masna bolest jetre, kardiovaskularne bolesti, Omega-3 indeks, Indeks masne jetre, višestruko nezasićene masne kiseline

Rad sadrži: 46 stranica, 10 slika, 10 tablica, 92 literaturna navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Doc. dr. sc. Darija Vranešić Bender, dipl.ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić
2. Doc. dr. sc. Darija Vranešić Bender, dipl.ing.
3. Prof. dr. sc. Ivančica Delaš
4. Izv. prof. dr. sc. Zvonimir Šatalić (zamjena)

Datum obrane: 17. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Quality Control

Laboratory for Nutrition Science

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

ASSESSMENT OF CARDIOVASCULAR RISK BY MEASURING OMEGA-3 INDEX IN NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE PATIENTS

Marija Hok, 823/N

Abstract: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease in Western countries. Over the last decade, a number of studies has been published that indicate the association of NAFLD and cardiovascular disease. Cardiovascular disease with liver disease is the most common cause of increased mortality in patients with NAFLD. The aim of this thesis was to assess the cardiovascular risk of 14 patients with NAFLD by measuring the *omega-3 index* and to determine whether there is correlation of the omega-3 index with other indicators of cardiovascular risk - anthropometric parameters, lipid concentration in the blood, liver enzymes and the value of *Fatty Liver Index*. Anthropometric methods, total lipid extraction and gas chromatography were used. The results of cardiovascular risk assessment show that the omega-3 index in female subjects was 3.25 ± 1.14 %, while in male subjects it was 3.74 ± 0.97 %. The obtained values are very low, and according to them, both sexes belong to a group with a high risk of cardiovascular disease.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, cardiovascular diseases, Omega-3 index, Fatty liver index, PUFA

Thesis contains: 46 pages, 10 figures, 10 tables, 92 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Assist. prof. Darija Vranešić Bender, PhD

Reviewers:

1. Ines Panjkota Krbavčić, PhD, Full professor
2. Darija Vranešić Bender, PhD, Assistant professor
3. Ivančica Delaš, PhD, Full professor
4. Zvonimir Šatalić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 17th July 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Nealkoholna masna bolest jetre	2
2.2. Epidemiologija nealkoholne masne bolesti jetre	3
2.3. Patogeneza nealkoholne masne bolesti jetre	3
2.4. Dijagnostika nealkoholne masne bolesti jetre	5
2.5. Terapijski pristup liječenju nealkoholne masne bolesti jetre	7
2.5.1. Promjena životnih navika	7
2.5.2. Upotreba dodataka prehrani	7
2.5.3. Farmakoterapija	9
2.5.4. Kirurški zahvati	9
2.6. Nealkoholna masna bolest jetre i kardiovaskularne bolesti	10
2.7. Procjena kardiovaskularnog rizika	11
2.7.1. Metabolizam omega-6 i omega-3 nezasićenih masnih kiselina	11
2.7.2. Prehrambeni izvori i preporuke za unos omega-3 nezasićenih masnih kiselina	13
2.7.3. Mehaniizam kardioprotektivnog djelovanja omega-3 nezasićenih masnih kiselina	14
2.7.4. Omega-3 indeks	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. Ispitanici	19
3.2. Materijali	20
3.2.1. Uređaji	20
3.2.2. Pribor	20
3.2.3. Kemikalije	20
3.3. Metode	21
3.3.1. Antropometrijska mjerenja	21
3.3.2. Uzorkovanje krvi	21
3.3.3. Ekstrakcija ukupnih lipida eritrocita	22
3.3.4. Priprema metilnih estera masnih kiselina	22
3.3.5. Plinska kromatografija	22
3.3.6. Obrada podataka	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Osnovne karakteristike ispitanika	24
4.1.1. Raspodjela ispitanika prema spolu i dobi	24

4.1.2. Antropometrijski parametri	25
4.1.3. Stupanj povezanosti antropometrijskih parametara	26
4.2. Vrijednosti serumskih lipida	27
4.2.1. Stupanj povezanosti antropometrijskih parametara i serumskih lipida.....	28
4.3. Vrijednosti jetrenih enzima	28
4.3.1. Stupanj povezanosti antropometrijskih parametara i jetrenih enzima	29
4.3.2. Stupanj povezanosti koncentracije serumskih lipida i jetrenih enzima	30
4.4. Vrijednost omega-3 indeksa	31
4.4.1. Stupanj povezanosti omega-3 indeksa s ostalim parametrima	32
4.5. Vrijednost Indeksa masne jetre	34
4.5.1. Stupanj povezanosti Indeksa masne jetre s ostalim parametrima	34
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	39
7. PRILOZI.....	47

1. UVOD

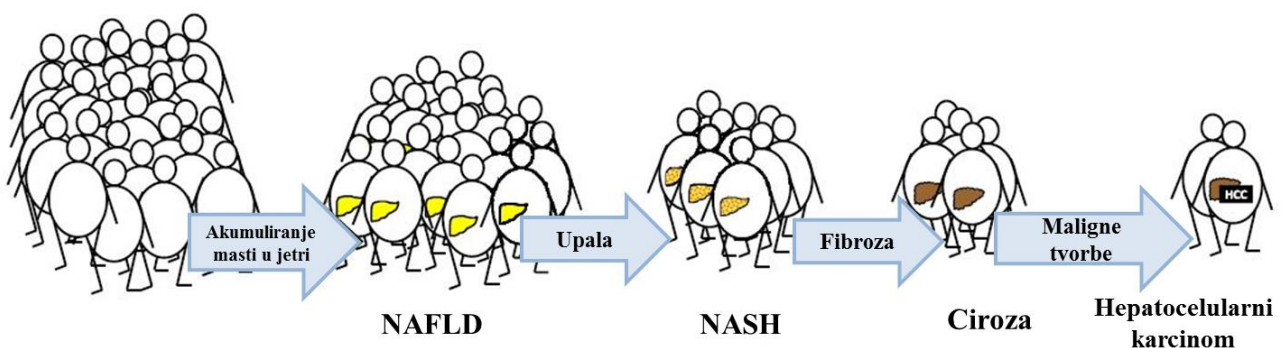
Nealkoholna masna bolest jetre (engl. *Nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) najčešći je uzrok kroničnih bolesti jetre širom svijeta. Posljednjih godina, prevalencija se povećala na više od 30 % kod odraslih osoba, a incidencija još uvijek raste. Većina oboljelih od NAFLD-a ima jednostavnu steatozu, a u više od trećine pacijenata NAFLD napreduje do teškog oblika nealkoholnog steatohepatitisa (engl. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*, NASH) (Dietrich i Hellerbrand, 2014). Za potvrdu dijagnoze NAFLD-a, mora postojati dokaz o prisutnosti steatoze jetre, bilo histološki ili ultrazvučno. Nadalje, ne smiju biti prisutni sekundarni uzroci akumulacije masti, kao npr. značajna konzumacija alkohola, dugotrajna upotreba lijekova ili prisutnost monogenih nasljednih bolesti (Chalasani i sur., 2018). Jedan od neinvazivnih testova koji se pokazao korisnim u dijagnostici jer s velikom točnošću može utvrditi bolest masne jetre je Indeks masne jetre (engl. *Fatty liver index*) (Sun i sur., 2018). Inzulinska rezistencija i pretilost smatraju se glavnim čimbenicima rizika NAFLD-a, zbog čega NAFLD dovodi do povećanog rizika za razvoj dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti, te se smatra jetrenom manifestacijom metaboličkog sindroma (Saltzman i sur., 2018). Posljednjih desetak godina objavljen je veći broj studija koje govore o povezanosti NAFLD-a i kardiovaskularnih bolesti, a pokazalo se da su kardiovaskularne bolesti, uz samu bolest jetre, najčešći uzrok povećanog mortaliteta u bolesnika s NAFLD-om. Moguće je da su bolesnici s fibrozom i patohistološki verificiranim NASH-om u većem riziku nego bolesnici s jednostavnim steatozom. Brojni autori predlažu redoviti probir na kardiovaskularne bolesti kod bolesnika s NAFLD-om (Mikolašević i sur., 2016). *Omega-3 indeks* u terminologiju je uveden prije nekoliko godina, a označava sadržaj eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) u eritrocitima, izražen kao njihov udio u ukupnim masnim kiselinama. Tvorci tog parametra tvrde kako je on odličan pokazatelj sadržaja ω -3 nezasićenih masnih kiselina u tkivima, te predstavlja fiziološki značajan i neovisan čimbenik rizika za kardiovaskularne bolesti, s potencijalnim značajem u kliničkoj primjeni (Vranešić Bender, 2011).

S obzirom da oboljeli od NAFLD-a imaju veći rizik smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, glavni cilj ovog istraživanja bio je procijeniti kardiovaskularni rizik oboljelih od NAFLD-a mjerenjem omega-3 indeksa. Također, cilj je bio i odrediti postoji li povezanost omega-3 indeksa s ostalim pokazateljima kardiovaskularnog rizika - antropometrijskim parametrima, koncentracijom lipida u krvi, aktivnošću jetrenih enzima i vrijednošću Indeksa masne jetre.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Nealkoholna masna bolest jetre

Nealkoholna masna bolest jetre (engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) najčešći je uzrok kroničnih bolesti jetre u zapadnim zemljama, a predviđa se da će do 2020. godine biti glavni uzrok zatajenja i transplantacije jetre (Marjot i sur., 2018). NAFLD prvi put je opisao Ludwig sa suradnicima 1980. godine (prema Demir i sur., 2015), a obuhvaća cijeli spektar bolesti masne jetre u pojedinaca bez značajne potrošnje alkohola (definirano kao <40 g dnevno za muškarce i <20 g dnevno za žene), u rasponu od masne jetre, preko steatohepatitisa i ciroze jetre, do hepatocelularnog karcinoma (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) (slika 1). Histološki, NAFLD se može kategorizirati kao nealkoholna masna jetra (engl. *Non-alcoholic fatty liver*, NAFL) ili kao nealkoholni steatohepatitis (engl. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*, NASH). NAFL se definira kada $\geq 5\%$ hepatocita pokazuje akumuliranje masti, ali bez hepatocelularnog oštećenja. NASH se definira kada je uz prisutnost $\geq 5\%$ hepatocita kod kojih se akumulira mast, prisutna i upala uz hepatocelularno oštećenje sa ili bez fibroze (Chalasan i sur., 2018). Posljednjih godina sve je veći broj publikacija koje govore u prilog tome da NAFLD nije bolest ograničena samo na jetru, nego je udružena s nizom ekstrahepatalnih bolesti i stanja. Najčešće je povezana s kardiovaskularnim bolestima, kroničnom bubrežnom bolesti i dijabetesom tipa 2 (Mikolašević i sur., 2016), pri čemu se smatra jetrenom manifestacijom metaboličkog sindroma (Saltzman i sur., 2018; Hok, 2018).



Slika 1. Prirodni tijek nealkoholne masne bolesti jetre
(Prilagođeno prema Dietrich i Hellerbrand, 2014)

2.2. Epidemiologija nealkoholne masne bolesti jetre

Od NAFLD-a, najčešćeg poremećaja jetre u zapadnim zemljama, boluje 17 - 46 % odraslih, ovisno o dijagnostičkoj metodi, dobi, spolu i etničkoj pripadnosti. Prisutan je kod 7 % osoba normalne tjelesne mase, i to češće kod žena i osoba mlađe dobi s katalitičkom koncentracijom jetrenih enzima unutar preporučenih vrijednosti. I kod takvih bolesnika bolest može biti progresivna (EASL i sur., 2016). Prevalencija NAFLD-a je 30 - 40 % u muškaraca i 15 - 20 % u žena, a kod oboljelih od dijabetesa tipa 2 javlja se čak u 70 % pacijenata (Byrne i Targher, 2015). Prevalencija NAFLD-a, ali i progresivnijih stadija veća je u starijoj životnoj dobi, poglavito zbog dugog trajanja bolesti. Primijećena je razlika između rasa, s najvećom prevalencijom NAFLD-a u Hispanoamerikanaca, zatim bijelaca, a najmanjom u Afroamerikanaca, ukazujući na postojanje genetske predispozicije za razvoj bolesti (Gomerčić Palčić, 2015). Prekomjerni prehrambeni unos, pretilost i inzulinska rezistencija glavni su čimbenici rizika za razvoj NAFLD-a. Okolišni čimbenici, disbioza crijevne mikrobiote, genetske varijacije (osobito PNPLA3 genotip) uz prethodnu pojavu dijabetesa tipa 2, ciroze i bolesti masne jetre u obitelji, povećaju rizik za razvoj NAFLD-a (Wai-Sun Wong i sur., 2018).

2.3. Patogeneza nealkoholne masne bolesti jetre

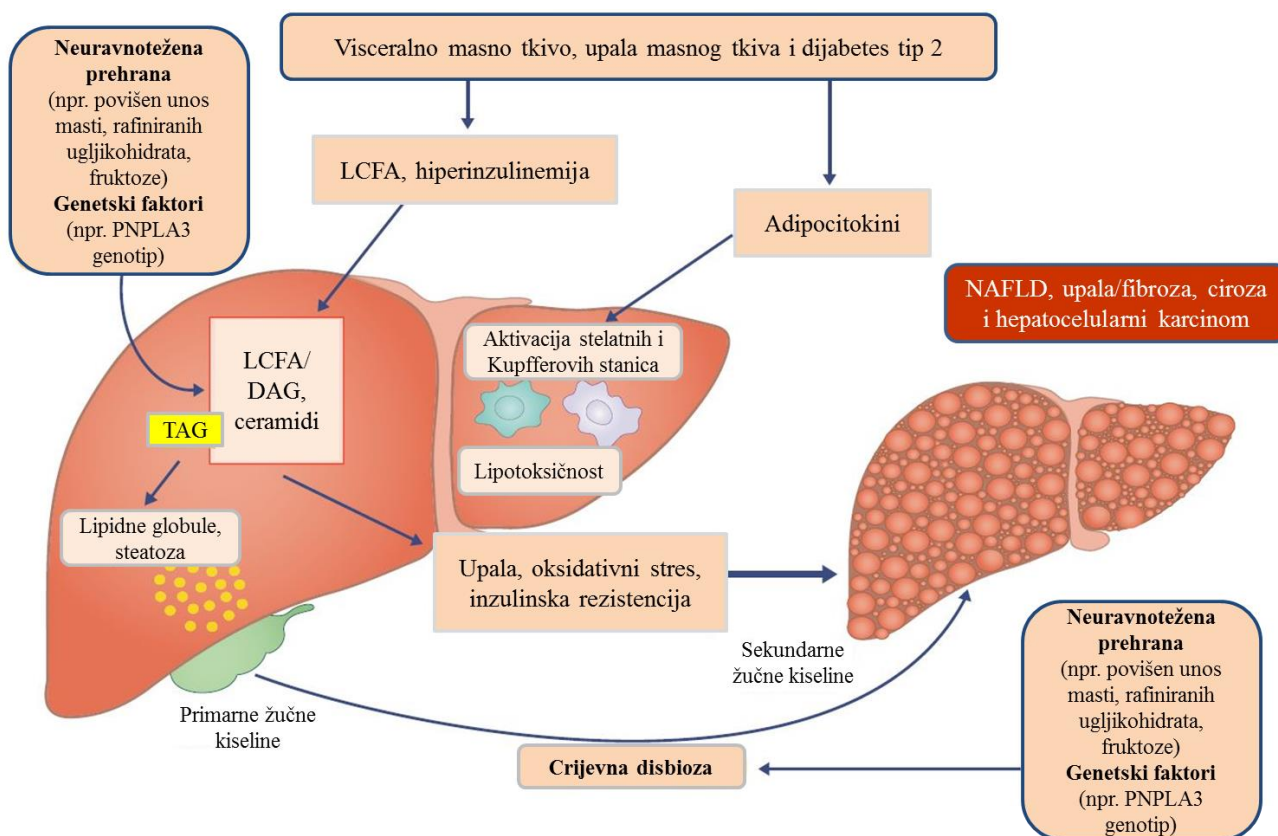
Jetra ima glavnu ulogu u metabolizmu lipida: pri ulasku, proizvodnji, pohrani te eliminaciji lipida iz organizma. Poremećaj u bilo kojem od tih procesa može dovesti do NAFLD-a (Berlanga i sur., 2014). Pojava i progresija NAFLD-a pripisuje se nizu čimbenika koji su dio teorije „višestrukih udarača“, a koja kaže da je NAFLD rezultat upale u jetri izazvane brojnim okidačima povezanim s masnim tkivom (Saltzman i sur., 2018; Hok, 2018).

Visceralno masno tkivo generira višestruke signale koji utječu na promjenu metabolizma lipida i glukoze, što dovodi do akumulacije masti u jetri (steatoza) i stvaranja proupalnih uvjeta koji su okidač za oštećenje jetre (Rinella, 2015). Steatotična jetra postaje osjetljiva na „druge udarce“ (neravnoteža adipocitokina/citokina, toksini kao što su lipopolisaharidi koji ulaze u cirkulaciju uslijed bakterijskog prerastanja u tankom crijevu i crijevne permeabilnosti, disfunkcija mitohondrija, oksidativni stres, lipidna peroksidacija, aktivacija Kupfferovih i stelatnih stanica) koji su najvjerojatniji uzroci hepatocelularne ozljede, poticanja upalne aktivnosti, apoptoze i fibroze u oboljelih s progresivnom bolešću (Gomerčić Palčić, 2015).

Inzulinska rezistencija (IR) igra ključnu ulogu u patogenezi nastanka NAFLD-a. Kao jedan od simptoma metaboličkog sindroma proizlazi iz kompleksnih interakcija proupalnih cirkulirajućih medijatora s tkivima i organima, ali i genetske podloge te stila života (Petta i sur., 2016). Povećana aktivacija hormon-osjetljive lipaze u adipocitima kod IR, unos hrane bogate mastima te pojačana lipoliza, dovode do povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina (SMK) u plazmi (Gomerčić Palčić, 2015). Kronična povećana razina SMK-a može ometati metaboličke puteve (Berlanga i sur., 2014), te rezultirati sintezom ceramida i diacilglicerola u jetri. Oni dodatno pojačavaju jetrenu IR, progresiju oksidativnog stresa u mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu te sintezu proupalnih citokina (faktor nekroze tumora α [TNF- α] i interleukina [IL-6, IL-1 β]). To dovodi do oštećenja hepatocita i stanja lipotoksičnosti, a u konačnici i nastanka NASH-a ili ciroze jetre (Gomerčić Palčić, 2015) (slika 2). Također, adiponektin, leptin, rezistin, TNF- α i IL-6 koji su vezani uz steatozu, pridonose i većem riziku od kardiovaskularnih bolesti (Yoshitaka i sur., 2017).

U fiziološkim uvjetima, stimulirana je sinteza triacilglicerola s ciljem odstranjenja viška SMK-a (Berlanga i sur., 2014). Temeljem eksperimentalnih studija pokazalo se da nakupljanje SMK u jetri može dovesti do direktne ozljede hepatocita povećanjem oksidativnog stresa i aktivacijom upalnih puteva iz čega proizlazi da je akumulacija triacilglicerola vjerojatno protektivni mehanizam (Gomerčić Palčić, 2015). Kolesterol i SMK, osobito kada se akumuliraju u mitohondrijima, predstavljaju „agresivne“ lipide koji dovode do oštećenja jetre posredovanih TNF- α i do nastanka reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) (Berlanga i sur., 2014; Hok, 2018).

Jedan od puteva koji doprinosi upalnim procesima u jetri kod pacijenata s NAFLD-om je i međusobna povezanost metabolizma jetre i mikroorganizama crijeva. Određena vrsta prehrane (npr. hrana bogata fruktozom i/ili višestruko nezasićenim masnim kiselinama) možda ne utječe direktno na jetrenu akumulaciju masti i upalu, ali utječe indirektno putem promjene sastava crijevne mikrobiote – disbiozom (Demir i sur., 2015) (slika 2).



Slika 2. Utjecaj različitih čimbenika na razvoj nealkoholne masne bolesti jetre, ciroze i hepatocelularnog karcinoma. (DAG - diacilgliceroli, TAG - triacilgliceroli, LCFA - dugolančane masne kiseline, PNPLA3 - engl. *patatin-like phospholipase domain-containing* 3) (Prilagođeno prema Byrne i Targher, 2015)

2.4. Dijagnostika nealkoholne masne bolesti jetre

Unatoč sve većoj prevalenciji, NAFLD ostaje uglavnom nedijagnosticiran i netretiran u rutinskoj medicinskoj praksi. Većina bolesnika s NAFLD-om nema nikakvih simptoma, dok samo rijetki navode nelagodu u gornjem desnom kvadrantu abdomena ili pojačani umor. Dijagnoza se najčešće postavlja slučajno tijekom pregleda abdomena ultrazvukom učinjenim zbog nekog drugog razloga, ili nalazom povećanih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova (aspartat-aminotransferaza, AST; alanin-aminotransferaza, ALT ili γ -glutamil-transferaza, GGT). Rano prepoznavanje bolesti od velike je važnosti za pravodobno, ispravno i uspješno liječenje (Bukmir i sur., 2015).

Zlatni standard u dijagnostici NAFLD-a predstavlja biopsija jetre, međutim, biopsija nije prikladna za sve pacijente i ponekad može dovesti do komplikacija. Stoga se često u dijagnostici masne jetre koriste neinvazivne tehnike kao što su magnetska rezonancija (MR), računalna tomografija (CT) i ultrazvuk (UZV). Dok je MR vrlo osjetljiv u otkrivanju nižih stupnjeva steatoze, ultrazvuk i CT pružaju polukvantitativna mjerenja. Nadalje, ove metode su povezane s velikim troškovima i obično nisu prikladne za probir na velikoj populaciji (Jäger i sur., 2015). Radi neinvazivne dijagnostike NAFLD-a, do sada je razvijeno više bodovnih sustava temeljenih na različitim biomarkerima i čimbenicima rizika: *SteatoTest*, *Indeks masne jetre*, *NAFLD liver fat score (LFS)*, *lipid accumulation product (LAP)* i *hepatic steatosis index (HSI)* (Gomerčić Palčić, 2015). Njihova prednost je što se mogu koristiti za probir na velikoj populaciji, no zbog relativno kratke upotrebe učinkovitost u predikciji NAFLD-a još uvijek nije poznata (Gomerčić Palčić, 2015).

Indeks masne jetre (engl. *Fatty liver index, FLI*) razvijen je na talijanskoj populaciji dobi 18 – 75 godina, koja je uključivala 216 osoba sa i 280 osoba bez sumnje na jetrenu bolest, a prisutnost masne jetre identificirana je pomoću ultrazvuka. FLI uključuje četiri podatka iz rutinske kliničke prakse: vrijednost indeksa tjelesne mase (ITM), koncentraciju triacilglicerola, katalitičku koncentraciju GGT-a te opseg struka (Bedogni i sur., 2006). Formula za izračun Indeksa masne jetre glasi:

$$FLI = \left(\frac{e^{0,953 \cdot \log_e(\text{trigliceridi}) + 0,139 \cdot ITM + 0,718 \cdot \log_e GGT + 0,053 \cdot \text{opseg struka} - 15,745}}{1 + e^{0,953 \cdot \log_e(\text{trigliceridi}) + 0,139 \cdot ITM + 0,718 \cdot \log_e GGT + 0,053 \cdot \text{opseg struka} - 15,75}} \right) * 100$$

pri čemu je:

TG = koncentracija triacilglicerola (mg dL⁻¹); ITM = indeks tjelesne mase (kg m⁻²);

GGT = katalitička koncentracija γ -glutamilttransferaze (U L⁻¹).

Vrijednost *Indeksa masne jetre* kreće se od 0 do 100. U Bedognijevoj studiji je s velikom dijagnostičkom točnošću određeno da ispitanici s vrijednošću FLI < 30 nemaju masnu jetru, dok je onima s FLI \geq 60 utvrđena bolest masne jetre (prema Jäger-u i sur., 2015). Naknadno provedene studije su pokazale da FLI s velikom točnošću ukazuje na bolest masne jetre, te da je povezan s inzulinskom rezistencijom, ranom aterosklerozom i rizikom za srčane bolesti, zbog čega može biti od koristi u ranoj dijagnostici (Sun i sur., 2018).

2.5. Terapijski pristup liječenju nealkoholne masne bolesti jetre

Većina oboljelih od NAFLD-a je pretila i boluje od metaboličkog sindroma. Stoga je cilj liječenje usmjeriti na pridružene metaboličke komorbiditete kao što su inzulinska rezistencija, hiperlipidemija i dijabetes tip 2. To se postiže ponajprije promjenom životnih navika (Bukmir i sur., 2015; Chalasani i sur., 2018), a potom i farmakoterapijom, iako trenutno nema odobrenih farmakoloških sredstava za liječenje NASH-a i NAFLD-a (Konerman i sur., 2018). Uspješan tretman NAFLD-a poboljšat će ishod bolesti, tj. smanjiti progresiju NAFLD-a do ciroze i hepatocelularnog karcinoma, a time i smrtnost (EASL i sur., 2016; Hok, 2018).

2.5.1. Promjena životnih navika

Prehrana igra važnu ulogu u terapiji NAFLD-a. Od svih načina prehrane, kao dijelom terapije NAFLD-a najboljom se pokazala mediteranska prehrana koja je, uz blagotvorne učinke na jetru i kardiometaboličke čimbenike, bila učinkovita pri smanjenju tjelesne mase (Sofi i Casini, 2014). Provedene studije, uključujući PREDIMED studiju, podupiru pretpostavku da je mediteranska prehrana povezana s manjom prevalencijom NAFLD-a. Blagotvoran učinak mediteranske prehrane povezan je s poboljšanjem kardiometaboličkog statusa (smanjenjem serumskih lipida i regulacijom glikemije) i antioksidativnim učinkom komponenata mediteranske prehrane (polifenoli i vitamin E), čime se smanjuje oksidativni stres ključan u nastanku inzulinske rezistencije (Baratta i sur., 2017).

Štetne posljedice pretilosti, dijabetesa i drugih komponenata metaboličkog sindroma u pacijenata s NAFLD-om, dodatno su povezane s manjom razinom tjelesne aktivnosti, što je primijećeno kod oboljelih (Ahmed i sur., 2015). Aerobna aktivnost, npr. hodanje i vožnja biciklom, svima je dostupan način brige za zdravlje. Tijekom aerobnog vježbanja dolazi do veće potrošnje energije, čime je značajniji utjecaj na smanjenje tjelesne mase kao i na druge čimbenike povezane s NAFLD-om, kao što su glikirani hemoglobin HbA1c, krvni tlak i serumski kolesterol (Hashida i sur., 2017).

2.5.2. Upotreba dodataka prehrani

Ljekovita biljka sikavica (lat. *Silybum marianum*) od davnina je poznata u liječenju bolesti jetre. Aktivna tvar u sikavici je silimarin - kompleksna mješavina sedam flavonolignana.

Kao tretman pri liječenju NAFLD-a, preporučuje se kombinacija silimarina uz promjenu životnih navika. Silimarin je pokazao sličan učinak kao i neki lijekovi u vidu antioksidativnog (npr. NOX-1/4 inhibitori), protufibroznog (npr. antagonist galektin-3, simtuzumab) i protuupalnog (npr. sirtuini) djelovanja, ali sa znatno manjim nuspojavama (Colica i sur., 2017).

Jetra se u najvećoj mjeri opskrbljuje krvlju portalnim krvotokom, pri čemu postoji anatomska os koja povezuje jetru s crijevima. U slučaju poremećaja te osi uslijed intestinalne disbioze, bakterijskog prerastanja tankog crijeva ili povećane crijevne propusnosti, može doći do razvoja NAFLD-a. Suplementacija probioticima u oboljelih od NAFLD-a dovodi do obnove crijevne mikrobiote i smanjenja upalnih procesa u jetri (Lavekar i sur., 2017).

U složenoj patogenezi NAFLD-a, oksidativni stres igra važnu ulogu u nastanku ozljede hepatocita. Vitamin E predstavlja obećavajući pristup NAFLD-u djelujući na komponente oksidativnog stresa (El Hadi i sur., 2018). U placebo kontroliranoj PIVENS studiji ispitivan je učinak pioglitazona i vitamina E na NASH. Poboljšanje je bilo značajnije u oboljelih koji su uzimali visoke doze vitamina E (800 IU na dan) u usporedbi s placebom nakon 96 tjedana, dok za pioglitazon poboljšanje nije bilo statistički značajno. Histološka analiza je pokazala smanjenje baloniranja hepatocita i lobularne upale uslijed primjene vitamina E, što odražava očekivani antioksidativni učinak pri smanjenju oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom (Chitturi i sur., 2018).

Postoji poveznica između nedostatka vitamina D i komponenata metaboličkog sindroma, kao što su inzulinska rezistencija i dislipidemija (Sharifi i Amani, 2017). Smatra se da je u pozadini vezanje vitamina D na specifični vitamin D receptor eksprimiran na različitim vrstama stanica u jetri (Barchetta i sur., 2017). S obzirom da je preuranjeno govoriti o suplementaciji vitaminom D kao tretmanom liječenja NAFLD-a, za početak se preporučuje slijediti smjernice Endokrinološkog društva (engl. *Endocrine Society*) i djelovati na deficit vitamina D kod oboljelih od NAFLD-a (Sharifi i Amani, 2017).

Omega-3 višestruko nezasićene masne kiseline (m.k.) (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*), eikozapentaenska kiselina (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA), imaju povoljan učinak u regulaciji metaboličkih puteva lipida u jetri, funkcije masnog tkiva, upale te smanjenju nakupljanja masti u jetri, na način da smanjuju gensku ekspresiju nekoliko transkripcijskih faktora koji su uključeni u lipogenezu i akumulaciju triacilglicerola (Nobili i sur., 2016).

Rezultati metaanalize koja je proučavala utjecaj omega-3 PUFA u tretmanu NAFLD-a, podupiru njihov blagotvoran učinak u optimizaciji steatoze jetre, razine jetrenih enzima i razine lipida u krvi (triacilgliceroli i HDL), pri čemu mogu usporiti napredak NAFLD-a (Lu i sur., 2016).

2.5.3. Farmakoterapija

Trenutno nema odobrenih farmakoterapijskih sredstava za liječenje NASH-a i NAFLD-a od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*) i EMA (engl. *European Medicines Agency*) (Konerman i sur., 2018), zbog čega se primjenjuju lijekovi s dokazanim učinkom, iako u primjeni izvan odobrene indikacije („off-label“) (Rotman i Sanyal, 2017).

Četiri su glavne skupine lijekova s utjecajem na ciljane metaboličke puteve: (1) usmjereni na smanjenje nakupljanja masti u jetri i nastali metabolički stres; (2) usmjereni na oksidativni stres, upalu i ozljede jetre nastale uslijed metaboličkog stresa; (3) koji ciljano djeluju na crijeva pri čemu imaju utjecaj na interakciju između jetre i crijeva; (4) antifibrotici, čiji je cilj smanjiti napredovanje fibroze i nastale komplikacije (Rotman i Sanyal, 2017). Brojni potencijalni lijekovi su u II. i III. fazi kliničkih ispitivanja, a dobiveni podaci pokazuju obećavajuće pomake u farmakoterapiji upale, fibroze i steatoze (Konerman i sur., 2018). Uzevši u obzir kompleksnu patogenezu NAFLD-a, čini se da će kombinirana terapija biti budući pristup u liječenju (Tilg, 2017).

2.5.4. Kirurški zahvati

U pacijenata oboljelih od NAFLD-a koji ne reagiraju na promjenu životnih navika, kao ni na farmakoterapiju, opcija je barijatrijska operacija, kako za smanjenje tjelesne mase, tako i metaboličkih komplikacija s dugoročnim stabilnim rezultatima (EASL i sur., 2016). Barijatrijska operacija se predlaže kao terapija izbora kod oboljelih od dijabetesa tipa 2 ili metaboličkog sindroma sa II i III stupnjem pretilosti (Chitturi i sur., 2018). Pokazalo se da barijatrijska operacija može dovesti do poboljšanja histološkog stanja jetre, uključujući steatozu, upalu i fibrozu, čak i u morbidno pretilih pacijenata s NASH-om dokazanim biopsijom (Shouhed i sur., 2017).

NASH je trenutno druga najčešća i najbrže rastuća indikacija za transplantaciju jetre u pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom u SAD-u (Chitturi i sur., 2018). Indikacije za transplantaciju jetre kod NASH-om uzrokovane ciroze i hepatocelularnog karcinoma su iste kao i kod ostalih bolesti jetre (Pais i sur., 2016). Stopa preživljavanja nakon transplantacije jetre u pacijenata s NASH-om ista je kao i kod drugih bolesti, pri čemu su pacijenti s NASH-om skloniji smrti zbog povezanih rizičnih metaboličkih faktora, kao što su pretilost, povišen krvni tlak i dijabetes (Zezos i Renner, 2014). Nakon transplantacije jetre, u pacijenata s cirozom uzrokovanom NASH-om moguće je ponovno javljanje NASH-a, koje je vremenski ovisno, a prema procjenama može dosegnuti 100 % u periodu od pet godina nakon transplantacije (Pais i sur., 2016; Hok, 2018).

2.6. Nealkoholna masna bolest jetre i kardiovaskularne bolesti

NAFLD je dio multisistemske bolesti koja obuhvaća složene interakcije između jetre, crijeva, visceralnog i subkutanog masnog tkiva, mišićnog tkiva i kardiovaskularnog sustava, a jedna od polaznih točaka je neravnoteža u energetske unosu i potrošnji (Francque i sur., 2016). Kada se ovi mehanizmi pokrenu, započinje začarani krug u kojem je međusobna povezanost različitih čimbenika veoma složena, pa je teško procijeniti uzročno-posljedične odnose (Francque i sur., 2016). Brojna retrospektivna i prospektivna istraživanja su pokazala da bolesnici s patohistološki verificiranim NASH-om imaju određeni stupanj disfunkcije srčanog endotela, dijastoličku disfunkciju lijevog ventrikula, povećanu debljinu intime i medije karotidnih arterija i veću prevalenciju karotidnih aterosklerotskih plakova u usporedbi s osobama koje nemaju NAFLD (Mikolašević i sur., 2016).

U studiji koja je 18 godina pratila 132 ispitanika sa biopsijom dokazanim NAFLD-om, ispitanik je uzrok smrtnosti. Na prvom su mjestu bili tumori, a odmah iza njih kardiovaskularne bolesti (Misra i sur., 2009). Prema metaanalizi Wu i suradnika, pokazalo se da su NAFLD i NASH, iako nisu bili povezani s ukupnim i kardiovaskularnim mortalitetom, bili povezani s povećanim rizikom od razvoja hipertenzije, ateroskleroze i koronarne bolesti srca (Wu i sur., 2016). U opservacijskoj studiji, Yoshitake i sur. (2017) su pokazali da osobe koje nisu pretile, a boluju od NAFLD-a, imaju veći rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti u usporedbi s pretilim i ne pretilim osobama bez NAFLD-a. Razlog tomu je akumulacija ektopičnog masnog tkiva u jetri i oko srca, koje predstavlja rizik za razvoj kardiovaskularnog incidenta.

Nadalje, utvrđena je povezanost povećanih koncentracija adiponektina, leptina, čimbenika nekroze tumora α (TNF - α) i interleukina IL-6 kod jetrene steatoze s rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Yoshitaka i sur., 2017). S obzirom na uočenu povezanost, kod oboljelih od NAFLD-a bi trebalo procijeniti rizik od kardiovaskularnih bolesti, a procjenu rizika treba ponavljati svakih jednu do dvije godine (Patil i Sood, 2017). Omega-3 indeks predstavlja koristan biomarker za kardiovaskularne bolesti, a može biti i koristan pokazatelj NAFLD rizika (Parker i sur., 2015).

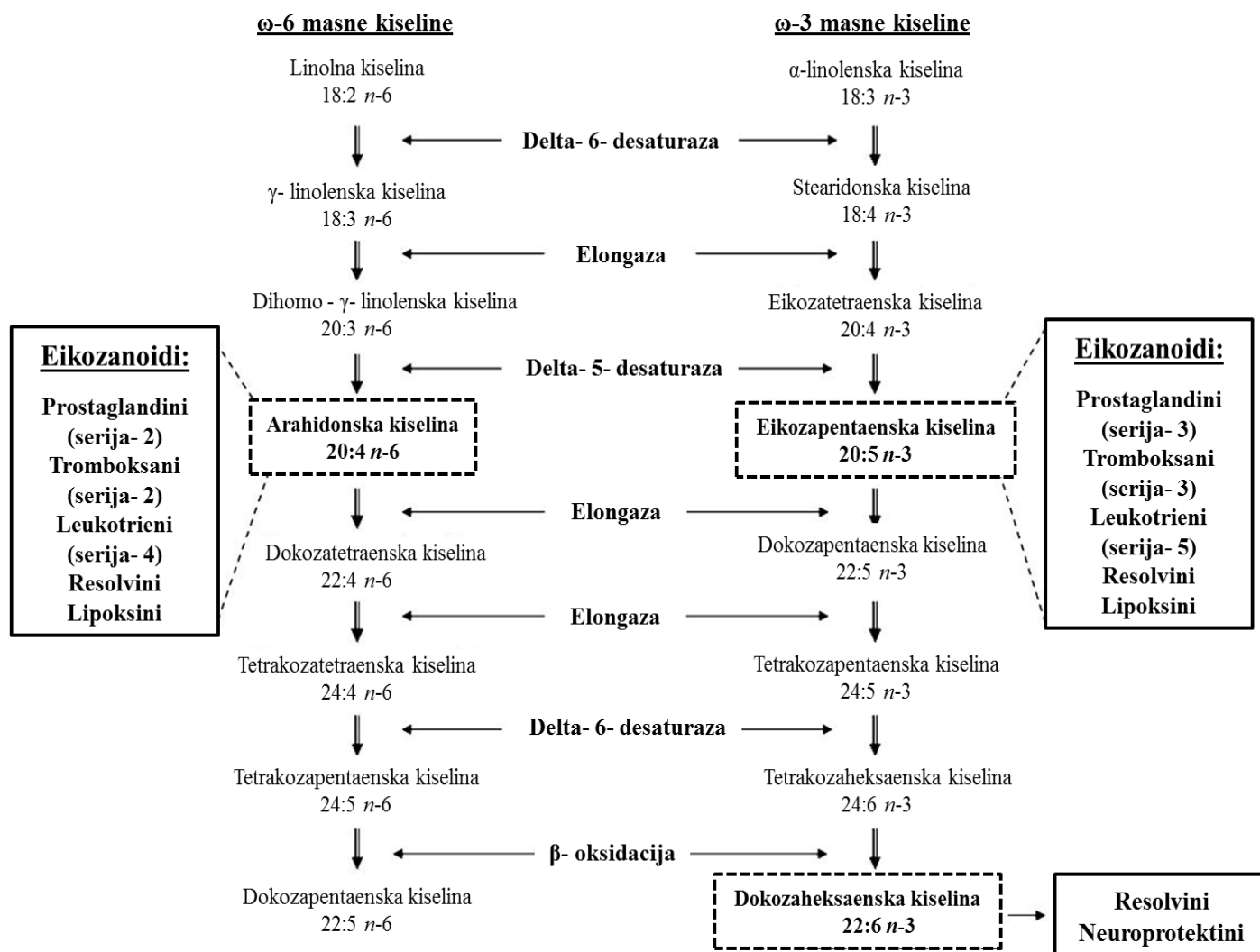
2.7. Procjena kardiovaskularnog rizika

Poveznica između omega-3 PUFA i niske smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, prvi put je uočena krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća istraživanjem grenlandske populacije Eskima, u čijoj su prehrani dominirali kitovi, tuljani, morske ptice i ribe (prema Balk i Lichtenstein-u, 2017). U usporedbi s kohortom Danaca, populacija Eskima je imala manje aterogen lipidni profil, manji broj trombocita, viši status omega-3 PUFA u membranama trombocita i duže protrombinsko vrijeme (Bowen i sur., 2016). Pretpostavilo se da je manja učestalost kardiovaskularnih bolesti posljedica antitrombotskog učinka prehrane bogate omega-3 nezasićenim masnim kiselinama, posebice eikozapentaenskom i dokozaheksaenskom. Ovi su nalazi bili temelj za više od četiri desetljeća opservacijskih i intervencijskih studija kojima se ispitivao učinak omega-3 PUFA na rizik od kardiovaskularnih bolesti (Bowen i sur., 2016).

2.7.1. Metabolizam omega-6 i omega-3 nezasićenih masnih kiselina

Ljudskom organizmu esencijalne su dvije nezasićene masne kiseline – linolna (LA) i α -linolenska (ALA); prva je omega-6, a druga omega-3 nezasićena masna kiselina. Enzimskim reakcijama u organizmu one se konvertiraju u višestruko nezasićene masne kiseline duljih lanaca. Naoko male strukturne razlike dviju PUFA uzrokuju različito ponašanje u organizmu (Vranešić Bender, 2011). Obje masne kiseline su ishodni spojevi u sintezi eikozanoida - grupe bioaktivnih spojeva koji kao signalne molekule utječu na fiziološke procese. Ovisno o ishodnom spoju, eikozanoidi mogu uzrokovati upalne procese ako im je preteča LA, ili djelovati protuupalno, ako im je preteča ALA (Balk i Lichtenstein, 2017) (slika 3).

Za normalno funkcioniranje našeg organizma potrebne su nam obje masne kiseline, pri čemu je veoma važan omjer, a preporuka je da omjer omega-6 i omega-3 PUFA u prehrani iznosi 4:1 (Vranešić Bender, 2011).



Slika 3. Metabolizam ω-6 i ω-3 nezasićenih masnih kiselina

(Prilagođeno prema Wall i sur., 2010)

Put sinteze EPA i DHA nije učinkovit, a primjenom izotopa je uočeno da se 0,1–7,9 % ALA pretvara u EPA-u, dok se 0,1% - 3,8 % pretvara u DHA. Zbog neučinkovitosti puta sinteze iz ALA, unos EPA i DHA prehranom ključan je kako bi se ostvarili blagotvorni učinci na zdravlje (Bowen i sur., 2016).

Zanimljivo je da se biosinteza EPA i DHA iz prehrambenih izvora pokazala učinkovitijom kod žena nego kod muškaraca, osobito pretvorba u DHA, kada je prehrambeni unos EPA i DHA nizak. Smatra se da je to prilagodba visokoj fetalnoj potrebi za DHA tijekom trećeg tromjesečja trudnoće i razvoja mozga fetusa. Nadalje, pokazalo se da status DHA raste i za vrijeme korištenja hormonske nadomjesne terapije i hormonske terapije u transseksualnosti (Metherel, 2007).

2.7.2. Prehrambeni izvori i preporuke za unos omega-3 nezasićenih masnih kiselina

Glavni prehrambeni izvori α -linolenske masne kiseline su sojino i repičino ulje, lanene sjemenke i orašasti plodovi, dok su masna riba i plodovi mora glavni izvor EPA i DHA (Balk i Lichtenstein, 2017). I divlje i uzgojene vrste riba predstavljaju dobar izvor omega-3 PUFA, a prema nekim istraživanjima, uzgojena riba može sadržavati i veće koncentracije EPA i DHA. Pored poželjnog profila masnih kiselina, masne ribe i morski plodovi su nutritivno vrijedan izbor zbog visokog sadržaja proteina, niskog sadržaja zasićenih masnih kiselina, te sadržaja često deficitarnih mikronutrijenata kao što su vitamin D i B₁₂, selen i magnezij (Bowen i sur., 2016). Ulje račića krila, ulje jetre bakalara i ulje algi predstavljaju odličan alternativni izvor EPA i DHA (Tur i sur., 2012). Sve je dostupnija i hrana obogaćena omega-3 nezasićenim masnim kiselinama, uključujući kruh, mliječne proizvode, jaja, meso, ulje, itd. Hrana se obogaćuje ili se životinje direktno hrane ribljim uljem (npr. uljem haringe, lososa, tune, inćuna). Konzumacija obogaćene hrane je odličan način povećanja statusa EPA i DHA u vegana, vegeterijanaca ili osoba koje ne konzumiraju ribu (Tur i sur., 2012).

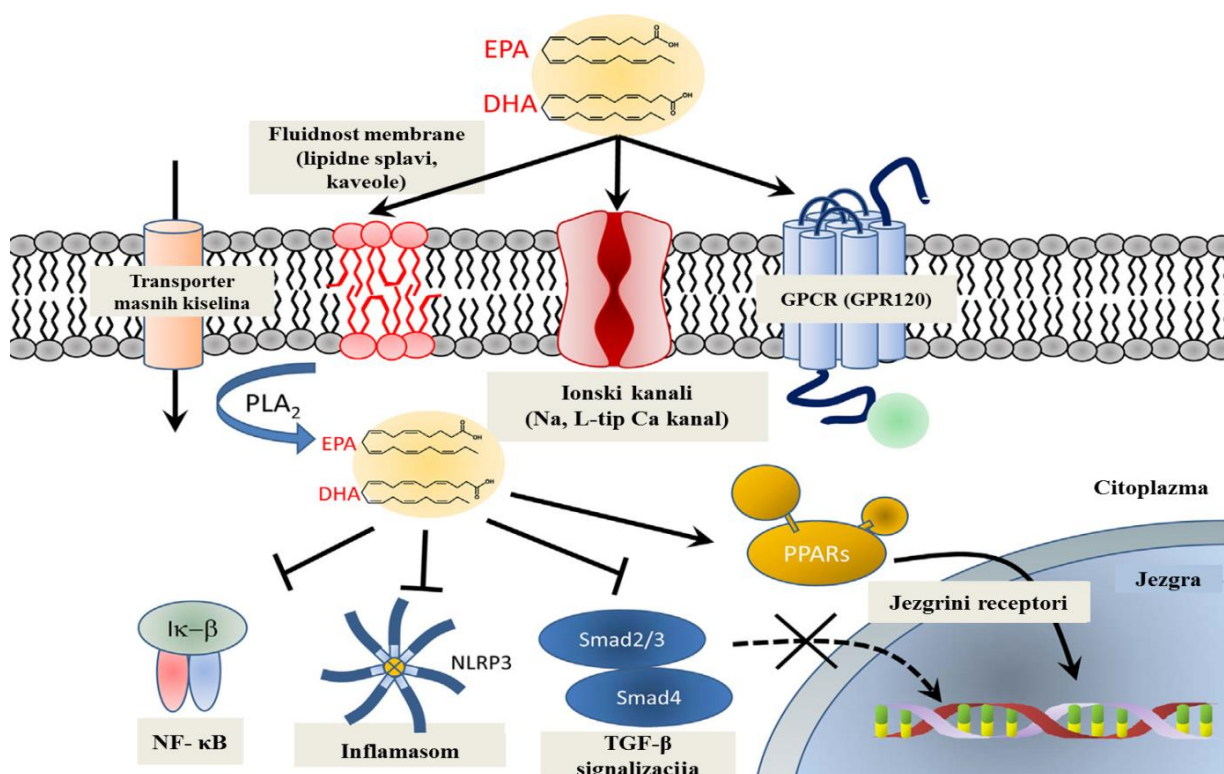
Istraživanje o navikama i preferencijama potrošača o konzumaciji ribe u Hrvatskoj proveo je Eurofish (međunarodna organizacija za razvoj ribarstva i akvakulture u Europi) u suradnji s Ministarstvom poljoprivrede Republike Hrvatske. Istraživanje je provedeno na reprezentativnom uzorku od 1001 ispitanika na razini šest okrupljenih regija (Slavonija, Središnja Hrvatska, Sjeverna Hrvatska, Zagreb, Istra i Primorje te Dalmacija). Rezultati su pokazali da većina ispitanika konzumira ribu (87 %). Izrazito veliki postotak konzumacije ribe zabilježen je u regiji Istra i Primorje (97 %), dok je takva tendencija manja u kontinentalnim regijama. Manji dio ispitanika ne konzumira ribu i to prvenstveno jer im se ne sviđa okus/miris (54 %) ili nemaju naviku (27 %). U svim regijama je zabilježeno da ispitanici konzumiraju ribu zbog dobrog okusa (58 %) i dobrog utjecaja na zdravlje (47 %).

Stanovnici Hrvatske najčešće konzumiraju oslića (40 %), srdelu (38 %) i šarana (24 %), dok je redoslijed na razini regija drugačiji. Nadalje, hrvatski potrošači konzumiraju ribu kod kuće jednom ili nekoliko puta tjedno (71 %), s učestalijom konzumacijom jednom tjedno (44 %) i s izraženijom frekvencijom u jadranskim regijama – Dalmaciji, Istri i Primorju. Potrošači preferiraju divlju ribu (62 %) naspram ribe iz uzgoja (13 %) (Eurofish, 2017).

Prema preporukama EFSA-e (engl. *European Food Safety Authority*), odgovarajući unos ALA bi trebao činiti 0,5 % ukupno unesene energije kod svih populacijskih skupina. Nadalje, EFSA preporučuje da bi odrasle osobe trebale unositi 0,25 g EPA + DHA/dan pri čemu se dodatnih 0,1 - 0,2 g DHA preporučuje trudnicama i dojiljama. Preporuke Američkog udruženja za bolesti srca (engl. *American Heart Association*) za unos EPA+DHA su: zdrave osobe 0,5 g/dan, osobe s koronarnom bolesti srca 1g/dan, a osobe s hipertrigliceridemijom 3-4 g/dan (Castro i Calder, 2018). Da bi se zadovoljile preporuke za unos EPA i DHA kod zdravih osoba, Američke prehrambene smjernice 2015 - 2020 preporučuju dva serviranja masnije ribe tjedno (Balk i Lichtenstein, 2017).

2.7.3. Mehanizam kardioprotektivnog djelovanja omega-3 nezasićenih masnih kiselina

Biološke membrane građene su od velikog broja raznovrsnih molekula lipida, proteina i ugljikohidrata. Za održavanje fluidnosti i elastičnosti membrana ključna je građa molekula fosfolipida, odnosno činjenica da je na glicerol u molekuli fosfolipida vezana nezasićena masna kiselina (Buretić - Tomljanović, 2014). Duljina i zasićenost masnih kiselina vezanih na fosfolipide utječe na svojstva staničnih membrana mijenjanjem mikrodomena lipidnih splavi i kaveola koji koncentriraju membranske proteine i lipide, te funkcioniraju kao signalne platforme (Mozaffarian i Wu, 2011). Omega-3 nezasićene masne kiseline imaju protuupalni i protufibrozni učinak koji se ostvaruje modifikacijom: signalizacije nuklearnog faktora κ B (NF- κ B) i transformirajućeg faktora rasta β (TGF- β) (inhibicija Smad2/3 translokacije u jezgru), NLRP3 inflammasoma (engl. *NLR family pyrin domain containing 3*), GPR120 (engl. *G protein coupled receptor 120*) (čiji su ligand EPA i DHA) i PPAR α/γ -a (engl. *peroxisome proliferator-activated receptors*) (Endo i Arita, 2016) (slika 4).



Slika 4. Molekularni mehanizam kardioprotektivnog djelovanja omega-3 masnih kiselina (Prilagođeno prema Endo i Arita, 2016).

(PLA₂- fosfolipaza A₂, NF-κB- nuklearni faktor κB, NLRP3 inflammasom- engl. *NLR family pyrin domain containing 3*, PPARs- engl. *peroxisome proliferator-activated receptors*, GPR120- engl. *G protein coupled receptor 120*, TGF-β- engl. *Transforming growth factor-β*)

Istraživanja su pokazala da se antiaritmjsko djelovanje omega-3 nezasićenih masnih kiselina ostvaruje putem modulacije elektrofiziologije miocita. EPA i DHA djeluju na način da smanjuju aktivnost natrijevih kanala membrane kardiomiocita, čime se povećava prag depolarizacije membranskog potencijala. Također, EPA i DHA utječu na aktivnost kalcijevih kanala L-tipa, dovodeći do smanjenja slobodnih citosolskih kalcijevih iona, čime se stabilizira električna podražljivost miocita i sprječava aritmija (Mozaffarian i Wu, 2011). Ovi nalazi upućuju da je kardioprotektivni učinak omega-3 PUFA posredovan izravnom interakcijom s membranskim ionima (Endo i Arita, 2016). Molekularni mehanizmi kardioprotektivnog djelovanja omega-3 masnih kiselina u konačnici dovode do smanjenja krvnog tlaka i triacilglicerola u plazmi, antitrombotskog djelovanja, protuupalnog i antiaritmjskog učinka, poboljšanja endotelne funkcije i stanja inzulinske rezistencije (Rangel-Huerta i Gil, 2018).

2.7.4. Omega-3 indeks

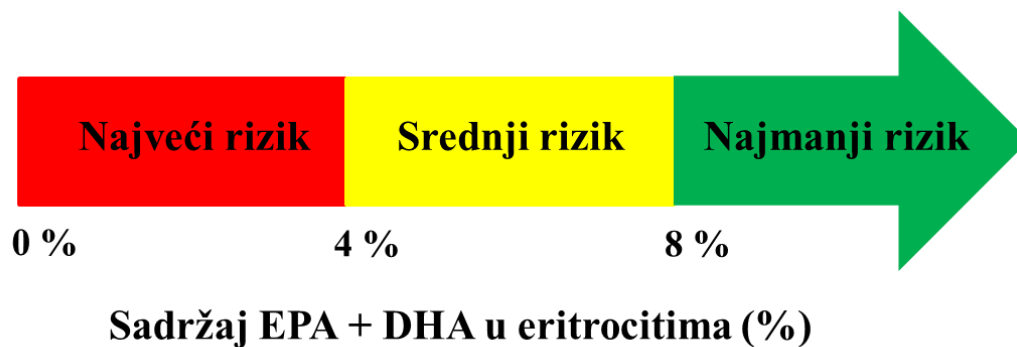
Omega-3 indeks predstavlja udio masa dviju blagotvornih omega-3 nezasićenih masnih kiselina u membranama eritrocita, eikozapentaenske i dokozaheksaenske kiseline, a izražava se kao postotak u ukupnim masnim kiselinama (Harris, 2008). Indeks su 2004. godine kao biomarker rizika smrti od kardiovaskularnih bolesti predložili Harris i von Schacky (prema Langlois i Ratnayake, 2015). Analitička metoda koja se obično primjenjuje za određivanje omega-3 indeksa u eritrocitima je plinska kromatografija koja slijedi nakon postupka ekstrakcije i metiliranja masnih kiselina (Hals i sur., 2017). Odabir da se sastav omega-3 nezasićenih masnih kiselina mjeri u membranama eritrocita (a ne npr. u plazmi), temelji se na činjenici da učinci omega-3 nezasićenih masnih kiselina polaze od njihovog primarnog djelovanja u i na membranama stanica (Harris, 2008). Zahvaljujući životnom vijeku eritrocita od 120 dana, omega-3 indeks predstavlja dugoročan biomarker unosa omega-3 nezasićenih masnih kiselina, koji nije pod utjecajem nedavno konzumirane hrane (Langlois i Ratnayake, 2015).

Prednosti mjerenja vrijednosti omega-3 indeksa u eritrocitima su:

- standardizirana metodologija i mala biološka varijabilnost
- visoka analitička reproducibilnost (koeficijent varijacije: 4-7 %)
- preanalitička stabilnost uzorka (7 dana na sobnoj temperaturi)
- mjerljivost u uzorcima krvi uzetimata natašte i onima koji nisu uzeti natašte
- sastav masnih kiselina eritrocita stabilan je najmanje 4 godine zamrznut na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- sastav masnih kiselina eritrocita je manje podložan dnevnim varijacijama nego plazma
- vrijeme poluživota eritrocita, a time i vrijednosti EPA + DHA, je 4-6 puta dulje nego kod serumskih vrijednosti EPA + DHA
- sastav EPA + DHA u eritrocitima snažno korelira s omega-3 biomarkerima u drugim izvorima, kao što su serumski fosfolipidi, puna krv i serum (Harris, 2008)

Za razliku od eritrocita, omega-3 indeks mjeren u plazmi je osjetljiviji biomarker kratkotrajnih promjena, te se mjerenje u plazmi preferira ako je fokus na kratkotrajnim promjenama statusa omega-3 PUFA (Harris i Thomas, 2010). Vrijednost omega-3 indeksa $\geq 8\%$ povezana je s manjim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, odnosno boljim kardioprotektivnim djelovanjem omega-3 PUFA, dok je indeks $\leq 4\%$ povezan sa slabijim kardioprotektivnim djelovanjem (slika 5) (Harris, 2007).

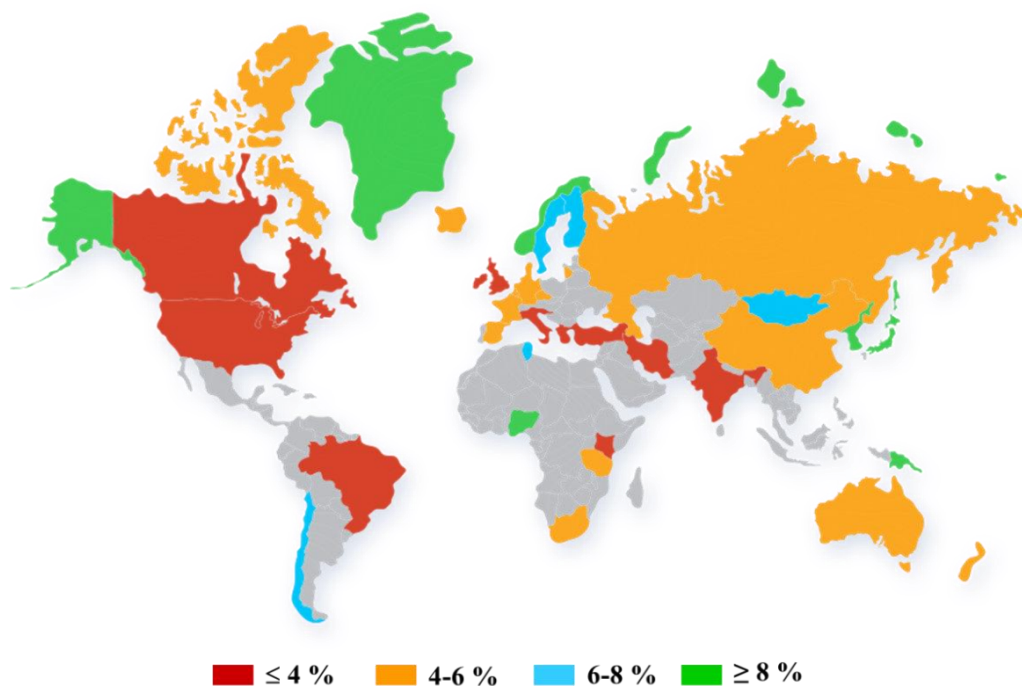
Vrijednosti ispod 1,5 % i iznad 21 % se ne uzimaju u razmatranje (von Schacky, 2011). Zone rizika od kardiovaskularnih bolesti procijenjene su pregledom literature (Harris, 2007). Prema istraživanju Flocka i suradnika procjenjuje se da bi prosječna odrasla osoba s malom vrijednošću omega-3 indeksa (npr. 4,3 %) trebala uzimati barem 1 g/dan EPA + DHA tijekom 5 mjeseci kako bi se postigla vrijednost omega-3 indeksa od 8 %. Pokazalo se da ova doza smanjuje sve uzroke smrtnosti, srčanu smrt i iznenadnu smrt kod bolesnika nakon infarkta. Time se vrijednost omega-3 indeksa približava prosječnoj vrijednosti u Japanu, gdje je smrtnost od kardiovaskularnih bolesti manja u odnosu na SAD (Flock i sur., 2013).



Slika 5. Raspodjela vrijednosti omega-3 indeksa ovisno o zonama rizika od kardiovaskularnih bolesti (Prilagođeno prema Harris, 2007).

S vrijednošću omega-3 indeksa koreliraju različiti čimbenici i to pozitivno (+) ili negativno (-), kao npr. dob (+), ITM (-), socioekonomski status (+), tjelesna aktivnost (+) i pušenje (-). Utjecaj nasljedne komponente na omega-3 indeks je 24 %, stoga je nemoguće predvidjeti vrijednost indeksa kod pojedinca, kao što je nemoguće predvidjeti povećanje indeksa kao odgovor na određenu dozu EPA + DHA (von Schacky, 2014).

Globalni pregled unosa omega-3 nezasićenih masnih kiselina pokazao je da regije s visokom razinom EPA + DHA u krvi (> 8 %) obuhvaćaju Japan, Skandinaviju te područja s domorodačkim stanovništvom i populacijama koje nisu u potpunosti prilagođene zapadnjačkoj prehrani. Zanimljivo je da su u Sjevernoj i Južnoj Americi, Europi, Jugoistočnoj Aziji, Africi i na Bliskom Istoku zabilježene niske razine EPA+ DHA u krvi (slika 6) (Stark i sur., 2016). Međutim, treba istaknuti da je vrijednost omega-3 indeksa teško usporediti u studijama, osim ako nije korištena standardizirana analitička metoda, npr. HS-Omega-3 Index® (Tribulova i sur., 2017).



Slika 6. Vrijednosti omega-3 indeksa mjenog kod zdravih pojedinaca, prema globalnoj studiji (Prilagođeno prema Stark i sur., 2016).

Slika preuzeta s: <http://www.omega3indexproject.com/us/>

3. EKSPERIMENTALNIDIO

3.1. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 14 ispitanika s ultrazvučno dijagnosticiranim NAFLD-om ili NASH-om s područja Zagrebačke županije. Rekrutirani su u Ambulanti za hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC) u razdoblju od siječnja do lipnja 2017. godine. Ispitanici su bili u dobi od 39 do 64 godine, od toga 9 žena i 5 muškaraca. Prilikom posjeta ispitanici su upućeni u protokol istraživanja i potpisali su informirani pristanak (prilog 1). Potom su provedena antropometrijska mjerenja te uzimanje uzorka krvi koja je korištena za daljnje analize. Biokemijsku analizu jetrenih enzima ispitanici su obavili u nadležnim medicinsko-biokemijskim laboratorijima Domova zdravlja. Ispitanicima je rečeno da dan prije nego li dolaze u KBC izbjegavaju konzumaciju ribe, morskih plodova i alkohol.

Kriteriji za sudjelovanje u istraživanju bili su: upućenost u protokol istraživanja i potpisani informirani pristanak, starost između 18 i 70 godina, ITM manji od 40 kg m^{-2} , općenito dobro zdravlje ispitanika te izbjegavanje konzumacije alkohola tijekom trajanja istraživanja.

Isključujući kriteriji bili su: alergija na školjkaše, poremećaji krvarenja, poremećaji apsorpcije uslijed promjena u gastrointestinalnom sustavu, obavljena kolecistektomija, konzumacija alkohola više od 14 jedinica tjedno, konzumacija droga, konzumacija više od 6 šalica dnevno napitaka koji sadrže kofein (npr. čaj, kava) ili više od 1 litre pića koje sadrži metilksantin (npr. cola), antikoagulantna terapija, konzumacija dodataka prehrani dugolančanih omega-3 nezasićenih masnih kiselina tri mjeseca prije uključivanja u istraživanje, konzumacija ribe više od 2 puta mjesečno, trudnoća i dojenje, HIV pozitivne osobe i prisutnost hepatitisa B ili C.

Ovo istraživanje odobrila su nadležna etička tijela: Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb, nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodilo u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

3.2. Materijali

3.2.1. Uređaji

- Antropometrijska vaga *TANITA* body composition analyzer BC-420MA, Nizozemska
- Centrifuga Centrikon T-42K, *Kontron Instruments*, Italija
- Centrifuga Technica Mikro 242, *Železniki*, Slovenija
- Plinski kromatograf 7890B GC System, *Agilent Technologies*, SAD
- Uparivač UNIVAPO 100H, opremljen jedinicom za hlađenje UNICRYO MC 2L, *Uniequip*, Martinsried, Njemačka
- Vibro-miješalica Technica EV-202, *Železniki*, Slovenija
- Vodena kupelj TKS, *Termo medicinski aparati Bodalec*, Hrvatska

3.2.2. Pribor

- Eppendorf epruvete 2 mL
- Epruvete Bacto
- Epruvete Falcon 50 mL
- Erlenmeyerova tikvica
- Filter papir
- Graduirane epruvete 10 mL
- Konične epruvete 20 mL s teflonskim čepom na navoj
- Mikropipete Eppendorf (50 μ L, 100 μ L, 250 μ L i 1000 μ L)
- Parafilm Sigma
- Pipeta 5 mL
- Staklene kapaljke
- Staklene vialice s čepovima na navoj
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić

3.2.3. Kemikalije

- Destilirana voda (D.D. H₂O), pročišćena uređajem Milipore, *Labena*, Zagreb, Hrvatska
- Heptadekanska kiselina C₁₇H₃₄O₂ (C17:0)- interni standard, *Sigma-Aldrich*, Njemačka

- Izopropanol (99,9 % čistoće), *T.T.T.*, Sveta Nedelja, Hrvatska
- Kloroform, *Sigma-Aldrich*, Švicarska
- Koncentrirana klorovodična kiselina, *T.T.T.*, Sveta Nedelja, Hrvatska
- Metanol (99,8% čistoće), *Sigma-Aldrich*, Švicarska
- Natrijev klorid 0,9%-tna otopina, *Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu*, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev sulfat, *T.T.T.*, Sveta Nedelja, Hrvatska
- Petroleter, Fluka, *Sigma-Aldrich*, Švicarska
- Supelco 37 Component FAME Mix, *Supelco*, SAD

3.3. Metode

3.3.1. Antropometrijska mjerenja

Tjelesna masa ispitanika (u kg) izmjerena je na antropometrijskoj vagi (*TANITA body composition analyzer BC-420MA*). Ispitanici su vagani bez obuće i s laganom odjećom na sebi. Podatak o tjelesnoj visini dobiven je od ispitanika. Pomoću podataka o tjelesnoj masi i visini, izračunat je indeks tjelesne mase (ITM, kg m^{-2}), na način da se tjelesna masa u kilogramima podijeli s kvadratom visine u metrima. Opseg struka (u cm) izmjeren je pomoću centimetarske vrpce tako da je mjeren najuži dio trupa gledano s prednje strane.

3.3.2. Uzorkovanje krvi

Ispitanicima je uzet uzorak krvi natašte u epruvete od 5 mL s dodatkom EDTA, u dnevnoj bolnici Ambulante za upalne bolesti crijeva i kliničku prehranu KBC-a Zagreb. Daljnji postupak nastavljen je u laboratoriju Zavoda za kemiju i biokemiju, Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Nježnim okretanjem epruvete 8-10 puta, sadržaj epruvete je promiješan. Potom je pipetirano 2x500 μL krvi u odvojene eppendorf epruvete (duplikat), nakon čega je 10 minuta centrifugirano pri 3000 okretaja u minuti (Centrifuga Technica Mikro 242). Plazma je odvojena u eppendorf epruvete. Talog eritrocita ispran je s 4x1 mL fiziološke otopine, a između svakog ispiranja centrifugirano je 5 min pri 2000 o min^{-1} . Odvojena plazma i isprani eritrociti potom su pohranjeni u zamrzivač na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnje analize. Plazma je korištena za određivanje serumskih lipida (triacilgliceroli, ukupni kolesterol, HDL- i LDL- kolesterol), pri čemu je analiza provedena u medicinsko-biokemijskom laboratoriju KBC-a Zagreb.

3.3.3. Ekstrakcija ukupnih lipida eritrocita

Na isprane smrznute eritrocite dodan je 1 mL destilirane vode, nakon čega su ostavljeni u hladnjaku kako bi preko noći došlo do hemolize membrana. Nakon hemolize, sadržaj je promiješan na vortex miješalici (Technica EV-202) i potom centrifugiran pri 2000 o min^{-1} (Centrifuga Technica Mikro 242). 50 μL supernatanta izuzeto je u eppendorf epruvetu za određivanje ukupnih proteina, a ostatak je kvantitativno prebačen u Falcon epruvetu od 50 mL. Ekstrakcija ukupnih lipida eritrocita provedena je metodom prema Rose i Oklanderu (Rose i Oklander, 1965). U Falcon epruvetu koja sadrži suspenziju eritrocita dodano je 5,5 mL izopropanola i ostavljeno 1 h uz povremeno miješanje. Potom je dodano 3,5 mL kloroforma, ostavljeno 1 h uz povremeno miješanje, nakon čega je sadržaj centrifugiran 30 min pri 2500 o min^{-1} (Centrifuga Centrikon T-42K). Kapalicom je pažljivo odvojena organska faza u kojoj se nalaze ukupni lipidi, te je upareno do suha.

3.3.4. Priprema metilnih estera masnih kiselina

Postupak pripreve metilnih estera masnih kiselina provodi se prema ISO metodi 5509 (ISO, 2000). Na suhi ekstrakt ukupnih lipida dodano je 2 mL metanolne HCl (8,6 mL konc. HCl, ad 100 mL CH_3OH), epruveta se zatvori teflonskim čepom i stavi u vodenu kupelj 45 min na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (Vodena kupelj TKS). Nakon hlađenja sadržaja na sobnu temperaturu, doda se 2 mL petroletera i snažno promiješa. U Falcon epruvetu se prebaci gornja, organska faza (čine ju petroleter i masne kiseline), a s donjim slojem se postupak ekstrakcije petroleterom ponovi još tri puta. Potom se ekstraktu doda 2 mL destilirane vode i snažno promiješa. Vodeni sloj se izdvoji staklenom kapalicom i odbaci, a postupak se još jednom ponovi. U petroletersku fazu koja sadrži masne kiseline doda se žličica bezvodnog natrijevog sulfata i ostavi preko noći. Sadržaj se filtrira i upari do suha.

3.3.5. Plinska kromatografija

Analiza metilnih estera masnih kiselina provedena je na plinskom kromatografu 7890B GC System (Agilent Technologies, SAD), opremljenim plameno-ionizacijskim detektorom (FID). Za razdvajanje metilnih estera korištena je kapilarna kolona Zebron ZB-FAME (dimenzije: $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,20 \text{ }\mu\text{m}$).

Temperatura injektora iznosila je 240 °C, a temperatura detektora 260 °C. Instrument je opremljen uređajem za automatsko injektiranje uzorka („autosampler“) istog proizvođača uz mogućnost aplikacije smanjenog volumena uzorka („split/splitless“ sustav). Uzorak (0,5 µL) je injektiran u split modu omjera 1:100, a prethodno je dodano 10 µL internog standarda heptadekanske kiseline (C17:0, $\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$). Početna temperatura kolone bila je 100 °C 2 min, zatim je povećana na 140 °C zagrijavanjem 10 °C min⁻¹, potom na 190 °C zagrijavanjem 3 °C min⁻¹ i konačno do 260 °C zagrijavanjem 30 °C/min, nakon čega je na toj temperaturi održano 2 min. Kao plin nosač korišten je helij čistoće 6.0, uz protok 1,2 mL/min. Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je na temelju vremena retencije usporedbom s vremenom retencije poznatih standarda (Supelco 37 Component FAME mix). Kvantitativno određivanje pojedinih masnih kiselina provedeno je usporedbom površine šiljka internog standarda s površinom šiljka pojedine masne kiseline. Prikupljanje i obrada podataka provedena je integriranim računalnim programom *Agilent Technologies*. Vrijednost omega-3 indeksa predstavlja sadržaj EPA+DHA u eritrocitima izražen kao postotak u ukupnim masnim kiselinama.

3.3.6. Obrada podataka

U statističkoj analizi korištene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Prikazani su postoci za kategorijske varijable, srednja vrijednost i standardna devijacija. Za testiranje razlika između dviju nezavisnih skupina primjenjen je Studentov t-test. Za analizu korelacije korišten je Pearsonov test. U svim testovima p-vrijednost <0,05 (dvostrani test) predstavljala je razinu statističke značajnosti. Statistička obrada podataka učinjena je u programu SPSS verzija 23 (IBM Inc., SAD).

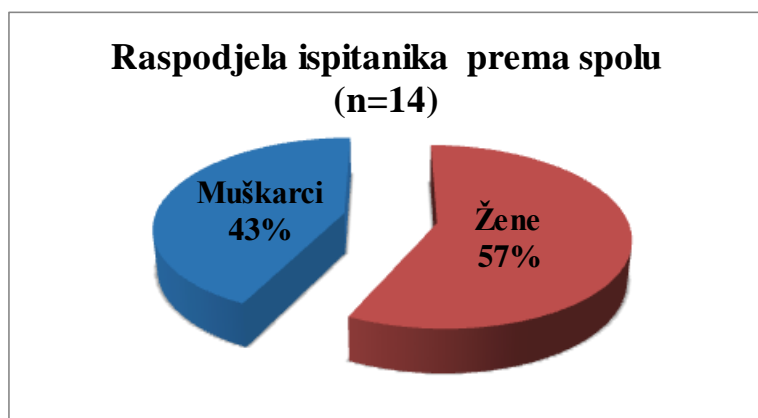
4. REZULTATI I RASPRAVA

Nealkoholna masna bolest jetre smatra se nezavisnim čimbenikom rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, a prema nekim studijama, više oboljelih od NASH-a umire zbog kardiovaskularnih bolesti nego od bolesti jetre (Athiros i sur., 2015). Stoga brojni autori predlažu redoviti probir („*screening*“) na kardiovaskularne bolesti u oboljelih od NAFLD-a (Mikolašević i sur., 2016). Novim pouzdanim pokazateljem kardiovaskularnog rizika pokazao se omega-3 indeks (Tribulova i sur., 2017). U ovom radu procjena kardiovaskularnog rizika učinjena je na 14 ispitanika s ultrazvučno dijagnosticiranim NAFLD-om ili NASH-om, s područja Zagrebačke županije. Na svim ispitanicima provedena su antropometrijska mjerenja (tjelesna masa i opseg struka), laboratorijska mjerenja serumskih lipida (triacilgliceroli, ukupni kolesterol, HDL- i LDL-kolesterol) i jetrenih enzima (ALP, ALT, AST i GGT), te vađenje krvi za određivanje vrijednosti omega-3 indeksa. Prema navedenim izmjerenim parametrima, izračunati su indeks tjelesne mase i Indeks masne jetre. Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazani su u obliku tablica i grafova.

4.1. Osnovne karakteristike ispitanika

4.1.1. Raspodjela ispitanika prema spolu i dobi

Istraživanjem je obuhvaćeno 14 ispitanika, od čega 57 % žena i 43 % muškaraca (slika 7). Prosječna dob u skupini žena bila je $58,4 \pm 6,7$ godina, u rasponu od 46 do 64 godine. Prosječna dob u skupini muškaraca bila je $43,8 \pm 3,7$ godina, pri čemu se raspon kretao od 39 do 48 godina.



Slika 7. Raspodjela ispitanika po spolu (n=14)

4.1.2. Antropometrijski parametri

Od antropometrijskih parametara mjereni su tjelesna masa (TM) i opseg struka. Podatak o tjelesnoj visini (TV) dobiven je od ispitanika. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je na temelju podataka TM i TV. Prema izračunatom ITM-u, ispitanici su svrstani ovisno o stanju uhranjenosti (tablica 1).

Tablica 1. Stanje uhranjenosti prema indeksu tjelesne mase (ITM) (Fan i sur., 2017)

Stanje uhranjenosti	ITM (kg m ⁻²)	Udio ispitanika (%)
Pothranjenost	< 18,5	0
Normalna tjelesna masa	18,5 – 24,9	7,1
Prekomjerna tjelesna masa	25,0 – 29,9	21,4
I stupanj pretilosti	30,0 – 34,9	57,1
II stupanj pretilosti	35,0 – 39,9	14,3
III stupanj pretilosti	≥ 40,0	0

Srednja vrijednost tjelesne visine kod ispitanika ženskog spola bila je $1,63 \pm 0,1$ m (tablica 2), dok je vrijednost tjelesne mase bila $82,0 \pm 12,2$, s rasponom od 60,2 kg do 98,1 kg. Na temelju izračunatog indeksa tjelesne mase (tablica 1), u skupini ženskog spola jedna ispitanica je imala normalnu TM, dvije ispitanice su imale prekomjernu TM, pet ispitanica imalo je pretilost I stupnja, dok je jedna ispitanica bila pretilosti II stupnja.

Rezultati pokazuju da je srednja vrijednost ITM-a u skupini žena bila $30,9 \pm 4,7$ kg m⁻² što pripada kategoriji I stupnja pretilosti, a potvrđuje dosadašnje spoznaje da se NAFLD većinom javlja kod pretilih ljudi (Marjot i sur., 2018). Srednja vrijednost opsega struka kod ispitanica je iznosila je $100,9 \pm 9,6$ cm, u rasponu od 83 do 117 cm. Podaci su prikazani u tablici 2. Samo je jedna ispitanica imala opseg struka unutar preporučenih vrijednosti (žene < 88 cm), dok je opseg struka svih ostalih ispitanica bio veći od preporučenog. Dobiveni rezultati potvrđuju da je opseg struka veći od preporučenog jedan od rizičnih čimbenika povezanih s NAFLD-om (Chalasan i sur., 2018).

Tablica 2. Antropometrijski parametri ispitanika (srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

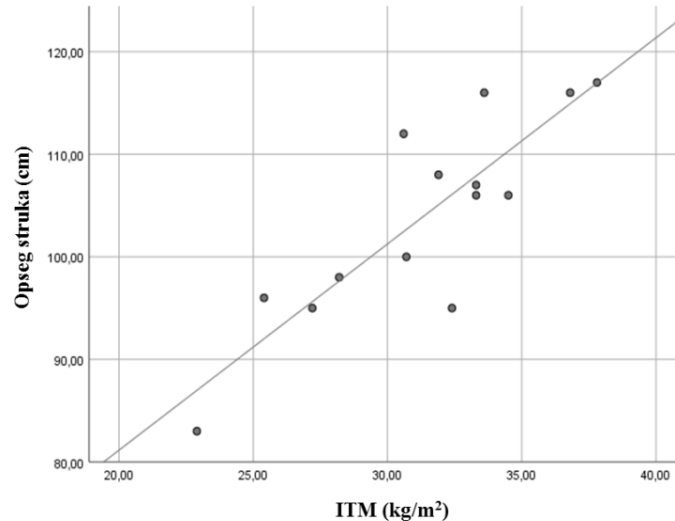
	Žene (n=9)	Muškarci (n=5)
Dob (godine)	58,4 \pm 6,7	43,8 \pm 3,7
Tjelesna visina (m)	1,63 \pm 0,1	1,73 \pm 0,1
Tjelesna masa (kg)	82,0 \pm 12,2	94,9 \pm 4,6
Indeks tjelesne mase (kg m⁻²)	30,9 \pm 4,7	32,0 \pm 3,6
Opseg struka (cm)	100,9 \pm 9,6	109,4 \pm 8,7

Srednja vrijednost tjelesne visine kod ispitanika muškog spola bila je $1,73 \pm 0,1$ m, dok je vrijednost tjelesne mase bila $94,9 \pm 4,6$ kg u rasponu od 89,2 kg do 99,9 kg. Na temelju izračunatog indeksa tjelesne mase, u skupini muškog spola jedan je ispitanik imao prekomjernu TM, trojica su imala I stupnj pretilosti, a jedan II stupnj pretilosti. Rezultati pokazuju da je srednja vrijednost ITM-a u skupini muškaraca bila $32,0 \pm 3,6$ kg m⁻² što pripada kategoriji I stupnja pretilosti. Srednja vrijednost opsega struka iznosila je $109,4 \pm 8,7$ cm, u rasponu od 95 do 116 cm. Samo je jedan ispitanik imao opseg struka unutar preporučenih vrijednosti (muškarci < 102 cm), dok su ostali ispitanici imali opseg struka veći od preporučenog. Podaci su prikazani u tablici 2.

Ukupno gledano, prema vrijednostima ITM-a 7,1 % imalo je normalnu TM, 21,4 % prekomjernu TM, 57,1 % ih je patilo od I stupnja pretilosti, dok je njih 14,3 % patilo od II stupnja pretilosti (tablica 1). Slični podaci dobiveni su u studiji Parkera i sur. (2015), koji su uspoređivali antropometrijske parametre oboljelih od NAFLD sa zdravim kontrolnim ispitanicima. Ispitanici s NAFLD-om su imali statistički značajno veći ITM, opseg struka i količinu visceralnog masnog tkiva (Parker i sur., 2015).

4.1.3. Stupanj povezanosti antropometrijskih parametara

Utvrđena je statistički značajna jaka pozitivna povezanost ITM-a s opsegom struka svih ispitanika oboljelih od NAFLD-a ($r = 0,855$; $p = 0,0001$), dakle što je ispitanik imao veći indeks tjelesne mase to je imao i veći opseg struka (slika 8). Dobiveno potvrđuje i studija Parkera i suradnika, gdje su ITM i opseg struka u oboljelih od NAFLD-a snažno pozitivno korelirali, ali i bili statistički povezani s količinom masti jetre (Parker i sur., 2015).



Slika 8. Povezanost indeksa tjelesne mase (ITM) i opsega struka kod ispitanika oboljelih od nealkoholne masne bolesti jetre ($r = 0,855$; $p = 0,0001$)

Zanimljiva je statistički značajna umjerena negativna povezanost dobi i opsega struka ($r = -0,565$; $p = 0,035$), što znači da su mlađi ispitanici imali veći opseg struka. Dobiveni rezultati se razlikuju od rezultata dobivenih preglednim radom Stevensa i suradnika, prema kojem su stariji ispitanici imali veći opseg struka. Kao objašnjenje se navodi da starenjem dolazi do gubitka subkutanog masnog tkiva (prvo perifernog, potom abdominalnog), akumulacije visceralnog masnog tkiva i nakupljanja ektopičnog masnog tkiva (u mišićima, jetri, koštanoj srži, itd.) (Stevens i sur., 2010).

4.2. Vrijednosti serumskih lipida

Kod NAFLD-a dolazi do poremećaja metabolizma lipida, stoga su ispitivane vrijednosti serumskih lipida: triacilglicerola, ukupnog kolesterola, LDL- i HDL-kolesterola. Srednje vrijednosti serumskih lipida kod ispitanica ženskog spola bile su blago povišene u odnosu na preporuke: triacilgliceroli $1,85 \pm 0,62 \text{ mmol L}^{-1}$ (preporuka: $<1,7 \text{ mmol L}^{-1}$), ukupni kolesterol $5,21 \pm 0,71 \text{ mmol L}^{-1}$ (preporuka: $< 5 \text{ mmol/L}$) i LDL-kolesterol $3,18 \pm 0,68 \text{ mmol L}^{-1}$ (preporuka: $< 3 \text{ mmol L}^{-1}$). Koncentracija HDL-kolesterola bila je $1,19 \pm 0,44 \text{ mmol L}^{-1}$, granično s vrijednošću preporuka ($> 1,2 \text{ mmol L}^{-1}$). Srednje vrijednosti serumskih lipida kod ispitanika muškog spola bile su unutar preporuka, osim blago smanjene vrijednosti HDL-kolesterola (tablica 3).

Tablica 3. Vrijednost serumskih lipida ispitanika (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

	Žene (n=9)	Muškarci (n=5)
Triacilgliceroli (mmol L⁻¹)	1,85 ± 0,62	1,17 ± 0,51
Ukupni kolesterol (mmol L⁻¹)	5,21 ± 0,71	4,19 ± 1,32
HDL-kolesterol (mmol L⁻¹)	1,19 ± 0,44	1,13 ± 0,12
LDL-kolesterol (mmol L⁻¹)	3,18 ± 0,68	2,52 ± 1,17

4.2.1. Stupanj povezanosti antropometrijskih parametara i serumskih lipida

Podaci o međusobnoj povezanosti antropometrijskih parametara i serumskih lipida nalaze se u tablici 4. Statistički značajna povezanost uočena je za ITM i HDL-kolesterol gdje je povezanost bila statistički umjereno negativna ($r = -0,691$; $p = 0,006$). Dakle, što je ispitanik imao veći indeks tjelesne mase to su bile manje vrijednosti HDL-kolesterola. Dobivena korelacija potvrđuje dosadašnje spoznaje prema kojima pretilost, nepravilna prehrana, nedovoljna tjelesna aktivnost, pušenje i alkohol utječu na smanjenje vrijednosti HDL-kolesterola (Rashid i Genest, 2007). Povezanost koncentracije serumskih lipida s drugim antropometrijskim parametrima nije bila statistički značajna.

Tablica 4. Stupanj povezanosti antropometrijskih parametara i serumskih lipida (** $p < 0,01$)

	Dob	Opseg struka	ITM
Triacilgliceroli	0,133	-0,019	0,254
Ukupni kolesterol	0,273	-0,426	-0,175
HDL-kolesterol	0,441	-0,506	- 0,691**
LDL-kolesterol	0,101	-0,292	-0,016

4.3. Vrijednosti jetrenih enzima

Izmjerene su vrijednosti jetrenih enzima - biomarkera oštećenja jetre, a to su: alkalna fosfataza (ALP), alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST) i gama-glutamilttransferaza (GGT). Studija Bi-a i suradnika pokazala je da su jetreni enzimi, i to osobito ALT i GGT, nezavisni prediktori metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2 i koronarne bolesti srca kod oboljelih od NAFLD-a (Bi i sur., 2014).

Srednje vrijednosti ALP su kod ispitanika oba spola bile unutar referentnih vrijednosti. Srednje vrijednosti ALT, AST i GGT bile su veće od gornje referentne vrijednosti kod ispitanika oba spola (tablica 5).

Tablica 5. Vrijednost katalitičke koncentracije jetrenih enzima ispitanika i gornje granice referentnih vrijednosti (srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

	Žene (n=9)	Gornja referentna vrijednost (žene)	Muškarci (n=5)	Gornja referentna vrijednost (muškarci)
ALP (U L⁻¹)	92,7 \pm 27,1	119 (153*)	82,3 \pm 27,5	142
ALT (U L⁻¹)	59,1 \pm 29,0	36	71,8 \pm 30,3	48
AST (U L⁻¹)	50,0 \pm 23,4	30	42,6 \pm 15,0	38
GGT (U L⁻¹)	94,9 \pm 116,7	35	197,6 \pm 229,4	55

* u postmenopauzi (Barišić, 2013)

Pri čemu je: ALP = katalitička koncentracija alkalne fosfataze (U L⁻¹); ALT = katalitička koncentracija alanin-aminotransferaze (U L⁻¹); AST = katalitička koncentracija aspartat-aminotransferaze (U L⁻¹); GGT = katalitička koncentracija γ -glutamiltransferaze (U L⁻¹).

4.3.1. Stupanj povezanosti antropometrijskih parametara i jetrenih enzima

Ispitivana je povezanost između antropometrijskih parametara i katalitičke vrijednosti jetrenih enzima (tablica 6). Statistički značajna povezanost utvrđena je za ITM i ALT, gdje je povezanost bila umjereno pozitivna ($r = 0,636$; $p = 0,014$), što znači da je porastom indeksa tjelesne mase rasla vrijednost alanin-aminotransferaze ispitanika. Slično potvrđuje i studija Sanyal-a i suradnika, gdje je uočena statistički značajna pozitivna povezanost između vrijednosti ALT-a i GGT-a s masnom jetrom kod oboljelih od NAFLD-a. Također, ALT i GGT su značajno pozitivno korelirali s opsegom struka, ITM-om, HDL-kolesterolom, triacilglicerolima i glukozom mjerenom natašte (Sanyal i sur., 2015). U studiji Čolak i sur. (2013) na dvije skupine studenata (pretili vs. normalna TM), pokazalo se da su vrijednosti ALT, AST i GGT bile veće u pretilih studenata. Isto tako, ALT je pozitivno korelirao s opsegom struka i ITM-om.

Tablica 6. Stupanj povezanosti između antropometrijskih parametara i jetrenih enzima (* $p < 0,05$)

	Dob	Opseg struka	ITM
ALP	0,233	-0,259	-0,06
ALT	-0,303	0,447	0,636*
AST	-0,035	0,007	0,367
GGT	-0,347	0,305	0,442

Pri čemu je: ALP = katalitička koncentracija alkalne fosfataze ($U L^{-1}$); ALT = katalitička koncentracija alanin-aminotransferaze ($U L^{-1}$); AST = katalitička koncentracija aspartat-aminotransferaze ($U L^{-1}$); GGT = katalitička koncentracija γ -glutamiltransferaze ($U L^{-1}$).

4.3.2. Stupanj povezanosti koncentracije serumskih lipida i jetrenih enzima

Nealkoholna masna bolest jetre u većini je slučajeva povezana s abdominalnom pretilošću, inzulinskom rezistencijom i dislipidemijom (Asrih i Jornayvaz, 2015). S obzirom na oštećenja jetre koja pri tome nastaju i dovode do povećanog lučenja jetrenih enzima u krv, NAFLD se smatra jetrenom manifestacijom metaboličkog sindroma (Saltzman i sur., 2018). Prema rezultatima Bi i suradnika, vrijednosti indeksa tjelesne mase, opsega struka, triacilglicerola, ukupnog kolesterola, ALT-a, AST-a i GGT-a bile su veće kod oboljelih od NAFLD-a nego kod zdravih kontrolnih ispitanika, dok su vrijednosti HDL-kolesterola bile niže (Bi i sur., 2014). Te podatke potvrđuju i druge studije gdje se pokazalo da su vrijednosti serumskih lipida pozitivno korelirale sa stadijima NAFLD-a (Peng i sur., 2017; Bhusal i sur., 2017).

Ispitivanjem međusobne povezanosti vrijednosti katalitičkih koncentracija jetrenih enzima, umjereno pozitivna povezanost uočena je za ALT, GGT i AST, što znači da je rastom vrijednosti jednog od navedenih enzima, rasla vrijednost drugog. Nadalje, uočena je umjereno negativna povezanost HDL-kolesterola s ALT-om ($r = -0,546$; $p = 0,044$), AST-om ($r = -0,565$; $p = 0,035$) i triacilglicerolima ($r = -0,584$; $p = 0,028$) što znači da je smanjenjem vrijednosti HDL-kolesterola, rasla vrijednost ALT-a, AST-a i triacilglicerola (tablica 7). Također, uočena je statistički značajna snažna pozitivna povezanost ukupnog kolesterola s LDL-kolesterolom ($r = 0,964$, $p < 0,000$), što znači da je rastom ukupnog, rasla vrijednost LDL-kolesterola.

Dobivene rezultate potvrđuje nekoliko studija gdje je također uočena pozitivna korelacija koncentracije triacilglicerola, ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola s jetrenim enzimima, te negativna korelacija s HDL-kolesterolom (Al-Jameil i sur., 2014; Kashinakunti i sur., 2017).

Tablica 7. Stupanj međusobne povezanosti jetrenih enzima i serumskih lipida
(* p<0,05; ** p<0,01)

	ALP	ALT	AST	GGT	Triacilgliceroli	Ukupni kolesterol	HDL-kolesterol	LDL-kolesterol
ALP	1	0,317	0,4	0,221	0,199	- 0,012	- 0,016	- 0,071
ALT	0,317	1	0,609*	0,548*	0,268	0,078	- 0,546*	0,217
AST	0,400	0,609*	1	0,610*	0,505	0,250	- 0,565*	0,347
GGT	0,221	0,548*	0,610*	1	- 0,216	- 0,009	- 0,224	0,148
Triacilgliceroli	0,199	0,268	0,505	-0,216	1	0,477	- 0,584*	0,457
Ukupni kolesterol	- 0,012	0,078	0,250	-0,009	0,477	1	0,12	0,964**
HDL-kolesterol	- 0,016	- 0,546*	- 0,565*	-0,224	- 0,584*	0,120	1	-0,060
LDL-kolesterol	- 0,071	0,217	0,347	0,148	0,457	0,964**	- 0,060	1

4.4. Vrijednost omega-3 indeksa

Pouzdanim pokazateljem kardiovaskularnog rizika, pokazao se omega-3 indeks, te je izmjerena njegova vrijednost u eritrocitima oboljelih od NAFLD-a. Dobiveni rezultati pokazuju da je omega-3 indeks kod ispitanika ženskog spola bio $3,25 \pm 1,14$ %, dok je kod ispitanika muškog spola bio $3,74 \pm 0,97$ % (tablica 8). Dobivene vrijednosti su veoma male, te prema njima ispitanici oba spola imaju velik rizik od kardiovaskularnih bolesti, tj. njihov status EPA i DHA pruža slabo kardioprotektivno djelovanje. Podaci ne čude s obzirom da je konzumacija ribe u Hrvatskoj vrlo mala, a riba i morski plodovi su glavni izvor blagotvornih omega-3 nezasićenih masnih kiselina, EPA i DHA. Konzumacija ribe u Hrvatskoj iznosila je 18,4 kg *per capita* u 2015. godini, dok prema zadnjim podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS) konzumacija ribe iznosi od 8 do 9 kg *per capita* u 2012. godini. Nadalje, prema Eurofish istraživanju o navikama i preferencijama potrošača o konzumaciji ribe u Hrvatskoj, najmanja konzumacija zabilježena je u Središnjoj i Sjevernoj Hrvatskoj (Eurofish, 2017). U studiji Blocka i suradnika se pokazalo da je omega-3 indeks bio 13,2 % veći za svaku dodatnu kategoriju unosa ribe, dok je vrijednost omega-3 indeksa bila 58,1 % viša kod ispitanika koji su uzimali dodatke omega-3 PUFA (Block i sur., 2008).

Zbog načina života i prehrane bogate ribom, omega-3 indeks u zdravih Koreanaca i Japanaca kreće se od 7 do 11 %, dok je u zapadnjačkim populacijama manji i kreće se oko 4 % (Kim i sur., 2012).

Tablica 8. Vrijednost omega-3 indeksa, indeksa masne jetre i podaci o pušenju
(srednja vrijednost ± standardna devijacija)

	Žene (n=9)	Muškarci (n=5)
Indeks masne jetre	75,6 ± 26,1	86,8 ± 12,3
Omega-3 indeks (%)	3,25 ± 1,14	3,74 ± 0,97
Pušači (n)	3/9	1/5

Metaanaliza Guoa i suradnika pokazala je da zdravi, kontrolni ispitanici imaju statistički značajno veću razinu DHA u eritrocitima i jetri u odnosu na oboljele od nealkoholne masne bolesti jetre (Guo i sur., 2018). Nekoliko studija je pokazalo nizak status omega-3 m.k. kod žena u zapadnim zemljama. U njemačkoj nacionalnoj studiji *VitaMinFemin* sudjelovalo je 446 žena dobi 40 do 60 godina, a srednja vrijednost omega-3 indeksa bila je $5,49 \pm 1,17$ %. Od toga je 62,8 % žena imalo omega-3 indeks između 4 i 6 % (Gellert i sur., 2017). U Americi je provedena studija na 111 veterana dobi 69 ± 8 godina s bolešću perifernih arterija. Srednja vrijednost omega-3 indeksa bila je $5,2 \pm 1,8$ %. Pokazalo se da je veća vrijednost omega-3 indeksa bila kod starijih ispitanika i ispitanika koji nisu pušili (Nosova i sur., 2014).

4.4.1. Stupanj povezanosti omega-3 indeksa s ostalim parametrima

Kao što je prikazano u tablici 9, ispitana je povezanost omega-3 indeksa s antropometrijskim parametrima, jetrenim enzimima, serumskim lipidima i vrijednošću Indeksa masne jetre. Statistički značajna povezanost nije uočena niti za jedan parametar. Nadalje, nezavisnim t-testom ispitano je postoji li razlika u vrijednosti omega-3 indeksa ovisno o spolu i ovisno o tome je li ispitanik pušač. Od 14 ispitanika, u skupini ženskog spola, tri ispitanice su izjavile da puše, dok je u skupini muškog spola samo jedan ispitanik pušio (tablica 8). Razlika u vrijednosti omega-3 indeksa ovisno o spolu ($p = 0,436$), kao i o tome je li ispitanik pušač ($p = 0,332$), nije bila statistički značajna. U francuskoj studiji Wagnera i suradnika na 503 ispitanika dobi 35-64 godine, omega-3 indeks je bio veći kod žena, a pozitivna povezanost uočena je između omega-3 indeksa i dobi, što znači da je starenjem omega-3 indeks bio veći.

Također, uočena je negativna povezanost pušenja i opsega struka s omega-3 indeksom. Dakle, što je bio veći opseg struka, bila je manja vrijednost omega-3 indeksa. Isto tako, ako je ispitanik bio pušač, izmjerena je manja vrijednost omega-3 indeksa (Wagner i sur., 2015).

Snažna veza između dobi i vrijednosti omega-3 indeksa uočena je na različitim populacijama. Nekoliko je mogućih objašnjenja. Moguće je da stariji ljudi, s obzirom na više zdravstvenih problema, više brige posvećuju redovitom uzimanju kapsula omega-3 PUFA, i to iz koncentriranijih izvora. Moguće je i da konzumiraju više α -linolenske kiseline prehranbenim izvorima, ili da je kod njih pretvorba u tkivima puno učinkovitija (Block i sur., 2008).

Zanimljive rezultate je pokazala studija Itomure i suradnika, gdje je vrijednost EPA i DHA u eritrocitima također rasla s dobi. Objašnjenje je bilo da stariji Japanci jedu puno više ribe nego mlađi, što je potvrđeno studijama (Itomura i sur., 2008). U studiji Harrisa i sur. (2013) na 160 000 ispitanika, primijećeno je da vrijednost omega-3 indeksa raste s dobi i to 7 % za svako desteljeće te postaje stabilna nakon sedamdesete godine života.

Tablica 9. Stupanj međusobne povezanosti između dobi, antropometrijskih parametara i serumskih lipida (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

	Omega-3 indeks	
	r	p
Dob	-0,029	0,922
Opseg struka	-0,343	0,230
ITM	-0,25	-0,250
ALP	0,177	0,562
ALT	-0,014	0,962
AST	0,134	0,648
GGT	0,155	0,597
Triacilgliceroli	-0,243	0,402
Ukupni kolesterol	-0,279	0,335
HDL-kolesterol	0,011	0,969
LDL-kolesterol	-0,25	0,389
Indeks masne jetre	-0,298	0,301

Studije su pokazale da je manja vrijednost EPA i DHA kod pretilih ispitanika povezana s većom razinom prooksidansa u eritrocitima. Viša razina proupalnih markera, debljina, oksidativni stres i upala dovode do lošijeg statusa omega-3 PUFA (Harris i sur., 2012).

Isto tako, ispitanici koji su pušili, imali su statistički značajno manji omega-3 indeks. To se može objasniti da dim cigarete dovodi do oksidativnog stresa i oksidacije dugolančanih omega-3 PUFA i time do manje vrijednosti omega-3 indeksa (Wagner i sur., 2015).

Nadalje, u studiji Blocka i suradnika na uzorku od 704 ispitanika, pokazalo se da ITM, HDL-, LDL- i ukupni kolesterol nisu bili statistički značajno povezani s vrijednošću omega-3 indeksa (Block i sur., 2008), dok je studija Rose i suradnika pokazala suprotno. Studija na 475 starijih ispitanika u Australiji je pokazala da su ITM, opseg struka, triacilgliceroli i GGT negativno korelirali s vrijednošću omega-3 indeksa, te da je prevalencija NAFLD-a bila veća kod ispitanika koji su imali niži status omega-3 indeksa (Rose i sur., 2016).

Učinak omega-3 PUFA na smanjenje koncentracije triacilglicerola je poznat, stoga ne čudi negativna povezanost koncentracije triacilglicerola s omega-3 indeksom (Harris i sur., 2012). U nacionalnoj kanadskoj studiji, kao i u studiji Rose i suradnika, uočena je pozitivna povezanost HDL-kolesterola i omega-3 indeksa (Langlois i Ratnayake, 2015; Rose i sur., 2016), što podupire rezultate intervencijskih studija da suplementacija ribljim uljem doprinosi povećanju razine HDL-kolesterola (Ferguson i sur., 2016).

4.5. Vrijednost Indeksa masne jetre

Indeks masne jetre (engl. *Fatty liver indx*, FLI) pokazao se kao snažan dijagnostički pokazatelj NAFLD-a u studiji Motamed i sur. (2016). S obzirom da FLI čine četiri parametra (ITM, opseg struka, GGT, triacilgliceroli) koja su usko vezana uz NAFLD, rezultat je očekivan. Vrijednosti ITM-a i opsega struka veće od preporučenih, smatraju se esencijalnim čimbenicima rizika za nastanak NAFLD-a, zbog čega je i prevalencija NAFLD-a veća kod pretilih (Motamed i sur., 2016). Prema dobivenim podacima, srednja vrijednost FLI kod ispitanika ženskog spola bila je $75,6 \pm 26,1$, dok je kod ispitanika muškog spola bila $86,8 \pm 12,3$ (tablica 8). Vrijednost FLI su kod oba spola ≥ 60 čime je utvrđena bolest masne jetre.

4.5.1. Stupanj povezanosti Indeksa masne jetre s ostalim parametrima

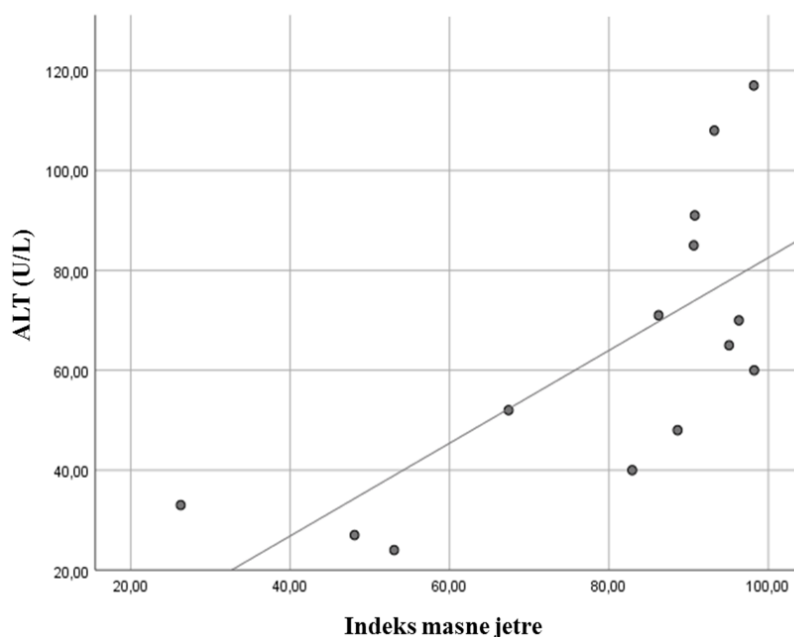
Rezultati usporedbe FLI s ostalim parametrima nisu se razlikovali ovisno o spolu. Rezultati su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Stupanj međusobne povezanosti Indeksa masne jetre s ostalim parametrima

(** p<0,01)

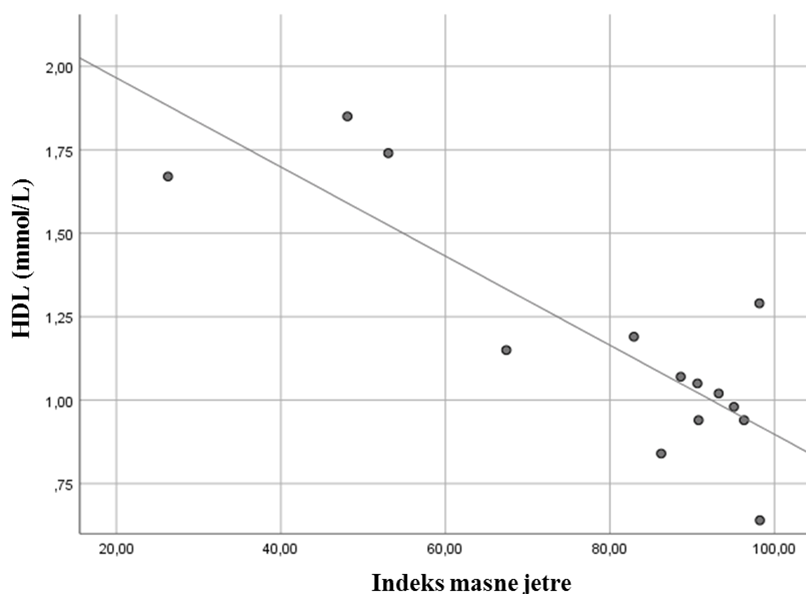
	Dob	Omega-3 indeks	ALP	ALT	AST	Ukupni kolesterol	HDL-kolesterol	LDL-kolesterol
Indeks masne jetre	- 0,488	- 0,298	0,003	0,715**	0,445	- 0,135	- 0,841**	0,043

Statistički značajna umjereno pozitivna povezanost uočena je za ALT i Indeks masne jetre ($r = 0,715$; $p = 0,004$), što znači da je porastom vrijednosti ALT-a rasla vrijednost Indeksa masne jetre (slika 9). S obzirom na povećane vrijednosti jetrenih enzima kod NAFLD-a, povezanost je očekivana.



Slika 9. Povezanost Indeksa masne jetre i ALT-a ($r = 0,715$; $p = 0,004$)

Također, utvrđena je statistički značajna jaka negativna povezanost HDL-kolesterola i Indeksa masne jetre ($r = -0,841$; $p < 0,001$), što znači da se smanjenjem vrijednosti HDL-kolesterola, povećava vrijednost Indeksa masne jetre (slika 10). Ovi rezultati u skladu su sa studijom Jägera i sur. (2015) gdje je vrijednost HDL-kolesterola također snažno negativno korelirala sa Indeksom masne jetre, za razliku od ALT-a koji je snažno pozitivno korelirao.



Slika 10. Povezanost Indeksa masne jetre i HDL-kolesterola ($r = -0,841$; $p < 0,001$)

U studiji Suna i sur. (2018), uz negativnu korelaciju HDL-kolesterola i pozitivnu korelaciju ALT-a, dodatno se pokazala pozitivna korelacija LDL-kolesterola i AST-a. Povezanost s ostalim parametrima (dob, ALP, AST, ukupni kolesterol, LDL-kolesterol i Omega-3 indeks) nije bila statistički značajna (tablica 10). Suprotno dobivenim rezultatima, Rose i sur. (2016) su u svojoj studiji utvrdili snažnu negativnu povezanost Omega-3 indeksa i Indeksa masne jetre. Opservacijske studije su pokazale poveznicu nižeg statusa omega-3 PUFA u tkivu jetre i manje konzumacije omega-3 PUFA s pojavnošću NAFLD-a. Eksperimentalne studije pokazuju da PUFA reguliraju mRNA ekspresiju gena (npr. *PPAR- α* , *SREBP-1c* i *ChREBP*) uključenih u pohranjivanje masti u jetri (Parker i sur., 2015).

Glavni nedostaci ovog istraživanja su mali broj ispitanika i nedostatak kontrolne skupine zdravih ispitanika, zbog čega je interpretacija rezultata otežana.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, čiji je glavni cilj bio procijeniti kardiovaskularni rizik oboljelih od NAFLD-a mjerenjem omega-3 indeksa, može se zaključiti:

1. Procjenom stanja uhranjenosti pomoću indeksa tjelesne mase kod oboljelih od NAFLD-a, utvrđeno je da 7,1 % ispitanika ima normalnu TM, 21,4 % prekomjernu TM, 57,1 % pati od I stupnja pretilosti, dok njih 14,3 % pati od II stupnja pretilosti. Pretilost se smatra glavnim čimbenikom rizika za razvoj NAFLD-a, stoga se NAFLD javlja većinom kod pretilih, što ovi rezultati i potvrđuju.
2. Utvrđena je statistički značajna jaka pozitivna povezanost indeksa tjelesne mase s opsegom struka ispitanika ($p < 0,001$). Dakle, što je ispitanik imao veći ITM to mu je i opseg struka bio veći. Dobiveni rezultati potvrđuju da je opseg struka veći od preporučenog jedan od čimbenika rizika povezanih s NAFLD-om.
3. Statistički značajna umjereno negativna povezanost utvrđena je između indeksa tjelesne mase i koncentracije HDL-kolesterola u krvi ispitanika ($p = 0,006$). Dakle, što je ispitanik imao veći ITM to su bile manje vrijednosti HDL-kolesterola, čime se potvrđuje spoznaja da pretilost utječe na smanjenje vrijednosti HDL-kolesterola.
4. Utvrđena je statistički značajna umjereno pozitivna povezanost indeksa tjelesne mase s vrijednostima alanin-aminotransferaze u krvi ispitanika ($p = 0,014$). Isto tako utvrđena je i međusobna pozitivna povezanost vrijednosti jetrenih enzima (ALT, AST i GGT). Povećane vrijednosti katalitičkih koncentracija jetrenih enzima smatraju se biomarkerom oštećenja jetre oboljelih od NAFLD-a, što ovi rezultati potvrđuju.
5. Statistički značajna umjereno negativna povezanost utvrđena je između koncentracije HDL- kolesterola i ALT-a ($p = 0,044$), AST-a ($p = 0,035$) i triacilglicerola ($p = 0,028$).
6. Rezultati procjene kardiovaskularnog rizika mjerenjem vrijednosti omega-3 indeksa pokazuju da je omega-3 indeks kod ispitanika ženskog spola bio $3,25 \pm 1,14$ %, dok je kod ispitanika muškog spola bio $3,74 \pm 0,97$ %. Dobivene vrijednosti su veoma male, te prema njima ispitanici oba spola spadaju u skupinu visokog rizika od kardiovaskularnih bolesti.

7. Razlika u vrijednosti omega-3 indeksa ovisno o spolu ($p = 0,436$), kao i o tome je li ispitanik pušač ($p = 0,332$), nije bila statistički značajna, što se može pripisati malom broju ispitanika.
8. Nije utvrđena statistički značajna povezanost vrijednosti omega-3 indeksa s ostalim parametrima kardiovaskularnog rizika - antropometrijskim parametrima, jetrenim enzimima, koncentracijom serumskih lipida i Indeksom masne jetre. Ovakav rezultat se također može pripisati malom broju ispitanika.
9. Utvrđena je statistički značajna umjereno pozitivna povezanost katalitičke koncentracije ALT-a i Indeksa masne jetre ($p = 0,004$), te snažna negativna povezanost HDL-kolesterola i Indeksa masne jetre ($p < 0,000$). Međusobni odnos ovih parametara mogao bi poslužiti u procjeni stanja bolesti u osoba oboljelih od NAFLD.
10. Dobivene rezultate trebalo bi potvrditi daljnjim istraživanjima, koja bi uz veći broj ispitanika, obuhvatila i zdravu kontrolnu skupinu. Iako je ovim istraživanjem obuhvaćen mali broj ispitanika, rezultati ukazuju da je zbog niske vrijednosti omega-3 indeksa razvidno slabo kardioprotektivno djelovanje EPA i DHA kod oboljelih od NAFLD-a. S obzirom na dobivene rezultate, u zdravstvenom sustavu bi se više pažnje trebalo posvetiti procjeni, a zatim i smanjenju kardiovaskularnog rizika oboljelih od NAFLD-a.

6. LITERATURA

- Ahmed, A., Wong, R. J., Harrison, S.A. (2015) NAFLD Review: Diagnosis, Treatment and Outcomes. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **13** (12), 2062-2070.
- Al-Jameil, N., Khan, F.A., Arjumand, S., Khan, M. F., Tabassum, H. (2014) Associated liver enzymes with hyperlipidemic profile in type 2 diabetes patients. *Int J Clin Exp Pathol.* **7** (7), 4345-4349.
- Anonymous (2018) The Omega-3 Index Project™, <<http://www.omega3indexproject.com/us/>>. Pristupljeno 12. lipnja 2018.
- Asrih, M., Jornayvaz, F.R. (2015) Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol.* **418** (1), 55-65.
- Athyros, V.G., Tziomalos, K., Katsiki, N., Doumas, M., Karagiannis, A., Mikhailidis, D. P. (2015) Cardiovascular risk across the histological spectrum and the clinical manifestations of non-alcoholic fatty liver disease: An update. *World J Gastroenterol.* **21** (22), 6820-6834.
- Balk, E. M., Lichtenstein, A. H. (2017) Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Summary of the 2016 Agency of Healthcare Research and Quality Evidence Review. *Nutrients.* **9** (8), 1-13. doi: 10.3390/nu9080865.
- Baratta, F., Pastori, D., Polimeni, L., Bucci, T., Ceci, F., Calabrese, C., Ernesti, I., Pannitteri, G., Violi, F., Angelico, F., Del Ben, M. (2017) Adherence to Mediterranean Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effect on Insulin Resistance. *Am J Gastroenterol.* **112** (12), 1832-1839.
- Barchetta, I., Cimini, F.A., Cavallo, M.G. (2017) Vitamin D Supplementation and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Present and Future. *Nutrients.* **9** (9), 1-9. doi: 10.3390/nu9091015.
- Baršić, N. (2013) Važnost povišenih vrijednosti gama-glutamil transpeptidaze za otkrivanje i procjenu težine nealkoholnoga steatohepatitisa. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu: Medicinski fakultet, Zagreb.
- Bedogni, G., Bellentani, S., Miglioli, L., Masutti, F., Passalacqua, M., Castiglione, A., Tiribelli, C. (2006) The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* **6** (33), 1-7.
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porrás, J.A., Auguet, T. (2014) Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol.* **7**, 221-39.

- Bhusal, K. R., Simkhada, R., Nepal, P. (2017) Lipid profile in different grades of Ultrasonic Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *JCMS Nepal*. **13** (2), 258-261.
- Bi, W.R., Yang, C.Q., Shi, Q., Xu, Y., Cao, C.P., Ling, J., Wang, X.Y. (2014) Large-scale analysis of factors influencing nonalcoholic fatty liver disease and its relationship with liver enzymes. *Genet Mol Res*. **13** (3), 5880-5891.
- Block, R.C., Harris, W.S., Pottala, J.V. (2008) Determinants of Blood Cell Omega-3 Fatty Acid Content. *Open Biomark J*. **1**, 1-6.
- Bowen, K. J., Harris, W. S., Kris-Etherton, P. M. (2016) Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Are There Benefits? *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. **18** (11), 1-16. doi: 10.1007/s11936-016-0487-1.
- Bukmir, L., Smokrović, H., Diminić-Lisica, I., Ljubotina, A., Popović, B. (2015) Nealkoholna masna bolest jetre. *Acta Med Croatica*. **69**, 305-310.
- Buretić-Tomljanović, A. (2014) Zašto je važno zdravlje bioloških membrana. *Medicina Fluminensis*. **50**, 391-413.
- Byrne, C.D., Targher, G. (2015) NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol*. **62**, 47-64.
- Castro, G. S., Calder, P. C. (2018) Non-alcoholic fatty liver disease and its treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Clin Nutr*. **37**, 37-55.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S.A., Brunt, E.M., Sanyal, A.J. (2018) The Diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*. **67**(1), 328-357.
- Chitturi, S., Wong, V.W., Chan, W.K., Wong, G.L., Wong, S.K., Sollano, J., Ni, Y.H., Liu, C. J., Lin, Y.C., Lesmana, L.A., Kim S.U., Hashimoto, E., Hamaguchi, M., Goh, K.L., Fan, J., Duseja, A., Dan, Y.Y., Chawla, Y., Farrell, G., Chan, H.L. (2018) The Asia-Pacific Working Party on Nonalcoholic Fatty Liver Disease Guidelines 2017 Part 2: Management and special groups. *J Gastroenterol Hepatol*. **33** (1), 86-98.
- Colica, C., Boccuto, L., Abenavoli, L. (2017) Silymarin: An option to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. **23** (47), 8437–8438.
- Čolak, E., Pap, D., Majkić-Singh, N., Obradović, I. (2013) The association of obesity and liver enzyme activities in a student population at increased risk for cardiovascular disease. *J Med Biochem*. **32** (1), 26 –31.
- Demir, M., Lang, S., Steffen, H.M. (2015) Nonalcoholic fatty liver disease – current status and future directions. *J Dig Dis*. **16**, 541–557.

- Dietrich, P., Hellerbrand, C. (2014) Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **28** (4), 637-53.
- disease: Meta-analyses of case-control and RCT. *Clin Nutr.* **37** (1), 113- 122.
- El Hadi, H., Vettor, R., Rossato, M. (2018) Vitamin E as a Treatment for NAFLD: Reality or Myth? *Antioxidants.* **7** (1), 1-13. doi:10.3390/antiox7010012.
- Endo, J., Arita, M. (2016) Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Cardiol.* **67**(1), 22-27.
- Eurofish i Uprava ribarstva, Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske (2017) Konzumacija ribe u Hrvatskoj. Pristupljeno 18. lipnja 2018. Preuzeto sa: <http://www.mps.hr/ribarstvo/UserDocsImages/Final_hrvatski_Eurofish_Izve%C5%A1taj_Konzumacija%20ribe%20u%20Hrvatskoj_2017.pdf >.
- European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO) (2016) EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* **64** (6), 1388-402.
- Fan, J.G., Kim, S.U., Wai-Sun Wong, V. (2017) New trends on obesity and NAFLD in Asia. *J Hepatol.* **67** (4), 862-873.
- Ferguson, J.J., Veysey, M., Lucock, M., Niblett, S., King, K., MacDonald-Wicks, L., Garg, M.L. (2016) Association between omega-3 index and blood lipids in older Australians. *J Nutr Biochem.* **27**, 233-40.
- Flock, M.R., Skulas-Ray, A.C., Harris, W.S., Etherton, T.D., Fleming, J.A., Kris-Etherton, P.M. (2013) Determinants of Erythrocyte Omega-3 Fatty Acid Content in Response to Fish Oil Supplementation: A Dose–Response Randomized Controlled Trial. *J Am Heart Assoc.* **2**(6), 1-13. doi: 10.1161/JAHA.113.000513.
- Francque, S.M., van der Graaff, D., Kwanten, W.J. (2016) Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *J Hepatol.* **65**(2), 425-43.
- Gellert, S., Schuchardt, J.P., Hahn, A. (2017) Low long chain omega-3 fatty acid status in middle-aged women. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **117**, 54-59.
- Gomerčić Palčić, M. (2015) Ekspresija i distribucija kaveolina-1 i transformirajućeg čimbenika rasta beta u hepatocitima bolesnika s nealkoholnom masnom bolešću jetara. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu: Medicinski fakultet, Zagreb.

- Guo, X. F., Yang, B., Tang, J., Li, D. (2018) Fatty acid and non-alcoholic fatty liver disease: Meta-analyses of case-control and RCT. *Clin Nutr.* **37** (1), 113- 122.
- Hals, P.A., Wang, X., Xiao, Y.F. (2017) Effects of a purified krill oil phospholipid rich in long-chain omega-3 fatty acids on cardiovascular disease risk factors in non-human primates with naturally occurring diabetes type-2 and dyslipidemia. *Lipids Health Dis.* **16** (1), 1-16. doi:10.1186/s12944-017-0411-z.
- Harris, W.S. (2007) Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: A Case for Omega-3 Index as a New Risk Factor. *Pharmacol Res.* **55** (3), 217–223.
- Harris, W.S. (2008) The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease. *Am J Clin Nutr.* **87**(6), 1997S-2002S.
- Harris, W.S., Pottala, J.V., Lacey, S.M., Vasan, R.S., Larson, M.G., Robins, S.J. (2012) Clinical correlates and heritability of erythrocyte eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid content in the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis.* **225** (2), 425-31.
- Harris, W.S., Pottala, J.V., Varvel, S.A., Borowski, J.J., Ward, J.N., McConnell, J.P. (2013) Erythrocyte omega-3 fatty acids increase and linoleic acid decreases with age: observations from 160,000 patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **88** (4), 257-63.
- Harris, W.S., Thomas, R.M. (2010) Biological variability of blood omega-3 biomarkers. *Clin Biochem.* **43** (3), 338-40.
- Hashida, R., Kawaguchi, T., Bekki, M., Omoto, M., Matsuse, H., Nago, T., Takano, Y., Ueno, T., Koga, H., George, J., Shiba, N., Torimura, T. (2017) Aerobic vs. resistance exercise in NAFLD: A systematic review. *J Hepatol.* **66** (1), 142-152.
- Hok, M. (2018) Utjecaj ulja račića krila na čimbenike rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod oboljelih od nealkoholne masne bolesti jetre. Rad nagrađen Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu u ak.god. 2017./18.
- ISO 5509:2000, Animal and vegetable fats and oils - preparation of methyl esters of fatty acids.
- Itomura, M., Fujioka, S., Hamazaki, K., Kobayashi, K., Nagasawa, T., Sawazaki, S., Kirihara, Y., Hamazaki, T. (2008) Factors influencing EPA+DHA levels in red blood cells in Japan. *In Vivo.* **22** (1), 131-135.

- Jäger, S., Jacobs, S., Kröger, J., Stefan, N., Fritsche, A., Weikert, C., Boeing, H., Schulze, M.B. (2015) Association between the Fatty Liver Index and Risk of Type 2 Diabetes in the EPIC-Potsdam Study. *PLoS One*. **10** (4), 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0124749.
- Kashinakunti, S.V., Rangappa, M., Kallaganada, G.S. (2017) Correlation between liver enzymes and lipid profile in type II diabetes mellitus – A case control study. *J. Biotechnol. Biochem.* **3** (5), 01-05.
- Kim, Y. J., Jeong, D.W., Lee, J. G., Lee, H.C., Lee, S.Y., Kim, Y.J., Yi, Y.H., Park, Y. S., Cho, Y. H., Bae, M. J., Choi, E. J. (2012) Omega-3 index and smoking in patients with acute ST-elevation myocardial infarction taking statins: a case-control study in Korea. *Lipids Health Dis.* **11**(43), 1-8. doi: 10.1186/1476-511X-11-43.
- Konerman, M.A., Jones, J.C., Harrison, S.A. (2018) Pharmacotherapy for NASH: Current and emerging. *J Hepatol.* **68**, 362–375.
- Langlois, K., Ratnayake, W.M. (2015) Omega-3 Index of Canadian adults. *Health Rep.* **26** (11), 3-11.
- Lavekar, A.S., Raje, D.V., Manohar, T., Lavekar, A.A. (2017) Role of Probiotics in the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis. *Euroasian J Hepatogastroenterol.* **7** (2), 130–137.
- Lu, W., Li, S., Li, J., Wang, J., Zhang, R., Zhou, Y., Yin, Q., Zheng, Y., Wang, F., Xia, Y., Chen, K., Liu, T., Lu, J., Zhou, Y., Guo, C. (2016) Effects of Omega-3 Fatty Acid in NAFLD: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 1-11. doi: 10.1155/2016/1459790.
- Marjot, T., Sbardella, E., Moolla, A., Hazlehurst, J., Tan, G. D., Ainsworth, M., Cobbold, J. F. L., Tomlinson, J.W. (2018) Prevalence and severity of non-alcoholic fatty liver disease are underestimated in clinical practice: impact of a dedicated screening approach at a large university teaching hospital. *Diabet. Med.* **35** (1), 89-98.
- Metherel, A. H. (2007) Omega-3 Fatty Acid Blood Biomarkers Before and After Acute Fish Oil Supplementation in Men and Women. Master thesis. University of Waterloo: Department of Kinesiology, Waterloo.
- Mikolašević, I., Orlić, L., Štimac, D., Mavrinac, V., Ferenčić, A., Rundić, A., Babić, V., Milić, S. (2016) Nealkoholna masna bolest jetre – multisistemska bolest? *Liječ Vjesn.* **138**, 353–358.
- Misra, V. L., Khashab, M., Chalasani, N. (2009) Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk. *Curr Gastroenterol Rep.* **11** (1), 50–55.

- Motamed, N., Sohrabi, M., Ajdarkosh, H., Hemmasi, G., Maadi, M., Sayeedian, F. S., Pirzad, R., Abedi, K., Aghapour, S., Fallahnezhad, M, Zamani, F. (2016) Fatty liver index vs waist circumference for predicting non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* **22** (10), 3023-3030.
- Mozaffarian, D., Wu, J.H. (2011) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol.* **58** (20), 2047-2067.
- Nobili, V., Alisi, A., Musso, G., Scorletti, E., Calder, P.C., Byrne, C.D. (2016) Omega-3 fatty acids: Mechanisms of benefit and therapeutic effects in pediatric and adult NAFLD. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **53** (2), 106-120.
- Nosova, E.V., Chong, K.C., Alley, H.F., Harris, W.S., Boscardin, W.J., Conte, M.S., Owens, C.D., Grenon, S.M. (2014) Clinical correlates of RBC omega-3 fatty acid content in male veterans with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* **60** (5), 1325-1331.
- Pais, R., Barritt, A.S., Calmus, Y., Scatton, O., Runge, T., Lebray, P., Poynard, T., Ratziu, V., Conti, F. (2016) NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *J Hepatol.* **65** (6), 1245-1257.
- Parker, H.M., O'Connor, H.T., Keating, S.E., Cohn, J.S., Garg, M.L., Caterson, I.D., George, J., Johnson, N.A. (2015) Efficacy of the Omega-3 Index in predicting NAFLD in overweight and obese adults: a pilot study. *Br J Nutr.* **114** (5), 780-787.
- Patil, R., Sood, G.K. (2017) Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *World J Gastroenterol.* **8** (2), 51-58.
- Peng, K., Mo, Z., Tian, G. (2017) Serum Lipid Abnormalities and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adult Males. *Am J Med Sci.* **353** (3), 236-241.
- Petta, S., Gastaldelli, A., Rebelos, E., Bugianesi, E., Messa, P., Miele, L., Svegliati-Baroni, G., Valenti, L., Bonino, F. (2016) Pathophysiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* **17**(12), 1-26. doi:10.3390/ijms17122082.
- Rangel-Huerta, O. D., Gil, A. (2018) Omega- 3 fatty acids in CVD risk factors: An updated systematic review of randomised clinical trials. *Clin Nutr.* **37**(1), 72-77.
- Rashid, S., Genest, J. (2007) Effect of Obesity on High-density Lipoprotein Metabolism. *Obesity (Silver Spring).* **15** (12), 2875-2888.
- Rinella, M.E. (2015) Nonalcoholic Fatty Liver Disease. A Systematic Review. *JAMA.* **313** (22), 2263-2273.

- Rose, H.G., Oklander, M. (1965) Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res.* **6**, 428-31.
- Rose, M., Veysey, M., Lucock, M., Niblett, S., King, K., Baines, S., Garg, M.L. (2016) Association between erythrocyte omega-3 polyunsaturated fatty acid levels and fatty liver index in older people is sex dependent. *J Nutr Intermed Metab.* **5**, 78-85.
- Rotman, Y., Sanyal, A.J. (2017) Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* **66** (1), 180–190.
- Saltzman, E.T., Palacios, T., Thomsen, M., Vitetta, L. (2018) Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Microbiol.* **9** (61), 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2018.00061.
- Sanyal, D., Mukherjee, P., Raychaudhuri, M., Ghosh, S., Mukherjee, S., Chowdhury, S. (2015) Profile of liver enzymes in non-alcoholic fatty liver disease in patients with impaired glucose tolerance and newly detected untreated type 2 diabetes. *Indian J Endocrinol Metab.* **19** (5), 597–601.
- Sharifi, N., Amani, R. (2017) Vitamin D supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A critical and systematic review of clinical trials. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1-11. doi: 10.1080/10408398.2017.1389693.
- Shouhed, D., Steggerda, J., Burch, M., Nouredin, M. (2017) The role of bariatric surgery in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* **11** (9), 797-811.
- Sofi, F., Casini, A. (2014) Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: New therapeutic option around the corner? *World J Gastroenterol.* **20** (23), 7339-7346.
- Stark, K. D., Van Elswyk, M. E., Higgins, M. R., Weatherford, C. A., Salem Jr., N. (2016) Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Prog Lipid Res.* **63**, 132-152.
- Stevens, J., Katz, E.G., Huxley, R.R. (2010) Associations between gender, age and waist circumference. *Eur J Clin Nutr.* **64** (1), 6–15.
- Sun, K., Lin, D., Li, F., Qi, Y., Feng, W., Yan, L., Chen, C., Ren, M., Liu, D. (2018) Fatty liver index, albuminuria and the association with chronic kidney disease: a population-based study in China. *BMJ.* **8** (1), 1-9. doi: 10.1136/bmjopen-2017-019097.
- Tilg, H. (2017) How to Approach a Patient With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* **153** (2), 345-349.

- Tribulova, N., Szeiffova Bacova, B., Egan Benova, T., Knezl, V., Barancik, M., Slezak, J. (2017) Omega-3 Index and Anti-Arrhythmic Potential of Omega-3 PUFAs. *Nutrients*. **9** (11), 1-21. doi: 10.3390/nu9111191.
- Tur, J.A., Bibiloni, M.M., Sureda A., Pons, A. (2012) Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *Br J Nutr*. **107** (2), 23-52. doi: 10.1017/S0007114512001456.
- von Schacky, C. (2011) The Omega-3 Index as a risk factor for cardiovascular diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **96**, 94– 98.
- von Schacky, C. (2014) Omega-3 Index and Cardiovascular Health. *Nutrients*. **6**, 799-814.
- Vranešić Bender, D. (2011) Omega-3 masne kiseline – svojstva i djelovanje. *Medix*. **17**, 234 – 240.
- Wagner, A., Simon, C., Morio, B., Dallongeville, J., Ruidavets, J.B., Haas, B., Laillet, B., Cottel, D., Ferrières, J., Arveiler, D. (2015) Omega-3 index levels and associated factors in a middle-aged French population: the MONA LISA-NUT Study. *Eur J Clin Nutr*. **69** (4), 436-41.
- Wai-Sun Wong, V., Chan, W. K., Chitturi, S., Chawla, Y., Dan, Y.Y., Duseja, A., Fan, J., Goh, K.L., Hamaguchi, M., Hashimoto, E., Kim, S.U., Lesmana, L.A., Lin, Y.C., Liu, C. J., Ni, Y. H., Sollano, J., Kin-Hung Wong, S., Lai-Hung Wong, G., Lik-Yuen Chan, H., Farrell, G. (2018) Asia–Pacific working party on non-alcoholic fatty liver disease guidelines 2017- part 1: definition, risk factors and assessment. *J Gastroenterol Hepatol*. **33** (1),70-85.
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2010) Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*. **68**(5), 280-9.
- Wu, S., Wu, F., Ding, Y., Hou, J., Bi, J., Zhang, Z. (2016) Association of non-alcoholic fatty liver disease with major adverse cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 1-14. doi: 10.1038/srep33386.
- Yoshitaka, H., Hamaguchi, M., Kojima, T., Fukuda, T., Ohbora, A., Fukui, M. (2017) Nonoverweight nonalcoholic fatty liver disease and incident cardiovascular disease. *Medicine*. **96** (18), 1-5. doi: 10.1097/MD.00000000000006712.
- Zazos, P., Renner, E.L. (2014) Liver transplantation and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. **20** (42), 15532–15538.

7. PRILOZI

Prilog 1. Informirani pristanak za sudjelovanje u kliničkom ispitivanju

INFORMIRANI PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE U KLINIČKOM ISPITIVANJU

Naziv ispitivanja: „Primjena ulja račića krilla kod nealkoholne masne bolesti jetre“

ISTRAŽIVAČI: prof. dr. sc. Željko Krznarić, dr. med.

prof. dr. sc. Adriana Vince, dr. med.

doc. dr. sc. Darija Vranešić Bender, dipl. ing.

Mirja Jošić, dipl. ing.

Adresa provođenja istraživanja:

- KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb (Centar za kliničku prehranu)
- Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Mirogojska 8, 10000 Zagreb
(Zavod za infekcijske bolesti jetre i febrilna stanja)

Uvod

Cilj ovog informiranog pristanka je upoznavanje ispitanika sa svrhom i načinom sudjelovanja u ispitivanju. Nakon upoznavanja s detaljima ispitivanja, ispitanik daje pristanak za sudjelovanje u ispitivanju što potvrđuje svojim potpisom. Potrebno je naglasiti kako ispitanik može odbiti sudjelovanje u ispitivanju u bilo kojem trenutku. Istraživač je obavezan odgovoriti na sva pitanja ispitanika koja su povezana sa samim ispitivanjem.

Vaše sudjelovanje u istraživanju treba se temeljiti na jasnom razumijevanju ciljeva istraživanja i načina i postupaka za njegovo provođenje te mogućih koristi ili rizika za Vas kao ispitanika. Stoga Vas molimo da, prije donošenja odluke, pažljivo pročitate i proučite ovu obavijest, a ako u njoj nađete na bilo kakve nejasnoće ili nepoznate riječi i izraze da o tome pitate istraživače i liječnike koji u istraživanju sudjeluju i dužni su Vam i spremni odgovoriti na svako pitanje.

Inicijali bolesnika: _____

OPIS KLJUČNOG PROBLEMA I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) je jetrena manifestacija metaboličkog sindroma. Pretilost i inzulinska rezistencija su glavni čimbenici koji doprinose razvoju ove bolesti. NAFLD manifestira se jetrenim oštećenjima koji se karakteriziraju kao steatoza, steatohepatitis i fibroza koji mogu dovesti do ciroze. Steatoza jetre reverzibilno je stanje, no upalno stanje jetre koje se događa kod pacijenata s nealkoholnim steatohepatitisom (NASH) može rezultirati oštećenjima jetrenih stanica koja povećavaju rizik od ciroze jetre, zatajenja i karcinoma. NAFLD, a posebno NASH povećava rizik od ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Trenutno ne postoji adekvatna terapija lijekovima stoga je pronalazak sigurne i učinkovite terapije imperativ. Ranija istraživanja pokazala su kako omega – 3 masne kiseline imaju blagotvoran učinak na metabolički sindrom, a nedavno se pokazalo kako imaju i utjecaj kod NAFLD-a. Ulje krilla je bogat izvor omega – 3 masnih kiselina eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske (DHA) masne kiseline, a ove dugolančane masne kiseline se nalaze u obliku fosfolipida, za razliku od ribljeg ulja gdje se nalaze u obliku triglicerida. Postoje dokazi kako je apsorpcija omega – 3 masnih kiselina u obliku fosfolipida veća u usporedbi s apsorpcijom iz triglicerida.

Hipoteza istraživanja je da unos ulja račića krilla u obliku dodatka prehrani tijekom 6 mjeseci može poboljšati zdravlje jetre kod ispitanika s dijagnosticiranom nealkoholnom masnom bolesti jetre.

CILJ I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Istraživat će se ima li unos ulja račića krilla tijekom 6 mjeseci utjecaj na zdravlje jetre što će se provjeravati na dva načina, iz uzorka krvi te pomoću ultrazvuka. Tijekom istraživanja uzimanje uzorka krvi kao i ultrazvučna pretraga obaviti će se dva puta. Prvi put će biti na početku istraživanja, a drugi na kraju istraživanja odnosno nakon 6 mjeseci. Predviđeno trajanje projekta je 6 mjeseci od studenog 2015. do travnja 2016. godine.

ULOGA VAS KAO ISPITANIKA U ISTRAŽIVANJU

Ispitivanje će obuhvatiti 60 ispitanika s dijagnosticiranim NAFLD ili NASH koji će nasumično biti podijeljeni u dvije skupine. Jedna skupina će unositi ulje račića krilla Almagea KRILL OIL CARDIO+ (1500 mg ulja račića krilla od kojih EPA 180 mg, DHA 82,5 mg, Vitamin E 36 mg, selen 165 mcg), a druga placebo (1500 mg sojinog ulja). Ispitivanje će dodatno obuhvatiti i 30 zdravih ispitanika kao kontrolnu skupinu koji će unositi ulje račića krilla Almagea KRILL OIL CARDIO+.

Inicijali bolesnika: _____

Istraživat će se do kakvih je promjena došlo na krvnim parametrima nakon 6 mjeseci u usporedbi s početnim stanjem: markeri inzulinske rezistencije, lipidni profil (ukupni kolesterol, LDL, HDL, trigliceridi), omega - 3 indeks, jetreni enzimi (ALT, AST, GGT). Također će se usporediti rezultati biokemijskih parametara skupine koja je unosila ulje račića krilla sa rezultatima skupine koja je unosila placebo, a usporedba će biti izvršena i s rezultatima kontrolne skupine (zdravi ispitanici) koji su unosili ulje račića krilla. Ista analiza će biti provedena s rezultatima ultrazvučne pretrage.

Istraživači se obavezuju da prikupljene osobne podatke neće koristiti za drugu namjenu.

Također, ispitanici neće u svrhu ovog istraživanja biti podvrgnuti dodatnim nestandardnim postupcima već uključuje krvnu pretragu i ultrazvučnu pretragu koje su dio standardne medicinske dijagnostike i praćenja stanja pacijenata s NAFLD/NASH.

Ispitanici će također biti zamoljeni da vode dnevnik prehrane u trajanju od nekoliko dana kako bi se utvrdile njihove prehrambene navike.

KOJE SU ZA VAS MOGUĆE PREDNOSTI I KORISTI OD SUDJELOVANJA?

Prednosti sudjelovanja u studiji su kontrola zdravstvenog stanja pod nadzorom liječnika te jedinstvena prilika ispitivanja omega - 3 indeksa. Omega - 3 indeks označava sadržaj EPA+DHA u eritrocitima izražen kao postotak od ukupnih masnih kiselina, a predstavlja fiziološki relevantan i neovisan čimbenik rizika za kardiovaskularne bolesti s potencijalnim značajem u kliničkoj primjeni. Omega - 3 masne kiseline unosimo putem prehrane, a namirnice bogate ovim mastima su plava riba (srdela, skuša, tuna, incuni) te riba iz hladnih mora (haringa, losos), alge, zooplankton i plodovi mora, kao i neke namirnice biljnog porijekla. Omega - 3 indeks ukazuje na sadržaj omega - 3 masnih kiselina u tkivima.

KOJI SU ZA VAS MOGUĆI RIZICI SUDJELOVANJA U ISTRAŽIVANJU?

Mogući rizici su lakše nuspojave poput gastrointestinalnih smetnji (nadimanje, dispepsija, vjetrovi, podrigivanje, povrat kiseline) te alergijskih reakcija uslijed preosjetljivosti na bilo koju komponentu dodatka prehrani.

MOŽETE LI ODBITI SUDJELOVATI U ISPITIVANJU?

Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju u cijelosti je dobrovoljno. Slobodni ste odbiti sudjelovati u ispitivanju te u svakom trenutku možete napustiti ispitivanje bez ikakvih posljedica ili gubitka zdravstvene skrbi. Vaša odluka da se povučete iz ispitivanja neće utjecati na Vašu buduću skrb.

Inicijali bolesnika: _____

Ispitivač može prekinuti Vaše sudjelovanje u ispitivanju ako je uvjeren da je to u Vašem najboljem interesu ili ako se ne pridržavate uputa ispitanika. Jamčimo da će Vaša dokumentacija ostati strogo povjerljiva, a Vaš identitet zaštićen.

POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

Svi Vaši osobni podaci biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj projekta i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. U naše baze podataka Vi ćete biti uneseni prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditelj projekta i njegovi suradnici, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji mogu imati i predstavnici Etičkog povjerenstva u ustanovi u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) te predstavnici Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta, koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.

ZA ŠTO ĆE SE KORISTITI PODACI DOBIVENI U OVOM ZNANSTVENOM ISTRAŽIVANJU?

Podaci dobiveni ovim istraživanjem prezentirat će se putem znanstvenih i stručnih publikacija, a rezultati će biti prikazani na stručnim sastancima i kongresima.

TKO ORGANIZIRA I FINANCIRA OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje provodi se u sklopu znanstvenog projekta „Primjena ulja račića krilla kod nealkoholne masne bolesti jetre“, a financira se iz osobnih sredstava. Provode ga i organiziraju Klinička jedinica za kliničku prehranu (KBC Zagreb), Zavod za infekcijske bolesti jetre i febrilna stanja (Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević") i Zavod za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

Ovo istraživanje odobrila su nadležna etička tijela: Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb, nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

Inicijali bolesnika: _____

KOGA MOŽETE KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPITE?

Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije, ili imate dodatnih pitanja, slobodno se obratite voditelju projekta ili njegovim suradnicima, kako slijedi:

1. Ime i prezime voditelja projekta: prof. dr. sc. Željko Krznarić, dr.med.

Adresa voditelja projekta: Klinički bolnički centar Zagreb
Klinička jedinica za kliničku prehranu
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

Broj telefona voditelja projekta: +385 1 2367 730

2. Ime i prezime suradnika projekta: doc. dr. sc. Darija Vranešić Bender, dipl. ing.

Adresa suradnika projekta: Klinički bolnički centar Zagreb
Klinička jedinica za kliničku prehranu
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb

Broj telefona suradnika projekta: +385 1 2367 730

O VAŠOJ PISANOJ SUGLASNOSTI ZA SUDJELOVANJE U OVOM ISTRAŽIVANJU

Presliku dokumenta (potpisne stranice) koji trebate potpisati ako pristajete sudjelovati u ovom istraživanju dobit ćete Vi i voditelj istraživanja. Izvorni primjerak dokumenta će zadržati i čuvati voditelj istraživanja.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili mogućnost Vašeg sudjelovanja u ovom znanstvenom istraživanju. Ova obavijest sastavljena je u skladu s odredbama Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

Pročitao/la sam ovu informaciju i pristajem sudjelovati u ispitivanju pod nazivom „Primjena ulja račića krilla kod nealkoholne masne bolesti jetre.“

IME I PREZIME ISPITANIKA _____

POTPIS ISPITANIKA: _____

DATUM: _____

dan/mjesec/godina

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marija Hok

Ime i prezime studenta