

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO- BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Marija Hok

**Utjecaj ulja račića krila na čimbenike rizika za razvoj  
kardiovaskularnih bolesti kod oboljelih od nealkoholne masne  
bolesti jetre**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je 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 i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2017./2018.

## POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

NAFLD – nealkoholna masna bolest jetre (engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*)

NASH – nealkoholni steatohepatitis (engl. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*)

NAFL – nealkoholna masna jetra (engl. *Non-alcoholic fatty liver*)

TNF- $\alpha$  – faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor necrosis factor alpha*)

SMK – slobodne masne kiseline (engl. *Free fatty acids*)

IR– inzulinska rezistencija

LCFA- dugolančane masne kiseline (engl. *Long-chain fatty acids*)

DAG- diacilglicerol

TAG- trigliceridi

PNPLA3- engl. *patatin-like phospholipase domain-containing 3*

ITM- indeks tjelesne mase (engl. *Body mass index*)

TM- tjelesna masa

TV- tjelesna visina

MUFA- mononezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated fatty acids*)

HCC- hepatocelularni karcinom (engl. *Hepatocellular carcinoma*)

BSA- albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*)

AST- aspartat-aminotransferaza

ALT- alanin-aminotransferaza

GGT- gama-glutamilttransferaza

ALP- alkalna fosfataza

EPA- eikozapentaenska kiselina

DHA- dohozaheksaenska kiselina

FDA- engl. *Federal Drug Administration*

EMA- engl. *European Medicines Agency*

GLP-1- engl. *glucagon-like peptide 1*

GIP- engl. *gastrointestinal insulinotropic polypeptide*

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| 1.1. Nealkoholna masna bolest jetre - terminologija .....                | 1  |
| 1.2. Patofiziologija nealkoholne masne bolesti jetre .....               | 1  |
| 1.3. Terapijske mogućnosti u liječenju NAFLD-a .....                     | 3  |
| 1.3.1. Promjena prehrambenih navika .....                                | 3  |
| 1.3.2. Povećanje tjelesne aktivnosti.....                                | 4  |
| 1.3.3. Upotreba dodataka prehrani .....                                  | 5  |
| 1.3.3.1. <i>Silimarin</i> .....  | 5  |
| 1.3.3.2. <i>Vitamin D</i> .....  | 5  |
| 1.3.3.3. <i>Vitamin E</i> .....  | 6  |
| 1.3.3.4. <i>Probiotici</i> .....   | 6  |
| 1.3.3.5. <i>Omega-3 masne kiseline</i> .....                             | 7  |
| 1.3.4. Farmakoterapija.....  | 7  |
| 1.3.5. Barijatrijska kirurgija.....                                      | 8  |
| 1.3.6. Transplantacija jetre .....                                       | 9  |
| 1.4. NAFLD kao čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti ..... | 9  |
| <b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....                           | 11 |
| <b>3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE</b> .....                          | 12 |
| 3.1. Ispitanici .....  | 12 |
| 3.2. Materijali .....  | 13 |
| 3.2.1. Uređaji.....  | 13 |
| 3.2.2. Pribor .....  | 13 |
| 3.2.3. Kemikalije .....  | 14 |
| 3.3. Metode.....   | 15 |
| 3.3.1. Antropometrijska mjerenja.....                                    | 15 |
| 3.3.2. Uzorkovanje krvi .....  | 15 |
| 3.3.3. Ekstrakcija ukupnih lipida eritrocita.....                        | 15 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.4. Određivanje ukupne mase proteina u eritrocitima.....                               | 16        |
| 3.3.5. Određivanje ukupnog kolesterola u eritrocitima .....                               | 17        |
| 3.3.6. Statistička analiza .....  | 18        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>19</b> |
| 4.1. Antropometrijski parametri .....   | 19        |
| 4.1.1. Utjecaj intervencije na antropometrijske parametre .....                           | 21        |
| 4.2. Vrijednosti serumskih lipida.....  | 22        |
| 4.2.1. Utjecaj intervencije na vrijednost serumskih lipida .....                          | 23        |
| 4.3. Vrijednost ukupnog kolesterola mjenog u eritrocitima .....                           | 24        |
| 4.3.1. Utjecaj intervencije na vrijednost ukupnog kolesterola mjenog u eritrocitima ..... | 25        |
| 4.4. Vrijednosti jetrenih enzima .....  | 25        |
| 4.4.1. Utjecaj intervencije na vrijednost jetrenih enzima .....                           | 26        |
| <b>5. ZAKLJUČCI .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>6. ZAHVALA .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>7. POPIS LITERATURE.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>8. SAŽETAK.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>9. SUMMARY.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>PRILOZI.....</b>   | <b>37</b> |

## 1. UVOD

### 1.1. Nealkoholna masna bolest jetre - terminologija

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 glavnim uzrokom zatajenja i transplantacije jetre (Marjot i sur., 2018). NAFLD je prvi puta opisao Ludwig sa suradnicima 1980. godine (Demir i sur., 2015), a obuhvaća cijeli spektar bolesti masne jetre u pojedinaca bez značajne potrošnje alkohola, u rasponu od masne jetre, steatohepatitisa do ciroze jetre. 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 (Chalasani i sur., 2018).

Posljednjih godina sve je veći broj publikacija koje govore u prilog tome da NAFLD nije samo bolest ograničena 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). Prevalencija NAFLD-a je 30-40 % u muškaraca i 15-20 % u žena, a kod oboljelih od dijabetesa tipa 2 javlja se čak kod 70 % pacijenata (Byrne i Targher, 2015). Prekomjerni prehrambeni unos, pretilost i inzulinska rezistencija, glavni su rizični faktori 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 NAFLD-a (Wai-Sun Wong i sur., 2018).

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 povišenih jetrenih biokemijskih testova. Rano prepoznavanje od velike je važnosti za pravodobno, ispravno i uspješno liječenje (Bukmir i sur., 2015).

### 1.2. Patofiziologija 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).

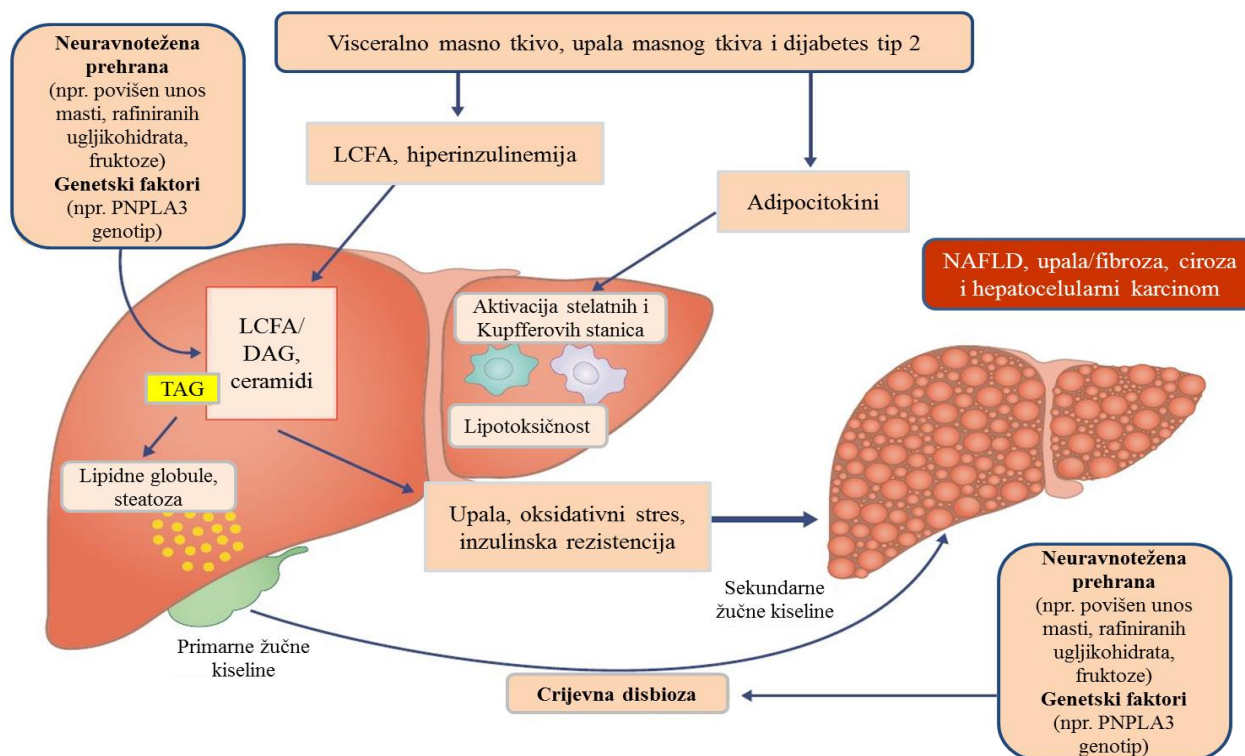
Pojava i progresija NAFLD-a pripisuje se nizu čimbenika koji su dio teorije „višestrukih udaraca“, koja kaže da je NAFLD rezultat upale u jetri izazvane brojnim intestinalnim okidačima i onima povezanim s masnim tkivom (Saltzman i sur., 2018). Također je posljedica neravnoteže između unosa i sinteze masti s jedne te njihove razgradnje i eliminacije iz organizma s druge strane (Gomerčić Palčić, 2015).

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 bolesnika s progresivnim oblikom bolesti (Gomerčić Palčić, 2015).

Inzulinska rezistencija (IR) igra ključnu ulogu u patogenezi nastanka bolesti masne jetre. IR kao jedan od simptoma metaboličkog sindroma proizlazi iz kompleksnih interakcija proupalnih cirkulirajućih medijatora s tkivima i organima, ali i genetske podloge te stila života (prehrana, tjelesna aktivnost) (Petta i sur., 2016). Povećana aktivacija hormon-osjetljive lipaze u adipocitima kod IR, unos hrane bogate mastima i pojačana lipoliza dovode do povišenja slobodnih masnih kiselina (SMK) u plazmi (Gomerčić Palčić, 2015). Kronična povišena razina SMK-a može ometati metaboličke puteve (Berlanga i sur., 2014) te rezultirati stvaranjem 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 alfa [TNF- $\alpha$ ] i interleukina [IL-6, IL-1 $\beta$ ]). Ti čimbenici dovode do oštećenja hepatocita i stanja lipotoksičnosti te u konačnici nastanka NASH-a ili ciroze jetre (Gomerčić Palčić, 2015) (slika 1.).

Pod fiziološkim uvjetima, sinteza triglicerida je stimulirana s ciljem odstranjenja viška SMK-a (Berlanga i sur., 2014). Na temelju eksperimentalnih studija pokazalo se da akumulacija triglicerida predstavlja protektivni mehanizam kada su hepatociti izloženi potencijalnim toksičnim metabolitima triglicerida (Gomerčić Palčić, 2015). SMK i kolesterol, osobito kada se akumuliraju u mitohondrijima, smatraju se „agresivnim“ lipidima koji dovode do TNF- $\alpha$  posredovanih oštećenja jetre i nastanka reaktivnih kisikovih spojeva (Berlanga i sur., 2014).

Jedan od puteva koji doprinosi upalnim procesima u jetri kod pacijenata s NAFLD-om je i međusobna povezanost mikroorganizama crijeva i jetre. Određena vrsta prehrane (npr. hrana bogata fruktozom i/ili polinezasićenim 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 1.).



**Slika 1.** Utjecaj različitih čimbenika na razvoj NAFLD-a, ciroze i hepatocelularnog karcinoma.

(DAG- diacilglicerol, TAG- trigliceridi, LCFA- dugolančane masne kiseline, PNPLA3- engl. *patatin-like phospholipase domain-containing 3*) (Prilagođeno prema Byrne i Targher, 2015)

### 1.3. Terapijske mogućnosti u liječenju NAFLD-a

Većina bolesnika s NAFLD-om 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).

#### 1.3.1. Promjena prehrambenih navika

Prehrana ima važan učinak u terapiji NAFLD-a (Sofi i Casini, 2014). Pokazalo se da su oboljeli od NAFLD-a skloniji konzumaciji energetski bogate hrane, zasićenih masti, kolesterola i zaslađenih napitaka, dok istovremeno ne unose dovoljno svježeg voća, zelenog povrća, vlakana i omega-3 masnih kiselina (Chitturi i sur., 2018).



Kvaliteta masti u prehrani igra važnu ulogu u patogenezi NAFLD-a pri čemu se blagotvornim pokazao utjecaj mononezasićenih masnih kiselina (engl. *monounsaturated fatty acids*, MUFA). Zamjena jednostavnih ugljikohidrata i zasićenih masti sa MUFA-om, npr. uvođenjem maslinovog ulja u prehranu dovelo je do poboljšanja glikemije, krvnog tlaka i povišenja HDL-kolesterola, istovremeno prevenirajući aterogenezu (Sofi i Casini, 2014).

Na temelju provedenih studija, pokazalo se da gubitak tjelesne mase od 7% ili više, uz pravilnu prehranu tijekom najmanje jedne godine, može poboljšati histologiju jetre u pacijenata s biopsijom dokazanim NASH-om (Ahmed i sur., 2015). Kod gubitka tjelesne mase, preporuča se da to bude postupno (do 1 kg/tjedan) uz prehranu sa smanjenjem energetske unosa 500-1000 kcal. Nagli gubitak kilograma se ne preporučuje i može dovesti do pogoršanja NASH-a. Takve dijete moguće je primjenjivati uz strogi nadzor i to uglavnom kao pripremu za barijatrijsku operaciju (Chitturi i sur., 2018).

Od svih načina prehrane kao dijelom terapije NAFLD-a, najboljim se pokazala mediteranska prehrana koja je uz blagotvorne učinke na jetru, bila efikasna pri smanjenju tjelesne mase (Sofi i Casini, 2014). Provedene studije, kao i značajna PREDIMED studija, podupiru tezu da je mediteranska prehrana povezana s nižom prevalencijom NAFLD-a. Blagotvoran učinak mediteranske prehrane povezan je s poboljšanjem kardiometaboličkog statusa (snižanjem serumskih triglicerida 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).

### **1.3.2. Povećanje tjelesne aktivnosti**

Štetne posljedice pretilosti, dijabetesa i drugih komponenata metaboličkog sindroma u pacijenata sa NAFLD-om, dodatno su povezane s nižom 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. Uslijed 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 HbA1c, krvni tlak i serumski kolesterol (Hashida i sur., 2017).

Vježbe izdržljivosti prikladnije su za oboljele od NAFLD-a kojima je kontraindicirano aerobno vježbanje, npr. kod pretilosti. Prema istraživanjima, vježbe izdržljivosti dovele su do smanjenja količine masti jetre uslijed povećane oksidacije, ali i poboljšanja glikemije jer se povećala ekspresija transportnog proteina GLUT4 i enzima glikogen sintaze (Loomba i Cortez-Pinto, 2015). Postoje i oboljeli kojima su umjerena aerobna aktivnost ili vježbe izdržljivosti izrazito teške, što zbog morbidne pretilosti, vezanosti uz krevet, starosti ili drugih komorbiditeta koji onemogućuju mobilnost.

Njima se preporučuju tzv. hibridni i akceleracijski treninzi, koji su se pokazali učinkovitima u sniženju biokemijskih pokazatelja NAFLD-a (Whitsett i Van Wagner, 2015).

Iako vježbanje ima klinički značajan utjecaj na količinu masti u jetri (smanjenje od 20 do 30 %), u usporedbi s redukcijom tjelesne mase gdje dolazi i do smanjenja 80 % masti jetre, učinak je skroman (Romero-Gómez i sur., 2017). Kombinirana strategija vježbanja uz promjenu prehrambenih navika bila je efikasnija u smanjenju masne jetre nego svaki čimbenik posebno ( 49,8 % zajedno vs. 30,2 % posebno) (Ahmed i sur., 2015). Kako bi se postigli najbolji rezultati, važan je multidisciplinarni pristup liječnika, dijetetičara, farmaceuta, psihologa i kineziologa (Chitturi i sur., 2018).

### **1.3.3. Upotreba dodataka prehrani**

#### ***1.3.3.1. Silimarin***

Ljekovita biljka sikavica (lat. *Silybum marianum*) od davnina je poznata u liječenju bolesti jetre. Aktivna tvar u sikavici je silimarin - kompleksna mješavina sedam flavonolignana (Colica i sur., 2017). Unatoč metodološkim nedostacima provedenih studija na silimarinu, u dvije placebo kontrolirane studije pokazalo se da silimarin značajno pozitivno utječe na razinu AST-a (aspartat-aminotransferaza) i ALT-a (alanin-aminotransferaza) u oboljelih od NASH-a. Isto tako, novije studije na oboljelima od NAFLD-a pokazuju da silimarin može dosegnuti više razine u krvi, u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Hellerbrand i sur., 2016). 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), antifibroznog (npr. antagonist galektin-3, simtuzumab) i protuupalnog (npr. sirtuini) djelovanja, ali sa znatno nižim nuspojavama (Colica i sur., 2017).

#### ***1.3.3.2. Vitamin D***

Postoji poveznica između deficita vitamina D i komponenata metaboličkog sindroma, kao što su inzulinska rezistencija i dislipidemija (Sharifi i Amani, 2017). Studije upućuju na izravnu ulogu vitamina D u moduliranju upale jetre i nastanka fibroze te poboljšanju jetrenog odgovora na inzulin (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).

Pregledni rad proučio je mnoge kliničke studije različitog trajanja i korištenih doza vitamina D, međutim, rezultati su različiti. Potrebna su daljnja randomizirana, placebo kontrolirana istraživanja kako bi se odredile odgovarajuće doze i učinkovitost vitamina D (Sharifi i Amani, 2017).

S obzirom da je preuranjeno govoriti o suplementaciji vitaminom D kao tretmanom liječenja NAFLD-a, za početak se preporučuje slijediti smjernice Endokrinološkog društva (Endocrine Society) i djelovati na deficit vitamina D kod oboljelih od NAFLD-a (Sharifi i Amani, 2017).

#### **1.3.3.3. Vitamin E**

Vitamin E glavni je antioksidans topiv u mastima u našem tijelu, a uz antioksidativna svojstva posjeduje i protuupalno te antiaterogeno svojstvo. U složenoj patogenezi NAFLD-a, oksidativni stres igra važnu ulogu u nastanku ozljede hepatocita. Stoga, djelujući na komponente oksidativnog stresa, vitamin E čini obećavajući pristup NAFLD-u (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/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. Zanimljivo je da je došlo do značajnog smanjenja jetrene steatoze i sniženja ALT-a, ali nije bilo utjecaja na stanje fibroze (Chitturi i sur., 2018).

Međutim, postoji zabrinutost oko dugotrajne sigurnosti konzumacije vitamina E. Metaanaliza koja je ispitala učinak vitamina E na incidenciju moždanog udara, pokazala je 22 % veći rizik od hemoragijskog moždanog udara, dok je rizik od ishemijskog moždanog udara bio manji 10 %. Nadalje, vitamin E se povezuje i s blagim povećanjem rizika tumora prostate. Dobivene rezultate treba uzeti u obzir prilikom odabira tretmana NAFLD-a (El Hadi i sur., 2018).

#### **1.3.3.4. Probiotici**

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, A.S. i sur., 2017). U randomiziranoj kontroliranoj studiji, uočeno je poboljšanje vrijednosti jetrenih enzima u NAFLD pacijenata na terapiji gdje su uvedeni *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*, u odnosu na placebo. U drugoj randomiziranoj studiji, pacijenti su uz promjenu životnih navika (prehrana i tjelovježba) uzimali kombinaciju *Bifidobacterium longum* i fruktooligosaharida, dok je kod druge skupine bila samo ispitivana promjena životnih navika. U prvoj skupini došlo je do značajnog smanjenja steatoze i vrijednosti TNF- $\alpha$  i AST (Singh i sur., 2017).

Relativno lako dostupni, niske cijene i bez prisutnih štetnih nuspojava, probiotici čine dobar izbor u terapiji bolesnika oboljelih od NAFLD-a (Lavekar, A.S. i sur., 2017).

#### ***1.3.3.5. Omega-3 masne kiseline***

Omega-3 masne kiseline, EPA (eikozapentaenska kiselina) i DHA (dokozaheksaenska kiselina) imaju povoljan učinak u regulaciji metaboličkih puteva lipida u jetri, funkcije masnog tkiva, upale te smanjenju nakupljanja triglicerida u jetri, na način da smanjuju gensku ekspresiju nekoliko transkripcijskih faktora koji su uključeni u lipogenezu i akumulaciju triglicerida (Nobili i sur., 2016). Rezultati metaanalize koja je proučavala utjecaj omega-3 masnih kiselina u tretmanu NAFLD-a, podupiru blagotvoran učinak omega-3 m. k. u optimizaciji steatoze jetre, razine jetrenih enzima i razine lipida u krvi (trigliceridi i HDL), pri čemu mogu usporiti napredak NAFLD-a (Lu i sur., 2016). Međutim, pokazalo se da EPA i DHA nemaju isti učinak u regulaciji metaboličkih puteva, odnosno da DHA ima superiorniji utjecaj na kontrolu steatoze, upale i fibroze (Jump i sur., 2018).

S obzirom da je riba ograničeni resurs, raste interes za iskorištavanje alternativnih izvora omega-3 m.k.. Ulje krila dobiveno iz antarktičkog račića (lat. *Euphausia superba*), bogat je izvor omega-3 masnih kiselina vezanih uz fosfolipide, što ih čini biodostupnijim u odnosu na riblje ulje gdje su dugolančane masne kiseline vezane za trigliceride. Uz to, ulje krila sadržava i astaksantin, snažan antioksidans, te vitamine A i E (Ulven i Holven, 2015).

Suplementacija uljem krila u studiji na miševima imala je značajan utjecaj na smanjenje hepatomegalije i steatoze (Ferramosca i Zara, 2014). U studiji koja je ispitala utjecaj ribljeg ulja i ulja krila u pacijenata s hiperlipidemijom bez isključenja terapije hipolipemicima, ulje krila imalo je značajniji učinak na smanjenje ukupnog i LDL-kolesterola te triglicerida, ali i na povećanje HDL-kolesterola nakon 3 mjeseca suplementacije (Berge i sur., 2014). Nadalje, u jednoj od studija uspoređivana je bioraspoloživost ulja račića krila i ribljeg ulja. Konzumacija ulja krila dovela je do značajnijeg povišenja razine EPA-e u plazmi i eritrocitima te ukupne vrijednosti omega-3 m.k., dok je vrijednost omega-3 indeksa bila dvostruko veća uspoređujući s ribljim uljem (Ulven i Holven, 2015).

#### **1.3.4. Farmakoterapija**

Trenutno nema odobrenih farmakoterapijskih sredstava za liječenje NASH-a i NAFLD-a od strane FDA (engl. *Federal Drug Administration*) i EMA-e (engl. *European Medicines Agency*) (Konerman i sur., 2018), zbog čega se primjenjuju lijekovi s dokazanim učinkom, iako u off-label<sup>1</sup> primjeni (Rotman i Sanyal, 2017).

---

<sup>1</sup> primjena izvan odobrene indikacije

Teorija „višestrukih udaraca“ doprinijela je definiranju ciljanih stanja u NAFLD-u (Tilg, 2017). Četiri su glavne skupine lijekova s utjecajem na ciljane metaboličke puteve: (1) Lijekovi usmjereni na smanjenje nakupljanja masti u jetri i nastali metabolički stres. Lijekovi u toj grupi uključuju agoniste receptora za aktivator proliferacije peroksisoma (npr. pioglitazon), lijekove koji utječu na farnesoid X receptor žučne kiseline (obetikolna kiselina), inhibitore *de novo* lipogeneze (aramchol), inkretine (liraglutid) i faktore raste fibroblasta FGF-2. (2) Lijekovi usmjereni na oksidativni stres, upalu i ozljede jetre nastale uslijed metaboličkog stresa. U ovoj skupini su antioksidansi (vitamin E), lijekovi koji djeluju na TNF- $\alpha$  (pentoksifilin) i imunosni modulatori (amlexanox, cenicriviroc). (3) Lijekovi koji ciljano djeluju na crijeva pri čemu imaju utjecaj na interakciju između jetre i crijeva. Tu pripadaju agensi protiv pretilosti kao što su orlistat ili modulatori crijevnog mikrobioma. (4) Antifibrotici (simutuzumab), 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 NAFLD-a (Tilg, 2017).

### **1.3.5. Barijatrijska kirurgija**

U pacijenata oboljelih od NAFLD-a koji ne reagiraju na promjenu životnih navika, kao ni na farmakoterapiju, barijatrijska operacija je opcija kako za smanjenje tjelesne mase, tako i metaboličkih komplikacija s dugoročnim stabilnim rezultatima (EASL i sur., 2016). Barijatrijska operacija predlaže se 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 biopsijom dokazanim NASH-om (Shouhed i sur., 2017).

Mehanizam koji dovodi do poboljšanja pokazatelja NAFLD-a nakon barijatrijske operacije, povezan je s poboljšanjem pokazatelja metaboličkog sindroma. Uzroci poboljšanja nakon barijatrijske operacije kompleksni su i povezani s izlučivanjem gastrointestinalnih hormona inkretina, osobito GLP-1 (engl. *glucagon-like peptide 1*) i GIP-a (engl. *gastrointestinal insulinotropic polypeptide*). Operacija utječe na metabolizam adipokina, ali i smanjuje količinu SMK-a što doprinosi povećanju inzulinske osjetljivosti te potiče protuupalni učinak imunomodulacijom (Cazzo i sur., 2017). U uspostavljanju dugoročne kontrole tjelesne mase, sve vrste barijatrijskih zahvata: laparoskopska operacija Roux-en-Y želučanom premosnicom, “sleeve“ gastrektomija, podvezivanje želuca podesivom trakom i duodenalni prijelaz, pokazali su se dugoročno učinkovitijima u odnosu na promjenu prehrambenih navika i vježbanje (Shouhed i sur., 2017).

### **1.3.6. Transplantacija jetre**

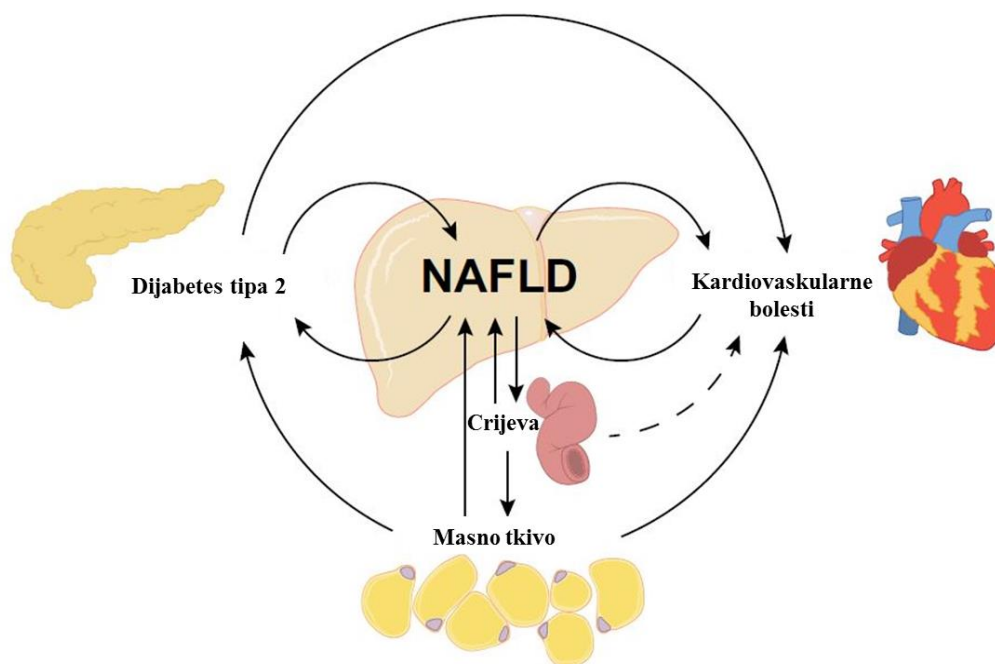
NASH je trenutno druga najčešća i najbrže rastuća indikacija za transplantaciju jetre u pacijenata sa hepatocelularnim karcinomom (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) u SAD-u (Chitturi i sur., 2018). Indikacije za transplantaciju jetre kod NASH-om uzrokovane ciroze i HCC-a su iste kao i kod ostalih 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).

Morbidno pretili pacijenti (ITM > 40 kg/m<sup>2</sup>, indeks tjelesne mase) s cirozom uzrokovanom NASH-om, kontraindicirani su za transplantaciju jetre zbog sporog cijeljenja rana, dugotrajne mehaničke ventilacije, više stope odbacivanja presađenog organa i višeg rizika od infekcija, zbog čega im se preoperativno savjetuje gubitak kilograma uz promjenu životnih navika. U slučajevima kada pretili pacijenti unatoč naporu za gubitkom kilograma, nisu uspjeli, podvrgnuti su "sleeve" gastrektomiji prije nego li je učinjena transplantacija jetre. Primijećeno je da je gubitak tjelesne mase bio održiv, međutim, ne preporuča se u rutinskoj kliničkoj praksi prije nego što se strategija validira (Siddiqui i Charlton, 2016). 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).

### **1.4. NAFLD kao čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti**

NAFLD je dio multisistemske bolesti koja obuhvaća složene interakcije između jetre, crijeva, visceralnog i subkutanog masnog tkiva, mišićnog tkiva i kardiovaskularnog sustava. Jedna od polaznih točaka je neravnoteža u energetske unosu i potrošnji, a premašivanjem kapaciteta skladištenja masnog tkiva dolazi do akumulacije ektopične masti, uključujući i jetru. Kada se ovi mehanizmi pokrenu, započinje začarani krug u kojem je međusobna povezanost različitih čimbenika veoma složena pa je teško procijeniti uzročno-posljedične odnose (slika 2.) (Francque i sur., 2016)

Brojna retrospektivna i prospektivna istraživanja pokazala su 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).



**Slika 2.** NAFLD je dio složene multisistemske bolesti (Prilagođeno prema Francque i sur., 2016)

Prema metaanalizi Wu i suradnika, pokazalo se da NAFLD i NASH nisu bili povezani s ukupnim i kardiovaskularnim mortalitetom, ali jesu s povišenim rizikom od razvoja hipertenzije, ateroskeroze i koronarne bolesti srca (Wu, S. i sur., 2016). U opservacijskoj studiji, Yoshitake i suradnici 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 povišenih adiponektina, leptina, TNF- $\alpha$  i IL-6 kod jetrene steatoze s rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Yoshitaka i sur., 2017).

S obzirom na uočenu povezanost, kod oboljelih od NAFLD-a trebalo bi procijeniti rizik od kardiovaskularnih bolesti. Procjenu rizika treba ponavljati svakih jednu do dvije godine, a ona bi trebala obuhvaćati tradicionalne čimbenike rizika od kardiovaskularnih bolesti uključujući pretilost, dijabetes, dislipidemiju i hipertenziju (Patil i Sood, 2017). Nadalje, korisnim čimbenikom kod procjene rizika za razvoj koronarne bolesti srca smatra se vrijednost ukupnog kolesterola mjereno u membranama eritrocitima jer odražava lipidni profil tijekom dužeg vremenskog razdoblja (Namazi i sur., 2014; Wu, M. i sur., 2017).

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Oboljeli od nealkoholne masne bolesti jetre imaju veći rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti. Omega-3 masne kiseline su pokazale učinak pri sniženju čimbenika rizika razvoja kardiovaskularnih bolesti kao što su razina triglicerida, ukupnog i LDL-kolesterola. Opći cilj ovoga rada bio je utvrditi utječu li omega-3 masne kiseline ulja račića krila na promjenu čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod oboljelih od NAFLD-a.

Hipoteza istraživanja je da konzumacija kapsula ulja račića krila tijekom 6 mjeseci može poboljšati antropometrijske i biokemijske parametre kod ispitanika s dijagnosticiranom NAFLD-om. Pregledom literature, utvrđeno je da nema istraživanja koja su ispitivala utjecaj omega-3 masnih kiselina iz ulja račića krila na ove čimbenike rizika kod oboljelih od NAFLD-a.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- 1) Utvrditi može li unos ulja račića krila dovesti do promjene antropometrijskih parametara kao što su tjelesna masa i opseg struka, u usporedbi s placebo.
- 2) Utvrditi može li unos ulja račića krila dovesti do promjene biokemijskih parametara kao što su alkalna fosfataza (ALP), alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST), gama-glutamilttransferaza (GGT), trigliceridi, ukupni kolesterol, LDL- i HDL-kolesterol, u usporedbi s placebo.
- 3) Utvrditi može li unos ulja račića krila dovesti do promjene ukupnog kolesterola mjerenog u eritrocitima u usporedbi s placebo. Pregledom literature, utvrđeno je da dosad nije bilo radova koji su ispitivali ovaj pokazatelj.



### 3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Provedeno istraživanje bilo je randomizirano, dvostruko slijepo i placebo kontrolirano. U istraživanju je sudjelovalo 14 ispitanika s ultrazvučno dijagnosticiranim NAFLD-om ili NASH-om, a regrutirani su u Ambulanti za hepatologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu od siječnja do lipnja 2017. godine. U intervencijskoj skupini bilo je 8 ispitanika, dok je u placebo skupini bilo 6 ispitanika. Prilikom prvog posjeta, ispitanici su upućeni u protokol istraživanja te su potpisali informirani pristanak (prilog 1.). Potom su provedena antropometrijska mjerenja te uzimanje uzorka krvi koja je korištena za daljnje analize. Isto je ponovljeno na kraju istraživanja. 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<sup>2</sup>, 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 napitaka koja sadrže kofein na dan (npr. čaj, kava) ili više od 1 litre pića koje sadrži metilksantin (npr. cola), antikoagulantna terapija, konzumacija dodataka prehrani dugolančanih omega-3 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.

Ispitanici su nasumično podijeljeni u dvije skupine. Intervencijska skupina je unosila ulje račića krila Almagea KRILL OIL CARDIO+ (Tablica 1.), a druga placebo (1500 mg sojinog ulja; 1 kapsula sadrži 500 mg sojinog ulja). U razdoblju od 6 mjeseci ispitanici su pili 1 kapsulu ujutro i 2 kapsule navečer uz obrok s vodom. Ispitanicima je rečeno da tijekom trajanja istraživanja, odnosno konzumacije kapsula ne mijenjaju dosadašnji način života (prehrambene navike, tjelesna aktivnost, konzumacija dodataka prehrani, itd.).

**Tablica 1.** Sastav kapsula Almagea KRILL OIL CARDIO+

|   | sadržaj 1 kapsule: | sadržaj 3 kapsule: |
|---|--------------------|--------------------|
| <b>Ulje antarktičkog krila (lat. <i>Euphausia superba</i>) - Superba™ Krill Oil, od čega prirodno sadrži:</b> | 500 mg             | 1500 mg            |
| Fosfolipidi   | 200 mg             | 600 mg             |
| Fosfatidilkolin   | 150 mg             | 450 mg             |
| Kolin   | 25 mg              | 75 mg              |
| Ukupne omega-3 masne kiseline   | 110 mg             | 330 mg             |
| EPA   | 60 mg              | 180 mg             |
| DHA   | 27,5 mg            | 82,5 mg            |
| <b>Vitamin E (D-alfa-tokoferol)</b>   | 12 mg              | 36 mg              |
| <b>Selen (natrijev selenat)</b>   | 55 µg              | 165 µg             |

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
- Spektrofotometar Camspec M-202, Cambridge, UK
- Uparivač UNIVAPO 100H, opremljen jedinicom za hlađenje UNICRYO MC 2L, *Uniequip*, Martinsried, Njemačka
- Vibro-miješalica Technica EV-202, *Železniki*, Slovenija

#### 3.2.2. Pribor

- Eppendorf epruvete 2 mL
- Epruvete Bacto

- Epruvete Falcon 50 mL
- Erlenmeyerova tikvica
- Filtar papir
- Graduirane epruvete 10 mL
- Konične epruvete 20 mL
- Mikropipete Eppendorf (50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 250  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L)
- Odmjerna tikvica od 100 mL
- Odmjerna tikvica od 50 mL
- Parafilm Sigma
- Pipeta 5 mL
- Staklene kapaljke
- Staklene kivete
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić

### 3.2.3. Kemikalije

- Destilirana voda (D.D. H<sub>2</sub>O), pročišćena uređajem Milipore, *Labena*, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteuov reagens  
PRIPREMA: 1 mL otopine Folin-Ciocalteua (*Fluka Sigma- Aldrich*, Švicarska) promiješa se s 2 mL destilirane vode
- Izopropanol (99,9 % čistoće), *T.T.T.*, Sveta Nedelja, Hrvatska
- Kloroform, *Sigma-Aldrich*, Švicarska
- Koncentrirana fosfatna kiselina (85 %-tna), *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Koncentrirana sulfatna kiselina, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska
- Ledena octena kiselina, *Sigma-Aldrich*, Švicarska
- Lowryjev reagens  
PRIPREMA: 100 mL 2 %-tne otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska) promiješa se s 1 mL 0,5 %-tne otopine CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska) i 1 mL 2 %-tne otopine K,Na-tartarata (*Kemika*, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid 0,9%, *Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu*, Zagreb, Hrvatska
- Standardna otopina albumina govedeg seruma u vodi,  $\gamma = 1$  mg/mL, *Sigma-Aldrich*, SAD
- Standardna otopina kolesterola,  $\gamma = 1$  mg/mL, *Dijagnostika*, Sisak, Hrvatska
- Željezov (III) klorid heksahidrat, *Kemika*, Zagreb, Hrvatska

### **3.3. Metode**

#### **3.3.1. Antropometrijska mjerenja**

Tjelesna masa (u kg) ispitanika 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 ( $\text{kg/m}^2$ ), 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. Antropometrijska mjerenja provedena su na početku i na kraju istraživanja.

#### **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, na početku i na kraju istraživanja. 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  $\mu\text{L}$  krvi u odvojene eppendorf epruvete (duplikat), nakon čega je 10 minuta centrifugirano pri 3000 o/min (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. na 2000 o/min. Odvojena plazma i isprani eritrociti potom su pohranjeni u zamrzivač na  $-80^\circ\text{C}$  do daljnje analize. Plazma je korištena za određivanje serumskih lipida (trigliceridi, 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 na 2000 o/min (Centrifuga Technica Mikro 242). 50  $\mu\text{L}$  supernatanta izuzeto je u eppendorf epruvetu za određivanje ukupnih proteina, a ostatak je pipetom prebačen u Falcon epruvetu od 50 mL. Potom je 0,5 mL destilirane vode dodano u eppendorf epruvetu i promiješano na vortex miješalici kako bi se preostali sadržaj isprao te pipetom prebacio u Falcon epruvetu. Postupak je još jednom ponovljen. Ekstrakcija ukupnih lipida eritrocita provedena je metodom prema Rose i Oklanderu (Rose i Oklander, 1965). U Falcon epruvetu je dodano 5,5 mL izopropanola, ostavljeno 1 h uz povremeno miješanje, potom 3,5 mL kloroforma (ostavljeno 1 h uz povremeno miješanje), nakon čega je sadržaj centrifugiran 30 min na 2500 o/min (Centrifuga Centrikon T-42K). Kapalicom je pažljivo odvojena organska faza u kojoj se nalaze ukupni lipidi, te je upareno do suha.

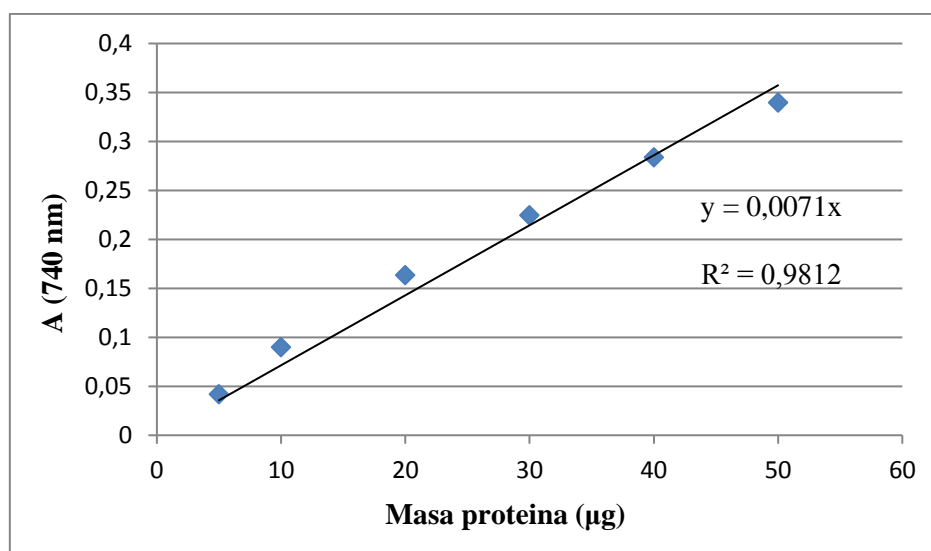
### 3.3.4. Određivanje ukupne mase proteina u eritrocitima

Masa ukupnih proteina u eritrocitima određena je kolorimetrijskom metodom po Lowryju (Lowry i sur., 1951). Slijepa proba, šest reakcijskih smjesa standardne otopine albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija i uzorci proteina eritrocita pripremljeni su prema tablici 2. u triplikatu.

**Tablica 2.** Popis korištenih volumena pojedinih kemikalija prilikom pripreme reakcijskih smjesa

| Broj epruvete                                  | Slijepa proba | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | Proba |
|--|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| V (stand. otopina BSA)/ $\mu\text{L}$          | -             | 5   | 10  | 20  | 30  | 40  | 50  | -     |
| V (dest. $\text{H}_2\text{O}$ )/ $\mu\text{L}$ | 200           | 195 | 190 | 180 | 170 | 160 | 150 | 150   |
| V (uzorak)/ $\mu\text{L}$                      | -             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 50    |
| V (Lowryjev reagens)/mL                        | 2,0           | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0   |

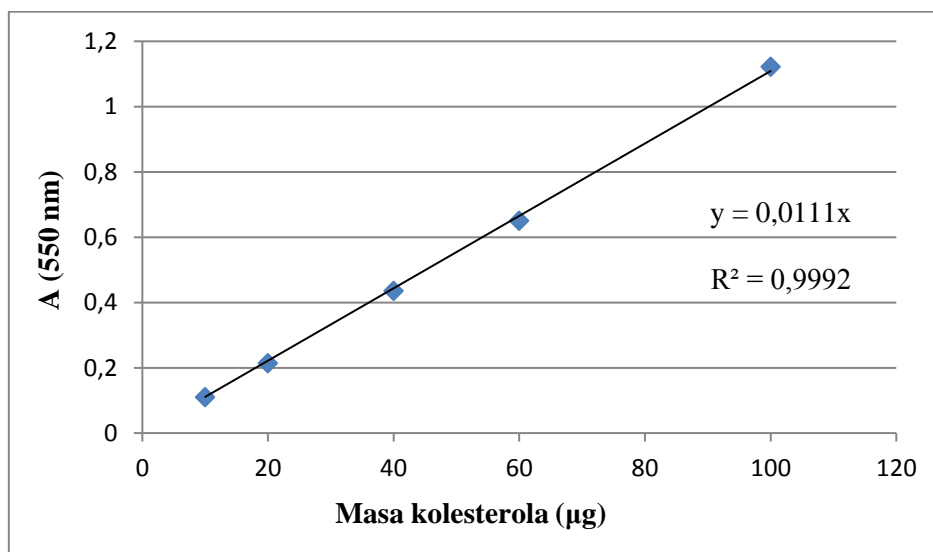
U reakcijsku smjesu doda se 2,0 mL Lowryjevog reagensa, sadržaj epruveta se promiješa i ostavi stajati 12 min na sobnoj temperaturi. Potom se u svaku epruvetu doda 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa uz brzo i snažno miješanje na vibracijskoj miješalici, te ostavi na sobnoj temperaturi 40 min. Nakon razvijanja boje apsorbancija se izmjeri na spektrofotometru (Camspec M-202) pri valnoj duljini  $\lambda = 740 \text{ nm}$  prema slijepoj probi. Na temelju vrijednosti apsorbancija izmjerenih za otopine poznate koncentracije proteina konstruiran je baždarni pravac (slika 3.).



**Slika 3.** Baždarni dijagram pomoću kojeg je određena masa proteina u eritrocitima

### 3.3.5. Određivanje ukupnog kolesterola u eritrocitima

Određivanje sadržaja ukupnog kolesterola provedeno je u ekstraktu ukupnih lipida eritrocita spektrofotometrijskom metodom prema Courchaine i sur. (1959) te Zlatkis i sur. (1963). Prvo je pripremljena *otopina 1*, na način da je u odmjernu tikvicu od 100 mL dodano 2,5 g željezovog (III) klorida i potom do oznake nadopunjeno koncentriranom fosfatnom kiselinom (85%-tna). Potom je pripremljena *otopina 2* na način da je 4 mL *otopine 1* dodano u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopunjeno do oznake koncentriranom sulfatnom kiselinom. Pripremljena je standardna otopina kolesterola koncentracije  $\gamma = 1 \text{ mg/mL}$ , čijim razrjeđivanjem je dobiveno 5 otopina poznate koncentracije u rasponu od 10 do 100  $\mu\text{g/mL}$ . U slijepu probu, epruvete s poznatim sadržajem kolesterola te u uzorke nepoznate koncentracije kolesterola dodan je 1,5 mL ledene octene kiseline i sadržaj je promiješan. Potom je dodan 1,0 mL *otopine 2* i sadržaj je promiješan na vortex miješalici. Nakon 10 min stajanja na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru (Camspec M-202) pri valnoj duljini  $\lambda=550 \text{ nm}$  prema slijepoj probi. Korištenjem vrijednosti apsorbancija izmjerenih za standardnu otopinu konstruiran je baždarni pravac (slika 4.).



**Slika 4.** Baždarni dijagram pomoću kojeg je određena masa kolesterola u eritrocitima

Konačni rezultati su izraženi kao mikrogrami kolesterola po miligramu proteina.

### **3.3.6. Statistička analiza**

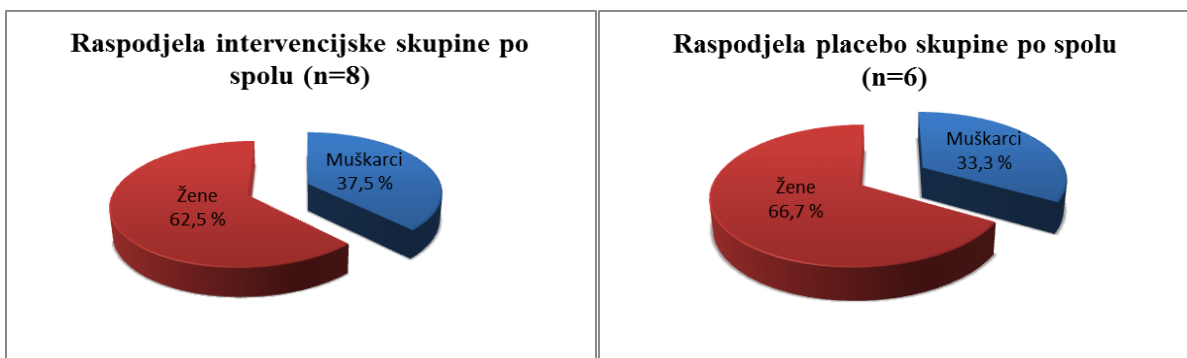
U statističkoj analizi korištene su deskriptivne i analitičke statističke metode. Prikazani su postoci za kategorijske varijable, srednja vrijednost i standardna devijacija. Pravilnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Kolomogorov-Smirnov i Shapiro Wilk testom, te su naknadno primjenjeni parametrijski i neparametrijski statistički testovi. Za testiranje razlika između dviju nezavisnih skupina primjenjen je Studentov t-test ili MannWhitney U-test, dok je za testiranje razlika između dviju zavisnih skupina korišten Studentov t-test za uparene uzorke ili Wilcoxonov 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

U istraživanju je sudjelovalo 14 ispitanika oboljelih od NAFLD-a ili NASH-a koji su nasumično raspodjeljeni u dvije skupine, intervencijsku (ispitanici su pili kapsule ulja račića krila) i placebo (ispitanici su pili kapsule sojinog ulja). Niti istraživač, niti ispitanici za vrijeme trajanja istraživanja (6 mjeseci) nisu znali tko kojoj skupini pripada. Svi ispitanici su ispunili obaveze zadane protokolom istraživanja te niti jedan od ispitanika nije odustao. Za vrijeme trajanja istraživanja nisu zabilježeni gastrointestinalni problemi kao ni štetni učinci uslijed konzumacije kapsula. Iako je ispitanicima rečeno da ne mijenjaju prehranbene navike, razinu tjelesne aktivnosti i konzumaciju dodataka prehrani, teško je pratiti jesu li se ispitanici zaista toga pridržavali, te jesu li pili kapsule redovito, što se moglo odraziti na rezultate istraživanja. Glavni nedostaci ovog istraživanja su mali broj ispitanika i nedostatak kontrolne skupine zdravih ispitanika zbog čega je interpretacija rezultata otežana.

### 4.1. Antropometrijski parametri

Od antropometrijskih parametara, mjereni su tjelesna masa (TM) i opseg struka. Podatak od tjelesnoj visini (TV) dobiven je od ispitanika. Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je na temelju podataka TM i TV. U intervencijskoj skupini bilo je 8 ispitanika, od čega 62,5 % žena i 37,5 % muškaraca. Placebo skupinu činilo je 6 ispitanika od čega 66,7 % žena i 33,3 % muškaraca (slika 5.).



Slika 5. Raspodjela intervencijske i placebo skupine po spolu

Prosječna dob intervencijske skupine bila je  $54,9 \pm 10,5$  godina, pri čemu se raspon kretao od 39 do 64 godine. Srednja vrijednost tjelesne visine bila je  $1,66 \pm 0,09$  m. Prosječna vrijednost TM na početku istraživanja iznosila je  $84,9 \pm 14,6$  kg, s rasponom od 60,2 kg do 99,9 kg. Na temelju izračunatog indeksa tjelesne mase, u intervencijskoj skupini dva su ispitanika imala normalnu TM, jedan prekomjernu TM, četiri ispitanika su patila od I. stupnja pretilosti, dok je jedan ispitanik patio od II. stupnja pretilosti.

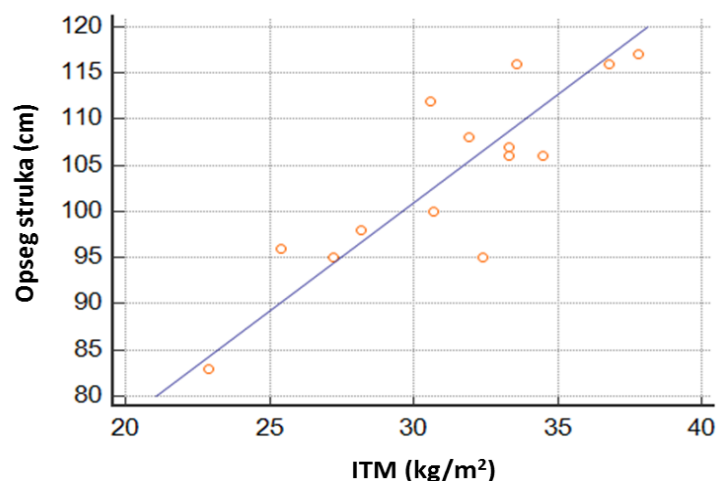


Rezultati pokazuju da je srednja vrijednost ITM-a u intervencijskoj skupini bila  $30,8 \pm 4,7 \text{ kg/m}^2$  što pripada kategoriji I. stupnja pretilosti, a potvrđuje dosadašnje spoznaje da se NAFLD većinom javlja kod pretilih ljudi (Marjot i sur., 2018). Srednja vrijednost opsega struka u intervencijskoj skupini iznosila je  $104,88 \pm 11,44 \text{ cm}$ , u rasponu od 83 do 117 cm. Samo je jedna ispitanica imala opseg struka unutar preporučenih vrijednosti (muškarci  $< 102 \text{ cm}$ , žene  $< 88 \text{ cm}$ ), dok je opseg struka svih ostalih ispitanika bio veći od preporučenog. Dobiveni rezultati potvrđuju da je opseg struka veći od preporučenog, jedan od rizičnih faktora povezanih sa NAFLD-om (Chalasan i sur., 2018).

Prosječna dob placebo skupine bila je  $52,5 \pm 7,9$  godina, pri čemu se raspon kretao od 46 do 64 godine. Srednja vrijednost tjelesne visine bila je  $1,67 \pm 0,09 \text{ m}$ . Prosječna vrijednost TM na početku studije iznosila je  $88,9 \pm 7,4 \text{ kg}$ , s rasponom od 76,9 kg do 96,6 kg. Na temelju izračunatog indeksa tjelesne mase, u placebo skupini dva su ispitanika imala prekomjernu TM, dvoje ih je patilo od I. stupnja pretilosti, a dvoje od II. stupnja pretilosti. Rezultati pokazuju da je srednja vrijednost ITM-a u placebo skupini bila  $32,1 \pm 3,7 \text{ kg/m}^2$  što pripada kategoriji I. stupnja pretilosti. Srednja vrijednost opsega struka iznosila je  $102,67 \pm 8,24 \text{ cm}$ , u rasponu od 95 do 116 cm. U placebo skupini, samo je jedan ispitanik imao opseg struka unutar preporučenih vrijednosti, dok su ostali ispitanici imali opseg struka veći od preporučenog.

Uzevši u obzir da svi ispitanici ( $n=14$ ) boluju od NAFLD-a, na početku studije je prema vrijednostima ITM-a njih 7,1 % imalo 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. Slični podaci su dobiveni u studiji Parkera i suradnika gdje su uspoređivali antropometrijske parametre oboljelih od NAFLD-a sa zdravim kontrolnim ispitanicima. Ispitanici sa NAFLD-om su imali statistički značajno veći ITM, opseg struka i količinu visceralnog masnog tkiva (Parker i sur., 2015).

Na početku istraživanja vidi se statistički značajna jaka pozitivna povezanost ITM-a s opsegom struka svih ispitanika oboljelih od NAFLD-a ( $r= 0,8551$ ;  $p= 0,0001$ ), dakle što je ispitanik imao veći indeks tjelesne mase to je imao i veći opseg struka (slika 6.). Dobiveno potvrđuje i studija Parkera i suradnika, gdje su ITM i opseg struka u oboljelih od NAFLD-a snažano međusobno korelirali, ali i bili statistički povezani sa količinom masti jetre (Parker i sur., 2015).



**Slika 6.** Povezanost ITM-a sa opsegom struka kod ispitanika (n=14) prije intervencije  
( $r = 0,8551$ ;  $p = 0,0001$ )

#### 4.1.1. Utjecaj intervencije na antropometrijske parametre

U intervencijskoj skupini je nakon 6 mjeseci konzumacije kapsula ulja račića krila došlo do statistički značajnog smanjenja tjelesne mase ( $p = 0,028$ ), ITM-a ( $p = 0,043$ ) i opsega struka ( $p = 0,041$ ) (tablica 3.). Rezultate podupire i metaanaliza Du i suradnika gdje je na temelju 21. rada uočeno statistički značajno smanjenje opsega struka uslijed konzumacije kapsula sa omega-3 masnim kiselinama, uz promjenu životnih navika. Promjene na TM-u i ITM-u nisu bile statistički značajne (Du i sur., 2015). U studiji Ramprasatha i suradnika nisu uočene statistički značajne promjene na TM-u, ITM-u i opsegu struka uslijed 4 tjedna duge intervencije uljem račića krila kod zdravih ispitanika (Ramprasath i sur., 2013).

U placebo skupini nije bilo statistički značajnih promjena antropometrijskih parametara (tablica 3.).

**Tablica 3.** Usporedba vrijednosti antropometrijskih parametara prije i nakon intervencije

| Parametar                | Skupina        | Broj ispitanika | Prije intervencije | Nakon intervencije | Promjena     | <i>p</i> -vrijednost promjene | <i>p</i> -vrijednost između skupina |
|--------------------------|----------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Tjelesna masa (kg)       | Intervencijska | 8               | 84,86 ± 14,57      | 83,00 ± 14,39      | -1,86 ± 2,39 | 0,028                         | 0,5245                              |
|                          | Placebo        | 6               | 88,98 ± 7,43       | 89,62 ± 9,17       | 0,63 ± 4,57  | 0,753                         |                                     |
| ITM (kg/m <sup>2</sup> ) | Intervencijska | 8               | 30,78 ± 4,72       | 30,11 ± 4,69       | -0,66 ± 0,88 | 0,043                         | 0,6253                              |
|                          | Placebo        | 6               | 32,07 ± 3,70       | 32,38 ± 5,04       | 0,32 ± 1,69  | 0,753                         |                                     |
| Opseg struka (cm)        | Intervencijska | 8               | 104,88 ± 11,44     | 102,88 ± 11,21     | -2,00 ± 2,20 | 0,041                         | 0,8982                              |
|                          | Placebo        | 6               | 102,67 ± 8,24      | 105,00 ± 14,27     | 2,33 ± 6,83  | 0,683                         |                                     |

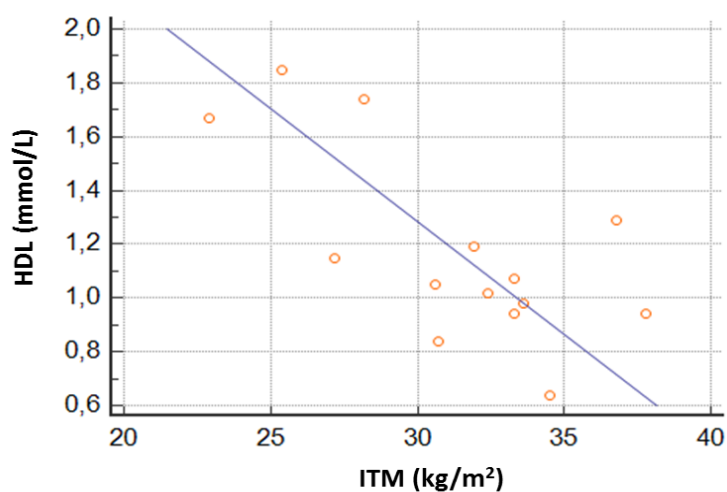
## 4.2. Vrijednosti serumskih lipida

S obzirom da kod NAFLD-a dolazi do poremećaja metabolizma lipida, ispitivane su vrijednosti serumskih lipida: triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL- i HDL-kolesterola, prije i nakon konzumacije kapsula u intervencijskoj, odnosno, placebo skupini. Na početku istraživanja nije uočena poveznost između ITM-a, opsega struka i vrijednosti kolesterola mjenjenog u eritrocitima sa razinom serumskih lipida (tablica 4.).

**Tablica 4.** Stupanj povezanosti ITM-a, opsega struka i vrijednosti kolesterola u eritrocitima sa vrijednostima serumskih lipida kod ispitanika (n=14) prije intervencije

|                                   |   | Trigliceridi | Ukupni kolesterol | LDL - kolesterol | HDL- kolesterol |
|-----------------------------------|---|--------------|-------------------|------------------|-----------------|
| ITM (kg/m <sup>2</sup> )          | r | 0,2537       | -0,1746           | -0,0161          | -0,6913         |
|                                   | p | 0,3814       | 0,5506            | 0,9565           | 0,0062          |
| Kolesterol u eritrocitima (µg/mg) | r | -0,1794      | -0,1624           | -0,1999          | 0,1774          |
|                                   | p | 0,5395       | 0,5792            | 0,4932           | 0,5441          |
| Opseg struka (cm)                 | r | -0,0186      | -0,4260           | -0,2925          | -0,5057         |
|                                   | p | 0,9497       | 0,1288            | 0,3102           | 0,0651          |

Statistički značajna povezanost je uočena jedino za ITM i HDL gdje je povezanost bila statistički umjereno negativna ( $r = -0,6913$ ;  $p = 0,0062$ ). Dakle, što je ispitanik imao veći indeks tjelesne mase to su bile niže vrijednosti HDL- kolesterola (slika 7.). Dobivena korelacija potvrđuje dosadašnje spoznaje prema kojima pretilost, nepravilna prehrana, nedovoljna tjelesna aktivnost, pušenje i alkohol utječu na sniženje vrijednosti HDL-a (Rashid i Genest, 2007).



**Slika 7.** Povezanost ITM-a s HDL- kolesterolom kod ispitanika (n=14) prije intervencije ( $r = -0,6913$ ;  $p = 0,0062$ )

#### 4.2.1. Utjecaj intervencije na vrijednost serumskih lipida

U intervencijskoj skupini je na kraju studije došlo do blagog povišenja vrijednosti triglicerida, ukupnog i LDL- kolesterola, dok je HDL- kolesterol ostao nepromijenjen. Međutim, promjene nisu bile statistički značajne (tablica 5). Rezultati ne iznenađuju s obzirom da su vrijednosti serumskih lipida na razini skupine bile u granicama preporučenog. Početne vrijednosti serumskih lipida u intervencijskoj skupini bile su: trigliceridi  $1,62 \pm 0,58$  mmol/L (preporuka:  $<1,7$  mmol/L), ukupni kolesterol  $4,57 \pm 1,09$  mmol/L (preporuka:  $< 5$  mmol/L), HDL- kolesterol  $1,20 \pm 0,36$  mmol/L (preporuka:  $> 1$  mmol/L) i LDL-kolesterol  $2,64 \pm 0,92$  mmol/L (preporuka:  $< 3$  mmol/L). Slični rezultati su dobiveni u prijašnjoj studiji Ramprasatha i suradnika na osobama sa normalnim vrijednostima serumskih lipida, gdje je došlo do povišenja ukupnog i LDL-kolesterola uspoređujući sa placebo. Prema istraživanjima, potrebne su značajno veće doze EPA+DHA (2-4 g/dan) da bi došlo do statistički značajne promjene vrijednosti serumskih lipida u osoba sa normalnim vrijednostima (Ramprasath i sur., 2013). U studiji Rundblada i suradnika, ulje račića krila nije dovelo do značajne promjene vrijednosti triglicerida u zdravih ispitanika (Rundblad i sur., 2018).

U studiji Bunea i suradnika ulje račića krila u dozi 1-3 g/dan (ovisno o ITM-u) u osoba sa hiperlipidemijom bez NAFLD-a bilo je efikasno u smanjenju vrijednosti triglicerida, ukupnog i LDL-kolesterola i povišenju HDL- kolesterola, uspoređujući sa placebo i ribljim uljem (Bunea i sur., 2004). Slično je pokazala studija Cicera i suradnika, gdje je kod osoba sa hiperlipidemijom bez NAFLD-a uslijed konzumacije ulja račića krila došlo do sniženja triglicerida i poboljšanja statusa HDL-a (Cicero i sur., 2015).

**Tablica 5.** Usporedba vrijednosti serumskih lipida i kolesterola mjenog u eritrocitima prije i nakon intervencije

| Parametar                         | Skupina        | Broj ispitanika | Prije intervencije | Nakon intervencije | Promjena         | <i>p</i> -vrijednost promjene | <i>p</i> -vrijednost između skupina |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Trigliceridi (mmol/L)             | Intervencijska | 8               | $1,62 \pm 0,58$    | $1,68 \pm 0,52$    | $0,06 \pm 0,52$  | 0,674                         | 0,4537                              |
|                                   | Placebo        | 6               | $1,59 \pm 0,80$    | $2,02 \pm 1,02$    | $0,43 \pm 1,24$  | 0,600                         |                                     |
| Ukupni kolesterol (mmol/L)        | Intervencijska | 8               | $4,57 \pm 1,09$    | $4,70 \pm 0,76$    | $0,13 \pm 0,79$  | 0,574                         | 0,3747                              |
|                                   | Placebo        | 6               | $5,22 \pm 0,97$    | $4,95 \pm 0,70$    | $-0,27 \pm 0,82$ | 0,345                         |                                     |
| HDL kolesterol (mmol/L)           | Intervencijska | 8               | $1,20 \pm 0,36$    | $1,20 \pm 0,35$    | $0,003 \pm 0,09$ | 0,158                         | 0,9299                              |
|                                   | Placebo        | 6               | $1,13 \pm 0,37$    | $1,12 \pm 0,49$    | $-0,01 \pm 0,44$ | 0,463                         |                                     |
| LDL kolesterol (mmol/L)           | Intervencijska | 8               | $2,64 \pm 0,92$    | $2,74 \pm 0,66$    | $0,11 \pm 0,55$  | 0,401                         | 0,0726                              |
|                                   | Placebo        | 6               | $3,36 \pm 0,76$    | $2,91 \pm 0,65$    | $-0,45 \pm 0,47$ | 0,075                         |                                     |
| Kolesterol u eritrocitima (ug/mg) | Intervencijska | 8               | $1,47 \pm 0,29$    | $1,60 \pm 0,62$    | $0,14 \pm 0,48$  | 0,674                         | 0,6333                              |
|                                   | Placebo        | 6               | $1,65 \pm 0,85$    | $1,66 \pm 0,47$    | $0,003 \pm 0,54$ | 0,917                         |                                     |

U placebo skupini početne vrijednosti triglicerida i HDL- kolesterola bile su unutar preporučenih vrijednosti, dok su vrijednosti ukupnog kolesterola i LDL- kolesterola bile blago povišene. Nakon 6 mjeseci konzumacije kapsula sojinog ulja došlo je do blagog povišenja vrijednosti triglicerida i do sniženja vrijednosti ukupnog, HDL- i LDL- kolesterola. Promjene, međutim, nisu bile statistički značajne (tablica 5.).

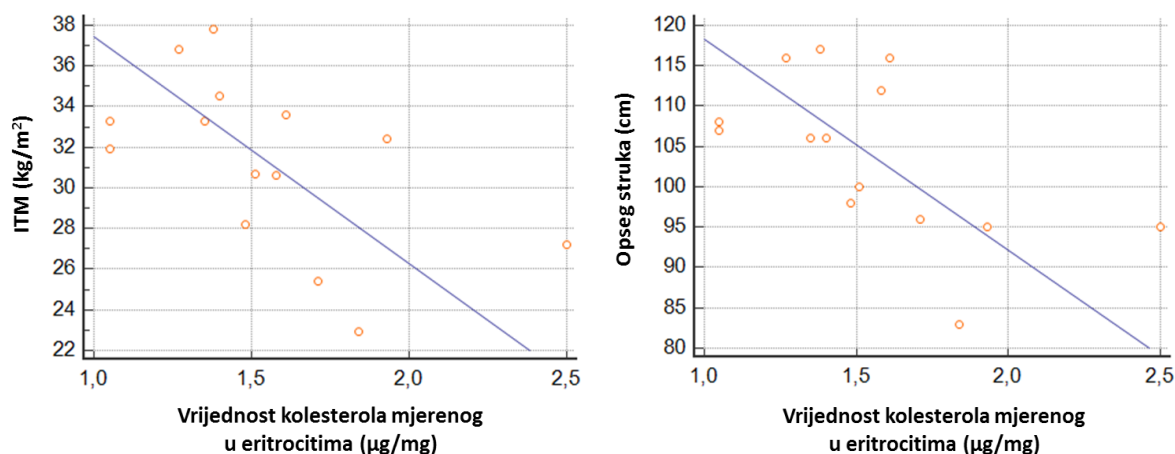
#### 4.3. Vrijednost ukupnog kolesterola mjenog u eritrocitima

Vrijednosti mjerenja serumskih lipida mogu varirati ovisno o raznim čimbenicima, između ostalog i hrani koju su ispitanici tih dana konzumirali (Berge i sur., 2014). Ukupni kolesterol mjenen u membranama eritrocitima odražava lipidni profil tijekom dužeg vremenskog razdoblja, stoga se smatra pouzdanijim čimbenikom rizika od kardiovaskularnih bolesti u odnosu na vrijednosti serumskih lipida (Namazi i sur., 2014). Na početku istraživanja nije uočena statistički značajna povezanost vrijednosti kolesterola mjenog u eritrocitima sa tjelesnom masom i visinom (tablica 6.).

**Tablica 6.** Stupanj povezanosti vrijednosti kolesterola mjenog u eritrocitima sa vrijednostima ITM-a, tjelesne mase, tjelesne visine i opsega struka kod ispitanika (n=14) prije intervencije

|                                   |   | ITM     | Tjelesna masa | Tjelesna visina | Opseg struka |
|-----------------------------------|---|---------|---------------|-----------------|--------------|
| Kolesterol u eritrocitima (µg/mg) | r | -0,5505 | -0,2380       | 0,4308          | -0,5702      |
|                                   | p | 0,0413  | 0,4126        | 0,1241          | 0,0333       |

Uočena je statistički značajna umjereno negativna povezanost vrijednosti kolesterola mjenog u eritrocitima s ITM-om ( $r = -0,5505$ ;  $p = 0,0413$ ) i opsegom struka ( $r = -0,5702$ ;  $p = 0,0333$ ). Prema tome, što je bio veći opseg struka i indeks tjelesne mase ispitanika, vrijednost kolesterola mjenog u eritrocitima je bila niža (slika 8.). Nažalost, ove podatke nije moguće komentirati u odnosu na relevantne znanstvene spoznaje, budući da ne postoje radovi koji su istraživali vrijednosti ukupnog kolesterola u eritrocitima u istraživanoj populaciji. Stoga ovi podaci predstavljaju prvi znanstveni doprinos u ovome području, koji nije moguće interpretirati zbog nedostatka podataka i znanstvenih radova.



**Slika 8.** Povezanost vrijednosti kolesterola mjenenog u eritrocitima s ITM-om ( $r = -0,5505$ ;  $p = 0,0413$ ) i opsegom struka ( $r = -0,5702$ ;  $p = 0,0333$ ) kod ispitanika ( $n = 14$ ) prije intervencije

#### 4.3.1. Utjecaj intervencije na vrijednost ukupnog kolesterola mjenenog u eritrocitima

Nakon 6 mjeseci intervencije, niti u jednoj skupini nije bilo statistički značajne promjene vrijednosti kolesterola mjenenog u eritrocitima (tablica 5.). Pregledom literature, utvrđeno je da dosad nije bilo istraživanja u kojima je ispitivana vrijednost kolesterola u eritrocitima oboljelih od NAFLD-a. Postoje istraživanja sa sličnim pokazateljem (kolesterol u membranama eritrocita) na oboljelima od kardiovaskularnih bolesti (Wu, M. i sur., 2017), no vrijednosti se ne mogu usporediti.

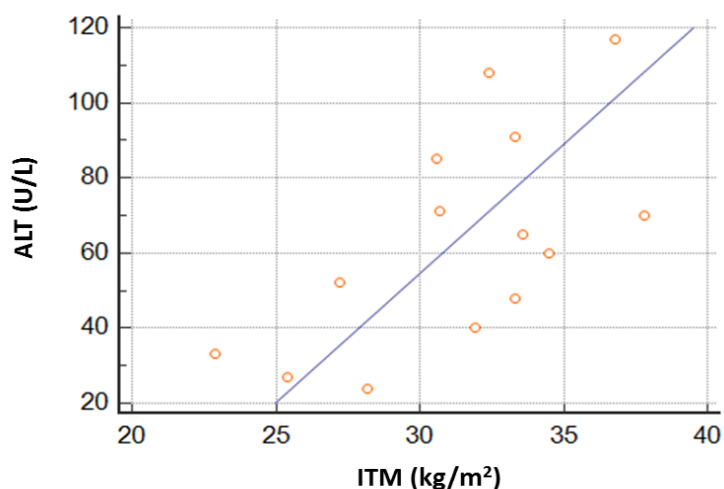
#### 4.4. Vrijednosti jetrenih enzima

Na početku i na kraju studije, izmjerene su vrijednosti jetrenih enzima- biomarkera oštećenja jetre, a to su: alkalna fosfataza (ALP), alanin-aminotransferaza (ALT), aspartat-aminotransferaza (AST) i gama-glutamilttransferaza (GGT). Na početku istraživanja nije uočena značajna poveznost između ITM-a, opsega struka i vrijednosti kolesterola mjenenog u eritrocitima sa vrijednostima jetrenih enzima (tablica 7.) Statistički značajna povezanost uočena je jedino za indeks tjelesne mase i ALT, gdje je povezanost bila umjereno pozitivna ( $r = 0,6364$ ;  $p = 0,0144$ ). To znači da što je bio veći indeks tjelesne mase ispitanika, bila je i viša vrijednost alanin-aminotransferaze (slika 9.).

**Tablica 7.** Stupanj povezanosti ITM-a, opsega struka i vrijednosti kolesterola mjenenog u eritrocitima s vrijednostima jetrenih enzima kod ispitanika (n=14) prije intervencije

|                                   |   | ALP     | ALT     | AST    | GGT     |
|-----------------------------------|---|---------|---------|--------|---------|
| ITM (kg/m <sup>2</sup> )          | r | -0,0597 | 0,6364  | 0,3666 | 0,4423  |
|                                   | p | 0,8465  | 0,0144  | 0,1973 | 0,1133  |
| Kolesterol u eritrocitima (μg/mg) | r | 0,4533  | -0,0498 | 0,1249 | -0,0402 |
|                                   | p | 0,1198  | 0,8657  | 0,6705 | 0,8915  |
| Opseg struka (cm)                 | r | -0,2593 | 0,4470  | 0,0066 | 0,3051  |
|                                   | p | 0,3922  | 0,1091  | 0,9822 | 0,2888  |

Slično potvrđuje i studija Sanyal i suradnika, gdje je uočena statistički značajna pozitivna povezanost između viših vrijednosti ALT-a i GGT-a sa masnom jetrom kod oboljelih od NAFLD-a. Također, ALT i GGT su značajno pozitivno korelirali sa opsegom struka, ITM-om, HDL-om, trigliceridima i glukozom mjenenom natašte (Sanyal i sur., 2015). U studiji Čolak i suradnika na dvije skupine studenata (pretili vs. normalna TM), pokazalo se da su vrijednosti ALT, AST i GGT bile više u pretilih studenata. Isto tako, ALT je pozitivno korelirao sa opsegom struka i ITM-om (Čolak i sur., 2013).



**Slika 9.** Povezanost ITM-a s ALT-om kod ispitanika (n=14) prije intervencije (r= 0,6364; p= 0,0144)

#### 4.4.1. Utjecaj intervencije na vrijednost jetrenih enzima

Usljed intervencije kapsulama ulja račića krila, nije došlo do promjene na AST-u, ALP-u i ALT-u u odnosu na početno stanje, ali je došlo do blagog sniženja GGT-a. Promjene, međutim, nisu bile statistički značajne. U placebo skupini je došlo do statistički neznačajnog sniženja svih jetrenih enzima (tablica 8).

**Tablica 8.** Usporedba vrijednosti jetrenih enzima prije i nakon intervencije

| Parametar | Skupina        | Broj ispitanika | Prije intervencije | Nakon intervencije | Promjena        | <i>p</i> -vrijednost promjene | <i>p</i> -vrijednost između skupina |
|-----------|----------------|-----------------|--------------------|--------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| ALT (U/L) | Intervencijska | 8               | 54,88 ± 20,78      | 55,63 ± 31,65      | 0,75 ± 25,57    | 0,833                         | 0,0939                              |
|           | Placebo        | 6               | 75,33 ± 35,95      | 45,67 ± 17,71      | -29,67 ± 37,21  | 0,173                         |                                     |
| ALP (U/L) | Intervencijska | 8               | 86,88 ± 29,99      | 87,62 ± 23,22      | 0,75 ± 18,76    | 0,866                         | 0,3111                              |
|           | Placebo        | 5               | 93,60 ± 22,48      | 84,40 ± 10,38      | -9,20 ± 15,35   | 0,225                         |                                     |
| AST (U/L) | Intervencijska | 8               | 39,88 ± 12,35      | 41,63 ± 25,45      | 1,75 ± 26,78    | 0,866                         | 0,4421                              |
|           | Placebo        | 6               | 57,33 ± 25,93      | 46,50 ± 40,89      | -10,83 ± 32,52  | 0,345                         |                                     |
| GGT (U/L) | Intervencijska | 8               | 56,00 ± 29,18      | 45,50 ± 13,37      | -10,50 ± 24,42  | 0,362                         | 0,9325                              |
|           | Placebo        | 6               | 232,33 ± 219,49    | 215,00 ± 215,32    | -17,33 ± 222,99 | 0,917                         |                                     |

Slični rezultati su dobiveni u metaanalizi Lu i suradnika gdje se pokazalo da omega-3 masne kiseline utječu na poboljšanje GGT-a kod oboljelih od NAFLD-a, ali ne značajno na ALT i AST (Lu i sur., 2016). Hals i suradnici su proveli istraživanje na čovjekolikim majmunima s dislipidemijom i dijabetesom tipa 2 (imaju sličan lipidni profil, transportne proteine i enzime kao i čovjek). Usljed 12 tjedana duge intervencije majmuni su dobivali ulje račića krila, ali nisu utvrđene statistički značajne promjene na AST-u, ALT-u i ALP-u (Hals i sur., 2017).



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, čiji je cilj bio odrediti utjecaj omega-3 masnih kiselina ulja račića krila na različite antropometrijske i krvne parametre kod oboljelih od NAFLD-a i dobivenih rezultata, može se zaključiti:

- Hipoteza rada nije u cijelosti potvrđena, budući da nije došlo do poboljšanja svih parametara koji ukazuju na kardiovaskularni rizik u ovih bolesnika.
- Utvrđena je statistički značajna jaka pozitivna povezanost indeksa tjelesne mase s opsegom struka ispitanika ( $r= 0,8551$ ;  $p= 0,0001$ ) prije intervencije. Dakle, što je ispitanik imao veći ITM to mu je i opseg struka bio veći.
- U intervencijskoj je skupini nakon 6 mjeseci došlo do statistički značajnog smanjenja tjelesne mase ( $p= 0,028$ ), ITM-a ( $p= 0,043$ ) i opsega struka ( $p= 0,041$ ). U placebo skupini nije došlo do statistički značajne promjene antropometrijskih parametara.
- Utvrđena je statistički značajna umjereno negativna povezanost indeksa tjelesne mase sa vrijednostima HDL-kolesterola ( $r= -0,6913$ ;  $p= 0,0062$ ) prije intervencije. Dakle, što je ispitanik imao veći ITM to su mu bile niže vrijednosti HDL-kolesterola.
- Nakon 6 mjeseci intervencije, niti u jednoj skupini nije došlo do statistički značajne promjene vrijednosti triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL- i LDL- kolesterola.
- Utvrđena je statistički značajna umjereno negativna povezanost vrijednosti kolesterola mjenog u eritrocitima s indeksom tjelesne mase ( $r= -0,5505$ ;  $p= 0,0413$ ) i opsegom struka ( $r= -0,5702$ ;  $p= 0,0333$ ) prije intervencije. Dakle, što je bio veći opseg struka i ITM ispitanika, vrijednost kolesterola mjenog u eritrocitima je bila niža.
- Nakon 6 mjeseci intervencije, niti u jednoj skupini nije došlo do statistički značajne promjene vrijednosti kolesterola mjenog u eritrocitima.
- Utvrđena je statistički značajna umjereno pozitivna povezanost indeksa tjelesne mase sa vrijednostima alanin-aminotransferaze ( $r= 0,6364$ ;  $p= 0,0144$ ) prije intervencije. Dakle, što je ispitanik imao veći ITM, to je bila viša vrijednost ALT-a.
- Nakon 6 mjeseci intervencije, niti u jednoj skupini nije došlo do statistički značajne promjene vrijednosti jetrenih enzima.
- Ovim istraživanjem obuhvaćen je mali broj ispitanika, potrebna su daljnja istraživanja koja bi obuhvatila uz veći broj ispitanika i zdravu kontrolnu skupinu. Navedeno bi pridonijelo lakšoj interpretaciji rezultata, osobito kod pokazatelja vrijednosti kolesterola mjenog u eritrocitima koji dosad nije ispitan.

## **6. ZAHVALA**

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Dariji Vranešić Bender na pomoći, podršci i konstruktivnim savjetima pri izradi ovog rada.

Posebno zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Ivančici Delaš s Medicinskog fakulteta na uloženom vremenu, strpljenju i nesebičnoj pomoći, kao i tehničaru Goranu Kapustiću na velikom doprinosu prilikom laboratorijskog rada.

Zahvaljujem i dr.med. Viktoru Domisloviću na pomoći oko izrade statističke analize.

## 7. POPIS LITERATURE

- Ahmed, A., Wong, R. J., Harrison, S.A. (2015) NAFLD Review: Diagnosis, Treatment and Outcomes. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **13** (12), 2062-2070.
- 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), doi: 10.3390/nu9091015.
- Berge, K., Musa-Veloso, K., Harwood, M., Hoem, N., Burri, L. (2014) Krill oil supplementation lowers serum triglycerides without increasing low-density lipoprotein cholesterol in adults with borderline high or high triglyceride levels. *Nutr Res.* **34** (2), 126-33.
- Berlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J.A., Auguet, T. (2014) Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol.* **7**, 221-39.
- Bukmir, L., Smokrović, H., Diminić-Lisica, I., Ljubotina, A., Popović, B. (2015) Nealkoholna masna bolest jetre. *Acta Med Croatica.* **69**, 305-310.
- Bunea, R., El Farrah, K., Deutsch, L. (2004) Evaluation of the Effects of Neptune Krill Oil on the Clinical Course of Hyperlipidemia. *Altern Med Rev.* **9** (4):420-8.
- Byrne, C.D., Targher, G. (2015) NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol.* **62**, 47-64.
- Cazzo, E., Pareja, J.C., Chaim, E.A. (2017) Nonalcoholic fatty liver disease and bariatric surgery: a comprehensive review. *Sao Paulo Med J.* **135** (3), 277-295.
- 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.
- Cicero, A. F., Rosticci, M., Morbini, M., Cagnati, M., Grandi, E., Parini, A., Borghi, C. (2015) Lipid-lowering and anti-inflammatory effects of omega 3 ethyl esters and krill oil: a randomized, cross-over, clinical trial. *Arch Med Sci.* **12** (3):507-12.
- Colica, C., Boccuto, L., Abenavoli, L. (2017) Silymarin: An option to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* **23** (47), 8437–8438.

- Courchaine, A. J., Miller, W.H., Stein D.B.Jr. (1959) Rapid semi-micro procedure for estimating free and total cholesterol. *Clin Chem.* **5**, 609-14.
- 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.
- Du, S., Jin, J., Fang, W., Su, Q. (2015) Does Fish Oil Have an Anti-Obesity Effect in Overweight/Obese Adults? A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One.* **10** (11): e0142652. doi: 10.1371/journal.pone.0142652.
- El Hadi, H., Vettor, R., Rossato, M. (2018) Vitamin E as a Treatment for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Reality or Myth? *Antioxidants.* **7**(1), doi: 10.3390/antiox7010012.
- 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.
- Ferramosca, A., Zara, V. (2014) Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol.* **20** (7), 1746-55.
- 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.
- 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.
- 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):11. doi:10.1186/s12944-017-0411-z.
- 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 non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *J Hepatol.* **66** (1), 142-152.
- Hellerbrand, C., Schattenberg, J.M., Peterburs, P., Lechner, A., Brignoli, R. (2016) The potential of silymarin for the treatment of hepatic disorders. *Clinical Phytoscience.* **2**:7. doi: 10.1186/s40816-016-0019-2.
- Jump, D.B., Lytle, K.A., Depner, C.M., Tripathy, S. (2018) Omega-3 polyunsaturated fatty acids as a treatment strategy for nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmacol Ther.* **181**, 108-125.

- Konerman, M.A., Jones, J.C., Harrison, S.A. (2018) Pharmacotherapy for NASH: Current and emerging. *J Hepatol.* **68**, 362–375
- 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.
- Loomba, R., Cortez-Pinto, H. (2015) Exercise and improvement of NAFLD: Practical recommendations. *J Hepatol.* **63**, 10–12.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1), 265-275.
- 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 Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract.* 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.
- 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.
- Namazi, G., Pourfarzam, M., Jamshidi Rad, S., Movahedian Attar, A., Sarrafzadega, N., Sadeghi, M., Asa, P. (2014) Association of the Total Cholesterol Content of Erythrocyte Membranes with the Severity of Disease in Stable Coronary Artery Disease. *Cholesterol.* doi: 10.1155/2014/821686.
- 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), 106-20.
- 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 non-alcoholic fatty liver disease 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.

- 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). doi:10.3390/ijms17122082.
- Ramprasath, V.R., Eyal, I., Zchut, S., Jones, P.J. (2013) Enhanced increase of omega-3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil. *Lipids Health Dis.* 12:178. doi: 10.1186/1476-511X-12-178.
- 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.
- Romero-Gómez, M., Zelber-Sagi, S., Trenell, M. (2017) Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* **67**, 829–846.
- Rose, H.G., Oklander, M. (1965) Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res.* **6**, 428-31.
- Rotman, Y., Sanyal, A.J. (2017) Current and upcoming pharmacotherapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.*, **66** (1), 180–190.
- Rundblad, A., Holven, K. B., Bruheim, I., Myhrstad, M.C., Ulven, S.M. (2018) Effects of krill oil and lean and fatty fish on cardiovascular risk markers: a randomised controlled trial. *J Nutr Sci.* **7**: e3. doi: 10.1017/jns.2017.64.
- 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. 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.
- Siddiqui, M.S., Charlton, M. (2016) Liver Transplantation for Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pre-Transplant Selection and Post-Transplant Management. *Gastroenterology.* **150** (8), 1849-62.

- Singh, S., Osna, N.A., Kharbanda, K.K. (2017) Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol.* **23** (36), 6549–6570.
- 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.
- Tilg, H. (2017) How to Approach a Patient With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* **153** (2), 345-349.
- Ulven, S.M., Holven, K.B. (2015) Comparison of bioavailability of krill oil versus fish oil and health effect. *Vasc Health Risk Manag.* **11**, 511-24.
- 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.
- Whitsett, M., Van Wagner, L.B. (2015) Physical activity as a treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *World J Hepatol.* **7** (16), 2041-2052.
- Wu, M., Zhang, J., Xu, Y., Wang, Y., Deng, F., Chen, X. (2017) Correlations of total cholesterol content of erythrocyte membranes with plasma cholesterol efflux capacity. *Biomed. Res.* **28** (10), 4305-4310.
- 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.* 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), 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.
- Zlatkis, A., Zak, B., Boyle, A. J. (1953) A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J Lab. Clin. Med.* **41**(3), 486-92.

## 8. SAŽETAK

Marija Hok

### Utjecaj ulja račića krila na čimbenike rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod oboljelih od nealkoholne masne bolesti jetre

Nealkoholna masna bolest jetre (engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) najčešći je uzrok kroničnih bolesti jetre u zapadnim zemljama. Obuhvaća cijeli spektar bolesti masne jetre u pojedinaca bez značajne potrošnje alkohola, u rasponu od masne jetre, steatohepatitisa do ciroze jetre. S obzirom da oboljeli od NAFLD-a imaju veći rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti, cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj omega-3 masnih kiselina ulja račića krila na različite čimbenike rizika (antropometrijske i krvne parametre) kod oboljelih od NAFLD-a. Istraživanje je bilo randomizirano, dvostruko slijepo i placebo kontrolirano, a trajalo je 6 mjeseci. Obuhvatilo je 14 ispitanika oboljelih od NAFLD-a, dobi 39 do 64 godine koji su raspoređeni u dvije skupine. U intervencijskoj skupini ispitanici su pili kapsule ulja račića krila, dok su u placebo skupini pili kapsule sojinog ulja. Analize uzoraka krvi provedene su u nadležnim medicinsko-biokemijskim laboratorijima ispitanika te u medicinsko-biokemijskom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Korištene metode za određivanje vrijednosti ukupnog kolesterola u eritrocitima bile su: metoda po Lowryju i metode po Courchaineu i Zlatkisu. Rezultati istraživanja su pokazali da je u intervencijskoj skupini došlo do statistički značajnog smanjenja tjelesne mase ( $p=0,028$ ), ITM-a ( $p=0,043$ ) i opsega struka ( $p=0,041$ ), u odnosu na placebo skupinu u kojoj promjena nije bila statistički značajna. Međutim, niti u jednoj od skupina nije došlo do statistički značajne promjene vrijednosti serumskih lipida, kolesterola mjenog u eritrocitima i jetrenih enzima. S obzirom da je ovo prvo istraživanje na tu temu, potrebna su daljnja istraživanja koja bi obuhvatila veći broj ispitanika i kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

**Ključne riječi:** Nealkoholna masna bolest jetre, ulje račića krila, omega-3 masne kiseline, kardiovaskularne bolesti.



## 9. SUMMARY

**Marija Hok**

### **Effects of krill oil on risk factors for the development of cardiovascular diseases in patients with non-alcoholic fatty liver disease**

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of chronic liver disease in Western countries. It includes the entire range of fatty liver diseases in individuals without significant alcohol consumption, ranging from fatty liver, steatohepatitis to liver cirrhosis. Considering that NAFLD patients have a higher risk of developing cardiovascular disease, the aim of this thesis was to examine the influence of omega-3 fatty acids of krill oil on various risk factors (anthropometric and blood parameters) in NAFLD patients. The study was randomized, double blind and placebo controlled, and lasted for 6 months. It included 14 NAFLD patients, ages 39 to 64, divided into two groups. In the intervention group subjects consumed krill oil capsules, while in placebo group consumed soybean oil capsules. Blood sample analyzes were performed in the competent medical-biochemical laboratories of the subjects and in the medical-biochemical laboratory of the University Hospital Centre Zagreb. The methods used to determine total cholesterol values in erythrocytes were: Lowry's method and methods by Courchaine and Zlatkis. The results of the study showed that there was a statistically significant reduction in body mass ( $p= 0.028$ ), BMI ( $p= 0.043$ ) and waist circumference ( $p= 0.041$ ) in the intervention group compared to the placebo group where the change was not statistically significant. None of the groups showed statistically significant changes in serum lipids, cholesterol measured in erythrocytes and liver enzymes. Considering that this is the first research on this subject, further research should involve a larger number of subjects and a control group of healthy subjects.

**Key words:** Non-alcoholic fatty liver disease, krill oil, omega-3 fatty acids, cardiovascular disease.

## **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, Kišpatičeva 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 naiđete 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.

#### **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.

Inicijali bolesnika: \_\_\_\_\_

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+.

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.

Inicijali bolesnika: \_\_\_\_\_

## **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, inćuni) 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, vjetрови, 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. Ispitivač može prekinuti Vaše sudjelovanje u ispitivanju ako je uvjeren da je to u Vašem najboljem interesu ili ako se ne pridržavate uputa ispitivanja. 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 infektivne bolesti jetre i febrilna stanja (Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević") i Zavod za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Inicijali bolesnika: \_\_\_\_\_

## **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).

## **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<br>Klinička jedinica za kliničku prehranu<br>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<br>Klinička jedinica za kliničku prehranu<br>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