

# Važnost povišenih vrijednosti gama-glutamil transpeptidaze za otkrivanje i procjenu težine nealkoholnoga steatohepatitisa

---

Baršić, Neven

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:308222>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-11**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## Središnja medicinska knjižnica

**Baršić, Neven (2013) *Važnost povišenih vrijednosti gama-glutamil transpeptidaze za otkrivanje i procjenu težine nealkohalnoga steatohepatitisa [Importance of elevated gamma-glutamyl transpeptidase in detection and prediction of severity of non-alcoholic steatohepatitis].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1898>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Neven Baršić**

**Važnost povišenih vrijednosti  
gama-glutamil transpeptidaze za  
otkrivanje i procjenu težine  
nealkoholnoga steatohepatitisa**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2013.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Neven Baršić**

**Važnost povišenih vrijednosti gama-  
glutamil transpeptidaze za otkrivanje i  
procjenu težine nealkoholnoga  
steatohepatitisa**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2013.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti i Kliničkom zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak" Kliničkog bolničkog centra "Sestre milosrdnice".

Voditelj istraživanja: prof. dr. sc. Marko Duvnjak

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Nealkoholna masna bolest jetre.....	1
1.1.1. Definicija.....	1
1.1.2. Spekter i prirodni tijek bolesti.....	2
1.1.3. Epidemiologija.....	3
1.1.4. Etiologija i patogeneza.....	4
1.1.5. Dijagnostika.....	6
1.1.6. Patohistološke značajke NAFLD.....	11
1.1.7. Liječenje NAFLD.....	16
1.2. Metabolički sindrom i nealkoholna masna bolest jetre.....	18
1.3. Gama-glutamil transpeptidaza .....	22
1.3.1. Općenito o enzimu.....	22
1.3.2. Gama-glutamil transpeptidaza i dijabetes.....	22
1.3.3. Gama-glutamil transpeptidaza i nealkoholna masna bolest jetre.....	24
1.4. Ostali jetreni biokemijski testovi u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre.....	26
1.5. Svrha istraživanja.....	28
2. HIPOTEZA.....	30
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	32
4. ISPITANICI I METODE.....	34
4.1. Prvi dio istraživanja - retrospektivno određivanje i usporedba prevalencije povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova kod bolesnika s dijabetes melitusom tipa 2.....	34
4.2. Drugi dio istraživanja - prospektivna studija bolesnika sa klinički postavljenom sumnjom na NAFLD kod kojih je zatim učinjena biopsija jetre.....	35
4.3. Statistička analiza.....	42
5. REZULTATI.....	44
5.1. Prevalencija povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova kod bolesnika s dijabetesom tipa 2.....	44
5.2. Prospektivno istraživanje dijagnostičke vrijednosti GGT i ostalih jetrenih biokemijskih testova analizom kohorte bolesnika s patohistološki potvrđenom nealkoholnom masnom bolesti jetre.....	47
5.2.1. Osnovni demografski podaci i podaci o sastavnicama metaboličkog sindroma.....	48
5.2.2. Podaci o vrijednostima jetrenih biokemijskih testova i patohistološkom spektru i značajkama bolesti.....	54
5.2.3. Usporedba kliničkih i patohistoloških značajki bolesti između bolesnika s izolirano povišenim vrijednostima GGT i bolesnika s povišenim ALT.....	58
5.2.4. Koreliranje vrijednosti pojedinih enzima s histološkim i kliničkim značajkama NAFLD.....	71
6. RASPRAVA.....	92
7. ZAKLJUČAK.....	99
8. SAŽETAK.....	101
9. SUMMARY.....	103
10. LITERATURA.....	105
11. ŽIVOTOPIS.....	120

# POPIS OZNAKA I KRATICA

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

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

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

BMI - indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

GGT - gama-glutamil transpeptidaza

ALT - alanin aminotransferaza

AST - aspartat aminotransferaza

AF - alkalna fosfataza

OR - omjer šansi (engl. *Odds Ratio*)

95% CI - 95% interval pouzdanosti (engl. *95% confidence interval*)

ROC krivulja (engl. *receiver operating characteristic curve*) - grafički prikaz dijagnostičke točnosti određene varijable u predikciji nekog stanja ovisno o uzetim vrijednostima praga

AUROC (engl. *area under receiver operating characteristic curve*) - površina ispod ROC krivulje, koja odražava dijagnostičku točnost ispitivane varijable

LDL - lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*)

HDL - lipoproteini visoke gustoće (engl. *high density lipoproteins*)

TNF- $\alpha$  - faktor nekroze tumora  $\alpha$

# 1. UVOD

## 1.1. Nealkoholna masna bolest jetre

### 1.1.1. Definicija

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD, engl. *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*) danas se smatra najčešćom kroničnom bolesti jetre u odrasloj populaciji, te se sve češće prepoznaje kao važan uzrok morbiditeta i mortaliteta povezanog s jetrom. Njena osnovna karakteristika je steatoza jetrenog parenhima (sa ili bez pridružene upale i fibroze) koja se javlja u odsutnosti konzumacije alkohola u količinama štetnim za jetru ili drugih rjeđih uzroka jetrene steatoze (određeni lijekovi, prirodni poremećaji metabolizma lipida, izgladnjivanje, parenteralna prehrana, poremećaji trudnoće).

Kao entitet prvi puta je opisana tek 1980. godine, kada su Ludwig i sur. upotrijebili naziv nealkoholni steatohepatitis (NASH, engl. *Non-Alcoholic Steatohepatitis*) za oblik bolesti jetre kod skupine bolesnika srednje dobi s poremećenim nalazima jetrenih biokemijskih testova i histološkim nalazom biopsije jetre koji je odgovarao alkoholnom steatohepatitisu, no bez anamneze uzimanja alkohola (1).

Kasnije je utvrđeno da NAFLD zapravo predstavlja važnu sastavnicu metaboličkog sindroma, s visokom prevalencijom u općoj populaciji. Posljednjih godina NAFLD je postala područje velikog znanstvenog interesa i brojnih bazičnih i kliničkih ispitivanja, no unatoč značajnom napretku u razumijevanju epidemiologije, patogeneze i tijeka bolesti, brojna pitanja zahtijevaju daljnje razjašnjenje, uključujući ona vezana uz dijagnostiku i liječenje bolesti.



### **1.1.2. Spektar i prirodni tijek bolesti**

Spektar NAFLD obuhvaća tri oblika bolesti: običnu steatozu jetre, NASH i cirozu.

Obična steatoza jetre (ili obična masna jetra) karakterizirana je makro- ili mikrovezikularnom masnom promjenom hepatocita bez pridružene upale i fibroze, te uglavnom ima benigni neprogresivni tijek i dobru prognozu. NASH je s druge strane karakteriziran osim steatoze i nekroinflamatornom komponentom, sa ili bez pridružene fibroze. Za razliku od obične steatoze, NASH pokazuje sklonost prema progresiji fibroze te u konačnici može dovesti do ciroze i njenih komplikacija.

U longitudinalnim studijama koje su uključivale kontrolnu biopsiju jetre nakon određenog vremenskog intervala (3-5 godina), progresija fibroze pratila se u oko 30-40 % bolesnika (2-4). U više studija uključujući nedavno objavljeni sistematski pregledni članak jasno je pokazano da NAFLD u konačnici može dovesti do ciroze, jetrenog zatajenja i hepatocelularnog karcinoma (5-8). U longitudinalnoj studiji Ekstedta i sur. koja je uključila 129 bolesnika s prosječnim razdobljem praćenja od 13.7 godina, mortalitet nije bio povišen kod bolesnika s običnom steatozom, dok je preživljenje bolesnika s inicijalnom dijagnozom steatohepatitisa bilo reducirano, s kardiovaskularnom ili jetrenom bolesti kao glavnim uzrocima smrti (4). U studiji Matteonija i sur. koja je pratila 132 bolesnika kroz 9 godina, 22% bolesnika s NASH-om razvilo je znakove ciroze, uz značajan mortalitet povezan s bolesti jetre, dok se ciroza razvila kod 2/59 (3.4%) bolesnika s običnom steatozom (6).

Nedavna meta-analiza kvantificirala je povišen mortalitet kojeg nosi NAFLD općenito (OR: 1.57, 95% CI: 1.18-2.10), te posebno NASH u odnosu na običnu steatozu (OR za NASH: 5.71, 95% CI: 2.31-14.13; OR za NASH s uznapredovalom fibrozom: 10.06, 95% CI 4.35-23.25) (9). Dodatni dokazi o povezanosti ciroze i NAFLD dolaze iz studija bolesnika s kriptogenom cirozom, koju se

usko povezuje s NASH-om: ti bolesnici imaju disproporcionalno visoku prevalenciju obilježja metaboličkog sindroma, što je tipično za NAFLD, te njihove biopsije jetre često pokazuju pojedine karakteristike NASH-a (10, 11). Dokazi o povezanosti hepatocelularnog karcinoma (HCC) i NAFLD-a zasad su većinom indirektni. U jednoj seriji od 105 bolesnika s hepatocelularnim karcinomom njih 29% imalo je kriptogenu cirozu, a na temelju histoloških i kliničkih značajki zaključeno je da je NAFLD bio odgovoran za najmanje 13% slučajeva (8). U drugoj studiji, klinička i patohistološka obilježja NASH-a bila su znatno češća kod bolesnika s hepatocelularnim karcinomom i kriptogenom cirozom u odnosu na one s jasno definiranom etiologijom ciroze (7). S druge strane, dvije japanske studije pokazale su vrlo visoku kumulativnu stopu HCC-a kod NASH-a s uznapredovalom fibrozom (7.6% u 5 godina, n=137), odnosno značajan udio bolesnika bez razvijene ciroze jetre među onima s HCC i NASH-om (26%) (12, 13). Ostaje otvorenim pitanje metodologije navedenih studija i primjenjivosti podataka na ostale populacije.

Iako je danas jasno da NAFLD nije tako bezazleno stanje kao što se inicijalno smatralo, čini se da ipak ima bolju prognozu i pokazuje sporije napredovanje bolesti u odnosu na alkoholnu bolest jetre i hepatitis C (14, 15). Učestalost pojave HCC-a kod bolesnika s uznapredovalom fibrozom i cirozom također je niža u odnosu na hepatitis C (16).

Zanimljivo, u seriji bolesnika s NASH-om kod kojih je učinjena transplantacija jetre, recidiv steatoze bio je prisutan kod 6/8 bolesnika u 2. godini nakon transplantacije, a njih troje imali su nalaz histologije sukladan s NASH-om (17).

### **1.1.3. Epidemiologija**

NAFLD se danas smatra najčešćom kroničnom bolesti jetre u zapadnoj populaciji. Prevalencija u općoj populaciji je visoka, a obzirom da je usko povezana s prevalencijom metaboličkog

sindroma, paralelno s trendom porasta učestalosti pretilosti i dijabetesa raste i prevalencija NAFLD. Izvještaji o procjeni prevalencije NAFLD donekle se razlikuju, ovisno o metodologiji koja je korištena i ispitivanim populacijama, a najčešće se kreću u rasponu od 15 do 30 % (18). Prevalencija NAFLD određenog ultrazvukom iznosila je 20-25% u Europi, do čak 46% u jednoj većoj američkoj studiji koja je uključila populaciju pretežno srednje dobi s prosječnim BMI od 29.8 kg/m<sup>2</sup> (19-21). Prevalencija histološki dokazanog NAFLD kod inače zdravih potencijalnih donora jetre iznosila je 27-38% u američkim studijama, a nešto niže u Europi (oko 15%) (22-25). U velikoj populacijskoj studiji koja je koristila MR spektroskopiju za procjenu steatoze, prevalencija NAFLD bila je 33% (26). Prevalencija NASH-a u općoj populaciji procjenjuje se uglavnom na oko 3-5%, no u studijama zdravih potencijalnih donora jetre iznosila je i do 15% (5, 18). Prema podacima iz novijih studija s većim brojem bolesnika koje su koristile unaprijedene histološke kriterije, NASH je prisutan u iznenađujuće velikom dijelu bolesnika s NAFLD-om, s udjelom od 40 do 75 % među bolesnicima s povišenim vrijednostima transaminaza, a nešto niže kod urednih transaminaza (4, 22, 27, 28). U populaciji izraženo pretilih koji su podvrgnuti barijatrijskom kirurškom liječenju, prevalencija histološki potvrđene steatoze u analizi 12 različitih studija iznosila je 91% (raspon: 85-98%), dok je NASH bio prisutan u 37% bolesnika, a ciroza je neočekivano nađena u 1.7% (raspon: 1-7%) (29). U populaciji bolesnika s dijabetesom tipa 2, ultrazvučno detektirana masna infiltracija jetre bila je prisutna u 62%, odnosno 69% dijabetičara (30, 31).

#### **1.1.4. Etiologija i patogeneza**

Obilje dokaza jasno pokazuje da je NAFLD usko povezan s metaboličkim sindromom i pridruženim poremećajima (pretilost, dislipidemija, poremećena regulacija glikemije,

hipertenzija). Postoje i znatno rjeđi, sekundarni oblici nealkoholne steatoze jetre koji su povezani s uzimanjem određenih lijekova, gladovanjem, parenteralnom prehranom, abetalipoproteinemijom, lipodistrofijom, urođenim poremećajima metabolizma kolesterola, te trudnoćom. Patofiziologija NAFLD nije do kraja razjašnjena, no najviše prevladava tzv. model 'dva udarca' (32). Prvi korak je nakupljanje triglicerida u jetri kao posljedica razlike u ulasku i sintezi lipida s jedne strane i njihovoj  $\beta$ -oksidaciji i izvozu s druge (33). Steatotična jetra zatim postaje osjetljiva na 'druge udarce' koji dovode do ozljede hepatocita, upale i fibroze. Inzulinska rezistencija, odnosno poremećaj u signalizacijskom putu inzulina, smatra se ključnim mehanizmom koji dovodi do steatoze, a sudjeluje i u razvoju steatohepatitisa. Prisutna je i kod bolesnika s NAFLD koji nisu pretili i imaju normalnu regulaciju glikemije (34). Odgovorna je za perifernu lipolizu i pojačan utok slobodnih masnih kiselina u jetru, kao i pojačanu sintezu masnih kiselina i triglicerida u jetri, što u konačnici rezultira nakupljanjem masti u jetri. Drugi čimbenici koji dovode do dodatnog oštećenja su oksidativni stres i peroksidacija lipida, proinflamatorni citokini (dominantno TNF- $\alpha$ ), te hormoni porijeklom iz masnog tkiva (adipocitokini) (35). Oksidacija masnih kiselina i u mitohondrijima i u peroksisomima može dovesti do stvaranja hepatotoksičnih slobodnih kisikovih radikala, koji uzrokuju oksidativni stres (36). Posljedična peroksidacija lipida i oštećenje strukture i funkcije mitohondrija, kao i oštećenje plazmatske membrane dodatni su koraci u razvoju steatohepatitisa (37). Oksidativni stres dovodi i do ekspresije Fas-liganda na hepatocitima koji u konačnici dovodi do indukcije apoptoze, a povezan je i s aktivacijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B koji inducira sintezu proinflamatornih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ ) (38, 39). Navedeni citokini također uzrokuju oštećenje hepatocita i apoptozu, te kemotaksiju neutrofila i aktivaciju jetrenih stielatnih stanica (40). Kupfferove stanice su, kao jetreni makrofagi, također važan izvor proinflamatornih citokina. U aktivirajuće stimuluse ubrajaju se citokini porijeklom iz hepatocita, čišćenje oksidiranih lipida putem 'scavenger' receptora, te endotoksini porijeklom iz crijeva (41).

Ulogu u patogenezi NAFLD imaju i adipocitokini, peptidi podrijetlom iz visceralnog masnog tkiva. Leptin inaktivira substrat inzulinskog receptora te je povezan s mehanizmom nastanka inzulinske rezistencije, a snižena razina adiponektina uz smanjenu ekspresiju njegovih receptora na hepatocitima koja se nalazi u NAFLD znači smanjenje njegovih povoljnih učinaka na  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina i smanjenje količine triglicerida u hepatocitima, smanjenje jetrene inzulinske rezistencije, te supresiju proizvodnje TNF- $\alpha$  u jetri (42). U konačnici, oštećenje hepatocita i pridružena upala dovesti će do aktivacije stelatnih stanica i sinteze proteina ekstracelularnog matriksa sa fibrozom jetre kao završnim u nizu opisanih zbivanja. U fibrogenezi važnu ulogu imaju i apoptoza hepatocita s ingestijom od strane Kupfferovih stanica i otpuštanjem TGF- $\beta$ , te smanjena proizvodnja adiponektina i povišene razine angiotenzina koji zatim stimulira stelatne stanice (35, 43).

### **1.1.5. Dijagnostika**

Većina bolesnika s NAFLD nema nikakvih simptoma vezano uz jetrenu bolest, dok samo rijetki navode nelagodu u gornjem desnom kvadrantu abdomena ili pojačan umor. Sumnja na prisutnost NAFLD se stoga najčešće postavlja slučajno, tijekom posjeta liječniku iz nekog drugog razloga. Izuzetak su naravno slučajevi kod kojih je već prisutna uznapredovala bolest jetre s razvijenom cirozom, kod kojih se klinička slika i laboratorijski nalazi ne razlikuju od onih kod ciroze jetre druge etiologije.

Steatoza jetre čest je slučajni nalaz tijekom pregleda abdomena ultrazvukom ili drugim slikovnim metodama učinjenim iz nekog drugog razloga. Karakteristike ili prirodni tijek NAFLD u ovoj skupini bolesnika dosad nisu sustavno proučene u studijama. Trenutno važeće smjernice u ovakvim slučajevima slučajnog nalaza steatoze, ukoliko nisu istovremeno prisutne i povišene

vrijednosti jetrenih biokemijskih testova ili simptomi i znakovi bolesti jetre, preporučuju samo detekciju prisutnih metaboličkih čimbenika rizika i drugih mogućih uzroka steatoze poput alkohola i lijekova, te postupke vezane za njihovo uklanjanje/liječenje (44). Drugi najčešći scenarij otkrivanja NAFLD je nalaz povišenih vrijednosti jednog ili više jetrenih biokemijskih testova (AST, ALT, GGT, AF). U tom slučaju potrebno je postaviti točnu dijagnozu, odnosno pokušati jasno definirati uzrok povišenja enzima. Postavljanje dijagnoze NAFLD zahtijeva ispunjenje 4 uvjeta:

1. dokaz steatoze jetre slikovnim metodama ili patohistološki
2. izostanak konzumacije značajnijih količina alkohola
3. izuzeće ostalih mogućih uzroka steatoze jetre
4. izuzeće drugih uzroka kronične bolesti jetre.

Ultrazvučni prikaz hiperehogene odnosno 'svijetle' jetre visoko je osjetljiv i specifičan za dijagnozu steatoze (oboje >90%), osobito kod infiltracije parenhima steatozom iznad 30% (45). Međutim, osjetljivost ultrazvuka nešto je niža kod manje izražene steatoze, a dijagnostička preciznost je ograničena i u slučajevima morbidne pretilosti zbog tehničkih ograničenja metode (46). Kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MR) u dijagnostici steatoze pokazuju sličnu preciznost kao ultrazvuk, no u slučajevima s manjom zahvaćenošću parenhima steatozom MR ima veću preciznost u detekciji steatoze, a ni CT ni MR nisu ograničeni morbidnom pretilosti (47). Negativna strana kada govorimo o detekciji steatoze u svakodnevnom kliničkom radu im je svakako dostupnost pretrage i cijena.

Među alternativne uzroke steatoze jetre, na koje je potrebno misliti pri postavljanju dijagnoze, ubrajaju se alkoholna bolest jetre, određeni lijekovi, hepatitis C, Wilsonova bolest, parenteralna prehrana, izgladnjivanje, bolesti jetre u trudnoći, lipodistrofija, abetalipoproteinemija i drugi urođeni metabolički poremećaji lipida (44). Kod svih bolesnika kod kojih se sumnja na NAFLD

potrebno je isključiti ostale uzroke kronične bolesti jetre - kronični virusni hepatitis, autoimune bolesti jetre (autoimuni hepatitis, primarni sklerozirajući kolangitis, primarnu bilijarnu cirozu, sindrome preklapanja), hemokromatozu, Wilsonovu bolest, deficit alfa-1-antitripsina, alkoholnu bolest jetre, te toksično oštećenje lijekovima i drugim ksenobioticima. Valja napomenuti da se kod bolesnika s NAFLD često nalaze povišene vrijednosti feritina, što zahtijeva daljnju obradu u smislu genotipizacije HFE i određivanja koncentracije željeza u suhoj tvari jetre jedino ukoliko je istovremeno povišena i saturacija transferina (44). Kao epifenomen je u određenom postotku bolesnika prisutan i povišen titar serumskih autoantitijela - u nedavnoj studiji na 864 bolesnika čak 21% bolesnika imalo je pozitivan nalaz antinuklearnih antitijela ili antitijela na glatke mišiće, no njihova prisutnost nije imala nikakav utjecaj na težinu patohistološke slike (48).

Prema definiciji, postavljanje dijagnoze NAFLD podrazumijeva isključenje konzumacije značajnijih količina alkohola. Međutim, preciziranje što značajnija količina alkohola točno podrazumijeva nije uvijek jednoznačno. U literaturi vezanoj uz NAFLD definicija značajnih količina alkohola je inkonzistentna i varirala je od >1 alkoholnog pića (~10g alkohola) dnevno do >40g dnevno, i nije se uvijek pravila razlika vezano uz spol (49). Nedavni konsenzus vezan uz provođenje studija s NAFLD definira značajne količine alkohola kao >21 piće tjedno za muškarce i >14 pića tjedno za žene kroz period od dvije godine prije biopsije jetre (50).

Daljnji korak u dijagnostici NAFLD je razlikovanje obične steatoze i steatohepatitisa, obzirom da ta dva oblika bolesti, kako je ranije spomenuto, imaju bitno različiti prirodni tijek i prognozu. Također je važno unutar steatohepatitisa procijeniti stupanj uznapređovalosti fibroze. Razlikovanje obične steatoze od steatohepatitisa i procjena stadija fibroze nisu mogući široko dostupnim slikovnim metodama (ultrazvuk, CT, MR), kao ni na temelju vrijednosti jetrenih enzima (47). Još uvijek važeći 'zlatni standard' u tome jest patohistološka analiza tkiva dobivenog biopsijom jetre, kojom je moguće potvrditi dijagnozu NAFLD, razlikovati običnu steatozu i

steatohepatitis, te procijeniti stupanj nekroinflamatorne aktivnosti i stadij fibroze. Biopsija jetre ima i svoje nedostatke: invazivna je, neugodna za bolesnika, zahtijeva hospitalizaciju i izostanak s posla, te predstavlja određeni trošak i zahtijeva vrijeme i ekspertizu više osoba. Intrinzični nedostaci same biopsije jetre su varijabilnost uzorkovanja (engl. *sampling variability*), koja potječe od činjenice da biopsija predstavlja samo pedesettisućiti dio jetrenog parenhima koji kod kroničnih bolesti jetre u pravilu nije jednakomjerno zahvaćen patološkim procesom, te varijabilnost u samoj patohistološkoj interpretaciji (engl. *interobserver variability, intraobserver variability*) (51). U posljednje vrijeme ulažu se značajni napor u razvoju neinvazivnih metoda koje bi zamijenile biopsiju jetre u razlikovanju steatohepatitisa i obične steatoze, kao i u procjeni uznapredovalosti fibroze. Od novijih metoda temeljenih na slikovnim metodama najviše napora uloženo je u razvoj ultrazvučne elastografije, koja se danas i koristi u određenim centrima u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Meta-analize pokazale su jako dobru dijagnostičku preciznost u detekciji ciroze, nešto slabiju preciznost u isključenju uznapredovale fibroze, dok su rezultati vezano uz detekciju nižih razina fibroze bili heterogeni (52). Najveća vrijednost ove metode zasad ostaje isključenje ciroze i uznapredovale fibroze kod bolesnika s niskim vrijednostima krutosti jetre, dok ostale nije moguće u potpunosti točno klasificirati (53). Obećavajući rezultati dobiveni su studijom MR elastografije u razlikovanju NASH-a od obične steatoze, dok se ta metoda već prethodno pokazala odličnom za isključenje prisutnosti fibroze (54, 55). Brojne studije usredotočene su u u posljednje vrijeme na istraživanje biomarkera, mjerljivih serumskih parametara koji ili odražavaju intenzitet upalnih procesa i nekroze hepatocita, ili ukazuju na remodeliranje ekstracelularnog matriksa i odlaganje kolagena. U tu svrhu analizirane su dijagnostičke mogućnosti citokeratina 18, hsCRP-a (high-sensitivity C reactive protein), pentraksina 3, parametara oksidativnog stresa, hijaluronske kiseline, laminina, kolagena tipa 6 i drugih. Najviše obećavajući rezultati postignuti su s citokeratinom 18, čija osjetljivost i



specifičnost u detekciji NASH-a su procijenjene na 78% i 87% u nedavnoj meta-analizi (9). Bilo je više pokušaja sastavljanja panela kliničkih i laboratorijskih parametara koji bi, objedinjeni u određenu formulu, omogućili razlikovanje steatohepatitisa od obične steatoze ili pak omogućili procjenu prisutnosti i izraženosti fibroze (53). Jedini koji bi mogao zaživjeti u široj upotrebi i koji je preporučen u najnovijim smjernicama je tzv. 'NAFLD Fibrosis Score', koji se izračunava na temelju formule koja uključuje vrijednosti šest lako dostupnih varijabli (dob, indeks tjelesne mase, hiperglikemija, trombociti, albumin, omjer AST/ALT). U meta-analizi, AUROC (engl. *area under the receiver operated curve*) za detekciju uznapredovale fibroze (premoštavajuća fibroza ili ciroza) iznosio je 0.85, te je uz 2 definirana praga osjetljivost iznosila 90%, a specifičnost 97% (9).

U konačnici, postavlja se pitanje kod kojih je točno bolesnika potrebno učiniti biopsiju jetre? U trenutno važećim smjernicama navodi se da izvođenje biopsije jetre treba razmotriti kod bolesnika s NAFLD koji imaju povišen rizik za prisutnost steatohepatitisa i uznapredovale fibroze, a u tu skupinu treba ubrojiti one koji ispunjavaju kriterije za metabolički sindrom i/ili one kod kojih rezultat izračunatog NAFLD Fibrosis Score ukazuje na mogućnost postojanja uznapredovale fibroze (44). Nadalje, biopsiju jetre treba razmotriti kod bolesnika sa sumnjom na NAFLD kod kojih drugi mogući uzroci steatoze jetre i kronične jetrene bolesti ne mogu drugačije biti isključeni. Poimanje ove druge skupine je relativno, pogotovo ako se uzmu u obzir podaci iz studija koje su pokazale da bolesnici s trajno povišenim vrijednostima jetrenih biokemijskih testova kod kojih su nalazi cjelokupne obrade prije biopsije jetre uredni (i koji se stoga u većini slučajeva obilježe kao vjerovatni NAFLD), nakon biopsije jetre u 20-30% slučajeva imaju dijagnosticiran neki drugi uzrok povišenja enzima, a samo u 70-80% slučajeva se zaista i radi o NAFLD (56, 57). U Tablici 1.1.5. prikazani su rezultati studije Skelly i sur. s učestalostima

pojedinih dijagnoza nakon učinjene biopsije jetre kod bolesnika kod kojih inicijalnom obradom definitivni uzrok jetrenog oštećenja nije utvrđen.

**Tablica 1.1.5.** Učestalost pojedinih dijagnoza nakon učinjene biopsije jetre kod bolesnika kod kojih inicijalnom obradom nije utvrđen definitivni uzrok jetrenog oštećenja

Konačna dijagnoza	N (ukupni n=354)	Relativna učestalost (%)
Nealkoholni steatohepatitis	120	34
Nealkoholna steatoza	115	32
Kriptogeni hepatitis	32	9
Oštećenje lijekovima	27	7.6
Normalna jetra	21	5.9
Alkoholna bolest jetre	10	2.8
Autoimuni hepatitis	7	1.9
Razno	22	6.3

Modificirano prema: Skelly MM, James PD, Ryder SD. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. J Hepatol 2001;35:195–199.

### 1.1.6. Patohistološke značajke NAFLD

Kao što je prethodno spomenuto, patohistološka analiza tkiva dobivenog biopsijom jetre je još uvijek važeći 'zlatni standard' u dijagnostici NAFLD. To je jedina metoda kojom je moguće definitivno potvrditi dijagnozu NAFLD, odnosno isključiti druge uzroke bolesti jetre kod klinički nejasnog povišenja jetrenih biokemijskih testova. Osim potvrde dijagnoze, druga važna funkcija biopsije jetre je razlikovanje obične steatoze i steatohepatitisa, kao dva oblika bolesti sa bitno različitim prirodnim tijekom, te evaluacija i semikvantifikacija nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze.

Histološki spektar NAFLD uključuje različite oblike steatoze s malim ili velikim masnim kapljicama, sa ili bez pridružene lobularne i portalne upale, te steatohepatitis, kojeg karakterizira steatoza, upala i znaci oštećenja hepatocita.

Osnovna histološka karakteristika NAFLD sadržana je i u samom nazivu bolesti: nakupljanje masti u obliku triglicerida unutar hepatocita, odnosno steatoza. Danas se kao minimalni kriterij za histološku dijagnozu NAFLD smatra prisutnost >5% masno promijenjenih hepatocita (58). Steatoza je u NAFLD obično makrovezikularna, što se odnosi na hepatocite s jednom velikom intracitoplazmatskom kapljicom masti ili s malim jasno definiranim kapljicama koje pomiču jezgru na periferiju. Moguća je i miješana steatoza, kod koje se osim makrovezikularne steatoze primjećuju i skupine hepatocita s centralno smještenim jezgrama i brojnim sitnim kapljicama masti u citoplazmi. Steatoza kod NAFLD karakteristično počinje u 3. zoni jetrenog acinusa, perivenularno. Kod oblika NAFLD karakteriziranog kao obična steatoza moguće je osim masno promijenjenih hepatocita vidjeti i žarišta lobularne upale, blagu portalnu upalu i lipogranulome. Međutim, po definiciji nisu prisutni znakovi hepatocelularnog oštećenja, kao ni fibroza (59). Razmjer steatoze se procjenjuje semikvantitativno, dijeleći parenhim acinusa na trećine, te se ocjenjuje kao postotak parenhima zahvaćenog steatozom: do 5%, 5%-33% (blaga steatoza), 33%-66% (umjerenjena steatoza), ili >66% (izražena steatoza). Tijekom progresije bolesti prema cirozi steatoza može postupno nestati, te ne mora više biti prisutna u cirotičnoj jetri.

Minimalni kriteriji za postavljanje dijagnoze nealkoholnog steatohepatitisa uključuju prisutnost steatoze, znakove oštećenja hepatocita (obično u obliku baloniranja), te lobularnu upalu (tipično u 3. zoni acinusa) (60). Prisutnost fibroze nije preduvjet za dijagnozu NASH-a. Hepatocelularno oštećenje u NASH-u opaža se u obliku baloniranja, apoptotičnih tjelešaca i litičke nekroze. Baloniranje hepatocita je jedna od najvažnijih patohistoloških obilježja NASH-a jer je već u inicijalnim studijama pokazalo značajnu povezanost s progresijom bolesti (6). Balonirani

hepatociti su uvećani, s obilnijom, blijedom citoplazmom i velikom hiperkromatskom jezgrom i prominentnim nukleolusom, a rezultat su promjena u citoskeletu hepatocita uslijed oštećenja. Apoptotična, acidofilna tjelešca rezultat su programirane smrti stanice, te su čest nalaz u steatohepatitisu. Lobularna (intraacinarna) upala obično je blaga, te se sastoji od miješanog upalnog infiltrata s limfocitima i nešto neutrofila i eozinofila. Često se mogu vidjeti i lobularni mikrogranulomi (nakupine Kupfferovih stanica) i lipogranulomi.

Portalna upala sastoji se od mononuklearnog infiltrata i obično je blagog intenziteta; izraženija portalna upala jedan je od pokazatelja težih oblika bolesti.

Fibroza u NASH-u obično počinje u 3. zoni acinusa i sastoji se od odlaganja kolagena i proteina ekstracelularnog matriksa duž sinusoida i oko hepatocita. S napredovanjem bolesti dolazi i do razvoja fibroze u portalnim prostorima i oko njih, a kasnije i do nastanka premoštavajuće fibroze, te u konačnici kod dijela bolesnika i do ciroze. Kod manjeg dijela bolesnika, prisutna je inicijalno portalna fibroza bez opisane perisinusoidalne/pericelularne fibroze.

Malloryeva tjelešca su eozinofilne intracitoplazmatske inkluzije koje se obično vide uz jezgre baloniranih hepatocita u zoni 3, obično u područjima perisinusoidalne fibroze. Sastoje se od aberantno posloženih intermedijarnih filamenata i nekoliko drugih proteina, a koreliraju s izraženijom nekroinflamatornom aktivnosti. Iako nisu preduvjet za dijagnozu NASH-a, niti su specifična za NASH (vidaju se i kod alkoholnog i lijekovima uzrokovanog steatohepatitisa, te kronične kolestaze), njihova prisutnost dodatno potvrđuje dijagnozu.

Glikogenirane jezgre su vakuolizirane jezgre obično periportalnih hepatocita, i njihova prisutnost govori u prilog nealkoholne etiologije steatohepatitisa, jer se jako rijetko mogu naći kod alkoholnog steatohepatitisa. Hepatocelularno nakupljanje željeza može biti prisutno u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre. Obično je blago izraženo i javlja se u periportalnim hepatocitima, uz nakupljanje u retikuloendotelnim stanicama. Značenje i patogeneza nakupljanja

željeza u NAFLD zasad nisu razjašnjeni, te nije dokazana povezanost s težim oblicima ili progresijom bolesti.

Trenutno postoje dva patohistološka sustava bodovanja koji su u široj upotrebi vezano u NAFLD. Prvi je razvijen 1999. godine od strane Brunt i sur. kao odgovor na potrebu za preciznijom patohistološkom dijagnostikom i stupnjevanjem NAFLD, na sličan način kao što je to već ranije bilo učinjeno za druge kronične bolesti jetre. U ovom sustavu bodovanja, 3 stupnja nekroinflamatorne aktivnosti definirani su prema izraženosti nekoliko histoloških karakteristika koje su se u korelacijskoj studiji pokazale najznačajnijim za procjenu težine bolesti: steatoza, baloniranje hepatocita, te lobularna i portalna upala (Tablica 1.1.6.1) (61). Stadiji fibroze podijeljeni su na osnovu prirodnog tijeka razvoja fibroze u NASH-u, od perisinusoidalne/pericelularne fibroze u zoni 3, zatim portalne/periportalne fibroze, prema premoštavajućoj fibrozi i cirozi (Tablica 1.1.6.1).

**Tablica 1.1.6.1** Sustav stupnjevanja nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze prema Brunt i sur.

Nekroinflamatorna aktivnost	Steatoza (1:<33%, 2: 33-66%, 3: >66%)	Baloniranje hepatocita	Upala	
			Lobularna (0: odsutna, 1: <2, 2: 2-4, 3: > 4 žarišta)	Portalna (0: odsutna, 1: blaga, 2: umjerena, 3: izražena)
<b>Stupanj 1 (blaga)</b>	1-2	minimalno	1-2	0-1
<b>Stupanj 2 (umjerena)</b>	2-3	jasno prisutno	1-2	1-2
<b>Stupanj 3 (izražena)</b>	2-3	izraženo	3	1-2

Stadij fibroze: 1: perisinusoidalna/pericelularna fibroza u zoni 3; 2: kao pod 1 uz žarišnu ili ekstenzivnu portalnu/periportalnu fibrozu; 3: premoštavajuća fibroza; 4: ciroza.

Sustav patohistološkog bodovanja koji se trenutno najviše koristi je sustav razvijen 2005. godine od strane NASH Clinical Research Network (CRN), skupine kliničkih centara i pridruženih

patologa kojima je cilj bio razviti sustav koji pokriva cjelokupni histološki spektar NAFLD i omogućuje preciznu usporedbu biopsija u terapijskim studijama na temelju zbroja bodova generiranih semikvantitativnim ocjenjivanjem pojedinih histoloških karakteristika (62). Taj konačni zbroj nazvan je 'NAFLD activity score' (NAS), iznosi u rasponu od 0 do 8, a sastoji se od pojedinačnih ocjena izraženosti steatoze, lobularne upale i baloniranja hepatocita (Tablica 1.1.6.2.). U validacijskoj studiji uspoređivana je korelacija NAS sa dijagnozom NASH-a postavljenom od strane patologa na temelju cjelokupnog pregleda tkiva dobivenog biopsijom, te su vrijednosti 5-8 odgovarale definitivnoj dijagnozi NASH-a a vrijednosti 1 i 2 dijagnozi obične steatoze (vrijednosti 3 i 4 označene su kao granične). Međutim, važno je napomenuti da NAS nije stvoren kao zamjena za histološku dijagnozu koju postavlja patolog, već samo kao nadopuna nalazu. Stupnjevanje fibroze prema sustavu NASH CRN slično je onom od Brunt i sur., s razlikom da je stadij 1 dodatno podijeljen u 3 podstadija (1A - blaga perisinusoidalna fibroza zone 3, 1B - umjerena perisinusoidalna fibroza zone 3, 1C - izolirana portalna/perportalna fibroza).

**Tablica 1.1.6.2.** NASH Clinical Research Network sustav bodovanja aktivnosti i fibroze

<b>NAFLD Activity Score (NAS): steatoza + lobularna upala + baloniranje ( raspon 0-8)</b>		
<b>Steatoza</b>	<b>Lobularna upala</b>	<b>Baloniranje hepatocita</b>
0: < 5%	0: nema	0: nema
1: 5%-33%	1: < 2	1: malo baloniranih stanica
2: 34-66%	2: 2-4	2: mnogo baloniranih stanica
3: > 66%	3: > 4	

Stadij fibroze: 0: nema; 1: 1a, blaga perisinusoidalna/pericelularna fibroza zone 3, 1b, umjerena perisinusoidalna/pericelularna fibroza zone 3, 1c, izolirana portalna/perportalna fibroza; 2: perisinusoidalna fibroza zone 3 i portalna/perportalna fibroza; 3: premoštavajuća fibroza; 4: ciroza.

### **1.1.7. Liječenje NAFLD**

Pristup bolesnicima s NAFLD s jedne strane obuhvaća liječenje same bolesti jetre, a s druge i liječenje pridruženih metaboličkih poremećaja poput pretilosti, dislipidemije i poremećene regulacije glikemije. Obzirom da je kod bolesnika s običnom steatozom prognoza vezano uz jetru odlična, ciljano liječenje jetrene bolesti trebalo bi obuhvatiti samo bolesnike s NASH-om.

U većem broju studija dokazano je da promjena životnih navika s ciljem redukcije tjelesne težine (redukcijska dijeta, redovita tjelesna aktivnost) dovodi do pada u vrijednostima transaminaza i smanjenja steatoze mjerene slikovnim tehnikama ili procijenjene histološki na kontrolnoj biopsiji (63-69). Utjecaj na poboljšanje patohistoloških promjena ovisi o razmjeru smanjenja težine, te je pokazano da redukcija težine u manjem opsegu (ali barem 3-5%) poboljšava samo steatozu, dok smanjenje težine za  $\geq 7\%$  odnosno  $\geq 9\%$  osim smanjenja steatoze dovodi i do poboljšanja u lobularnoj upali i baloniranju te smanjenja NAS (68, 69).

Učinak redovitog vježbanja bez redukcijske dijeta također je ispitivan u nekoliko studija, u kojima se u konačnici količina masti u jetri (procijenjena MR spektroskopijom) smanjila bez da je postignuta značajna promjena težine (70, 71).

Metformin je lijek koji smanjuje inzulinsku rezistenciju te bi prema mehanizmu svog djelovanja trebao imati povoljan učinak i na NAFLD kao jetrenu komponentu sindroma inzulinske rezistencije. Inicijalne studije pokazale su učinak na pad vrijednosti transaminaza, no skroman ili neznatan učinak na histologiju jetre (ev. blago smanjenje steatoze i upale) (72-74). Druge studije, uključujući veću randomiziranu kontroliranu studiju Haukelanda i sur. i nedavnu meta-analizu, nisu uspjele pokazati koristan učinak metformina niti na histološke promjene niti na razinu transaminaza (75-78).

Pioglitazon također spada u lijekove koji povećavaju osjetljivost na inzulin, te je njegova moguća uloga u terapiji NAFLD ispitivana u većem broju studija. Randomizirana studija Belforta i sur. na 55 bolesnika s NASH-om i intolerancijom glukoze ili dijabetesom pokazala je da pioglitazon značajno smanjuje razinu transaminaza i histološku izraženost steatoze, baloniranja i upale; smanjenje vrijednosti NAS zabilježeno je kod 73% liječenih bolesnika u usporedbi s 24% bolesnika na placebo (79). Aithal i sur. su u randomiziranoj studiji na 74 bolesnika pokazali učinak pioglitazona na smanjenje hepatocelularnog oštećenja i fibroze (80). Velika multicentrična PIVENS studija randomizirala je 247 bolesnika s NASH-om na terapiju pioglitazonom (30 mg/dan), vitaminom E (800IU/dan) ili placeboom tijekom 2 godine (81). Primarni cilj (smanjenje NAS za 2 ili više bodova bez povećanja fibroze) postignut je kod 34% bolesnika na pioglitazonu ( $P=0.04$  vs. placebo), u usporedbi s 19% na placebo i 43% na vitaminu E ( $P=0.001$  vs. placebo). Nestanak NASH-a zabilježen je kod 47% bolesnika na pioglitazonu u usporedbi s 21% na placebo ( $P=0.001$ ). Oba lijeka bila su povezana i sa smanjenjem steatoze i lobularne upale, kao i s padom vrijednosti transaminaza, a nisu imali učinak na promjenu izraženosti fibroze. Meta-analiza, koja je obuhvatila 5 randomiziranih kontroliranih ispitivanja, pokazala je da pioglitazon značajno poboljšava steatozu (OR: 4.05, 95 % CI: 2.58 – 6.35) i upalu (OR: 3.53, 95 % CI: 2.21 – 5.64), dok nema učinka na fibrozu (OR: 1.40, 95 % CI: 0.87 – 2.24) (78). U nedavno objavljenim smjernicama navedeno je da se pioglitazon može koristiti za liječenje NASH-a, iako dugotrajna sigurnost primjene i učinkovitost za ovu bolest još nisu utvrđeni (44).

Vitamin E je antioksidans čiji je učinak na NASH (stanje u kojem je oksidativni stres jedan od ključnih patogenetskih čimbenika) ispitivan u više studija (81-85). Iako su se metodološki dosta razlikovale, uglavnom je pokazano da vitamin E kod bolesnika s NASH-om dovodi do pada transaminaza i do smanjenja steatoze, upale i baloniranja hepatocita, bez učinka na fibrozu. Najveća među njima bila je prethodno opisana multicentrična PIVENS studija (81). Na temelju tih



rezultata, vitamin E se u smjernicama preporuča kao farmakoterapija prvog izbora kod bolesnika s NASH-om potvrđenim biopsijom koji nemaju dijabetes (44). Valja napomenuti još uvijek kontroverzno pitanje povećanja sveukupnog mortaliteta i rizika od raka prostate kod bolesnika na terapiji visokim dozama vitamina E, što je bilo zapaženo u dijelu studija i meta-analiza nevezanih za NAFLD.

Ursodeoksikolna kiselina (UDCA) također je ispitivana kao moguća terapija NAFLD i NASH-a. Većina studija bile su male 'pilot' studije, od kojih su neke pokazale mogući povoljan učinak UDCA u NAFLD, a jedina veća multicentrična randomizirana studija (na 166 bolesnika s NASH-om) pokazala je da UDCA što se tiče histoloških promjena i vrijednosti transaminaza ne pokazuje nikakvu razliku u učinku u odnosu na placebo (86).

Od ostalih lijekova, omega-3 masne kiseline i statini su u više malih studija pokazali mogući učinak na transaminaze i histologiju kod bolesnika s NASH-om, no zasad nedostaju prave randomizirane studije s histološki definiranim ciljevima koje bi potvrdile njihov učinak (87-90). Niz drugih lijekova ispitivan je kao potencijalna terapija NAFLD i NASH-a (fibrati, ezetimib, blokatori angiotenzinskih receptora, pentoksifilin, alopurinol, probiotici..), no bez značajnijih rezultata.

## **1.2. Metabolički sindrom i nealkoholna masna bolest jetre**

Metabolički sindrom, sindrom X ili sindrom inzulinske rezistencije nazivi su za konstelaciju metaboličkih abnormalnosti koja u konačnici znači povećan rizik kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa, a temeljne komponente čine abdominalna pretilost i inzulinska rezistencija. Inicijalno je definiran 1998. godine od strane Svjetske zdravstvene organizacije, a kasnije su se njegova

definicija i kriteriji donekle mijenjali na temelju niza kliničkih dokaza i analiza od strane više konsenzus konferencija i profesionalnih organizacija. Osnovna obilježja metaboličkog sindroma su centralni (abdominalni) tip pretilosti, hipertrigliceridemija, niski HDL kolesterol, hipertenzija i poremećena regulacija glikemije. U obilježja metaboličkog sindroma ubrajaju se i sindrom policističnih jajnika, NAFLD, hiperuricemija, te sindrom opstruktivne sleep apneje. Relativni rizik za kardiovaskularnu bolest kod bolesnika s metaboličkim sindromom u odsutnosti dijabetesa je 1.5-3 puta veći u odnosu na populaciju bez sindroma, a relativni rizik za razvoj dijabetesa je 3-5 puta veći.

Prevalencija metaboličkog sindroma u populaciji je visoka, te u Sjedinjenim Državama iznosi do 30%, dok je u populaciji Europskih zemalja nešto niža. Metabolički sindrom povezan je sa sedentarnim stilom života, a prevalencija raste sa starijom dobi. Procjenjuje se da oko 75% dijabetičara tipa 2 ima metabolički sindrom. Iako je centralna pretilost ključno obilježje sindroma, osobe normalne tjelesne težine također mogu imati inzulinsku rezistenciju i ostala obilježja sindroma.

Dijagnoza metaboličkog sindroma postavlja se na temelju konsenzusom postavljenih kriterija, aktualno najviše prema onima International Diabetes Federation (IDF) iz 2005. godine (91). Metabolički sindrom prisutan je ukoliko bolesnik ima centralni tip pretilosti (opseg struka  $\geq 94$  cm kod muškaraca odnosno  $\geq 80$  cm kod žena), uz barem dvije od preostale 4 sastavnice: hipertrigliceridemija (serumska vrijednost triglicerida  $\geq 1.7$  mmol/L ili terapija za hipertrigliceridemiju), snižen HDL kolesterol (HDL kolesterol  $< 1.03$  mmol/L kod muškaraca odnosno  $< 1.29$  mmol/L kod žena ili terapija za niski HDL), povišen krvni tlak (sistolički tlak  $\geq 130$  mmHg ili dijastolički tlak  $\geq 85$  mmHg ili antihipertenzivna terapija), povišena glikemija natašte (glukoza natašte  $\geq 5.6$  mmol/L) ili dijagnosticiran dijabetes tipa 2.

Osnovne mjere u liječenju metaboličkog sindroma sastoje se od redukcije tjelesne težine smanjenim unosom kalorija i provođenjem redovite tjelesne aktivnosti, što često dovodi i do poboljšanja u ostalim komponentama sindroma. Ostala terapija ovisi o prisutnim sastavnicama kod pojedinog bolesnika. U liječenju hipertenzije vezane uz metabolički sindrom inicijalni lijekovi izbora su ACE inhibitori ili blokatori receptora angiotenzina II, jer između ostalog i smanjuju učestalost novonastalog dijabetesa. Kod dijabetesa, agresivna kontrola glikemije može povoljno utjecati ne samo na komplikacije bolesti već i na vrijednosti triglicerida i HDL kolesterola. Metformin i tiazolidinedioni povećavaju inzulinsku osjetljivost, te povoljno djeluju i na druge komponente sindroma poput policističnih jajnika i NAFLD.

Što se tiče NAFLD i metaboličkog sindroma, danas je sasvim jasno da NAFLD predstavlja njegovu jetrenu komponentu. Točna prevalencija NAFLD i NASH-a u populaciji koja ispunjava kriterije za metabolički sindrom nije poznata, no o visokoj prevalenciji indirektno svjedoče studije u kojima je demonstrirana učestalost histološki definiranog NAFLD od 85-98% u populaciji morbidno pretilih, odnosno prevalencija ultrazvučno definiranog NAFLD od 62-69% u populaciji bolesnika s dijabetesom tipa 2 (29-31). U više studija jasno je potvrđena visoka učestalost metaboličkog sindroma kod bolesnika s dijagnosticiranom NAFLD, te se ona ovisno o metodologiji pojedine studije kretala oko 50 do 70% (92-94). Također je uočeno da prisutnost kriterijima definiranog metaboličkog sindroma znači i veći rizik prisutnosti NASH-a među bolesnicima s NAFLD, te veću vjerojatnost izražene fibroze. U studiji Marchesini i sur. na 163 bolesnika s patohistološki dokazanim NAFLD, 88% bolesnika s NASH-om imalo je metabolički sindrom u usporedbi s 53% bolesnika s običnom steatozom, što je značilo oko 3 puta veći rizik NASH-a (OR, 3.2; 95% CI, 1.2-8.9), te oko 3 puta veći rizik izražene fibroze (OR, 3.5; 95% CI, 1.1-11.2) kod bolesnika koji su ispunjavali kriterije za metabolički sindrom (93). I u drugim

studijama dokazana je povezanost ispunjavanja kriterija za metabolički sindrom s izraženijim patohistološkim karakteristikama, odnosno težim oblicima bolesti (95, 96).

Od pojedinih sastavnica sindroma, veći broj studija pokazao je da su dijabetes i pretilost najbolji prediktori težih patohistoloških oblika bolesti, uključujući izraženost steatohepatitisa te uznapređovalost fibroze i njenu progresiju (92, 97-99). Nasuprot tome, ostale sastavnice metaboličkog sindroma najčešće u studijama nisu individualno korelirale s težinom bolesti.

U studiji Haukelanda i sur. poremećena regulacija glikemije bila je jedini nezavisni prediktor za NASH (OR: 3.14; 95% CI: 1.20-8.23), odnosno fibrozu (OR: 3.83; 95% CI: 1.29-11.40) (92).

Utjecaj dijabetesa i stupnja pretilosti i na progresiju bolesti, odnosno progresiju fibroze, dokazan je u linearnim studijama s ponavljanim biopsijama, gdje su to također bili jedini nezavisni prediktori progresije (2, 4, 100). U studiji Younossi i sur. bolesnici s NAFLD i dijabetesom imali su inicijalno izraženije patohistološke promjene u odnosu na one bez dijabetesa, te su kasnije znatno češće razvili cirozu (25% prema 10%) (101).

U konačnici, može se zaključiti da je populacija koja ispunjava kriterije za metabolički sindrom, kao i populacija dijabetičara i morbidno pretilih, onaj dio opće populacije kod koje možemo ne samo očekivati visoku učestalost NAFLD, već i očekivati prisutnost uznapređovalijih oblika bolesti prilikom postavljanja dijagnoze i bržu progresiju bolesti tijekom praćenja. Probir za NAFLD kod bolesnika s metaboličkim sindromom ili dijabetesom i urednim vrijednostima jetrenih biokemijskih testova zasad u smjernicama nije preporučen, obzirom na značajne nedostatke vezane uz spoznaje o optimalnoj dijagnostici, liječenju i dugoročnoj koristi od eventualnog sustavnog probira (44). Takav stav bi se lako mogao promijeniti kroz nova saznanja u skorijoj budućnosti.

## **1.3. Gama-glutamil transpeptidaza**

### **1.3.1. Općenito o enzimu**

Gama-glutamil transpeptidaza (GGT) je enzim koji se nalazi na membranama stanica i sudjeluje u obrani od oksidativnog stresa putem ekstracelularne razgradnje glutaciona i omogućavanjem dostupnosti njegovih sastavnih aminokiselina stanicama (102). Iako je osim u hepatocitima i stanicama bilijarnog epitela GGT prisutan i u drugim organima (bubrezi, gušterača, mozak), enzim koji se nalazi u serumu zdravih osoba potječe iz jetre, te se mjerenje njegove aktivnosti već dugo vremena primarno koristi kao osjetljiv pokazatelj prisutnosti ili odsutnosti hepatobilijarne bolesti (103). Iako je njegovom primarnom ulogom tradicionalno smatrana detekcija kolestaze zajedno s alkalnom fosfatazom (AF), povišene vrijednosti GGT redovito su prisutne kod hepatocelularnog oštećenja. Osjetljivost GGT u detekciji primarnih bolesti jetre je preko 90%, te je još prije više od 30 godina navedeno da je GGT u usporedbi s drugim jetrenim testovima najsenzitivniji indikator bolesti jetre (104, 105). S druge strane, obzirom da je povišen u gotovo svim vrstama jetrenih bolesti, GGT nema toliku ulogu u diferencijalnoj dijagnozi hepatobilijarne bolesti. Opseg njegovog povišenja znatno varira, a općenito najviše vrijednosti nalaze se kod bilijarne opstrukcije, jetrenih metastaza, ciroze i alkoholne bolesti jetre (102). Među drugim mogućim uzrocima povišenja GGT najvažnija je ingestija alkohola, te određeni lijekovi poput fenitoina i barbiturata, koji uzrokuju povišenje aktivnosti indukcijom enzima (106, 107).

### **1.3.2. Gama-glutamil transpeptidaza i dijabetes**

Više starijih studija, provedenih u doba kada je NAFLD bio slabije poznat entitet, utvrdilo je veću učestalost povišenog GGT kod dijabetičara, no u nekim studijama nije bilo jasne razlike u odnosu

na populaciju bez dijabetesa (108). U studiji Colloredo-Mels i sur. koja je uključila 351 dijabetičara i 260 kontrola, prevalencija izolirano povišenog GGT bila je 17.5% kod muškaraca i 16% kod žena, u usporedbi sa 23% i 14.5% u kontrolnoj skupini (108). U studiju nisu bili uključeni ispitanici koji su imali povišen neki od ostalih jetrenih biokemijskih testova, kao ni oni s ultrazvučno promjenjenim jetrenim parenhimom (valja uzeti u obzir da se radi o 1988. godini). S druge strane, usporedni podaci o učestalosti povišenog ALT i GGT u populacijskim studijama bolesnika s dijabetesom najčešće nisu dostupni, ili su nekonzistentni i proizlaze iz analiza manjih skupina bolesnika (109-112). Jedina veća studija koja je detaljnije analizirala pitanje povišenih jetrenih biokemijskih testova u dijabetesu je studija Miyake i sur., koja je uključila ukupno 1211 bolesnika s poremećenom regulacijom glikemije ili dijabetesom (110). Udio povišenih vrijednosti ALT i GGT bio je 9.5% i 27.6% kod 116 bolesnika s povišenom glikemijom natašte, 7.7% i 29.3% kod 750 bolesnika s intolerancijom glukoze, 18.0% i 49.4% kod 233 bolesnika s novootkrivenim dijabetesom tipa 2, te 3.6% i 31.3% kod 112 bolesnika s liječenim dijabetesom. Kod kontrola s normalnom regulacijom glikemije povišen ALT nađen je kod 3.5%, a povišen GGT kod 19.4% ispitanika. Postoje i članci u kojima se spominje da je povišenje ALT najčešća abnormalnost jetrenih enzima u bolesnika s dijabetesom, bez navođenja konkretnih dokaza (113). Posljednjih desetak godina, više epidemioloških longitudinalnih studija koje su proučavale incidenciju dijabetesa konzistentno su pokazale da je razina GGT čvrst prediktor kasnije pojave dijabetesa, čak i ako se radi o vrijednostima koje su unutar referentnih (114-117). Interesantno, NAFLD se u tim radovima uglavnom ne spominje u tumačenju povezanosti GGT i dijabetesa. Osim s nastankom dijabetesa, GGT je također pokazao povezanost i sa kardiovaskularnim incidentima. U meta-analizi koja je obuhvatila 10 populacijskih studija, izračunat je 'adjusted hazard ratio' od 1.34 (95% CI: 1.22-1.48) za nastanak kardiovaskularnog incidenta po 1 logaritamskoj jedinici GGT (118). Predloženo je da bi GGT, osim kao rani 'subklinički' marker

NAFLD, s navedenim stanjima mogao biti povezan i kao marker oksidativnog stresa, koji je dokazano važan čimbenik u patogenezi svih stanja povezanih s metaboličkim sindromom.

### **1.3.3. Gama-glutamil transpeptidaza i nealkoholna masna bolest jetre**

Vezano uz NAFLD, GGT se u preglednim člancima, uključujući one često citirane, najčešće navodi zajedno s alkalnom fosfatazom kao enzim čije su vrijednosti često blaže povišene, ali od sekundarnog značenja i bez veće koristi u dijagnostici bolesti (119, 120). U NAFLD smjernicama American Gastroenterological Association iz 2002. GGT se ne navodi kao parametar kojeg je potrebno određivati kod bolesnika sa suspektnom NAFLD, a napominje se da je malo podataka o učestalosti i stupnju povišenosti GGT u NAFLD-u (121, 122). U preglednom članku Schreudera i sur. iz 2008. navodi se da je u NAFLD-u moguće naći povišene vrijednosti GGT i alkalne fosfataze, no da nije poznato s kojom učestalosti (123). Također, brojne epidemiološke studije u kojima nije provedena biopsija jetre koristile su kao surogat za dijagnozu NAFLD samo povišene vrijednosti ALT-a, dok je GGT izostavljan (113, 124, 125). U velikoj epidemiološkoj studiji o prevalenciji i etiologiji povišenih jetrenih biokemijskih testova u američkoj populaciji (koja je uključila preko 15.000 ispitanika), kao povišeni jetreni enzimi uzimane su samo vrijednosti AST i ALT, dok GGT nije određivan (126). Nadalje, dio studija koje su istraživale korelaciju kliničkih i laboratorijskih varijabli s prisutnosti NASH-a i pojedinim histološkim karakteristikama bolesti ignoriralo je GGT u analizama (127, 128).

Nekoliko studija dosad je pokazalo da je učestalost histološki definiranog NASH-a kod bolesnika s NAFLD-om i urednim transaminazama gotovo identična onoj kod bolesnika s povišenim transaminazama (28, 99, 129-131). Međutim, u 4 od 5 navedenih studija vrijednosti GGT nisu uzimane u obzir pri analizi, već su kao skupine s urednim enzimima definirani bolesnici s urednim

ALT ili urednim ALT i AST, neovisno o vrijednostima GGT. U preostaloj studiji kao skupina s povišenim enzimima uzimani su oni bolesnici s povišenjem  $\geq 1.5x$  iznad gornje granice normale (99).

S druge strane, vrijednosti ALT u studijama najčešće nisu pokazivale povezanost i prediktivnu vrijednost za steatohepatitis, više stupnjeve nekroinflamatorne aktivnosti i izraženiju fibrozu (3, 128, 132-135). Štoviše, u studiji Dixona i sur. u kojoj je dokazan značajan učinak redukcije tjelesne težine barijatrijskim liječenjem na histološko poboljšanje i regresiju NASH-a, GGT je bio najbolji prediktor histološkog poboljšanja, dok se ALT nije pokazao prediktorom (136). U analizi pedijatrijske podskupine bolesnika s NAFLD uključenih u studije NASH CRN, uz AST je i porast vrijednosti GGT bio nezavisno povezan s jačom izraženosti steatohepatitisa, a ALT nije pokazao povezanost (133). Nadalje, u studiji Tahana i sur. ekspresija markera apoptoze u tkivu jetre kod NAFLD-a bila je znatno viša kod bolesnika s povišenim GGT, a više vrijednosti GGT bile su povezane i sa višim stadijem fibroze (137). Iako se u nekim drugim studijama GGT nije pokazao kao prediktor težih oblika bolesti (3, 127, 128), važno je imati na umu i značajnu heterogenost metodologije studija, naročito po pitanju selekcije bolesnika za biopsiju jetre. Za procjenu prediktorne vrijednosti GGT za prisutnost NASH-a i izraženijih patohistoloških obilježja bolesti bilo bi važno biopirati i uključiti u studiju i bolesnike kod kojih je povišenje GGT jedina abnormalnost, što obično nije bio slučaj.

Pretraživanjem dosad objavljene literature vezane za NAFLD nije bilo moguće pronaći podatke o učestalosti izolirano povišenih vrijednosti GGT u NAFLD-u, kao ni o histološkom spektru bolesti i kliničkim karakteristikama bolesnika s izolirano povišenim GGT.



## 1.4. Ostali jetreni biokemijski testovi u nealkoholnoj masnoj bolesti jetre

Dijagnoza NAFLD često se postavlja nakon slučajnog nalaza blaže povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova. Oni su jednostavni, ekonomični, te kao i kod drugih bolesti jetre obično služe kao prva linija probira za prisutnost jetrenog oštećenja. Međutim, veći dio bolesnika s NAFLD u bilo kojem promatranom trenutku zapravo ima uredne vrijednosti enzima (5, 138). Enzimi koji su u NAFLD najčešće povišeni su ALT i GGT, dok se povišene vrijednosti AST nalaze nešto rjeđe (53). Vrijednosti ALT obično su više od AST, a rijetko prelaze razinu trostruke vrijednosti gornje granice normale. Alkalna fosfataza također može biti blago povišena kod nekih bolesnika, no to se viđa relativno rijetko, a još rjeđe je povišena alkalna fosfataza jedina uočljiva abnormalnost u jetrenim biokemijskim testovima (139). U oblicima bolesti s uznapredovalom fibrozom odnosno razvijenom cirozom, vrijednosti enzima su obično niže (tzv. 'burnt out NASH') (98).

Od navedenih enzima, kod sumnje na jetrenu bolest vrlo često se ALT uzima kao najčvršći marker prisutnosti NASH-a ili druge ozbiljne kronične bolesti jetre. Opravdanost takvog stava je međutim vrlo diskutabilna, posebno ako se razmotre rezultati niza studija koje su ispitivale odnos razine jetrenih biokemijskih testova prema histološkoj težini bolesti, uključujući izraženost upale ili fibroze i njihovu progresiju/regresiju na kontrolnim biopsijama. Iako su, kao i same studije, rezultati dosta heterogeni, u njima se ipak mogu zapaziti određeni obrasci.

Enzim koji je u studijama najčešće pokazivao korelaciju s patohistološkim nalazom je AST. U studijama Fotiadu i sur. i Patton i sur. AST je bio nezavisni prediktor definitivnog NASH-a ( $NAS \geq 5$ ), odnosno porast AST je korelirao s jačom izraženosti NASH-a (OR 1.017 po U/L, 95% CI 1.004–1.031) (128, 133). U drugoj od navedenih studija korelaciju s izraženosti NASH-a

pokazao je i GGT, a porast AST je osim toga korelirao i s izraženosti fibroze (OR 1.015 po U/L, 95% CI 1.006–1.024) (133). Osim same vrijednosti AST, omjer AST/ALT veći od jedan također se ponavljano pokazao prediktorom uznapredovale fibroze (premoštavajuće fibroze ili ciroze) (97, 98). U longitudinalnim studijama, progresija fibroze uočena na kontrolnoj biopsiji također je najčešće korelirala s razinom AST u vrijeme te druge biopsije. U studiji Harrisona i sur. AST je osim fibroze korelirao i sa pogoršanjem nekroinflamatorne aktivnosti, a u studiji Ekstedta i sur. je osim AST korelaciju s progresijom fibroze pokazao i ALT (3, 4). Nasuprot ovim rezultatima, u studiji Adamsa i sur. nijedan od enzima nije pokazao korelaciju s progresijom fibroze na kontrolnoj biopsiji, iako je pad vrijednosti ALT bio povezan sa smanjenjem upalne aktivnosti i izraženosti steatoze (2).

Za razliku od AST, ALT osim u dva navedena primjera iz longitudinalnih studija i jedne od studija Dixona i sur. redovito nije pokazivao povezanost s patohistološkim karakteristikama bolesti (3, 127, 128, 132-135). U studiji Kunde i sur. osjetljivost povišenog ALT za dijagnozu NASH-a ispitana u velikoj kohorti žena podvrgnutih barijatrijskom kirurškom liječenju bila je slaba, oko 40% (134). U studiji Wonga i sur., od 19 bolesnika s ALT manjim od prepolovljene vrijednosti gornje granice normale njih 8 (42%) je imalo steatohepatitis a 3 (16%) značajnu fibrozu (135). U analizi dosad najveće sakupljene kohorte dobro karakteriziranih bolesnika s NAFLD (kohorta NASH CRN), ispitivana je dijagnostička točnost 3 različite gornje granične vrijednosti ALT u detekciji NASH-a (98). Za konzervativne vrijednosti od 19 U/L za žene i 30 U/L za muškarce, osjetljivost za detekciju NASH-a bila je 99%, a specifičnost samo 8%; za laboratorijski definiranu gornju granicu referentnih vrijednosti osjetljivost je bila 74% a specifičnost 45%; za granicu postavljenu na 40 U/L za oba spola, osjetljivost je bila 86% a specifičnost 32%. Kao što je vidljivo, upotreba bilo koje od ovih vrijednosti gornje granice

normale nije pokazala zadovoljavajuću dijagnostičku preciznost na temelju koje bi ALT mogao biti pouzdan pokazatelj prisutnosti NASH-a kod bolesnika s NAFLD.

Više studija je dosad analiziralo klinički i histološki spektar NAFLD kod bolesnika s urednim vrijednostima ALT odnosno urednim transaminazama. Sve navedene studije pokazale su da je učestalost histološki definiranog NASH-a i izraženost pojedinih histoloških karakteristika uključujući steatozu, nekroinflamatornu aktivnost i fibrozu gotovo identična kod bolesnika s urednim ALT odnosno urednim transaminazama i onih s povišenim vrijednostima tih enzima (28, 99, 129-131). Tim studijama dokazano je da se cjelokupni spektar NAFLD uključujući izraženu upalu te uznapređovalu fibrozu i cirozu može naći i kod bolesnika s potpuno urednim vrijednostima ALT i AST.

## **1.5. Svrha istraživanja**

Podaci dostupni u literaturi vezano uz prevalenciju povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova u populaciji bolesnika s dijabetesom su manjkavi. Radi se većinom o člancima starijeg datuma koji su objavljeni u vrijeme kada nealkoholna masna bolest jetre nije bila toliko poznat entitet, ili pak o analizama manjih skupina bolesnika. Predloženi retrospektivni dio studije bi obzirom na veličinu uzorka predstavljao znatan doprinos dosad objavljenim podacima, te bi dodatno rasvijetlio odnos učestalosti povišenog GGT prema učestalostima povišenja ostalih enzima, i to ne samo konkretno u analiziranoj populaciji dijabetičara, već indirektno i kod bolesnika s NAFLD općenito.

Iako su u dosad objavljenim studijama ispitivane korelacije vrijednosti jetrenih biokemijskih testova sa prisutnosti i izraženosti NASH-a ili fibroze, rezultati su dosta heterogeni, a detaljnu

analizu i usporedbu koreliranja enzima sa pojedinačnim histološkim značajkama ili kliničkim karakteristikama teško je pronaći. Ne postoje podaci o učestalosti i značaju izolirano povišenog GGT u NAFLD-u, kao ni o histološkom spektru bolesti i kliničkim karakteristikama kod te podskupine bolesnika. Također ne postoje dokazi prema kojima bi ALT u detekciji i dijagnostici NAFLD bio vredniji pokazatelj od GGT, što je uvriježeno mišljenje kod znatnog dijela liječnika. Obzirom na navedene manjkavosti u dosad objavljenim podacima, te na učestalost pojave izolirano povišenog GGT i znatnu raznolikost pristupa tim bolesnicima, kao i na ignoriranje GGT u znatnom broju dosadašnjih studija, predložena studija mogla bi imati utjecaj i na svakodnevnu kliničku praksu i na metodologiju budućih istraživanja.

## 2. HIPOTEZA

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja temelji se na opservaciji iz kliničke prakse da je kod bolesnika s rizičnim čimbenicima za nealkoholnu masnu bolest jetre (NAFLD), odnosno onih kod kojih postoji sumnja na NAFLD vrijednost gama-glutamil transpeptidaze (GGT) znatno češće povišena iznad referentnih vrijednosti u odnosu na ostale jetrene biokemijske testove - alanin aminotransferazu (ALT), aspartat aminotransferazu (AST), te alkalnu fosfatazu (AF). Nadalje, istraživanje se temelji na opservaciji da se i u kliničkoj praksi i u znanstvenoj literaturi vezanoj uz NAFLD vrijednosti GGT relativno često ne uzimaju u razmatranje, što nema nikakvu podlogu u dosad objavljenim podacima. Naprotiv, u pojedinim studijama upravo je GGT pokazao najbolju korelaciju s određenim značajkama bolesti poput stadija fibroze ili pak histološkog poboljšanja na kontrolnoj biopsiji nakon barijatrijskog liječenja.

Na temelju tih opservacija, hipoteze koje smo pokušali dokazati u sklopu ovog istraživanja su slijedeće:

1. U usporedbi prevalencije povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova u populaciji bolesnika s dijabetesom tipa 2 (populacija s najznačajnijim rizičnim faktorom za NAFLD i izrazito visokom prevalencijom NAFLD), prevalencija povišenosti pojedinih enzima se razlikuje, i učestalost povišenog GGT je značajno viša od učestalosti povišenog ALT, AST ili AF.

2. Nema razlike u težini bolesti, histološkom spektru i pojedinim značajkama bolesti kod bolesnika s NAFLD kod kojih su izolirano povišene vrijednosti GGT u odnosu na bolesnike kod kojih su povišene vrijednosti ALT i/ili AST. Histološki uznapredovali oblici bolesti jednako su

zastupljeni u obje navedene skupine bolesnika, te se stoga nalaz izolirano povišenog GGT ne bi trebao zanemarivati.

3. U usporedbi koreliranja vrijednosti enzima s histološkim i kliničkim značajkama NAFLD, GGT moguće pokazuje bolju korelaciju od ALT, a time i veću dijagnostičku i prediktivnu vrijednost.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja je potvrditi i jasno definirati važnost povišenih vrijednosti gama-glutamil transpeptidaze u dijagnostici NAFLD, posebno u smislu otkrivanja nealkoholnog steatohepatitisa i procjene težine bolesti kod pojedinog bolesnika. Obzirom da takvi podaci trenutno nisu dostupni, od posebnog je interesa definirati učestalost i značaj povišenih vrijednosti GGT u situacijama u kojima su vrijednosti ostalih jetrenih biokemijskih testova (AST, ALT, alkalna fosfataza) ponavljano uredne. Obzirom da se nalaz GGT u kliničkoj praksi u određenim sredinama često zanemaruje, a slično se primjećuje i u značajnom dijelu epidemioloških, dijagnostičkih i terapijskih studija vezanih uz NAFLD, cilj je utjecati na promjenu takve prakse u budućnosti, odnosno poboljšati preciznost u dijagnostici bolesnika s bolestima jetre i utjecati na metodologiju budućih istraživanja.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Retrospektivno odrediti i usporediti prevalenciju povišenih vrijednosti GGT i povišenih vrijednosti ALT, AST i AF u velikoj kohorti bolesnika s dijabetes melitusom tipa 2 (cjelokupnoj populaciji dijabetičara koji se kontroliraju na Poliklinici Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu). Navedena populacija pogodna je za takvu analizu obzirom da se radi o populaciji bolesnika koji, uz populaciju izrazito pretilih, imaju najznačajniji rizični faktor za prisutnost NAFLD, kao i za prisutnost uznapredovalijih oblika NAFLD, te je to populacija koja, uz morbidno pretile, ima najveću zabilježenu prevalenciju NAFLD (do 70%). Važno je napomenuti da su dosad objavljeni podaci o vrijednostima jetrenih

biokemijskih testova u dijabetičkoj populaciji prilično heterogeni i potječu iz literature starijeg datuma, te bi naši podaci bitno doprinijeli boljem razumijevanju stvarne prevalencije povišenih vrijednosti ovih enzima kod dijabetičara.

2. Prospektivno sakupiti, pohraniti i obraditi podatke bolesnika sa klinički postavljenom sumnjom na NAFLD kod kojih je zatim učinjena biopsija jetre, te učiniti slijedeće analize:

- u sakupljenoj kohorti bolesnika kod kojih je potvrđen NAFLD definirati učestalost i izraženost pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma i ostale relevantne kliničke, laboratorijske i demografske parametre, te definirati histološki spektar bolesti uključujući prisutnost NASH-a, učestalost i izraženost pojedinih patohistoloških značajki bolesti, stupanj i stadij bolesti prema uvriježenim sustavima histološkog bodovanja i vrijednosti NAFLD Activity Score

- definirati učestalost povišenih vrijednosti pojedinih enzima u našoj kohorti bolesnika, te usporediti skupinu bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnike s povišenim ALT prema svim demografskim, kliničkim, laboratorijskim i histološkim parametrima

- odrediti i usporediti koreliranje vrijednosti jetrenih biokemijskih testova te dijela ostalih kliničkih i laboratorijskih parametara s patohistološkom težinom bolesti uključujući stupanj nekroinflamatorne aktivnosti, stadij fibroze i vrijednosti NAFLD Activity Score



## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Prvi dio istraživanja - retrospektivno određivanje i usporedba prevalencije povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova kod bolesnika s dijabetes melitusom tipa 2

U svrhu dokazivanja prve hipoteze, odnosno postizanja prvog cilja istraživanja (određivanje i usporedba prevalencije povišenih vrijednosti GGT i povišenih vrijednosti ALT, AST i AF u velikoj kohorti bolesnika s dijabetes melitusom tipa 2), pregledane su sve dostupne ambulantne povijesti bolesti bolesnika koji se kontroliraju na Poliklinici Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Interne klinike Kliničkog bolničkog centra 'Sestre milosrdnice' u Zagrebu. Povijesti bolesti bile su dostupne u elektronskom obliku, koristeći bazu podataka Crodiab, te su pregledane povijesti bolesti ukupno 1011 bolesnika, od čega 913 bolesnika s dijabetesom tipa 2. U studiju su uključeni svi bolesnici s dijabetesom tipa 2 i dostupnim podacima o vrijednostima jetrenih biokemijskih testova. Osim vrijednosti jetrenih enzima, zabilježeni su i kasnije analizirani podaci o dobi, spolu, indeksu tjelesne mase, vrijednostima lipida u serumu, vrijednostima HbA1c, konkomitantnim bolestima, konzumaciji alkohola, te lijekovima koje bolesnik koristi. Vrijednosti enzima uspoređene su sa referentnim vrijednostima prema spolu i dobi, te su za svakog bolesnika klasificirane kao normalne ili povišene. Nakon prikupljanja podataka i navedene klasifikacije, učinjena je analiza i izračunavanje prevalencije povišenih vrijednosti enzima. Zatim je učinjena usporedba prevalencije povišenih vrijednosti enzima među pojedinim enzimima, te analiza prema spolu, dobi, indeksu tjelesne mase, prisutnosti dislipidemije, vrijednostima HbA1c, te pojedinim lijekovima.

## **4.2. Drugi dio istraživanja - prospektivna studija bolesnika sa klinički postavljenom sumnjom na NAFLD kod kojih je zatim učinjena biopsija jetre**

U drugom, prospektivnom dijelu istraživanja, vezanom uz ciljeve definirane pod drugom točkom u poglavlju Ciljevi istraživanja, za uključivanje u istraživanje razmotreni su redom svi bolesnici pregledani na Poliklinici Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC 'Sestre milosrdnice' zbog povišenih jetrenih biokemijskih testova ili iz nekog drugog razloga koji bi upućivao na kroničnu bolest jetre. Nakon inicijalne ambulantne obrade, bolesnicima kod kojih su na temelju laboratorijskih nalaza i anamnestičkih podataka isključene ostale bolesti jetre te je postavljena sumnja na NAFLD, ili uzrok lezije jetre nije bio jasan a diferencijalnodijagnostički je uključivao NAFLD, predložena je biopsija jetre. Bolesnici koji su pristali na biopsiju uključeni su u istraživanje i kasnije analize. U ostalim slučajevima (pozitivna serologija na hepatitis, nalazi u smislu autoimune bolesti jetre, anamneza u skladu s oštećenjem jetre lijekovima i sl.) postupano je u skladu s uobičajenom kliničkom praksom, te ti bolesnici nisu bili obuhvaćeni istraživanjem. Prilikom hospitalizacije na gastroenterološkom odjelu radi izvođenja biopsije jetre uzeta je ponovno detaljna anamneza i klinički status, uključujući i detaljan upitnik o sadašnjoj i prošloj konzumaciji alkohola i uzimanju bilo kakvih lijekova i alternativnih pripravaka, te antropometrijska mjerenja (tjelesna visina, tjelesna masa, opseg struka, opseg bedra). Bolesnici su potpisali informirani pristanak i suglasnost u kojem potvrđuju upotrebu njihovih anamnestičkih, kliničkih, laboratorijskih, patohistoloških i ostalih nalaza svrhu predložene studije. Prilikom hospitalizacije proučeni su svi njihovi raniji laboratorijski i ostali nalazi, te su dodatno učinjene pretrage koje su eventualno nedostajale a nužne su u dijagnostici kroničnog jetrenog oštećenja i predviđene u okviru studije (Tablica 4.2.1.). Osim toga, svim bolesnicima učinjen je ultrazvuk abdomena i novi rutinski laboratorijski nalazi uključujući nalaze

jetrenih biokemijskih testova. Svi podaci zapisani su u studijsku test listu, koja je uz kopiju anamneze, otpusnog pisma i patohistološkog nalaza biopsije jetre te informirani pristanak pohranjena na za to predviđenom mjestu u prostoriji dostupnoj samo osoblju uključenom u studiju. Laboratorijski i ostali podaci zabilježeni ili određeni prilikom dolaska na biopsiju jetre prikazani su u Tablici 4.2.1.

Biopsija jetre učinjena je na standardni način, interkostalnim putem uz upotrebu Menghinijeve igle, uz prethodni prikaz područja biopsije ultrazvukom. Patohistološka analiza tkiva jetre dobivenog biopsijom učinjena je dva puta: prvi put odmah nakon učinjene biopsije jetre, prema ustaljenoj kliničkoj praksi, a drugi puta na kraju istraživanja, kada su od strane jednog patologa uključenog u istraživanje ponovno pregledane sve biopsije. Već kod prve analize, u dogovoru s patolozima u našoj ustanovi, učinjeno je, uz standardni pregled i opis preparata, ukoliko se patohistološki radilo o NAFLD-u odmah i stupnjevanje nekroinflamatorne aktivnosti i određivanje stadija fibroze prema Brunt i sur. i određivanje NAFLD Activity Score i stadija fibroze prema NASH CRN. Patohistološki nalaz je po prispjeću pohranjen s ostalim prethodno navedenim dokumentima na za to predviđenom mjestu.

Dodatni bolesnici obuhvaćeni ovim istraživanjem (njih ukupno 39) su bolesnici kod kojih je dijagnostička obrada uključujući biopsiju jetre učinjena na Zavodu za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb. Obuhvaćeni su bolesnici hospitalizirani radi biopsije jetre u periodu od rujna 2010. do kolovoza 2012. godine. Kod svih bolesnika proučena je kompletna elektronska medicinska dokumentacija, koja je bila dostupna putem 'Bolničkog informatičkog sustava' (BIS) i informatičkog sustava 'ISSA Anywhere'. Pregledane su sve ambulantne povijesti bolesti, laboratorijski nalazi, patohistološki nalazi biopsije jetre, te otpusna pisma, te su bolesnici selekcionirani prema istim prethodno opisanim principima. Svi

dostupni podaci zabilježeni su na isti način kao što je prethodno opisano za bolesnike obrađivane u KBC Sestre milosrdnice.

**Tablica 4.2.1.** Laboratorijski i ostali podaci zabilježeni ili određeni prilikom dolaska na biopsiju jetre

Tjelesna visina	T3, T4, TSH
Tjelesna težina	ALT (vrijednosti iz svih nalaza)
Indeks tjelesne mase	AST (vrijednosti iz svih nalaza)
Opseg struka	GGT (vrijednosti iz svih nalaza)
Opseg bedra	Alkalna fosfataza (vrijednosti iz svih nalaza)
Krvni tlak	Bilirubin
Anamneza hipertenzije	Kreatin-kinaza
Dijabetes tip 2, trajajne	Laktat dehidrogenaza
GUK natašte	Elektroliti u serumu
OGTT 0-2h	Kompletna krvna slika
HbA1c	Sedimentacija
Trigliceridi u serumu	CRP
Kolesterol ukupni	Fibrinogen
LDL kolesterol	PV, APTV
HDL kolesterol	Urea
UZV nalaz jetre (veličina, ehogenost, pravilnost kontura)	Kreatinin
Markeri virusnih hepatitisa:	Ukupni proteini
HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, anti-HCV, anti-HAV	Albumini
Antinuklearna antitijela (ANA)	Alfa-1-globulini
Antimitohondrijska antitijela (AMHA)	Alfa-2-globulini
Antitijela na glatku muskulaturu (AGLM)	Beta-globulini
Antitijela na mikrosome jetre i bubrega (LKM-1)	Gama-globulini
Antineutrofilna citoplazmatska antitijela (ANCA)	Ukupni IgG
Antitijela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG)	Ukupni IgA
Bakar u serumu	Ukupni IgM
Bakar u 24h-urinu	
Ceruloplazmin	
Fe, UIBC, TIBC	
Saturacija transferina	
Feritin	
Alfa-1 antitripsin u serumu	

Iz arhiva Zavoda za patologiju KBC Zagreb dobiveni su patohistološki preparati biopsija jetre od svih 39 bolesnika obuhvaćenih istraživanjem, koji su zatim pregledani od istog patologa koji je ponovno gledao i biopsije ostalih bolesnika. Patolog je preparate svih bolesnika obuhvaćenih istraživanjem gledao bez uvida u raniji, službeni nalaz patohistološkog opisa i dijagnoze.

Patohistološka analiza uključivala je, uz postavljanje dijagnoze NAFLD, postavljanje dijagnoze NASH-a prema navedenim minimalnim kriterijima (steatoza, lobularna upala, baloniranje/apoptoza/nekroza), gradiranje nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze prema sustavu Brunt i sur., određivanje NAS (NAFLD Activity Score), te detaljno semikvantitativno bodovanje svih pojedinih histoloških značajki koje nalazimo u NAFLD-u na način kako je to izvedeno u radovima Brunt i sur. i Kleiner i sur. prilikom razvoja spomenutih sustava bodovanja (61, 62). Pojedine patohistološke značajke zabilježene i analizirane u sklopu studije uključile su: izraženost steatoze, baloniranje hepatocita, intraacinarnu (lobularnu) upalu, portalnu upalu, Malloryev hijalin, acidofilna (apoptotična) tjelešca, glikogenirane jezgre, nakupljanje željeza, te perisinusoidalnu, portalnu i premoštavajuću fibrozu.

Podaci vezani za patohistološku analizu zabilježeni su u posebnu patohistološku test listu, koja je prikazana na Slici 4.2.1.

**Slika 4.2.1.** Patohistološka test lista predviđena za upisivanje podataka od strane patologa tijekom ponovnog očitavanja biopsija u završnom dijelu istraživanja

Ime i prezime pacijenta	
Broj biopsije	
Steatosa	Postotak zahvaćenih hepatocita na malom do srednjem povećanju: <5%      5-33% 33-66%    >66%
Balonziranje hepatocita	Nema Mali broj baloniranih stanica Prominentna balonziranje
Intraćelularna (lobularna) upala	Broj upalnih žarišta na povećanju 200x Nijedno žarište 1 žarište 2 žarišta 3 žarišta 4 žarišta >4 žarišta
Portalna upala	nema blaga umjerena izražena
Malloryeva tjelesca	Ima Nema
Apoptična (acidofilna) tjelesca	Ima Nema
Glikogeninane jezgre	Ima Nema
Hepatoćelularno zbijanje	prema Seattle: 0    1+    2+ 3+    4+

Fibроза	1A: blaga zone 3 perisinusoidna 1B: umjerena zone 3 perisinusoidna 1C: portalna/periportalna 2: i perisinusoidna i portalna/periportalna 3: premošćavajuća fibroza 4: ciroza
Nekroinflammatory stupanj prema Brunt	
Stadij fibroze prema Brunt	
NAFLD Activity Score (prema Kleiner i sur.)	steatoza (0-3) lobularna upala (0-3) balonziranje (0-2) ukupno:

**Nekroinflammatory stupanj prema Brunt**  
 Mild, grade 1 Steatosis (predominantly macrovesicular) involving up to 66% of biopsy; may see occasional ballooned zone 3 hepatocytes; scattered rare intra-actinar pun's & intra-actinar lymphocytes; no or mild portal chronic inflammation.

Moderate, grade 2 Steatosis of any degree; ballooning of hepatocytes (predominantly zone 3) obvious; intra-actinar pun's noted, may be associated with zone 3 pericellular fibrosis; portal and intra-actinar chronic inflammation varied, mild to moderate.

Severe, grade 3 Panacinar steatosis, ballooning and disarray obvious, predominantly in zone 3; intra-actinar inflammation noted as scattered pun's, pun's associated with ballooned hepatocytes & mild chronic inflammation; portal chronic inflammation mild or moderate, not marked.

**Stadij fibroze prema Brunt:**  
 Stage 1. Zone 3 perisinusoidal/ pericellular fibrosis, focally or extensively present.  
 Stage 2. Zone 3 perisinusoidal/ pericellular fibrosis with focal or extensive periportal fibrosis.  
 Stage 3. Zone 3 perisinusoidal/ pericellular fibrosis and portal fibrosis with focal or extensive bridging fibrosis.  
 Stage 4. Cirrhosis.

Kod svakog bolesnika definirana je prisutnost metaboličkog sindroma i pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma koristeći aktualnu definiciju International Diabetes Federation (IDF) iz 2005. godine (Tablica 4.2.2.). Metabolički sindrom prisutan je ukoliko bolesnik ima centralni tip pretilosti (opseg struka  $\geq 94$  cm kod muškaraca odnosno  $\geq 80$  cm kod žena), uz barem dvije od preostale 4 sastavnice: hipertrigliceridemija (serumska vrijednost triglicerida  $\geq 1.7$  mmol/L ili terapija za hipertrigliceridemiju), snižen HDL kolesterol (HDL kolesterol  $< 1.03$  mmol/L kod muškaraca odnosno  $< 1.29$  mmol/L kod žena ili terapija za niski HDL), povišen krvni tlak (sistolički tlak  $\geq 130$  mmHg ili dijastolički tlak  $\geq 85$  mmHg ili antihipertenzivna terapija), povišena glikemija natašte (glukoza natašte  $\geq 5.6$  mmol/L) ili dijagnosticiran dijabetes tipa 2.

**Tablica 4.2.2.** Metabolički sindrom prema definiciji International Diabetes Federation (IDF)

<b>Metabolički sindrom</b>	
centralni tip pretilosti	opseg struka $\geq 94$ cm muškaraci $\geq 80$ cm žene
<b>+ 2 od sljedećeg:</b>	
hipertrigliceridemija	trigliceridi $\geq 1.7$ mmol/L ili terapija za hipertrigliceridemiju
snižen HDL	HDL kolesterol $< 1.03$ mmol/L muškarci $< 1.29$ mmol/L žene ili terapija za niski HDL
povišen krvni tlak	sistolički tlak $\geq 130$ mmHg ili dijastolički tlak $\geq 85$ mmHg ili uzimanje antihipertenzivne terapije
glukoza natašte $\geq 5.6$ mmol/L ili dijagnosticiran dijabetes tipa 2	

Vrijednosti jetrenih biokemijskih testova definirane su kao povišene ukoliko su bile iznad gornje granice referentnih vrijednosti. Gornje granice referentnih vrijednosti identične su u biokemijskim

laboratorijima obje ustanove (KBC Sestre milosrdnice i KBC Zagreb - Rebro), te su prikazane u Tablici 4.2.3.

**Tablica 4.2.3.** Gornje granice referentnih vrijednosti pojedinih jetrenih biokemijskih testova

Enzim	Gornja granica referentne vrijednosti	
	Muškarci	Žene
<b>AST</b>	38	30
<b>ALT</b>	48	36
<b>GGT</b>	55	35
<b>Alk. fosfataza</b>	142	119 (153 u postmenopauzi)

Kao bolesnici s izolirano povišenim GGT definirani su oni bolesnici s nalazom povišenog GGT koji niti na jednom od najmanje 2 određivanja enzima u razmaku od najmanje 3 mjeseca nisu imali vrijednosti ALT ili AST iznad gornje granice normale. U praksi je najveći dio bolesnika imao više puta određene nalaze jetrenih biokemijskih testova, koji su svi uzeti u obzir tijekom provođenja istraživanja i kasnijeg unosa i analize podataka.

Svi bolesnici s inicijalno postavljenom sumnjom na NAFLD kod kojih je učinjena obrada prikazani su u rezultatima istraživanja, a u završnu analizu podataka uključeni su oni bolesnici kod kojih je na temelju rezultata cjelokupne obrade uključujući patohistološki nalaz biopsije jetre postavljena dijagnoza nealkoholne masne bolesti jetre.

Analizirani su:

- demografski podaci
- učestalost i izraženost metaboličkog sindroma i njegovih pojedinih sastavnica i vrijednosti ostalih relevantnih kliničkih i laboratorijskih parametara



- histološki spektar bolesti uključujući prisutnost NASH-a, učestalost i izraženost svake pojedine patohistološke značajke bolesti prema semikvantitativnom bodovanju, stupanj i stadij bolesti prema uvriježenim sustavima histološkog bodovanja, te vrijednosti NAS
- pojedinačne učestalosti povišenog ALT, AST, AF i GGT, te izolirano povišenog GGT kod bolesnika s histološki postavljenom dijagnozom NAFLD-a
- usporedba skupine bolesnika s povišenim ALT i bolesnika s izolirano povišenim GGT prema svim spomenutim demografskim, kliničkim, laboratorijskim i histološkim parametrima
- određivanje i usporedba korelacija vrijednosti GGT, ALT i AST te dijela ostalih kliničkih i laboratorijskih parametara sa histološki definiranom težinom bolesti

### **4.3. Statistička analiza**

U statističkoj analizi podataka korištene su standardne metode obrade podataka za opservacijske studije. Za kontinuirane varijable izračunat je medijan te 25. i 75. percentila, kao i srednja vrijednost i standardna devijacija, a za kategorijske varijable frekvencija i postotak pojedinih vrijednosti.

Grupe su, obzirom na broj bolesnika, uspoređivane primjenom neparametarskih testova. Kontinuirane varijable kod dvaju grupa uspoređene su Mann-Whitney testom, a više grupa Kruskal-Wallisovim testom. Kategorijske varijable uspoređene su primjenom Freeman-Halton ekstenzije Fisher exact testa. Odnos između kontinuiranih varijabli analiziran je primjenom generaliziranog linearnog modela u univarijatnoj i multivarijatnoj analizi. Pri tome je vrijednost 'NAFLD Activity Score' (NAS) rabljena kao kontinuirana, zavisna varijabla. Prediktivna vrijednost jetrenih biokemijskih testova u identifikaciji težih oblika NAFLD prikazana je i

konstrukcijom ROC krivulja, gdje su zavisne varijable bili NAS, stupanj nekroinflamatorne aktivnosti i stadij fibroze iskazani kao dihotomna varijabla.

Multivarijatna analiza utjecaja vrijednosti enzima na stupnjeve težine NAFLD izražene kroz patohistološku klasifikaciju prema Brunt i sur. ispitali smo kumulativnom logit modelom, jer su klasifikacije korištene kao ordinalne vrijednosti. Kao mjere asocijacije korišten je omjer šansi (*Odds ratio*). Za sve testove rabili smo nivo značajnosti (mogućnost pogrešnog odbacivanja 0 hipoteze)  $\alpha < 0.05$ .

Za obradu podataka korišten je SAS 9.3 statistički paket (SAS Institute, Cary, North Carolina).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Prevalencija povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova kod bolesnika s dijabetesom tipa 2

Koristeći elektronsku bazu podataka Crodiab, pregledane su povijesti bolesti ukupno 1011 bolesnika s dijabetesom koji se kontroliraju na Poliklinici Zavoda za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Interne klinike Kliničkog bolničkog centra 'Sestre milosrdnice' u Zagrebu. Među njima, izdvojeno je 913 bolesnika s dijabetesom tipa 2.

Podatak o konzumaciji alkohola u značajnijim količinama bio je potvrdno naveden u anamnezi kod 21 od 913 bolesnika (2.3%), te su ti bolesnici isključeni iz daljnje analize.

Osnovni demografski podaci preostala 892 bolesnika koji su uključeni u daljnje analize navedeni su u Tablici 5.1.1.

**Tablica 5.1.1.** Osnovni demografski podaci 892 bolesnika s dijabetesom tipa 2 koji su uključeni u analizu prevalencije povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova u populaciji dijabetičara

<b>Dob (godine)</b>	Srednja vrijednost $\pm$ SD	62.8 $\pm$ 10.2
	Medijan (25. - 75. percentila)	63 (56 - 70)
<b>Spol</b>	<i><b>Ženski</b></i>	
	Broj bolesnika (%)	441 (49.5%)
	<i><b>Muški</b></i>	
	Broj bolesnika (%)	451 (50.5%)
<b>Visina (cm)</b>	Srednja vrijednost $\pm$ SD	167.9 $\pm$ 9.8
	Medijan (25. - 75. percentila)	168 (161 - 175)
<b>Tjelesna težina (kg)</b>	Srednja vrijednost $\pm$ SD	87.2 $\pm$ 17.3
	Medijan (25. - 75. percentila)	85 (75 - 96)
<b>Indeks tjelesne mase (kg/m<sup>2</sup>)</b>	Srednja vrijednost $\pm$ SD	30.9 $\pm$ 5.4
	Medijan (25. - 75. percentila)	30.0 (27.0 - 34.0)

Vidljivo je da je ispitivana populacija prosječno bila starije dobi (oko 63 godine) i pretila (BMI  $\geq 30$ ), te da su oba spola bila jednako zastupljena.

Udio bolesnika s nalazom jetrenih biokemijskih testova iznad gornje granice referentnih vrijednosti izračunat je za svaki pojedini test kod svih preostalih bolesnika kod kojih su podaci o njihovim vrijednostima bili dostupni u pregledanim povijestima bolesti. Udio bolesnika s povišenim vrijednostima pojedinih enzima prikazan je u Tablici 5.1.2.

**Tablica 5.1.2.** Udio povišenih vrijednosti pojedinih jetrenih biokemijskih testova u populaciji bolesnika s dijabetesom tipa 2 i usporedba prema spolu

Biokemijski test	Udio bolesnika s povišenom vrijednošću			
	Ukupno	Žene	Muškarci	P vrijednost*
<b>ALT</b>	140/870 (16.1%)	72/431 (16.7%)	68/439 (15.5%)	0.645
<b>AST</b>	91/868 (10.5%)	47/429 (11.0%)	44/439 (10.0%)	0.660
<b>GGT</b>	218/653 (33.4%)	111/320 (34.7%)	107/333 (32.1%)	0.507
<b>Alkalna fosfataza</b>	4/291 (1.4%)	0/137 (0%)	4/154 (2.6%)	0.125

\*Kategorijske varijable: Exact test

U populaciji bolesnika s dijabetesom tipa 2 obuhvaćenih ovim dijelom istraživanja, zapažena je visoka prevalencija povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova. Povišene vrijednosti ALT zabilježene su kod 16.1 % bolesnika, a povišene vrijednosti GGT kod čak 33.4 % bolesnika. Povišen AST imalo je 10.5 % dijabetičara, dok je alkalna fosfataza bila povišena kod tek nekoliko bolesnika. Vidljivo je da nije bilo nikakve razlike u učestalosti povišenih enzima prema spolu. Može se zamijetiti da je učestalost povišenog GGT bila znatno viša od učestalosti povišenog ALT

i AST, i to dva ili tri puta. Iako se radilo o retrospektivno sakupljenim podacima te na taj način nije bilo moguće kod svih bolesnika nedvojbeno isključiti konzumaciju alkohola kao uzrok povišenja GGT, jednaka prevalencija povišenog GGT kod oba spola govori protiv konzumacije alkohola kao uzroka razlike u učestalosti povišenog GGT u odnosu na ALT. U konačnici možemo zaključiti da je GGT u populaciji dijabetičara znatno češće povišen od ALT i AST, a obzirom da se radi o populaciji s najvišom zabilježenom prevalencijom NAFLD (do 70%), vjerojatno je da zabilježena razlika predstavlja i razliku prisutnu općenito kod bolesnika s NAFLD.

U Tablici 5.1.3. prikazana je usporedba učestalosti povišenih vrijednosti pojedinih jetrenih biokemijskih testova ovisno o vrijednosti indeksa tjelesne mase (BMI). Vidljivo je da se učestalost povišenog ALT, AST i GGT značajno razlikovala među skupinama s različitim vrijednostima BMI, a najznačajnija razlika zabilježena je za GGT, kod kojeg je učestalost povišenih vrijednosti pravilno pratila rastuće kategorije pretilosti. Kod izrazito pretilih (BMI>35) učestalost povišenog GGT iznosila je oko 50 %, a povišeni ALT i AST bili su prisutni u 26 % odnosno 17 % bolesnika.

**Tablica 5.1.3.** učestalost povišenih vrijednosti pojedinih jetrenih biokemijskih testova ovisno o vrijednosti Indeksa tjelesne mase (BMI)

	<b>BMI do 25.0</b>	<b>BMI 25.1 - 30.0</b>	<b>BMI 30.1 - 35.0</b>	<b>BMI iznad 35.0</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>ALT</b>	21/140 (15.0%)	52/342 (15.2%)	28/238 (11.8%)	39/150 (26.0%)	0.004
<b>AST</b>	17/140 (12.1%)	29/340 (8.5%)	19/238 (8.0%)	26/150 (17.3%)	0.017
<b>GGT</b>	24/108 (22.2%)	77/257 (30.0%)	63/179 (35.2%)	54/109 (49.5%)	<.001
<b>Alk.fosf.</b>	0/58 (0%)	1/119 (0.8%)	1/71 (1.4%)	2/43 (4.7%)	0.230

\*Kategorijske varijable: Exact test

## **5.2. Prospektivno istraživanje dijagnostičke vrijednosti GGT i ostalih jetrenih biokemijskih testova analizom kohorte bolesnika s patohistološki potvrđenom nealkoholnom masnom bolesti jetre**

U ispitivanje je uključeno ukupno 98 bolesnika kod kojih je na temelju kliničke i laboratorijske obrade (kompletno uredni nalazi probira na poznate kronične bolesti jetre) postavljena sumnja na NAFLD i učinjena biopsija jetre.

Od tih 98 bolesnika, 59 bolesnika su bili obrađivani u KBC 'Sestre milosrdnice' a 39 bolesnika u KBC 'Zagreb'.

Kod 14 bolesnika dijagnoza NAFLD-a nalazom biopsije jetre nije potvrđena, te su oni izostavljeni iz kasnijih analiza. Ti bolesnici uključivali su:

- 8 bolesnika (od kojih 2 s izolirano povišenim GGT) sa nespecifičnim patohistološkim nalazom, bez kriterija za NAFLD (izostanak steatoze) i bez jasnih elemenata neke druge bolesti; u patohistološkoj slici bila je prisutna ili samo blaga portalna upala sa ili bez fibroze, ili samo nekoliko baloniranih hepatocita sa ili bez perisinusoidalne fibroze
- 4 bolesnika (od kojih 3 s izolirano povišenim GGT) kod kojih patohistološki nalaz nije imao obilježja NAFLD, već je prema nekim elementima upućivao na autoimunu bolest žučnih vodova, sa ili bez dodatnih obilježja autoimunog hepatitisa
- 1 bolesnik sa slikom hepatitisa bez steatoze i izraženim promjenama portalnih arterija u smislu vaskulitisa
- 1 bolesnik u dobi od 30 godina sa histološkom slikom izraženog steatohepatitisa i već razvijenom premoštavajućom fibrozom kod kojeg je više elemenata upućivalo da se radi o nekoj drugoj etiologiji bolesti jetre (odsutnost sastavnica metaboličkog sindroma, više članova obitelji umrlo od bolesti jetre, vrijednosti GGT povremeno do preko 2000, neproporcionalno mali broj

baloniranih hepatocita i izostanak nalaza glikogeniranih jezgri uz neuobičajeno jaku lobularnu i portalnu upalu)

Od navedenih 14 bolesnika ukupno 5 ih je dakle imalo izolirano povišene vrijednosti GGT.

U daljnje analize uključeno je preostalih 84 bolesnika.

### 5.2.1. Osnovni demografski podaci i podaci o sastavnicama metaboličkog sindroma

Osnovni demografski podaci bolesnika navedeni su u Tablici 5.2.1.1.

**Tablica 5.2.1.1.** Osnovni demografski podaci bolesnika

<b>Dob (godine)</b>	Medijan (25. - 75. percentila)	46 (37 - 54)
<b>Spol</b>	<i>Ženski</i>	
	Broj bolesnika (%)	35 (41.7)
	<i>Muški</i>	
	Broj bolesnika (%)	49 (58.3)
<b>Visina (cm)</b>	Srednja vrijednost ± SD	173.5 ± 11.2
	Medijan (25. - 75. percentila)	175 (165 - 180)
<b>Tjelesna težina (kg)</b>	Srednja vrijednost ± SD	88.9 ± 13.7
	Medijan (25. - 75. percentila)	89 (80 - 96)
<b>Indeks tjelesne mase (kg/m<sup>2</sup>)</b>	Srednja vrijednost ± SD	29.6 ± 4.1
	Medijan (25. - 75. percentila)	29.1 (26.6 - 30.8)
<b>Opseg struka (cm)</b>	Srednja vrijednost ± SD	96.1 ± 11.0
	Medijan (25. - 75. percentila)	95 (91 - 99)

Iz tablice je vidljivo da se najvećim dijelom radilo o bolesnicima srednje životne dobi (medijan 46 godina), te da su muškarci bili nešto zastupljeniji od žena (58.3 %). Uz prosječnu visinu od 175 cm i prosječnu tjelesnu masu 89 kg, te prosječni indeks tjelesne mase od 29.6 kg/m<sup>2</sup>, očekivano se

radilo o populaciji s prekomjernom tjelesnom masom. Tome u prilog govore i prosječne vrijednosti opsega struka.

Učestalost pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma (centralna pretilost, hipertenzija, poremećena regulacija glikemije, hipertrigliceridemija, snižen HDL) i hiperkolesterolemije prikazana je u Tablici 5.2.1.2. Kao referentne vrijednosti korištene su vrijednosti iz aktualne definicije International Diabetes Federation (Tablica 4.2.2.).

**Tablica 5.2.1.2.** Učestalost pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma

<b>Sastavnica metaboličkog sindroma</b>		<b>n (%)</b>
<b><i>Centralna pretilost</i></b>	<i>Da</i>	68 (90.7 %)
	<i>Ne</i>	7 (9.3 %)
<b><i>Hipertenzija</i></b>	<i>Da</i>	48 (58.5 %)
	<i>Ne</i>	34 (41.5 %)
<b><i>Dijabetes tip 2</i></b>	<i>Da</i>	13 (15.7 %)
	<i>Ne</i>	70 (84.3 %)
<b><i>Poremećena regulacija glikemije (povišena glikemija natašte / intolerancija glukoze / dijabetes)</i></b>	<i>Da</i>	51 (63.8 %)
	<i>Ne</i>	29 (36.2 %)
<b><i>Hipertrigliceridemija</i></b>	<i>Da</i>	54 (66.7 %)
	<i>Ne</i>	27 (33.3 %)
<b><i>Snižen HDL</i></b>	<i>Da</i>	14 (19.2 %)
	<i>Ne</i>	59 (80.8 %)

U našoj skupini bolesnika, pretilost je bila najčešće prisutna sastavnica metaboličkog sindroma (preko 90% bolesnika), dok su hipertrigliceridemija, poremećena regulacija glikemije i hipertenzija bile prisutne u oko 2/3 bolesnika. Snižene vrijednosti HDL bile su najrjeđe prisutna sastavnica metaboličkog sindroma - nađene su u manje od 20% bolesnika.



U Tablici 5.2.1.3. dodatno su prikazane učestalosti povišenih vrijednosti ukupnog kolesterola i LDL kolesterola. Očekivano, velik udio bolesnika imao je povišene vrijednosti kolesterola: povišen ukupni kolesterol (vrijednost preko 5.0 mmol/L) utvrđen je kod 70 % bolesnika, a povišene vrijednosti LDL kolesterola (>3.0 mmol/L) kod 50 % bolesnika.

**Tablica 5.2.1.3.** Učestalost povišenih vrijednosti ukupnog kolesterola i LDL kolesterola

	<b>n (%)</b>
<b>Ukupni kolesterol &gt;5.0 mmol/L</b>	59/84 (70.2 %)
<b>LDL kolesterol &gt; 3.0 mmol/L</b>	42/84 (50.0 %)

U Tablici 5.2.1.4. prikazana je učestalost metaboličkog sindroma u našoj skupini bolesnika, utvrđenog prema kriterijima iz definicije International Diabetes Federation (Tablica 4.2.2.). Također je prikazana raspodjela prema broju sastavnica metaboličkog sindroma prisutnih kod pojedinog bolesnika.

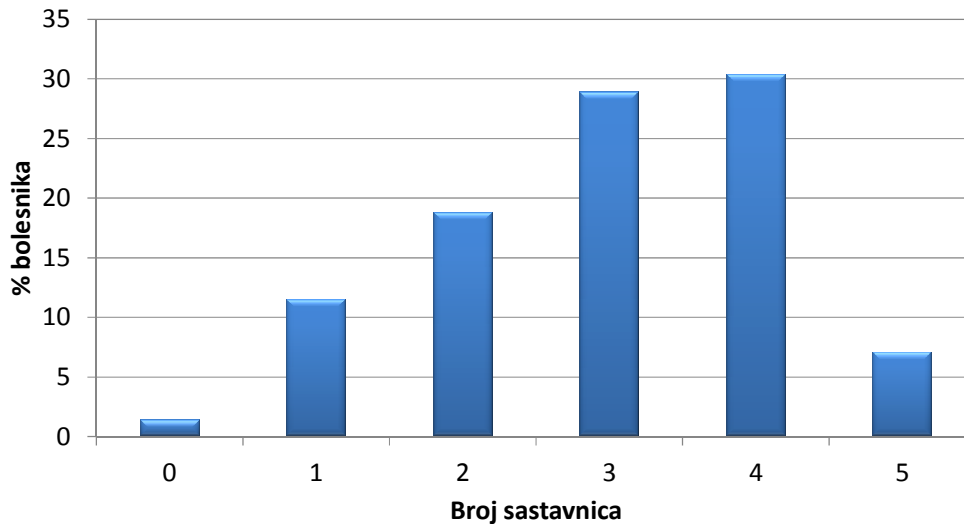
**Tablica 5.2.1.4.** Učestalost metaboličkog sindroma definiranog prema kriterijima IDF i raspodjela prema broju sastavnica metaboličkog sindroma prisutnih kod pojedinog bolesnika

		<b>udio bolesnika n (%)</b>
<b><i>Metabolički sindrom (definiran prema IDF)</i></b>	<i>Da</i>	52 (68.4 %)
	<i>Ne</i>	24 (31.6 %)
<b><i>Broj sastavnica metaboličkog sindroma kod pojedinog bolesnika</i></b>		
<i>0</i>		1 (1.4 %)
<i>1</i>		8 (11.5 %)
<i>2</i>		13 (18.8 %)
<i>3</i>		20 (28.9 %)
<i>4</i>		21 (30.4 %)
<i>5</i>		6 (8.7 %)

Metabolički sindrom definiran prema kriterijima IDF bio je prisutan u gotovo 70% bolesnika. Uočljivo je da je najveći dio bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze NAFLD imao manifestne 3 ili 4 sastavnice sindroma. Relativna učestalost broja prisutnih sastavnica metaboličkog sindroma po bolesniku prikazana je i na Slici 5.2.1.1.

**Slika 5.2.1.1.** Relativna učestalost broja prisutnih sastavnica metaboličkog sindroma po bolesniku

## Broj sastavnica metaboličkog sindroma



Kod svih bolesnika uključenih u istraživanje zabilježeni su i analizirani lijekovi koje su uzimali u vrijeme kad je učinjena biopsija jetre. U Tablici 5.2.1.5. prikazana je učestalost uzimanja pojedinih lijekova koji su dosad u studijama ispitivani kao potencijalna farmakološka terapija same nealkoholne masne bolesti jetre, a inače su uobičajena terapija u liječenju pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma.

**Tablica 5.2.1.5.** Učestalost uzimanja pojedinih lijekova koji su dosad ispitivani i u liječenju same nealkoholne masne bolesti jetre

<b>Lijek</b>	<b>n (%)</b>
Metformin	3 (3.6 %)
Pioglitazon	0 (0 %)
ACE inhibitori	18 (21.7 %)
Blokatori receptora angiotenzina II	7 (8.4 %)
Statini	13 (15.6 %)
Gemfibrozil	1 (1.2 %)

U usporedbi s učestalosti pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma, primjećuje se iznenađujuće mala učestalost uzimanja pojedinih skupina lijekova. Uz učestalost dijabetesa od 15.7 % u našoj skupini bolesnika, samo 3.7 % je bilo na terapiji metforminom. Ukupno 30.1% bolesnika je bilo na terapiji ACE inhibitorom ili blokatorom receptora angiotenzina II, u usporedbi s 58.5 % bolesnika koji su bili hipertoničari. Oko 16 % bolesnika bilo je na hipolipemijskoj terapiji, a prisutnost dislipidemije zabilježena je kod oko 2/3 bolesnika. Uzimajući u obzir rezultate studija u kojima su ovi lijekovi ispitivani kao moguća terapija nealkoholnog steatohepatitisa, te učestalost uzimanja pojedinih lijekova u našoj kohorti, možemo zaključiti da terapija pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma nije mogla značajnije utjecati na rezultate analiza patohistoloških nalaza u ovom istraživanju.

### 5.2.2. Podaci o vrijednostima jetrenih biokemijskih testova i patohistološkom spektru i značajkama bolesti

U Tablici 5.2.2.1. prikazana je učestalost povišenih vrijednosti (vrijednost iznad gornje granice referentnih vrijednosti) pojedinih jetrenih biokemijskih testova kod bolesnika s patohistološki dokazanim NAFLD koji su obuhvaćeni našim istraživanjem, a u Tablici 5.2.2.2. srednje vrijednosti, medijan i raspon vrijednosti pojedinih enzima.

**Tablica 5.2.2.1.** Učestalost povišenih vrijednosti pojedinih jetrenih biokemijskih testova

<b>Enzim</b>	<b>n (%)</b>
<b>AST</b>	46/84 (54.8 %)
<b>ALT</b>	60/84 (71.4 %)
<b>GGT</b>	74/84 (88.1 %)
<b>Alk. fosfataza</b>	9/84 (10.7%)

**Tablica 5.2.2.2.** Srednje vrijednosti, medijan i raspon vrijednosti pojedinih jetrenih biokemijskih testova

	<b>Srednja vrijednost ± SD</b>	<b>Medijan (25.-75. percentila)</b>	<b>Raspon vrijednosti (min. - maks.)</b>
<b>AST</b>	52.2 ± 42.6	41 (31-62)	18 - 330
<b>ALT</b>	86.3 ± 49.0	78 (48-113)	23 - 322
<b>GGT</b>	190.0 ± 225.9	121 (80-212)	17 - 1627
<b>Alk. fosfataza</b>	90.7 ± 32.8	79 (65-115)	45 - 211

U našoj skupini bolesnika s nealkoholnom masnom bolesti jetre, NASH definiran na temelju minimalnih kriterija (prisutnost steatoze, lobularne upale, i znakova oštećenja hepatocita u obliku baloniranja ili apoptoze) bio je prisutan u 88.1% slučajeva (74/84 bolesnika). U Tablici 5.2.2.3. prikazana je učestalost i izraženost pojedinih patohistoloških značajki NAFLD u našoj skupini bolesnika. Za semikvantitativno označavanje izraženosti pojedine patohistološke karakteristike

upotrebljena je podjela korištena u radovima Brunt i sur. i Kleiner i sur. prilikom razvoja danas uvriježenih patohistoloških sustava bodovanja NAFLD (61, 62).

**Tablica 5.2.2.3.** Učestalost i izraženost pojedinih patohistoloških značajki NAFLD

Patohistološka značajka	n (%) (n = 84)
<b>Steatoza</b>	
<5%	5 (6.0 %)
5-33%	32 (38.1 %)
33-66%	20 (23.8 %)
>66%	27 (32.1 %)
<b>Baloniranje hepatocita</b>	
Nema	7 (8.3 %)
Malo baloniranih stanica	41 (48.8 %)
Izraženo baloniranje	36 (42.9 %)
<b>Intraacinarna (lobularna) upala (broj žarišta na povećanju 200x)</b>	
bez žarišta	6 (7.1 %)
1 žarište	35 (41.7 %)
2 žarišta	28 (33.3 %)
3 žarišta	10 (11.9 %)
4 žarišta	2 (2.4 %)
>4 žarišta	3 (3.6 %)
<b>Portalna upala</b>	
Nema	10 (11.9 %)
Blaga	53 (63.1 %)
Umjerena	20 (23.8 %)
Izražena	1 (1.2 %)
<b>Malloryeva tjelešca</b>	
Nema	27 (32.2 %)

Ima	57 (67.8 %)
<b>Apoptotička (acidofilna) tjelešca</b>	
Nema	41 (48.8 %)
Ima	43 (51.2 %)
<b>Glikogenizirane jezgre</b>	
Nema	24 (28.6 %)
Ima	60 (71.4 %)
<b>Hepatocelularno željezo (0-4+ prema Searle)</b>	
0	63 (75.0 %)
1+	13 (15.5 %)
2+	6 (7.1 %)
3+	2 (2.4 %)
4+	0 (0 %)
<b>Fibroza</b>	
nema fibroze	3 (3.6 %)
blaga perisinusoidalna u zoni 3	25 (29.8 %)
umjerena perisinusoidalna u zoni 3	3 (3.6 %)
portalna/periportalna	10 (11.9 %)
perisinusoidalna sa portalnom	28 (33.3 %)
premoštavajuća fibroza	15 (17.9 %)
ciroza	0 (0 %)

U Tablici 5.2.2.4. prikazana je raspodjela bolesnika prema uvriježenim patohistološkim sustavima definiranja težine NAFLD - stupnjevanjem nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze prema sustavu Brunt i sur. i stupnjevanjem aktivnosti bolesti prema NASH CRN, što je izraženo kao 'NAFLD Activity Score'. Stupnjevanje fibroze prema sustavu NASH CRN prikazano je već u prethodnoj tablici.

**Tablica 5.2.2.4.** Raspodjela bolesnika prema stupnju nekroinflamatorne aktivnosti i stadiju fibroze sustava Brunt i sur. i prema 'NAFLD Activity Score'

<b>Nekroinflamatorni stupanj prema Brunt</b>	<b>n (%)</b> <b>n = 84</b>
0	2 (2.4 %)
blagi, stupanj 1	37 (44.0 %)
umjereni, stupanj 2	29 (34.5 %)
izraženi, stupanj 3	16 (19.0 %)
<b>Stadij fibroze prema Brunt</b>	
0	3 (3.6 %)
1: perisinusoidalna/ pericelularna fibroza	37 (44.0 %)
2: perisinusoidalna s portalnom fibrozom	29 (34.5 %)
3: premoštavajuća fibroza	15 (17.9 %)
4: ciroza	0 (0 %)
<i>nastavak tablice na slijedećoj stranici</i>	

NAFLD Activity Score	
0	2 (2.4 %)
1	1 (1.2 %)
2	6 (7.1 %)
3	17 (20.2 %)
4	15 (17.9 %)
5	13 (15.5 %)
6	12 (14.3 %)
7	16 (19.0 %)
8	2 (2.4 %)
Srednja vrijednost $\pm$ SD	4.6 $\pm$ 1.9
Medijan (25.-27. percentila)	5 (3 - 6)

Možemo vidjeti da je, ukoliko se promatra po kategorijama, u najvećem dijelu biopsija (njih 44%) bila prisutna blaga nekroinflamatorna aktivnost (stupanj 1), te fibroza prvog stadija - perisinusoidalna/pericelularna fibroza zone 3 (također u 44% biopsija). Najčešći NAFLD Activity Score iznosio je 3/8 (u 20% bolesnika), no srednja vrijednost i medijan bili su 5/8, što pokazuje značajnu nekroinflamatornu aktivnost kod većine bolesnika. Tome svjedoči i činjenica da je kod većine bolesnika (53.5%) opažena umjerena ili izražena nekroinflamatorna aktivnost (2. i 3. stupanj). Važno je primijetiti da je značajan postotak bolesnika (17.9%) u trenutku biopsije već imao razvijenu premoštavajuću ('bridging') fibrozu (3. stadij fibroze).



### **5.2.3. Usporedba kliničkih i patohistoloških značajki bolesti između bolesnika s izolirano povišenim vrijednostima GGT i bolesnika s povišenim ALT**

Da bi se dokazala hipoteza o jednakoj izraženosti kliničkih i patohistoloških značajki bolesti kod bolesnika s izolirano povišenim vrijednostima GGT i onih s povišenim ALT, uspoređene su te dvije skupine bolesnika.

Važno je napomenuti da su svi bolesnici s povišenim AST imali ujedno i povišen ALT.

Pet bolesnika imalo je u razdoblju praćenja prije i nakon biopsije normalne vrijednosti i ALT i GGT, te su ti bolesnici isključeni iz slijedeće analize. Niti jedan od njih nije imao povišen neki od ostalih enzima (AST, AF). Kod tih bolesnika biopsija jetre bila je učinjena ili radi definitivnog isključenja hemokromatoze ili Wilsonove bolesti, ili zbog simptoma (bol pod DRL, umor) uz ultrazvučni nalaz steatoze, ili zbog ranijeg podatka o povišenim transaminazama, koje su kasnije tijekom praćenja i prije i nakon biopsije bile uredne.

Od preostalih 79 bolesnika, 19 (24.1%) bolesnika imalo je izolirano povišene vrijednosti GGT, dok je preostalih 60 (75.9%) bolesnika imalo povišen ALT. Od tih 60 bolesnika s povišenim ALT, njih 5 imalo je uredne vrijednosti GGT.

Usporedba demografskih parametara bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT prikazana je u Tablici 5.2.3.1.

**Tablica 5.2.3.1.** Usporedba demografskih parametara bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

<i>Varijabla</i>	<i>Povišen ALT n=60</i>	<i>Izolirano povišen GGT n=19</i>	<i>P vrijednost*</i>
<b>Dob (godine)</b>			0.024
Medijan	44.5	53.0	
25. percentila	36.0	44.0	
75. percentila	54.0	62.0	
<b>Spol</b>			0.602
Ženski	27 ( 45.0%)	7 ( 36.8%)	
Muški	33 ( 55.0%)	12 ( 63.2%)	
<b>Visina (cm)</b>			0.746
Medijan	174.0	174.0	
25. percentila	165.0	162.0	
75. percentila	183.0	180.0	
<b>Tjelesna masa (kg)</b>			0.971
Medijan	83.5	90.0	
25. percentila	80.0	79.0	
75. percentila	97.0	95.0	
<b>Indeks tjelesne mase (kg/m<sup>2</sup>)</b>			0.904
Medijan	29.1	28.4	
25. percentila	26.8	26.4	
75. percentila	30.8	34.5	
<b>Opseg struka (cm)</b>			0.455
Medijan	95.0	91.0	
25. percentila	92.0	86.0	
75. percentila	99.0	98.0	

\* Kategorijske varijable: Exact test, kontinuirane varijable: Mann-Whitney test

Možemo vidjeti da je među demografskim parametrima jedina značajna razlika opažena u dobi bolesnika. Bolesnici s izolirano povišenim GGT bili su više dobi u odnosu na bolesnike s povišenim ALT (medijan 53 prema 44.5 godina,  $p=0.024$ ). Ove dvije skupine bolesnika nisu se razlikovale po udjelu spolova, kao ni po prosjeku tjelesne visine i težine, indeksu tjelesne mase ili opsegu struka.

Na Tablici 5.2.3.2. prikazana je usporedba učestalosti pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma kod bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT.

**Tablica 5.2.3.2.** Usporedba učestalosti pojedinih sastavnica metaboličkog sindroma kod bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

		<b>Povišen ALT n (%) (n=60)</b>	<b>Izolirano povišen GGT n (%) (n=19)</b>	<b>P vrijednost</b>
<b>Centralna pretilost</b>				0.349
	Ne	4 ( 7.5%)	3 ( 17.6%)	
	Da	49 ( 92.5%)	14 ( 82.4%)	
<b>Hipertenzija</b>				0.423
	Ne	26 ( 44.8%)	6 ( 31.6%)	
	Da	32 ( 55.2%)	13 ( 68.4%)	
<b>Dijabetes melitus tip 2</b>				0.152
	Ne	52 ( 88.1%)	14 ( 73.7%)	
	Da	7 ( 11.9%)	5 ( 26.3%)	
<b>Poremećena regulacija glikemije (povišena glikemija natašte / intolerancija glukoze / dijabetes)</b>				1.000
	Ne	21 ( 36.8%)	6 ( 33.3%)	
	Da	36 ( 63.2%)	12 ( 66.7%)	
<b>Hipertrigliceridemija</b>				0.777
	Ne	19 ( 33.3%)	5 ( 26.3%)	
	Da	38 ( 66.7%)	14 ( 73.7%)	
<b>Snižen HDL</b>				0.492
	Ne	40 ( 78.4%)	15 ( 88.2%)	
	Da	11 ( 21.6%)	2 ( 11.8%)	

Između dvije uspoređivane skupine nije zabilježena značajna razlika u učestalosti niti jedne od sastavnica metaboličkog sindroma. Pretilost i snižen HDL bili su nešto češći u skupini s povišenim ALT, a hipertenzija i manifestni dijabetes nešto češći u skupini s izolirano povišenim GGT, no spomenute razlike nisu bile značajne.

Usporedba udjela bolesnika s metaboličkim sindromom definiranim prema kriterijima IDF između bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT prikazana je na Tablici 5.2.3.3.

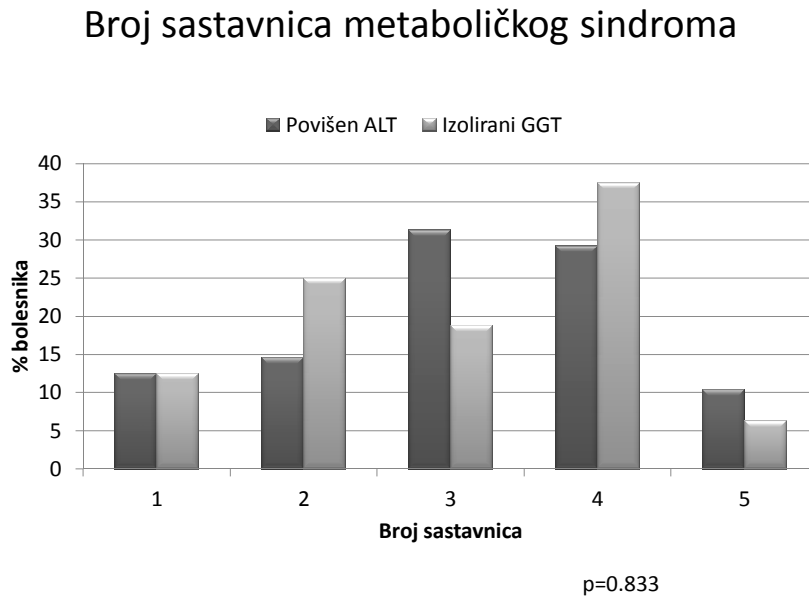
Također je uspoređena raspodjela broja sastavnica sindroma manifestiranih kod pojedinog bolesnika, što je prikazano i na Slici 5.2.3.1.

**Tablica 5.2.3.3.** Usporedba udjela bolesnika s definiranim metaboličkim sindromom i usporedba raspodjele broja sastavnica sindroma po pojedinom bolesniku između skupine s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

	<b>Povišen ALT n (%) (n=60)</b>	<b>Izolirano povišen GGT n (%) (n=19)</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>Metabolički sindrom (definiran prema IDF)</b>			0.765
Ne	16 ( 29.6%)	6 ( 35.3%)	
Da	38 ( 70.4%)	11 ( 64.7%)	
<b>Broj sastavnica metaboličkog sindroma</b>			0.833
0	1 ( 2.1%)	0	
1	6 ( 12.5%)	2 ( 12.5%)	
2	7 ( 14.6%)	4 ( 25.0%)	
3	15 ( 31.3%)	3 ( 18.8%)	
4	14 ( 29.2%)	6 ( 37.5%)	
5	5 ( 10.4%)	1 ( 6.3%)	

\*Kategorijske varijable: Exact test

**Slika 5.2.3.1.** Broj sastavnica metaboličkog sindroma kod bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT



Udio bolesnika s ispunjenim kriterijima za metabolički sindrom prema definiciji IDF nije se razlikovao između dvije uspoređivane skupine (70.4 vs. 64.7%). Izraženost metaboličkog sindroma prikazana kroz broj manifestiranih sastavnica po pojedinom bolesniku također je bila jednaka kod bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT.

U Tablici 5.2.3.4. uspoređene su učestalosti povišenih vrijednosti kolesterola između bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT.

**Tablica 5.2.3.4.** Usporedba učestalosti povišenih vrijednosti kolesterola između bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

	<b>Povišen ALT n (%) (n=60)</b>	<b>Izolirano povišen GGT n (%) (n=19)</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>Ukupni kolesterol &gt;5.0 mmol/L</b>			1.000
Ne	17 ( 28.3%)	5 ( 26.3%)	
Da	43 ( 71.7%)	14 ( 73.7%)	
<b>LDL kolesterol &gt; 3.0 mmol/L</b>			1.000
Ne	29 ( 48.3%)	9 ( 47.4%)	
Da	31 ( 51.7%)	10 ( 52.6%)	

\*Kategorijske varijable: Exact test

Iz tablice je vidljivo da su povišene vrijednosti ukupnog kolesterola i LDL kolesterola bile prisutne u jednako visokom postotku kod obje uspoređivane skupine bolesnika.

Učestalost uzimanja pojedinih lijekova u skupini bolesnika s izolirano povišenim GGT i onih s povišenim ALT uspoređena je u Tablici 5.2.3.5.

**Tablica 5.2.3.5.** Učestalost uzimanja pojedinih lijekova u skupini bolesnika s izolirano povišenim GGT i skupini s povišenim ALT

	<b>Povišen ALT n (%) (n=60)</b>	<b>Izolirano povišen GGT n (%) (n=19)</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>Metformin</b>	1 ( 1.7%)	1 ( 5.3%)	0.430
<b>Pioglitazon</b>	0	0	/
<b>ACE inhibitori</b>	12 ( 20.0%)	4 ( 21.1%)	1.000
<b>Blokatori receptora angiotenzina II</b>	6 ( 10.2%)	1 ( 5.3%)	1.000
<b>Statini</b>	12 ( 20.0%)	1 ( 5.3%)	0.169
<b>Gemfibrozil</b>	0	0	/

\*Kategorijske varijable: Exact test

Kao što se može uočiti, među uspoređivanim skupinama nije bilo značajne razlike u učestalosti uzimanja pojedinih lijekova koji u teoriji mogu utjecati na patohistološku sliku NAFLD. Opažena je međutim nešto veća učestalost uzimanja statina kod bolesnika s povišenim ALT (20% vs. 5.3%), što bi obzirom na poznate učinke statina na povišenje aminotransferaza teoretski moglo značiti da je kod malog dijela bolesnika koji su bili na terapiji statinom i imali povišen ALT to povišenje moguće bilo uzrokovano spomenutom terapijom, a ne bolesti jetre kao takvom.

U Tablici 5.2.3.6. prikazana je usporedba učestalosti i izraženosti pojedinih patohistoloških karakteristika između skupine bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT.

**Tablica 5.2.3.6.** Usporedba učestalosti i izraženosti pojedinih patohistoloških karakteristika između skupine bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

	<b>Povišen ALT n (%) (n = 60)</b>	<b>Izolirano povišen GGT n (%) (n = 19)</b>	<b>P vrijednost *</b>
<b>Steatoza jetre</b>			0.976
<5%	4 (6.7%)	1 (5.3%)	
5-33%	22 (36.7%)	8 (42.1%)	
33-66%	15 (25.0%)	4 (21.1%)	
>66%	19 (31.7%)	6 (31.6%)	
<b>Baloniranje hepatocita</b>			1.000
nema	5 (8.3%)	1 (5.3%)	
malo baloniranih stanica	29 (48.3%)	9 (47.4%)	
izraženo baloniranje	26 (43.3%)	9 (47.4%)	
<b>Intraacinarna (lobularna) upala (broj žarišta na povećanju 200x)</b>			0.377
nema žarišta	5 (8.3%)	1 (5.3%)	
1 žarište	27 (45.0%)	5 (26.3%)	
2-4 žarišta	24 (40.0%)	12 (63.2%)	
>4 žarišta	4 (6.7%)	1 (5.3%)	

<b>Portalna upala</b>			1.000
nema	8 (13.3%)	2 (10.5%)	
blaga	37 (61.7%)	12 (63.2%)	
umjerena	14 (23.3%)	5 (26.3%)	
izražena	1 (1.7%)	0 (0 %)	
<b>Malloryeva tjelešca</b>			1.000
nema	20 (33.3%)	7 (36.8%)	
ima	40 (66.7%)	12 (63.2%)	
<b>Apoptotična (acidofilna) tjelešca</b>			1.000
nema	29 ( 48.3%)	9 (47.3%)	
ima	31 ( 51.7%)	10 (52.7%)	
<b>Glikogenizirane jezgre</b>			0.028
nema	21 (35.0%)	1 (5.3%)	
ima	39 (65.0%)	18 (94.7%)	
<b>Hepatocelularno željezo (0-4+ prema Searle)</b>			0.028
0	50 (83.3%)	12 (63.2%)	
1+	5 (8.3%)	6 (31.6%)	
2+	4 (6.7%)	1 (5.3%)	
3+	1 (1.7%)	0 (0 %)	
4+	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Fibroza</b>			0.467
bez fibroze	3 ( 5.0%)	0 (0%)	
blaga perisinusoidalna fibroza zone 3	14 (23.3%)	9 ( 47.4%)	
umjerena perisinusoidalna fibroza zone 3	2 (3.3%)	0 (0%)	
izolirana portalna fibroza	7 ( 11.7%)	2 ( 10.5%)	
perisinusoidalna sa portalnom fibrozom	21 ( 35.0%)	6 ( 31.6%)	
premoštavajuća fibroza	13 ( 21.7%)	2 ( 10.5%)	
ciroza	0 (0%)	0 (0%)	

\*Kategorijske varijable: Exact test



Iz tablice je uočljivo da su ove dvije skupine imale gotovo identičnu učestalost i raspodjelu prema stupnjevima izraženosti većeg dijela patohistoloških značajki: steatoze, baloniranja hepatocita, portalne upale, Malloryevih tjelešaca i apoptotičnih tjelešaca. Također nije zabilježena značajna razlika među skupinama ni u izraženosti lobularne upale i fibroze, iako je zamijećena nešto veća učestalost izraženije lobularne upale (2-4 vidljiva žarišta) kod skupine s izolirano povišenim GGT (63.2% prema 40.0%), te nešto veća učestalost premoštavajuće fibroze kod skupine s povišenim ALT (21.7% prema 10.5%). Značajna razlika među uspoređivanim skupinama zabilježena je jedino u učestalosti prisutnosti glikogeniziranih jezgara te nakupljanja hepatocelularnog željeza, dviju patohistoloških karakteristika koje nisu važne u procjeni težine bolesti jer ne koreliraju s njom. Glikogenizirane jezgre nađene su kod gotovo svih bolesnika s izolirano povišenim GGT (94.7%), u usporedbi sa 65% kod bolesnika s povišenim ALT ( $P=0.028$ ). Obzirom da njihova prisutnost govori u prilog nealkoholne etiologije steatohepatitisa, jer se jako rijetko mogu naći kod alkoholnog steatohepatitisa, ovaj nalaz dodatno isključuje mogućnost da su izolirano povišene vrijednosti GGT kod ovih bolesnika bile posljedica konzumacije alkohola, odnosno da se radilo o neprepoznatoj alkoholnoj bolesti jetre. Blago nakupljanje željeza uočeno je nešto češće kod skupine s izolirano povišenim GGT (31.6% prema 8.3%,  $P=0.028$ ), no značenje tog nalaza je upitno, kao i općenito uloga i patogeneza nakupljanja željeza u steatohepatitisu, koja zasad nije razjašnjena.

Tablica 5.2.3.7. prikazuje usporedbu proporcije bolesnika s NASH-om, usporedbu stupnjeva nekroinflamatorne aktivnosti i stadija fibroze prema sustavu Brunt i sur., te usporedbu vrijednosti 'NAFLD Activity Score' (NAS) između skupine bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT. Usporedba stupnjeva nekroinflamatorne aktivnosti i stadija fibroze prema sustavu Brunt i sur. prikazana je i na Slikama 5.2.3.2. i 5.2.3.3.

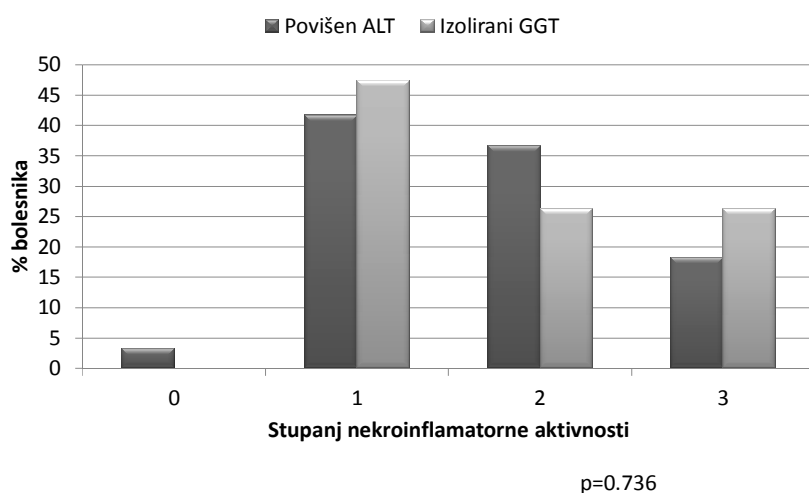
**Tablica 5.2.3.7.** Usporedba skupine s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT prema proporciji NASH-a, stupnjevima nekroinflamatorne aktivnosti i stadijima fibroze prema Brunt i sur., te vrijednostima NAS.

	<b>Povišen ALT n (%) (n = 60)</b>	<b>Izolirano povišen GGT n (%) (n = 19)</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>NASH</b>			1.000
Ne	8 (13,3%)	2 (10,5%)	
Da	52 (86,7%)	17 (89,5%)	
<b>Nekroinflamatorni stupanj prema Brunt</b>			0.736
0	2 (3.3%)	/	
blagi, stupanj 1	25 (41.7%)	9 (47.4%)	
umjereni, stupanj 2	22 (36.7%)	5 (26.3%)	
izraženi, stupanj 3	11 (18.3%)	5 (26.3%)	
<b>Stadij fibroze prema Brunt</b>			0.427
bez fibroze	3 (5.0%)	0 (0%)	
1: perisinusoidalna/ pericelularna fibroza	22 (36.7%)	11 (57.9%)	
2: perisinusoidalna sa portalnom fibrozom	22 (36.7%)	6 (31.6%)	
3: premoštavajuća fibroza	13 (21.7%)	2 (10.5%)	
4: ciroza	0 (0%)	0 (0%)	
<b>NAFLD Activity Score (NAS)</b>			0.700
0	2 (3.3%)	0 (0%)	
1	1 (1.7%)	0 (0%)	
2	3 (5.0%)	2 (10.5%)	
3	14 (23.3%)	2 (10.5%)	
4	10 (16.7%)	5 (26.3%)	
5	9 (15.0%)	2 (10.5%)	
6	9 (15.0%)	2 (10.5%)	
7	10 (16.7%)	6 (31.6%)	
8	2 (3.3%)	0 (0%)	
Medijan (25.-75. percentila)	4.5 (3.0 - 6.0)	5.0 (4.0-7.0)	0.460

\*Kategorijske varijable: Exact test, kvantitativne varijable: Mann-Whitney Test

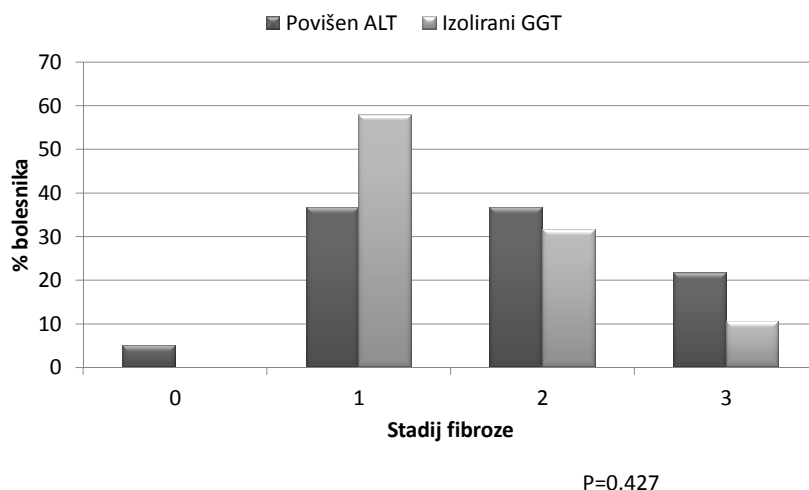
**Slika 5.2.3.2.** Stupnjevi nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur. kod bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

Stupnjevi nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.



**Slika 5.2.3.3.** Stadiji fibroze prema Brunt i sur. kod bolesnika s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

Stadiji fibroze prema Brunt i sur.

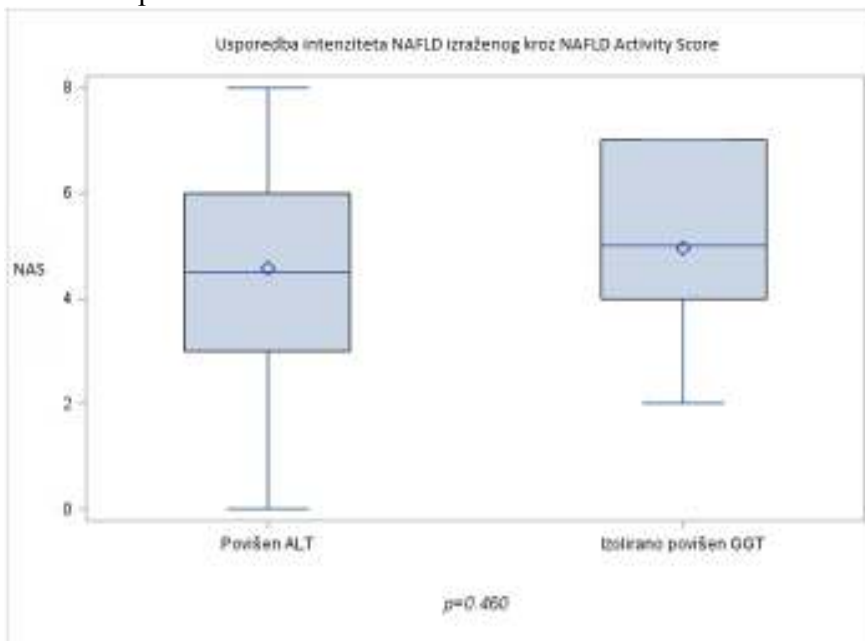


Vidljivo je da između uspoređivanih skupina nije postojala nikakva značajna razlika u raspodjeli bolesnika prema semikvantitativnim stupnjevima nekroinflamatorne aktivnosti i stadijima fibroze

sustava bodovanja prema Brunt i sur., kao ni prema vrijednostima NAFLD Activity Score. Prikazani podatci pokazuju da je patohistološka izraženost bolesti u uspoređivanim skupinama bila podjednaka. Proporcija bolesnika koji su ispunjavali patohistološke kriterije za NASH bila je identična (89.5% prema 86.7%,  $P= 1.00$ ). Kao što je spomenuto kod prethodne tablice, postojala je nešto veća učestalost premoštavajuće fibroze kod skupine s povišenim ALT (21.7% prema 10.5%).

Na Slici 5.2.3.4. još jednom je grafički prikazana usporedba vrijednosti 'NAFLD Activity Score' (NAS) između skupine bolesnika s povišenim ALT i bolesnika s izolirano povišenim GGT.

**Slika 5.2.3.4.** Usporedba vrijednosti NAS između skupine bolesnika s povišenim ALT i bolesnika s izolirano povišenim GGT



U Tablici 5.2.3.8. prikazana je usporedba vrijednosti raznih laboratorijskih parametara između dvije analizirane skupine. Možemo vidjeti da za većinu parametara nije postojala značajna razlika među skupinama, osim nešto viših vrijednosti ukupnog i LDL kolesterola kod bolesnika s povišenim ALT, te nešto viših vrijednosti beta i gama globulina (ali još uvijek unutar referentnih vrijednosti) kod bolesnika s izolirano povišenim GGT.

**Tablica 5.2.3.8.** Usporedba vrijednosti raznih laboratorijskih parametara između skupine s izolirano povišenim GGT i bolesnika s povišenim ALT

	<b>Povišen ALT</b>	<b>Izolirano povišen GGT</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>Lab. parametar</b>	Medijan (25.-75. percentila)	Medijan (25.-75. percentila)	
GUK nataste (mmol/L)	5.7 (5.2-6.1)	5.8 (5.3-6.6)	0.309
Ukupni kolesterol (mmol/L)	6.2 (5.5-6.8)	5.5 (5.0-6.6)	0.082
LDL (mmol/L)	4.0 (3.4-4.8)	3.3 (2.9-4.2)	0.054
HDL (mmol/L)	1.3 (1.1-1.6)	1.3 (1.1-1.6)	0.944
Trigliceridi (mmol/L)	1.8 (1.4-2.3)	2.4 (1.4-2.5)	0.135
GGT (IU/L)	140.0 (83.0-294.0)	100.0 (86.0-136.0)	0.113
LDH (mmol/L)	195.5 (176.0-219.0)	176.5 (154.0-189.0)	0.022
Bilirubin (mmol/L)	12.0 (9.4-16.6)	11.0 (9.0-13.3)	0.392
Serumsko željezo (mmol/L)	17.6 (14.0-21.1)	20.0 (17.3-25.0)	0.160
Saturacija Fe (%)	29.0 (23.0-36.0)	36.0 (30.0-40.0)	0.119
Feritin (ng/L)	202.5 (90.0-329.0)	211.0 (123.0-332.0)	0.890
Fibrinogen (mg/L)	3.7 (2.8-4.7)	4.0 (3.3-5.0)	0.399
CRP (mg/L)	3.0 (1.3-5.1)	4.8 (2.3-8.1)	0.151
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	6.5 (5.6-7.5)	7.3 (5.7-8.2)	0.325
Neutrofili (x10 <sup>9</sup> /L)	3.7 (3.2-4.5)	4.1 (3.4-5.1)	0.336
Trombociti (x 10 <sup>9</sup> /L)	233.0 (195.0-271.0)	230.5 (167.5-256.0)	0.444
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	13.0 (9.0-21.0)	8.5 (4.5-26.0)	0.437
Ukupni proteini (g/L)	74.5 (72.0-77.0)	74.5 (73.0-77.5)	0.750
Albumini (g/L)	45.0 (43.0-48.0)	44.0 (41.0-44.5)	0.172
Alfa-1 globulini (g/L)	2.7 (2.4-2.9)	2.6 (2.5-3.0)	0.641
Alfa-2 globulini (g/L)	6.7 (5.9-7.2)	6.4 (5.8-7.5)	0.969
Beta globulini (g/L)	8.3 (7.6-9.3)	9.1 (8.6-9.6)	0.032
Gama globulini (g/L)	11.4 (10.4-12.9)	12.9 (12.9-13.5)	0.026

\*Mann-Whitney test

### 5.2.4. Koreliranje vrijednosti pojedinih enzima s histološkim i kliničkim značajkama NAFLD

Za procjenu koreliranja vrijednosti pojedinih jetrenih biokemijskih testova s patohistološkom težinom bolesti u analizi su korištene najviše vrijednosti enzima zabilježene kod pojedinog bolesnika, koje su uspoređivane sa stupnjem nekroinflamatorne aktivnosti i stadijem fibroze prema sustavu bodovanja Brunt i sur., te sa vrijednosti 'NAFLD Activity Score' (NAS).

Analiza koreliranja izvedena je na nekoliko načina.

U Tablici 5.2.4.1. prikazana je usporedba vrijednosti jetrenih biokemijskih testova u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.

**Tablica 5.2.4.1.** Usporedba vrijednosti ALT, AST i GGT u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.

	Brunt nekroinfl. stupanj 0 (n=2)	Brunt nekroinfl. stupanj 1 (n=37)	Brunt nekroinfl. stupanj 2 (n=29)	Brunt nekroinfl. stupanj 3 (n=16)	P vrijednost*
<b>GGT</b>					0.896
Medijan	214.0	126.0	118.0	105.0	
25. percentila	107.0	66.0	80.0	86.0	
75. percentila	321.0	215.0	169.0	148.0	
<b>ALT</b>					0.196
Medijan	50.5	75.0	90.0	122.0	
25. percentila	45.0	43.0	53.0	54.0	
75. percentila	56.0	102.5	113.0	138.0	
<b>AST</b>					0.093
Medijan	32.5	35.5	44.0	62.0	
25. percentila	29.0	28.0	33.0	38.0	
75. percentila	36.0	54.5	55.0	80.0	

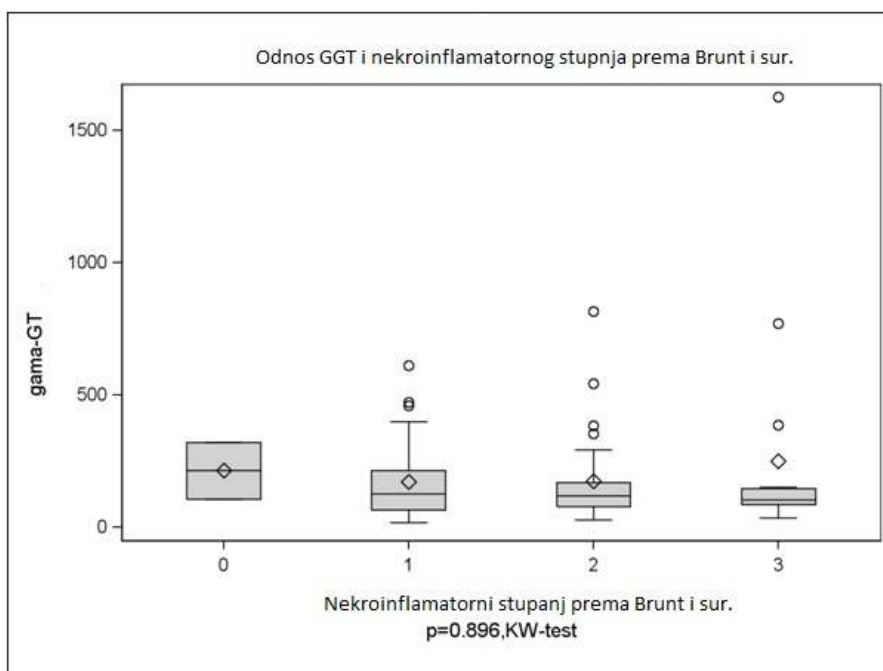
\* *Kontinuirane varijable: Kruskal-Wallis test*

Kao što je iz tablice vidljivo, vrijednosti GGT nisu pokazale značajnu dinamiku ovisno o stupnju nekroinflamatorne aktivnosti, dok se može uočiti trend viših vrijednosti AST i u manjoj mjeri

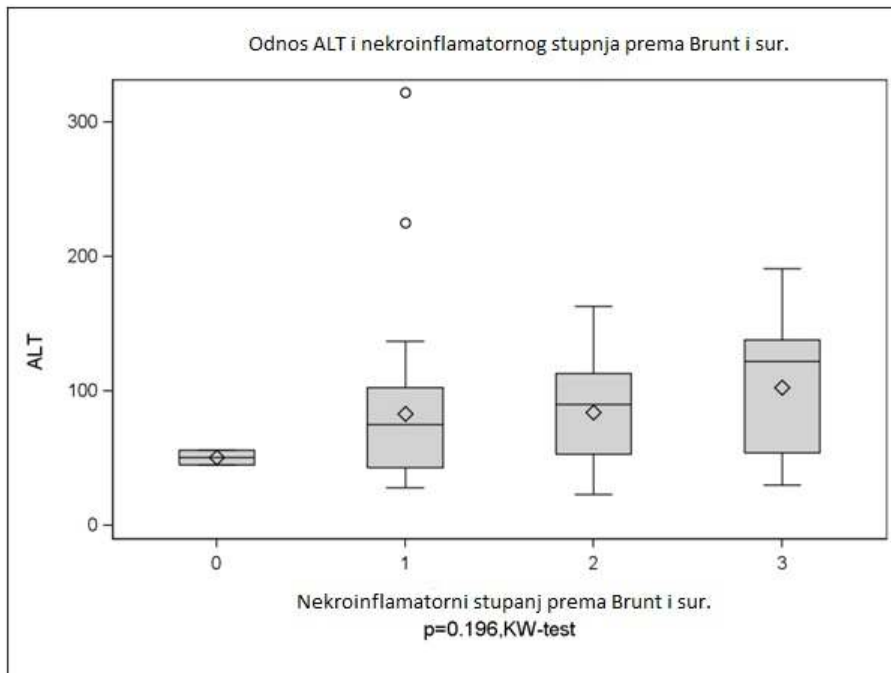
ALT, no vidljiva razlika nije dosegla statističku značajnost, te je zamjetljivo značajno preklapanje vrijednosti među pojedinim stupnjevima nekroinflamatorne aktivnosti.

Navedeno je još bolje uočljivo ukoliko se prikaže grafički, što je moguće vidjeti na Slikama 5.2.4.1., 5.2.4.2. i 5.2.4.3.

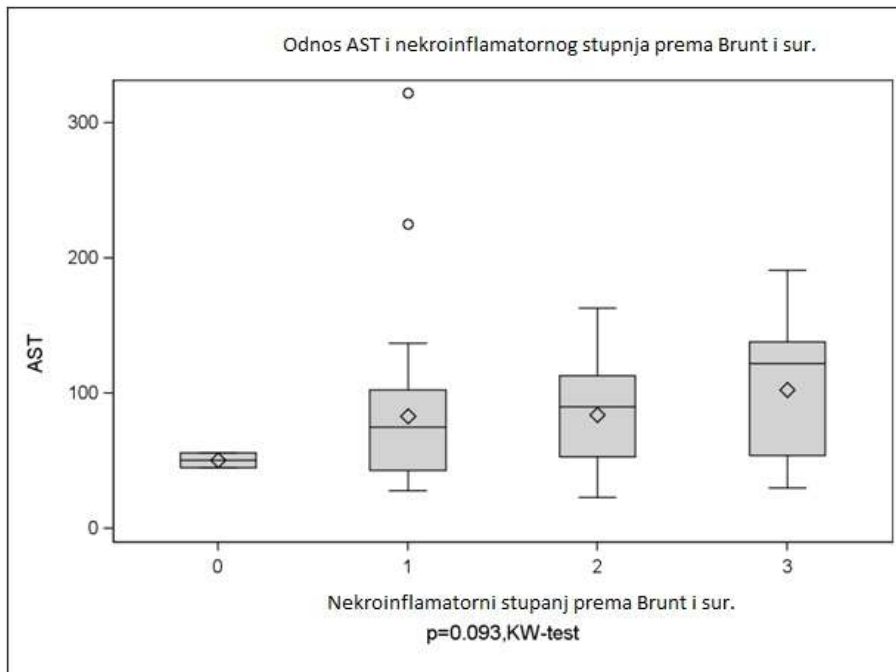
**Slika 5.2.4.1.** Vrijednosti GGT u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.



**Slika 5.2.4.2.** Vrijednosti ALT u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.



**Slika 5.2.4.3.** Vrijednosti AST u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.





Od ostalih analiziranih parametara, korelaciju sa stupnjem nekroinflamatorne aktivnosti pokazale su vrijednosti triglicerida ( $p=0.056$ , granična značajnost), te naročito broj sastavnica metaboličkog sindroma ( $p<0.001$ ) i udio bolesnika s poremećenom regulacijom glikemije ( $p=0.003$ ), što je prikazano u Tablici 5.2.4.2. Dob i indeks tjelesne mase nisu bili povezani s nekroinflamatornom aktivnosti.

**Tablica 5.2.4.2.** Usporedba dobi, indeksa tjelesne mase (BMI) i određenih parametara metaboličkog sindroma u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.

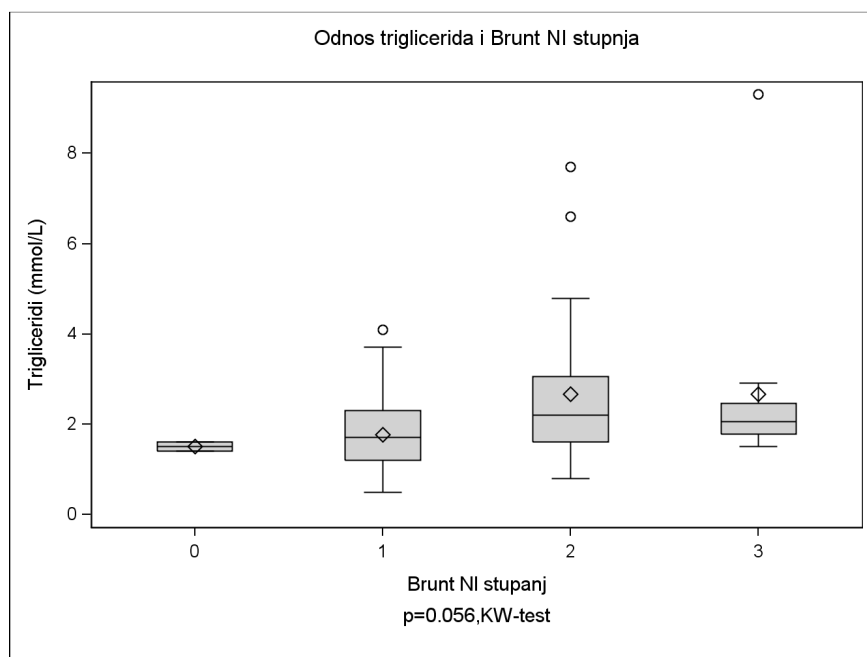
	<b>Brunt nekroinfl. stupanj 0 (n=2)</b>	<b>Brunt nekroinfl. stupanj 1 (n=37)</b>	<b>Brunt nekroinfl. stupanj 2 (n=29)</b>	<b>Brunt nekroinfl. stupanj 3 (n=16)</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>Dob</b>					0.759
Medijan	51.0	45.0	45.0	52.0	
25. percentila	41.0	34.0	40.0	33.5	
75. percentila	61.0	54.0	53.0	59.0	
<b>BMI</b>					0.809
Medijan	27.3	28.9	29.3	28.8	
25. percentila	23.7	26.5	26.3	27.8	
75. percentila	30.8	30.6	33.9	30.3	
<b>Broj sastavnica met. sindroma</b>					<0.001
Medijan	1.5	2.0	4.0	4.0	
25. percentila	1.0	1.0	3.0	3.0	
75. percentila	2.0	3.0	4.0	4.0	
<b>Trigliceridi</b>					0.056
Medijan	1.5	1.7	2.2	2.1	
25. percentila	1.4	1.2	1.6	1.8	
75. percentila	1.6	2.3	3.1	2.5	
<b>Poremećena regulacija glikemije</b>					0.003
Udio	0/2 (0%)	18/37 ( 48.6%)	21/29 ( 72.4%)	14/16 (87.5%)	
<b>Dijabetes tip 2</b>					0.106
Udio	0/2 (0%)	2/37 (5.4%)	7/29 ( 24.1%)	4/16 ( 25.0%)	

\* *Kontinuirane varijable: Kruskal-Wallis test, kategorijske varijable: Exact test*

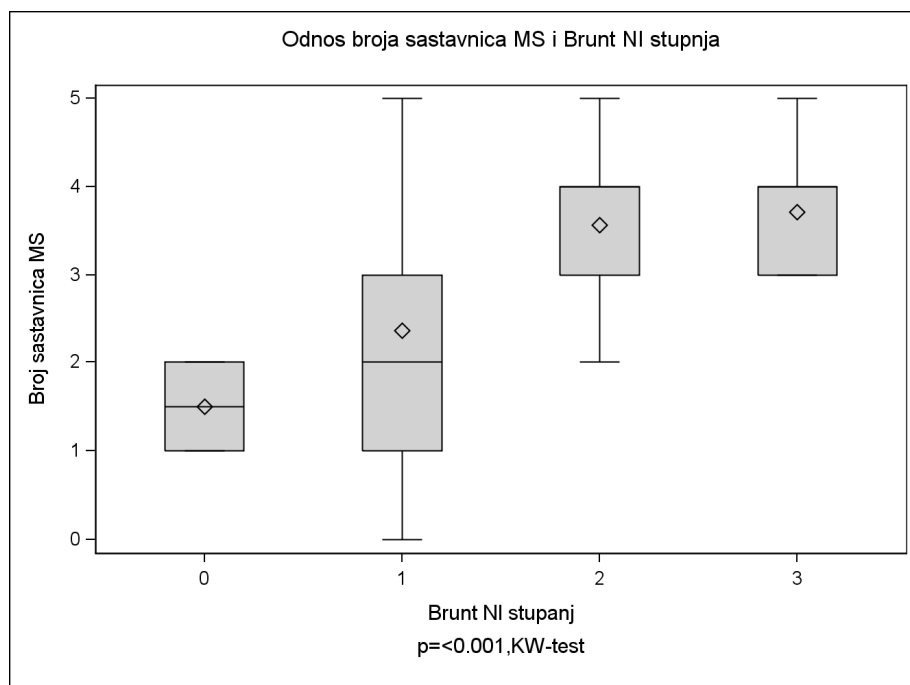
Iz tablice je uočljivo da je stupanj nekroinflamatorne aktivnosti jasno povezan s brojem sastavnica metaboličkog sindroma manifestnih kod pojedinog bolesnika. Bolesnici s patohistološki izraženijom aktivnosti bolesti imali su značajno viši broj sastavnica ( $p < 0.001$ ). Vidljiv je i trend viših vrijednosti triglicerida kod viših stupnjeva nekroinflamatorne aktivnosti, a iako statistička značajnost nije dostignuta, s većim brojem uključenih bolesnika trigliceridi bi najvjerojatnije pokazali značajnu korelaciju.

Na Slikama 5.2.4.4. i 5.2.4.5. grafički su prikazani navedeni odnosi.

**Slika 5.2.4.4.** Vrijednosti triglicerida u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.



**Slika 5.2.4.5.** Broj sastavnica metaboličkog sindroma u odnosu na stupanj nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur.



U Tablici 5.2.4.3. prikazana je usporedba vrijednosti jetrenih biokemijskih testova u odnosu na stadij fibroze prema Brunt i sur. Stupac sa fibrozom stadija 4 (ciroza) nije prikazan obzirom da kod nijednog bolesnika u kohorti obuhvaćenoj istraživanjem nije utvrđena ciroza.

**Tablica 5.2.4.3.** Usporedba vrijednosti ALT, AST i GGT u odnosu na stadij fibroze prema Brunt i sur.

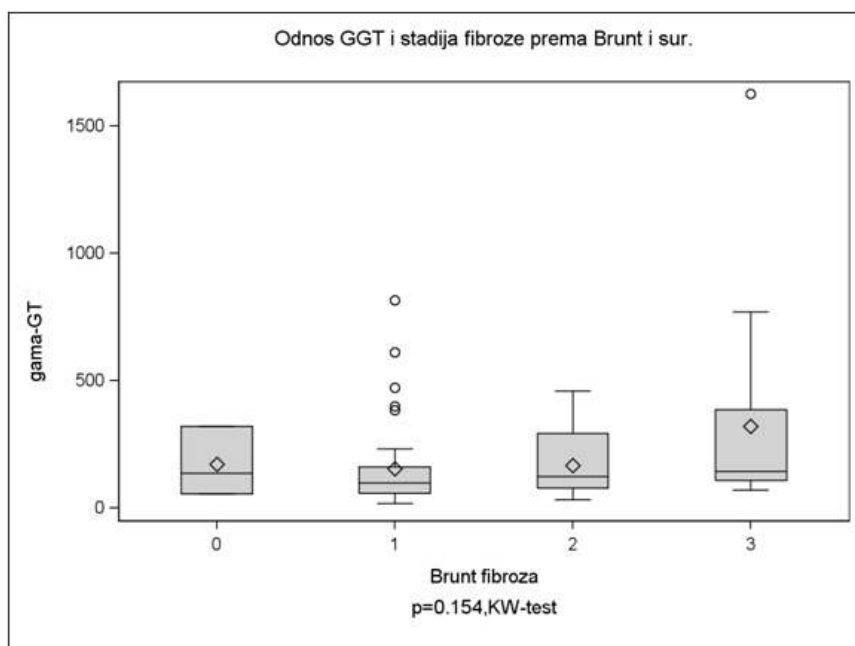
	<b>Brunt fibroza st. 0 (n=3)</b>	<b>Brunt fibroza st. 1 (n=37)</b>	<b>Brunt fibroza st. 2 (n=29)</b>	<b>Brunt fibroza st. 3 (n=15)</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>GGT</b>					0.154
Medijan	136.0	100.0	124.5	145.0	
25. percentila	56.0	58.0	80.0	109.0	
75. percentila	321.0	162.0	294.0	387.0	
<b>ALT</b>					0.130
Medijan	52.0	71.0	90.0	107.0	
25. percentila	45.0	41.0	51.0	68.0	
75. percentila	86.0	110.0	113.0	138.0	
<b>AST</b>					0.033
Medijan	33.0	36.0	44.0	53.0	
25. percentila	29.0	26.0	34.0	33.0	
75. percentila	36.0	46.0	62.0	94.0	

\* *Kontinuirane varijable: Kruskal-Wallis test*

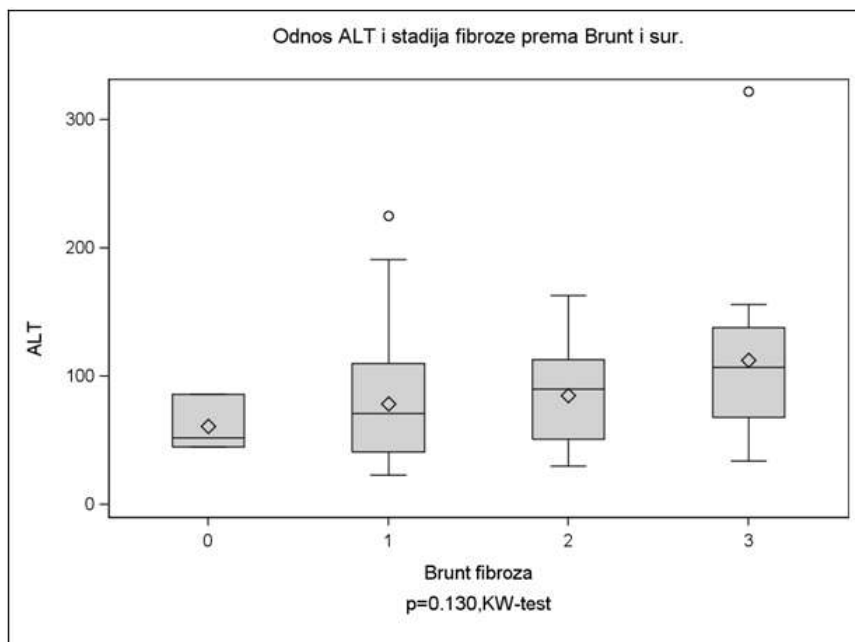
Niti analizom odnosa vrijednosti jetrenih biokemijskih testova i stadija fibroze prema Brunt i sur. nije ustanovljena značajno viša vrijednost GGT i ALT kod uznapredovalijih stadija fibroze. Međutim, vrijednosti AST značajno su se razlikovale u različitim stadijima fibroze ( $p=0.033$ ), te je vidljiva tendencija da uznapredovaliju fibrozu prati viša vrijednost AST. Ostali analizirani parametri nisu se značajno razlikovali kod različitih stadija fibroze, uključujući broj sastavnica metaboličkog sindroma.

Odnos vrijednosti GGT, ALT i AST prema stadijima fibroze grafički je prikazan na Slikama 5.2.4.6., 5.2.4.7. i 5.2.4.8.

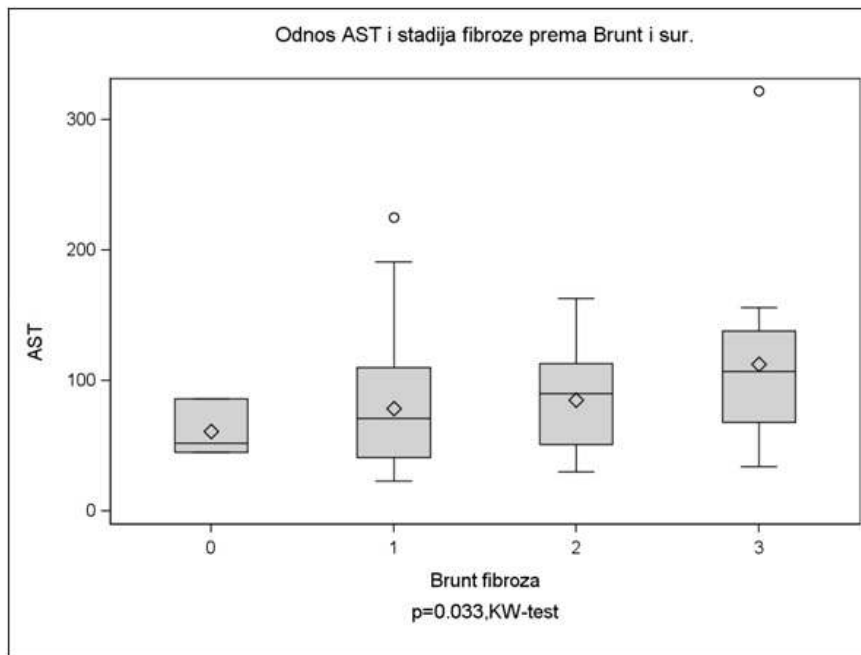
**Slika 5.2.4.6.** Vrijednosti GGT u odnosu na stadij fibroze prema Brunt i sur.



**Slika 5.2.4.7.** Vrijednosti ALT u odnosu na stadij fibroze prema Brunt i sur.



**Slika 5.2.4.8.** Vrijednosti AST u odnosu na stadij fibroze prema Brunt i sur.



Na Tablici 5.2.4.4. prikazana je usporedba dobi, indeksa tjelesne mase (BMI), učestalosti poremećene regulacije glikemije i učestalosti dijabetesa u odnosu na stadij fibroze prema Brunt i sur., obzirom da su te varijable u nekim prethodno objavljenim studijama pokazivale korelaciju s izraženosti fibroze. Kao što je iz tablice moguće vidjeti, u našoj kohorti bolesnika navedene varijable nisu pokazivale nikakvu korelaciju sa stadijem fibroze.

**Tablica 5.2.4.4.** Usporedba dobi, indeksa tjelesne mase (BMI) i učestalosti poremećene regulacije glikemije i dijabetesa u odnosu na stadij fibroze prema Brunt i sur.

	<b>Brunt fibroza st. 0 (n=3)</b>	<b>Brunt fibroza st. 1 (n=37)</b>	<b>Brunt fibroza st. 2 (n=29)</b>	<b>Brunt fibroza st. 3 (n=15)</b>	<b>P vrijednost*</b>
<b>Dob</b>					0.805
Medijan	57.0	46.0	44.5	47.0	
25. percentila	33.0	38.0	37.0	41.0	
75.percentila	61.0	55.0	53.5	54.0	
<b>BMI</b>					0.871
Medijan	29.0	29.2	29.6	28.0	
25. percentila	27.2	27.3	26.2	26.3	
75.percentila	30.8	31.1	32.3	29.9	
<b>Poremećena regulacija glikemije</b>					0.691
Udio	1/3 (33.3%)	22/37 (59.5%)	19/29 (65.5%)	11/15 (73.3%)	
<b>Dijabetes tip 2</b>					1.000
Udio	0/3 (0%)	6/37 (16.2%)	5/29 (17.2%)	2/15 (13.3%)	

\* *Kontinuirane varijable: Kruskal-Wallis test, kategorijske varijable: Exact test*

Iako nije utvrđena značajna korelacija vrijednosti jetrenih biokemijskih testova sa stupnjem nekroinflamatornih promjena, da bi potvrdili jednak odnos vrijednosti enzima prema intenzitetu bolesti provedena je i multivarijatna regresijska analiza (primjenom kumulativnog logit modela koji se primjenjuje za ordinalne varijable). Zavisna varijabla bio je stupanj nekroinflamatorne aktivnosti. Da bi se zadovoljilo uvjete za provedbu analize kumulativnim logit modelom, spojene su grupe stupnja 0 i 1. Kao nezavisne varijable uz GGT, ALT i AST uključene su i ostale varijable koje su u univarijatnoj analizi pokazale stupanj značajnosti  $p < 0.2$  (trigliceridi i broj sastavnica metaboličkog sindroma). Model je pokazao zadovoljavajuću usklađenost i eksplanatornu vrijednost ( $c=0.806$ ).

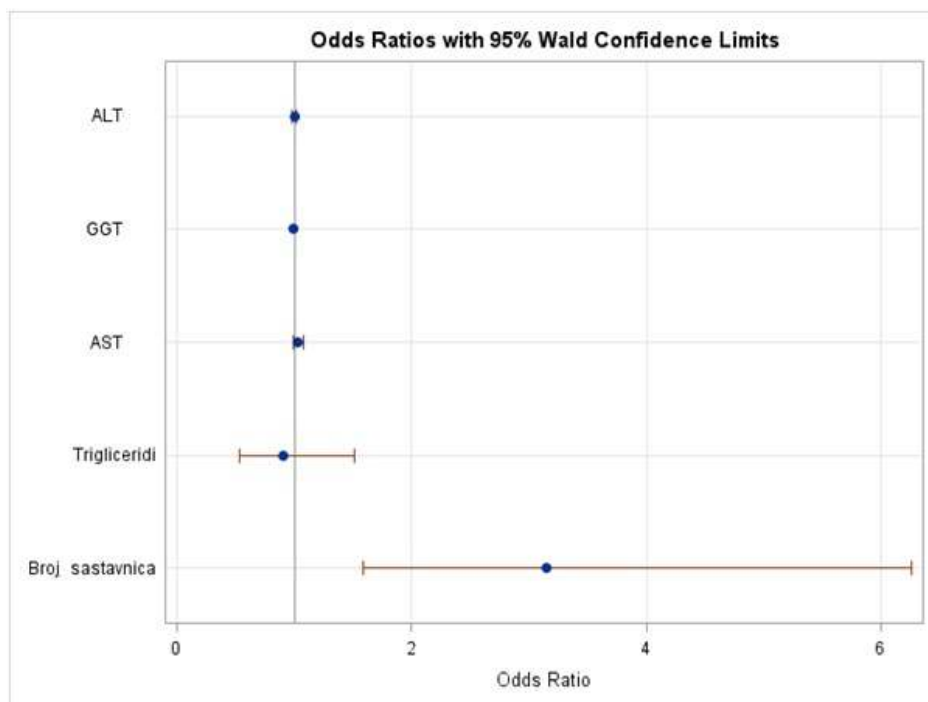
Rezultati multivarijatne kumulativne logističke regresijske analize ovisnosti intenziteta nekroinflamatorne aktivnosti prema Brunt i sur. u odnosu na nezavisne varijable GGT, ALT,

AST, trigliceride i broj sastavnica metaboličkog sindroma prikazani su u Tablici 5.2.4.5. i na Slici 5.2.4.9. Vidljivo je da vrijednosti enzima nisu pokazale značajan odnos sa stupnjem nekroinflamatornih promjena, kao ni vrijednosti triglicerida, dok je to ponovno nedvojbeno dokazano za broj sastavnica metaboličkog sindroma (OR 3.15, 95% CI: 1.59-6.26).

**Tablica 5.2.4.5.** Rezultati multivarijatne analize sa stupnjem nekroinflamatorne aktivnosti kao zavisnom varijablom

Nezavisna varijabla	Odds Ratio	95% Confidence interval
GGT	0.997	0.994 - 1.001
ALT	1.001	0.985 - 1.018
AST	1.035	0.998 - 1.075
Trigliceridi	0.903	0.541 - 1.509
Broj sastavnica metaboličkog sindroma	3.155	1.590 - 6.261

**Slika 5.2.4.9.** Rezultati multivarijatne analize sa stupnjem nekroinflamatorne aktivnosti kao zavisnom varijablom





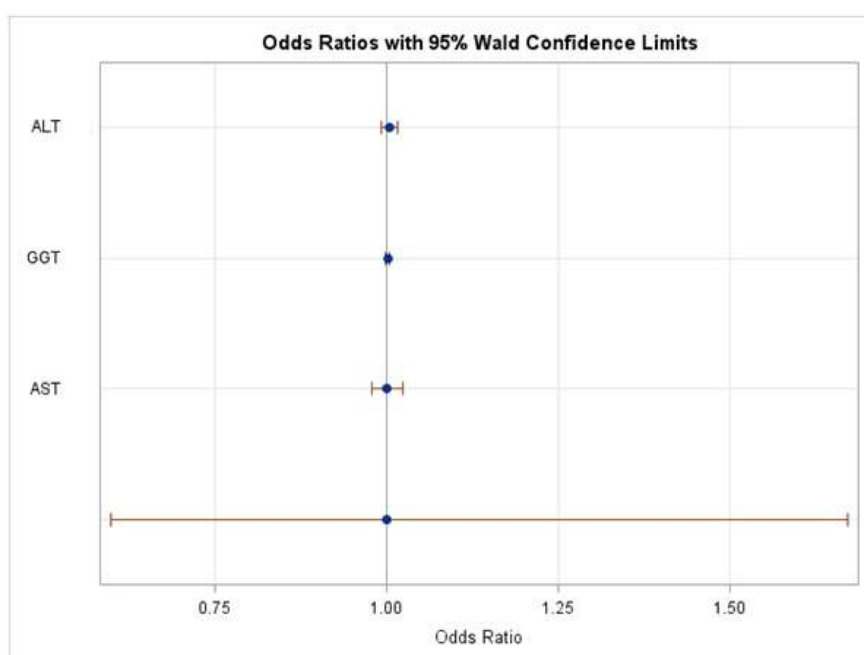
Jednaka analiza ponovljena je i za stadije fibroze prema Brunt i sur. Radi zadovoljenja uvjeta izvođenja kumulativnog logit modela, stadiji 0 i 1 spojeni su u jednu grupu. U model su kao nezavisne varijable ponovno uključene vrijednosti GGT, ALT i AST. Model je pokazao nižu eksplanatornu vrijednost ( $c=0.638$ ).

Rezultati multivarijatne analize ovisnosti izraženosti fibroze prema stadijima sustava Brunt i sur. u odnosu na nezavisne varijable GGT, ALT i AST prikazani su u Tablici 5.2.4.6. i na Slici 5.2.4.10. Može se uočiti da vrijednosti GGT i ALT nisu pokazale značajan odnos sa stadijima fibroze, kao ni vrijednosti AST.

**Tablica 5.2.4.6.** Rezultati multivarijatne analize sa stadijem fibroze kao zavisnom varijablom

Nezavisna varijabla	Odds Ratio	95% granice pouzdanosti
<b>GGT</b>	1.002	0.998 - 1.005
<b>ALT</b>	1.004	0.992 - 1.016
<b>AST</b>	1.001	0.978 - 1.024

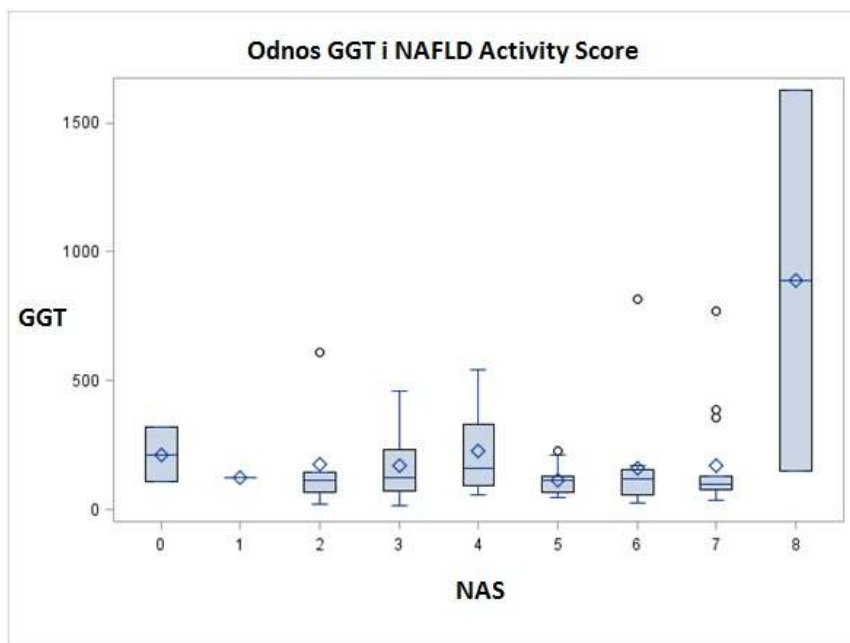
**Slika 5.2.4.10.** Rezultati multivarijatne analize sa stadijem fibroze kao zavisnom varijablom



Pored stupnja nekroinflamatorne aktivnosti i stadija fibroze prema sustavu Brunt i sur., treći patohistološki parametar za kojeg je analizirana korelacija vrijednosti jetrenih biokemijskih testova bio je široko upotrebljavani 'NAFLD Activity Score' (NAS), rezultat sustava bodovanja razvijenog od strane NASH Clinical Research Network kojem je cilj izraziti ukupnu aktivnost bolesti kroz cijeli spektar promjena koje NAFLD obuhvaća.

Na Slici 5.2.4.11. prikazan je odnos vrijednosti GGT prema vrijednostima NAS. Rombi označavaju srednju vrijednost, crte unutar pravokutnika odgovaraju medijanu, granice pravokutnika 25. i 75. percentilu, a vertikalne linije i krugovi raspon.

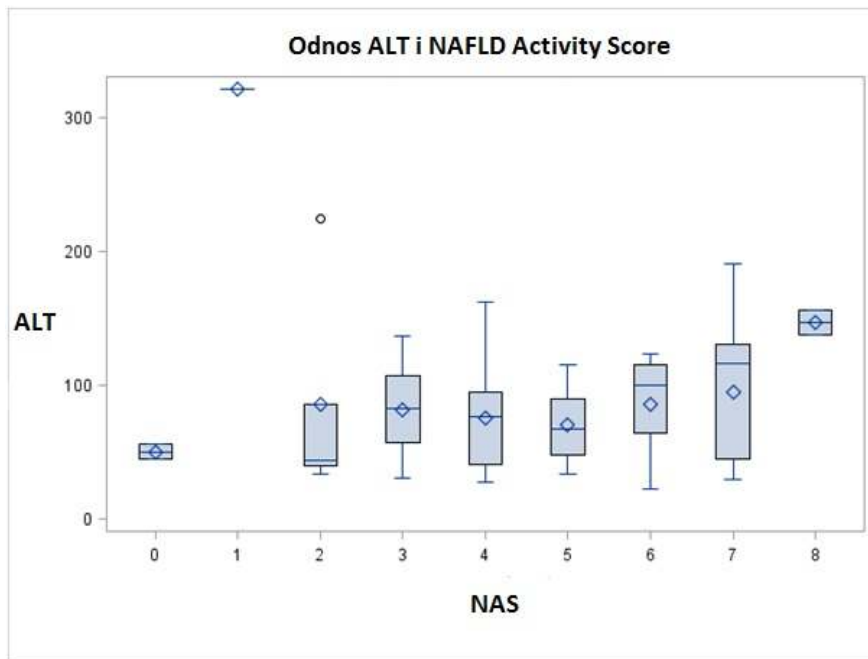
**Slika 5.2.4.11.** Odnos vrijednosti GGT prema težini bolesti izraženoj kroz NAS



Može se uočiti da vrijednosti GGT ne pokazuju trend rasta s višim vrijednostima NAS.

Na Slici 5.2.4.12. prikazan je odnos vrijednosti ALT prema vrijednostima NAS.

**Slika 5.2.4.12.** Odnos vrijednosti ALT prema težini bolesti izraženoj kroz NAS

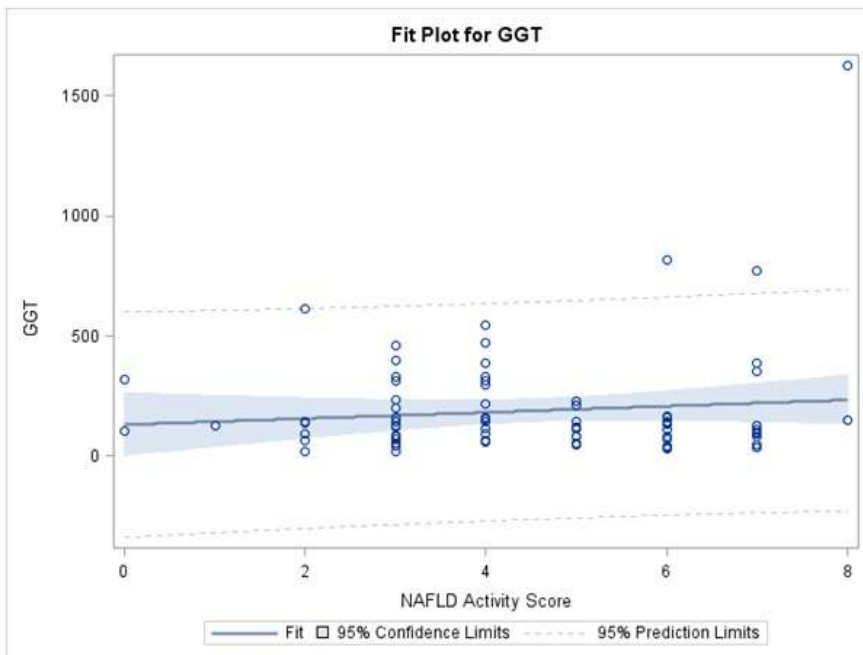


Vidljivo je da ni vrijednosti ALT nisu pokazale nikakvu pravilnu povezanost s vrijednostima NAS.

Dodatna analiza učinjena je na način da je NAS tretiran kao kontinuirana varijabla te je u univarijantnoj regresijskoj analizi ispitan odnos između jetrenih biokemijskih testova i NAS primjenom generaliziranog linearnog modela.

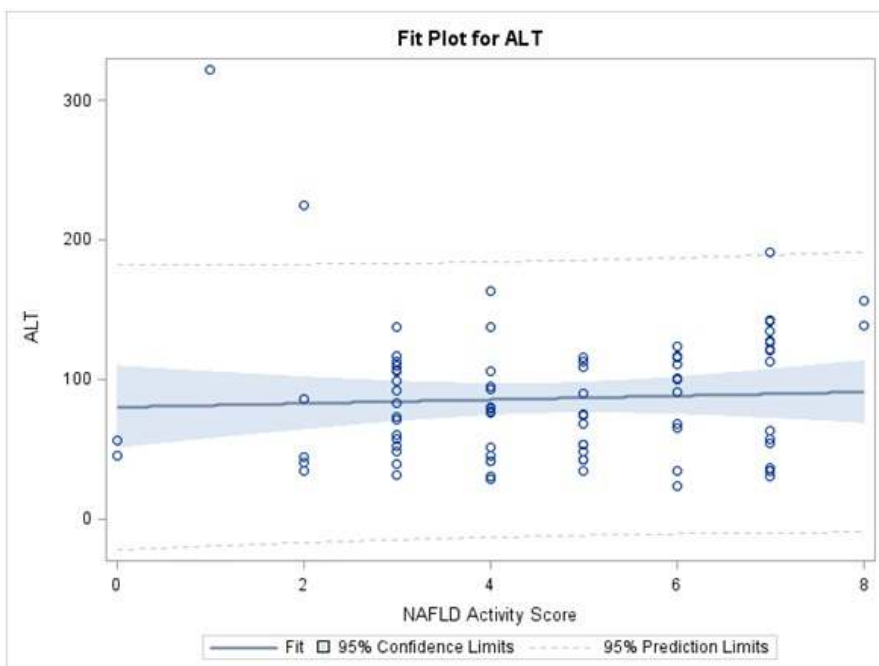
Slika 5.2.4.13. prikazuje odnos GGT i NAS prema generaliziranom linearnom modelu. Vidljivo je da ni ovakvom vrstom analize više vrijednosti NAS nisu povezane s višim vrijednostima GGT.

**Slika 5.2.4.13.** Odnos GGT i NAS, generalizirani linearni model.  $p=0.345$ .



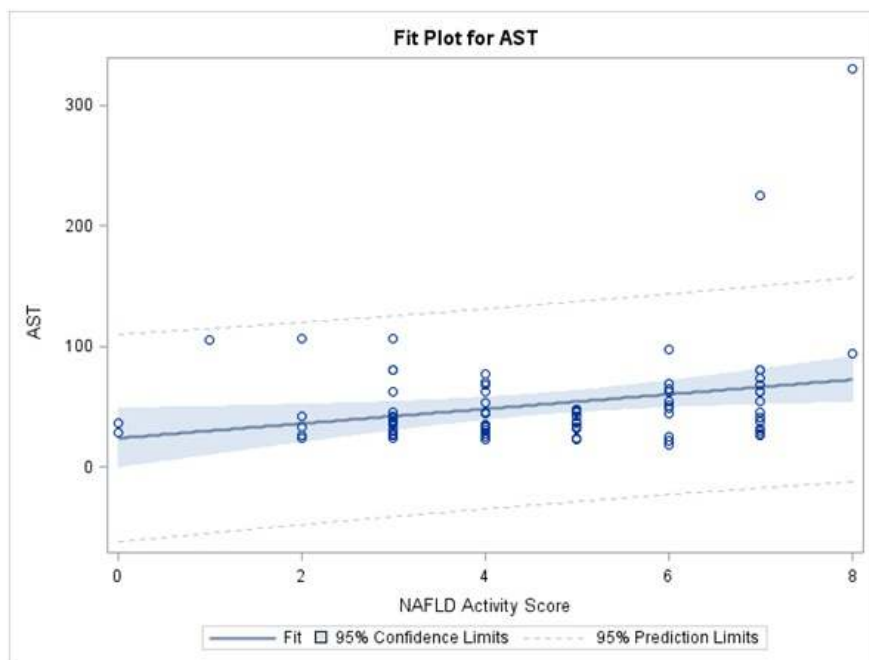
Slika 5.2.4.14. prikazuje odnos ALT i NAS prema generaliziranom linearnom modelu. Slično kao i kod GGT, vidljivo je da ni prema ovom modelu ALT nije povezan s višim vrijednostima NAS.

**Slika 5.2.4.14.** Odnos ALT i NAS, generalizirani linearni model.  $p=0.647$ .



S druge strane, porast AST bio je značajno povezan s višim vrijednostima NAS ( $p=0.017$ ), što je prikazano na Slici 5.2.4.15.

**Slika 5.2.4.15.** Odnos AST i NAS, generalizirani linearni model.  $p=0.017$ .

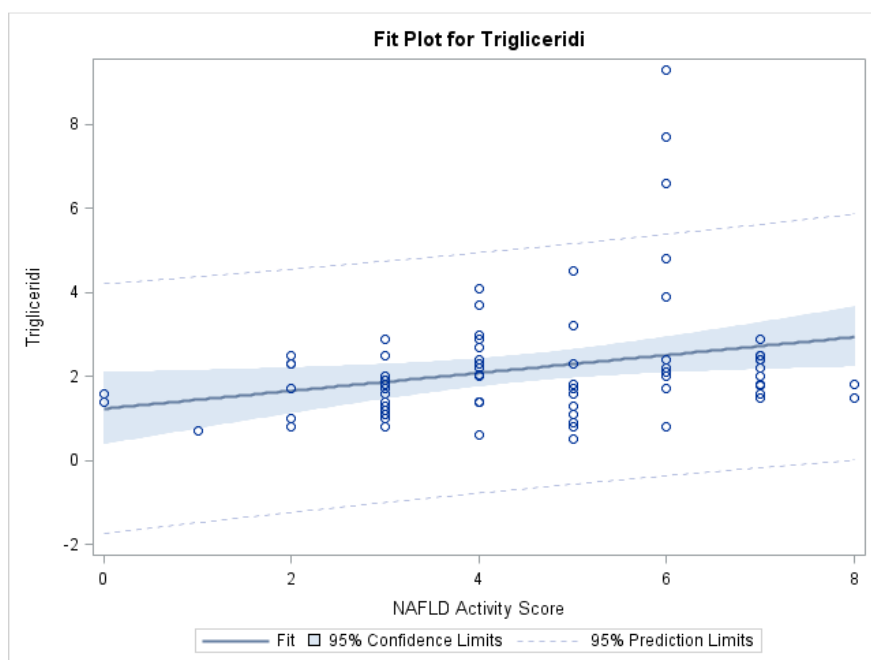


Analiza je dakle pokazala da ne postoji nikakav značajan odnos između vrijednosti ALT ili GGT i vrijednosti NAS, dok je odnos prema NAS-u dokazan za vrijednosti AST.

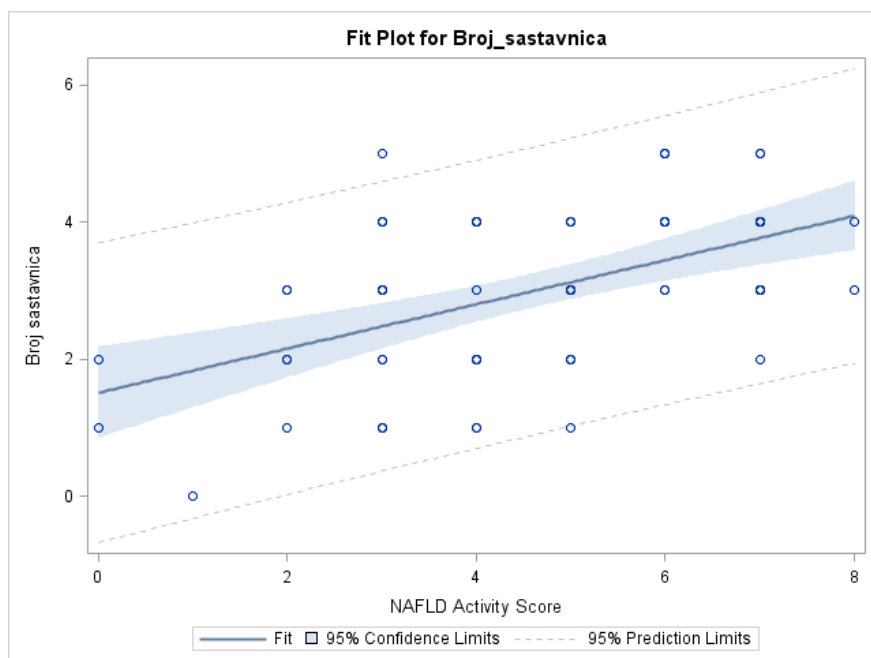
Ispitivanjem odnosa ostalih varijabli u univarijatnoj analizi ustanovljeno je da su i vrijednosti triglicerida povezane s višim vrijednostima NAS ( $p=0.020$ ), dok vrijednosti ukupnog kolesterola ( $p=0.595$ ) i LDL kolesterola ( $p=0.419$ ) nisu pokazale linearan odnos prema NAS-u. Najznačajniju povezanost s NAS pokazao je na kraju broj sastavnica metaboličkog sindroma ( $p<0.001$ ).

Na Slici 5.2.4.16. prikazan je odnos vrijednosti triglicerida i NAS, a na Slici 5.2.4.17. odnos broja sastavnica metaboličkog sindroma i NAS.

**Slika 5.2.4.16.** Odnos triglicerida i NAS, generalizirani linearni model.  $p=0.020$ .



**Slika 5.2.4.17.** Odnos broja sastavnica metaboličkog sindroma i NAS, generalizirani linearni model.  $p<0.001$ .



Nakon univarijatne analize provedena je i multivarijatna regresijska analiza. Da bi se pokazalo podjednak odnos ALT i GGT u odnosu na NAS i ove varijable su uvrštene u model, uz AST, trigliceride i broj sastavnica MS, koje su se pokazale značajne u univarijatnoj analizi. Model je pokazao prihvatljivu usklađenost. Rezultati prikazani u Tablici 5.2.4.7. pokazuju da su najznačajniji parametri povezani s višim vrijednostima NAS-a vrijednost AST i broj sastavnica metaboličkog sindroma, dok ALT i GGT nisu povezani s porastom NAS.

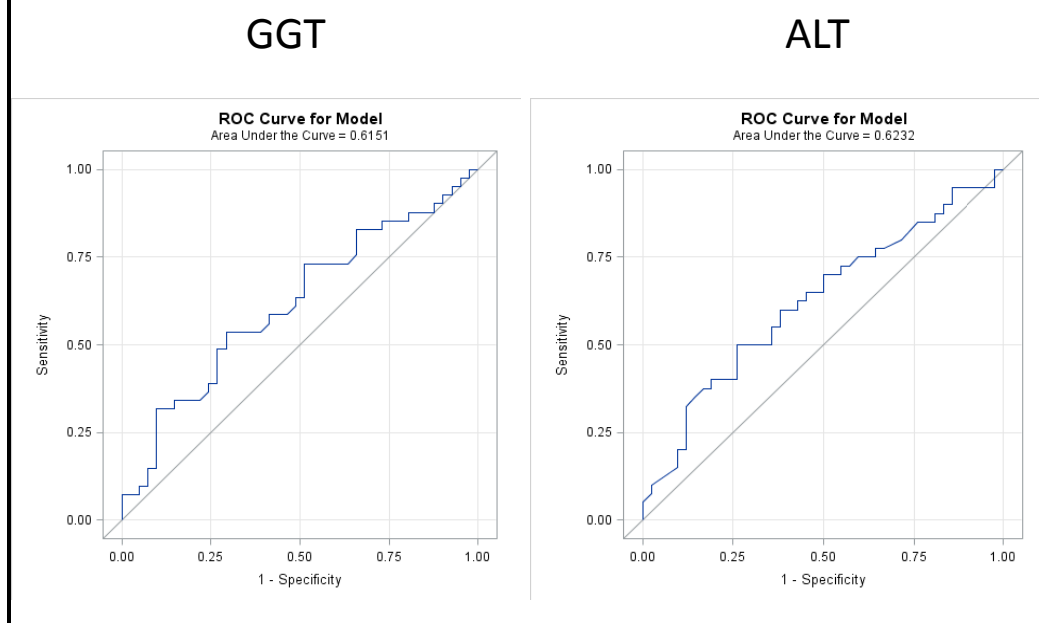
**Tablica 5.2.4.7.** Multivarijatna regresijska analiza odnosa ispitivanih varijabli i NAS

Varijabla	Korelacijski koeficijent	Standardna pogreška	P vrijednost
<b>GGT</b>	-0.002	0.001	0.1123
<b>ALT</b>	-0.002	0.004	0.5672
<b>AST</b>	0.022	0.008	0.0085
<b>Trigliceridi</b>	0.098	0.208	0.6363
<b>Broj sastavnica MS</b>	0.704	0.225	0.0028

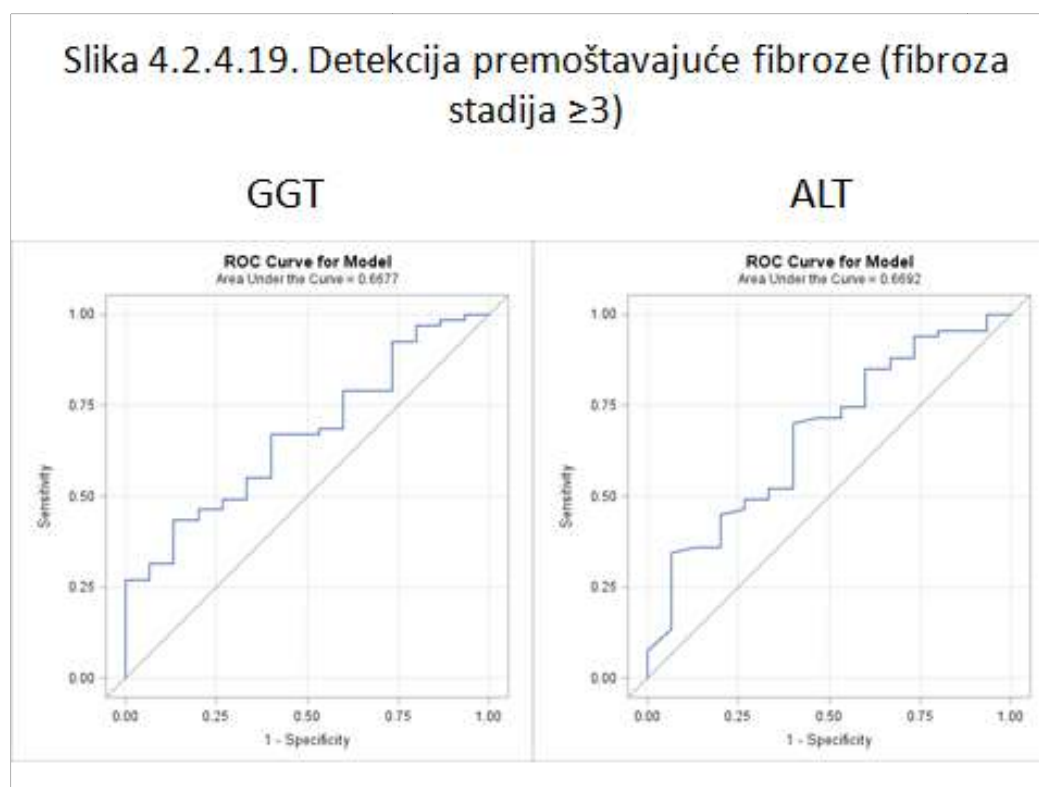
Na kraju, prediktivna vrijednost ALT i GGT za težinu patohistološke slike dodatno je ispitana i konstrukcijom ROC (engl. *receiver operating characteristic*) krivulja. Kao zavisna dihotomna varijabla uzimane su modificirane skupine patohistološke izraženosti nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze i vrijednosti NAS.

Slika 5.2.4.18. prikazuje dijagnostičku točnost GGT i ALT u detekciji značajne fibroze (fibroza stadija  $\geq 2$  prema Brunt i sur.).

Slika 4.2.4.18. Detekcija značajne fibroze (fibroza stadija  $\geq 2$ )

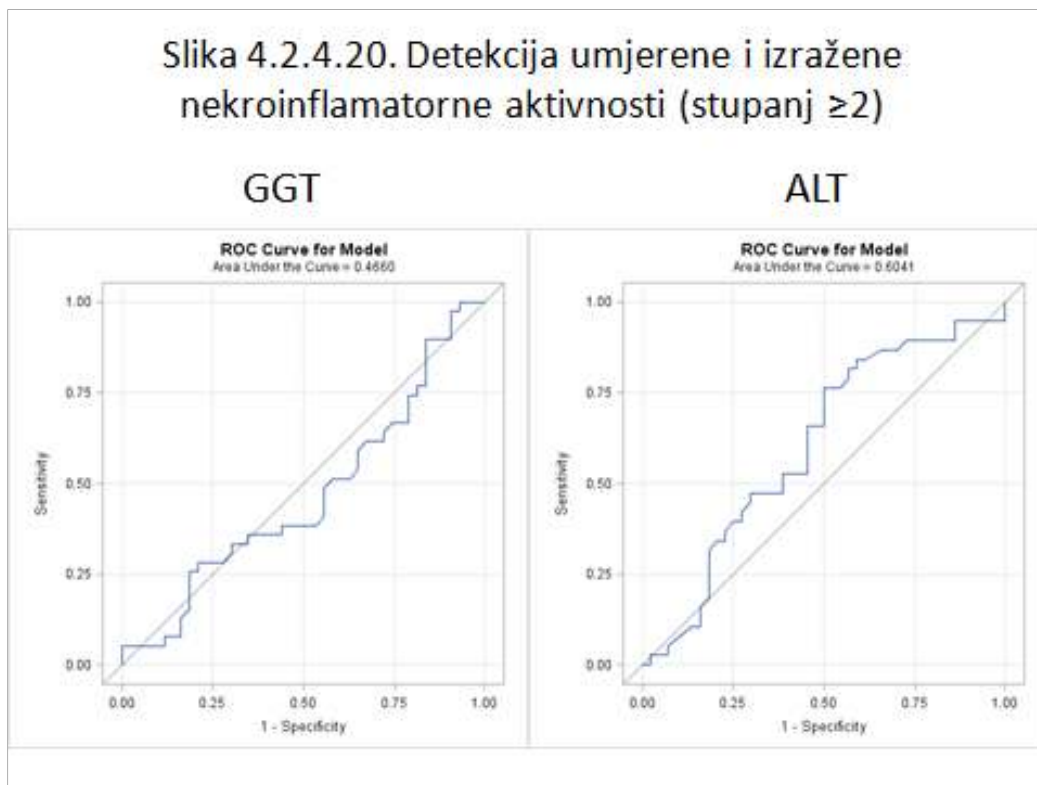


Slika 5.2.4.19. prikazuje dijagnostičku točnost GGT i ALT u detekciji premoštavajuće fibroze (fibroza stadija  $\geq 3$  prema Brunt i sur.).

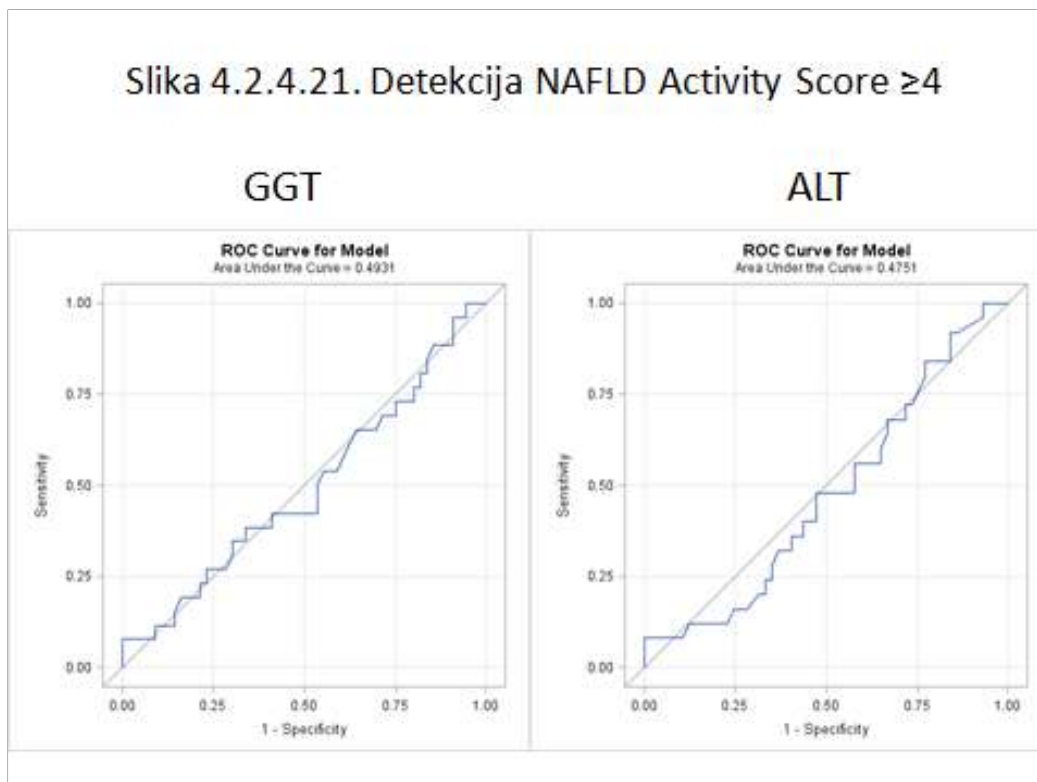




Slika 5.2.4.20. prikazuje dijagnostičku točnost GGT i ALT u detekciji umjerene i izražene nekroinflamatorne aktivnosti (nekroinflamatorna aktivnost stupnja  $\geq 2$  prema Brunt i sur.).



Slika 5.2.4.21. prikazuje dijagnostičku točnost GGT i ALT u detekciji NAFLD Activity Score  $\geq 4$ .



Uočljivo je da niti u jednom slučaju nije dobiven povoljan oblik krivulje, odnosno površina ispod krivulje (AUROC)  $> 0.70$ , što još jednom pokazuje da ni vrijednosti ALT niti GGT nemaju ulogu u detekciji patohistološki izraženijih oblika bolesti, odnosno detekciji viših stupnjeva nekroinflamatorne aktivnosti i stadija fibroze.

## 6. RASPRAVA

Nealkoholna masna bolest jetre (NAFLD) danas se smatra najčešćom kroničnom bolesti jetre u odrasloj populaciji, te predstavlja važan uzrok morbiditeta i mortaliteta povezanog s jetrom. NAFLD je usko povezana s metaboličkim sindromom, te se smatra njegovom jetrenom komponentom. Unatoč znatnim ulaganjima napora u bolje razumijevanje ove bolesti, brojna pitanja još uvijek zahtijevaju razjašnjenje, uključujući ona vezana uz pristup dijagnostici i liječenju bolesnika. Spektar NAFLD obuhvaća tri oblika bolesti: običnu steatozu, nealkoholni steatohepatitis (NASH) i cirozu. Dok obična steatoza uglavnom ima benigni tijek, NASH predstavlja potencijalno progresivni oblik bolesti koji u konačnici može dovesti do ciroze i njenih komplikacija. NASH je prisutan u velikom dijelu bolesnika s NAFLD-om, s udjelom do 75 % među bolesnicima s povišenim vrijednostima transaminaza. Stoga je vrlo važno njegovo pravodobno prepoznavanje, jer detekcija onih bolesnika s NAFLD koji imaju najveći rizik od progresivne bolesti omogućava aktivniji pristup u uvođenju nekog od oblika terapije za koje trenutno postoje određeni dokazi o učinkovitosti u sprečavanju napredovanja i/ili regresiji nekroinflammatory i fibroznih promjena jetrenog parenhima. Usprkos istraživanjima novih neinvazivnih metoda, biopsija jetre još uvijek predstavlja jedinu metodu kojom je moguće definitivno potvrditi dijagnozu NAFLD, razlikovati običnu steatozu od steatohepatitisa, te procijeniti izraženost nekroinflammatory i fibroznih promjena. Način selekcije bolesnika za biopsiju jetre podložan je još uvijek velikim varijacijama, kako u kliničkoj praksi među različitim sredinama i među pojedinim liječnicima, tako i u znanstvenoj literaturi vezanoj uz NAFLD. Kao i kod drugih bolesti jetre, jetreni biokemijski testovi obično služe kao prva linija probira za prisutnost jetrenog oštećenja. Od četiri glavna biokemijska testa na temelju kojih se postavlja sumnja na jetrenu bolest (ALT, AST, GGT, alkalna fosfataza), najčešće se ALT uzima kao najpouzdaniji marker moguće prisutnosti NASH-a ili

pak neke druge ozbiljne kronične bolesti jetre, te njegove povišene vrijednosti često usmjeravaju odluku prema izvođenju biopsije. Međutim, postavlja se pitanje opravdanosti takvih stavova. Naime, više studija jasno je pokazalo da je cijeli spektar NAFLD uključujući steatohepatitis i uznapredovalu fibrozu prisutan i kod bolesnika s normalnim vrijednostima ALT, i to u gotovo jednakim postocima kao kod bolesnika s povišenim ALT (28, 99, 129-131). Jednako tako, vrijednosti ALT najčešće nisu pokazivale korelaciju s izraženosti nekroinflamatorne aktivnosti i fibroze na biopsiji, čak i kada su analizirane vrijednosti ispod gornje granice referentnih (98, 128, 134, 135).

S druge strane, GGT je enzim koji je u kliničkoj praksi često zanemaren, kao i u dijelu studija, preglednih članaka i smjernica vezanih uz NAFLD. Da bi to moglo biti neopravdano, ukazuju rezultati nekih studija u kojima je demonstrirana povezanost vrijednosti GGT s patohistološkim karakteristikama NAFLD poput izraženosti steatohepatitisa i stadija fibroze (133, 136, 137). Učestalost povišenih vrijednosti GGT u NAFLD nije poznata, a naše opažanje iz kliničke prakse je da su kod bolesnika s obilježjima metaboličkog sindroma često prisutne izolirano povišene vrijednosti GGT, odnosno da je kod bolesnika kod kojih se postavi sumnja na NAFLD vrijednost GGT znatno češće povišena od vrijednosti ALT ili AST. Našu pretpostavku, odnosno usporedbu prevalencije povišenosti pojedinih enzima ispitali smo u populaciji bolesnika s dijabetesom tipa 2, koja uz populaciju pretilih predstavlja skupinu s najznačajnijim rizičnim faktorom za NAFLD i izrazito visokom prevalencijom NAFLD (do 70%). U analiziranoj populaciji od 892 bolesnika s dijabetesom tipa 2 koju smo obuhvatili našom studijom prikazana je relativno visoka učestalost povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova, a učestalost povišenog GGT bila je znatno viša od učestalosti povišenog ALT ili AST (33.4% prema 16.1% odnosno 10.5%). U usporedbi s ranije objavljenim rezultatima, prevalencija povišenog GGT u našoj skupini bila je slična: u studiji Colloredo-Mels i sur. koja je uključila 351 dijabetičara prevalencija izolirano povišenog GGT

bila je 16-17% (u studiju nisu bili uključeni ispitanici koji su imali povišen neki od ostalih jetrenih enzima), a u studiji Miyake i sur. udio povišenih vrijednosti GGT i ALT bio je 49.4% i 18.0% kod 233 bolesnika s novootkrivenim dijabetesom, te 31.3% i 3.6% kod 112 bolesnika s liječenim dijabetesom (108, 110).

U našem istraživanju, pri usporedbi učestalosti povišenih enzima među skupinama dijabetičara s rastućim vrijednostima BMI jedino je kod GGT učestalost pravilno pratila rastuće kategorije pretilosti ( $P < 0.001$ ), koje inače same po sebi predstavljaju jak prediktor prisutnosti i težine NASH-a (97). Važno je zapaziti da je naše istraživanje obuhvatilo znatno veći broj bolesnika od ranijih studija.

Ovim rezultatima potvrdili smo prvu hipotezu našeg istraživanja. Obzirom da se radi o populaciji s visokom prevalencijom NAFLD (do 70%), vjerojatno je da zabilježena razlika u učestalosti povišenih vrijednosti pojedinih enzima kod dijabetičara predstavlja i razliku prisutnu općenito kod bolesnika s NAFLD. To bi u konačnici potvrdilo naše inicijalno opažanje iz kliničke prakse.

U prospektivnom dijelu istraživanja, naša kohorta sastojala se najvećim dijelom od bolesnika srednje dobi (medijan 46 godina) i prekomjerne tjelesne mase (prosječni BMI oko  $30 \text{ kg/m}^2$ ), a udio bolesnika koji su ispunjavali kriterije za metabolički sindrom bio je 68%. Ti podaci su vrlo slični onima iz kohorte NASH Clinical Research Network (NASH CRN) i drugih opisanih kohorti (92, 93, 98). Izraženost pojedinih patohistoloških karakteristika bila je usporediva kod naših bolesnika i onih iz kohorte NASH CRN kada je u pitanju steatoza i lobularna upala, dok je prisutnost baloniranja bila češća u našoj kohorti (92% prema 66%), a uznapredovale fibroze češća u kohorti NASH CRN (31% prema 18%).

Radi dokazivanja pretpostavke o jednakoj težini bolesti kod bolesnika s izolirano povišenim GGT u odnosu na one s povišenim ALT, učinjena je detaljna usporedba ove dvije skupine bolesnika. Od demografskih parametara jedina značajna razlika opažena je u dobi bolesnika.

Bolesnici s izolirano povišenim GGT bili su nešto stariji u odnosu na bolesnike s povišenim ALT, no tumačenje ove razlike ostalo je nejasno. Udio bolesnika koji su ispunjavali kriterije za metabolički sindrom bio je jednak, a skupine se nisu razlikovale u učestalosti niti jedne od sastavnica metaboličkog sindroma, kao ni u broju manifestiranih sastavnica po pojedinom bolesniku. Najvažnije, dvije skupine imale su gotovo identičnu učestalost i izraženost većine pojedinačnih patohistoloških značajki. Skupina s izolirano povišenim GGT imala je čak nešto izraženiju lobularnu upalu, a glikogenizirane jezgre nađene su kod gotovo svih bolesnika s izolirano povišenim GGT (94.7%), u usporedbi sa 65% kod bolesnika s povišenim ALT ( $P=0.028$ ). Obzirom da njihova prisutnost govori u prilog nealkoholne etiologije steatohepatitisa, jer se jako rijetko mogu naći kod alkoholnog steatohepatitisa, ovaj nalaz dodatno isključuje mogućnost da su izolirano povišene vrijednosti GGT kod ovih bolesnika bile posljedica neprepoznate konzumacije alkohola ili lijekova.

Između uspoređivanih skupina nije postojala nikakva značajna razlika u raspodjeli bolesnika prema semikvantitativnim stupnjevima nekroinflamatorne aktivnosti i stadijima fibroze sustava Brunt i sur., kao ni prema vrijednostima NAFLD Activity Score. Proporcija bolesnika koji su ispunjavali minimalne kriterije za NASH bila je također identična.

Ovime smo dokazali da nema razlike u težini bolesti, histološkom spektru i pojedinim značajkama bolesti kod bolesnika s NAFLD kod kojih su izolirano povišene vrijednosti GGT u odnosu na bolesnike kod kojih su povišene vrijednosti ALT i/ili AST, čime je potvrđena druga hipoteza istraživanja. Obzirom da su histološki uznapredovaliji oblici bolesti jednako zastupljeni u obje navedene skupine bolesnika, mišljenja smo da se nalaz izolirano povišenog GGT nikako ne bi trebao zanemarivati. Dodatnu važnost pažljivom pristupu bolesnicima s izolirano povišenim GGT daje činjenica da je u našoj inicijalnoj kohorti (bolesnici sa sumnjom na NAFLD koji su podvrgnuti biopsiji jetre) kod troje od ukupno 24 bolesnika s

izolirano povišenim GGT biopsija jetre u konačnici uputila na autoimunu bolest jetre kao uzrok povišenja enzima, iako je sva prethodno učinjena serologija bila negativna.

Ono što dosad nije analizirala niti jedna od studija, a svakako bi bilo zanimljivo vidjeti, jest izraženost patohistoloških i kliničkih karakteristika kod onih bolesnika koji su u potpunosti asimptomatski i kontinuirano urednih vrijednosti svih jetrenih biokemijskih testova, u usporedbi sa skupinama koje smo mi evaluirali. Međutim, takvu studiju bi u realnim kliničkim uvjetima bilo vrlo teško provesti, primarno iz etičkih razloga.

Obzirom da smo inicijalno bili pretpostavili znatno veću učestalost povišenih vrijednosti GGT u odnosu na ALT/AST u populaciji bolesnika s NAFLD, kao i jednaku težinu bolesti kod onih bolesnika kod kojih je izolirano povišen GGT, kao treću hipotezu istraživanja postavili smo pitanje usporedbe koreliranja vrijednosti enzima s težinom bolesti.

Korelaciju pojedinih enzima ispitali smo i usporedili na tri načina (univarijatna i multivarijatna analiza, konstrukcija ROC krivulja). Korelaciju sa stupnjem nekroinflamatorne aktivnosti nisu pokazale ni vrijednosti GGT niti ALT ili AST, a jedina varijabla koja je jasno pokazala korelaciju i u univarijatnom i u multivarijatnom modelu bio je broj sastavnica metaboličkog sindroma (OR 3.15, 95% CI: 1.59-6.26). Ova povezanost težine metaboličkog sindroma i nekroinflamatorne aktivnosti već je bila zapažena i u ranije objavljenim studijama, te ukazuje na potrebu za agresivnijim pristupom u dijagnostici i liječenju kod bolesnika s izraženijim metaboličkim sindromom (93, 95, 96). Niti analizom odnosa vrijednosti jetrenih biokemijskih testova i stadija fibroze nije ustanovljena povezanost viših vrijednosti GGT i ALT s uznapređovalijim stadijem fibroze. Vrijednosti AST značajno su se razlikovale u različitim stadijima fibroze ( $p=0.033$ ), te je bila vidljiva tendencija da uznapređovaliju fibrozu prati viša vrijednost AST, no korelacija u multivarijatnoj analizi nije dokazana. Za ostale varijable, uključujući dob, indeks tjelesne mase i dijabetes (koji su u nekima od prethodno

objavljenih studija pokazivali korelaciju s izraženosti fibroze), u našoj kohorti također nije dokazana korelacija sa stadijem fibroze (92, 97-99).

Na kraju, ni vrijednosti GGT ni ALT nisu bile povezane sa vrijednostima NAFLD Activity Score (NAS), dok je povezanost dokazana i u univarijatnom i u multivarijatnom modelu za vrijednosti AST i broj sastavnica metaboličkog sindroma. Ova zapažanja u skladu su s podacima iz dijela prethodno objavljenih studija, u kojima je također AST među jetrenim biokemijskim testovima bio jedini koji je pokazivao korelaciju s težinom steatohepatitisa ili izraženosti fibroze (3, 128, 133).

U našoj kohorti dakle nije potvrđena korelacija vrijednosti GGT s patohistološkim karakteristikama i izraženosti bolesti, koja je ranije bila opisana u nekoliko studija (133, 136, 137). Vrijednosti GGT i ALT nisu se razlikovale u korelaciji s težinom bolesti, te time nije potvrđena treća hipoteza našeg istraživanja. Određena povezanost dokazana je za AST; vrijednosti AST u našoj su kohorti u svim slučajevima bile povišene zajedno s povišenim ALT, a učestalost povišenog AST bila je i u retrospektivnom dijelu našeg istraživanja na populaciji dijabetičara i u prospektivnoj analizi bioptiranih bolesnika znatno manja od učestalosti povišenog ALT, a pogotovo GGT. Zapaženu povezanost s težinom steatohepatitisa imao je broj sastavnica metaboličkog sindroma izraženih kod pojedinog bolesnika, što je na temelju rezultata ranijih studija prepoznato i u smjernicama, u kojima je naveden kao važan indikator onih bolesnika kod kojih se može očekivati najveća korist od biopsije jetre i kasnijeg liječenja (44).

Važno je primijetiti da je u našoj kohorti značajan postotak bolesnika (17.9%) u trenutku biopsije već imao razvijenu premoštavajuću ('bridging') fibrozu, koja je predstadij ciroze. Ti bolesnici s premoštavajućom fibrozom nisu se u našoj skupini bolesnika mogli jasno razlikovati od ostalih po nijednoj od kliničkih i laboratorijskih karakteristika, što još jednom



naglašava važnost pažljivog pristupa bolesnicima sa suspektom NAFLD, uz pravodobnu dijagnostiku i pokušaj liječenja.

## 7. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju potvrđena je visoka učestalost povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova na velikom uzorku populacije bolesnika s dijabetesom tipa 2, a učestalost povišenog GGT znatno je viša (oko 2 odnosno 3 puta) od učestalosti povišenog ALT ili AST. Obzirom da se radi o populaciji s visokom prevalencijom NAFLD (do 70%), indirektno smo potvrdili naše opažanje iz kliničke prakse da su kod bolesnika s obilježjima metaboličkog sindroma često prisutne izolirano povišene vrijednosti GGT, odnosno da je kod bolesnika kod kojih postoji sumnja na NAFLD vrijednost GGT znatno češće povišena od vrijednosti ALT ili AST.

U usporedbi bolesnika s izolirano povišenim GGT u odnosu na one s povišenim ALT, nema razlike u težini bolesti, histološkom spektru i pojedinim značajkama bolesti. Ove dvije skupine ne razlikuju se prema učestalosti i izraženosti metaboličkog sindroma ili njegovih sastavnica, učestalosti i izraženosti NASH-a i pojedinih patohistoloških značajki bolesti, te raspodjeli bolesnika prema semikvantitativnim stupnjevima nekroinflammatorne aktivnosti i stadijima fibroze ili prema vrijednostima NAFLD Activity Score. Obzirom da su histološki uznapređovaliji oblici bolesti jednako zastupljeni kod bolesnika s izolirano povišenim GGT, ovaj nalaz se u praksi nikako ne bi trebao zanemarivati. Dodatnu važnost takvom pristupu daje i činjenica da kod manjeg dijela ovih bolesnika umjesto potvrde NAFLD biopsija jetre u konačnici može uputiti na autoimunu bolest jetre.

Ni vrijednosti GGT niti vrijednosti ALT ne koreliraju dobro sa stupnjem nekroinflammatorne aktivnosti, stadijem fibroze, ili vrijednostima NAFLD Activity Score. Određena povezanost s patohistološkom težinom bolesti prikazana je za AST, koji pokazuje tendenciju prema višim vrijednostima s porastom izraženosti fibroze, a njegova povezanost s višim vrijednostima NAFLD Activity Score je jasno dokazana. Značajnu povezanost s težinom steatohepatitisa pokazuje broj sastavnica metaboličkog sindroma izraženih kod pojedinog bolesnika. Stoga,

nalaz povišenog AST i prisutnost većeg broja sastavnica metaboličkog sindroma kod pojedinog bolesnika jasno upućuju na povišen rizik za prisutnost uznapredovalije bolesti i potrebu agresivnijeg pristupa u dijagnostici i liječenju.

## 8. SAŽETAK

NAFLD je najčešća kronična bolest jetre u odrasloj populaciji, koja se sastoji od entiteta s različitom prognozom: obične steatoze, koja ima benignu prognozu, i NASH-a, koji ima potencijalno progresivni tijek. Razlikovanje ovih entiteta trenutno je definitivno moguće jedino biopsijom jetre. Selekcija bolesnika za biopsiju podložna je znatnim varijacijama ovisno o određenoj sredini i pojedinom liječniku. Najčešće se povišena vrijednost ALT uzima kao najpouzdaniji marker moguće prisutnosti NASH-a ili neke druge ozbiljne kronične bolesti jetre, te povišene vrijednosti ALT često usmjeravaju odluku prema izvođenju biopsije. Međutim, više studija pokazalo je da cijeli spektar NAFLD uključujući steatohepatitis i uznapređovalu fibrozu može biti prisutan i kod bolesnika s normalnim vrijednostima ALT.

S druge strane, primijetili smo da je kod bolesnika kod kojih postoji sumnja na NAFLD vrijednost GGT znatno češće povišena od ostalih jetrenih biokemijskih testova, a u kliničkoj praksi i u znanstvenoj literaturi vezanoj za NAFLD vrijednosti GGT relativno često se ne uzimaju u razmatranje, što nema opravdanje u dosad objavljenim studijama. Naprotiv, u pojedinim studijama upravo je GGT pokazao najbolju korelaciju s određenim značajkama patohistološki izraženije bolesti. Cilj našeg istraživanja bio je dokazati da je GGT kod bolesnika s NAFLD znatno češće povišen od ALT i da je patohistološka težina bolesti jednaka kod bolesnika s izolirano povišenim GGT i onih kod kojih je povišen ALT, te ispitati da li GGT ujedno i bolje korelira s patohistološkom težinom bolesti od ALT.

Usporedbu prevalencije povišenosti pojedinih enzima ispitali smo u populaciji bolesnika s dijabetesom tipa 2, koja uz populaciju pretilih predstavlja skupinu s najznačajnijim rizičnim faktorom za NAFLD i izrazito visokom prevalencijom NAFLD (do 70%). U analiziranoj populaciji od 892 bolesnika koju smo obuhvatili istraživanjem prikazana je relativno visoka učestalost povišenih vrijednosti jetrenih biokemijskih testova, a učestalost povišenog GGT bila je znatno viša od učestalosti povišenog ALT ili AST (33.4% prema 16.1% odnosno

10.5%). U prospektivnom dijelu istraživanja, uključeno je 98 bolesnika koji su bioptirani pod sumnjom na NAFLD, koji je dokazan kod njih 84. U detaljnoj usporedbi bolesnika s izolirano povišenim GGT i onih s povišenim ALT, skupine su imale gotovo identičnu učestalost i izraženost većine patohistoloških značajki, a nisu se razlikovale ni u težini metaboličkog sindroma. Skupina s izolirano povišenim GGT imala je nešto izraženiju lobularnu upalu, dok je uznapredovala fibroza bila nešto češća kod bolesnika s povišenim ALT. Nije postojala nikakva značajna razlika u učestalosti NASH-a, kao ni u raspodjeli bolesnika prema semikvantitativnim stupnjevima nekroinflamatorne aktivnosti i stadijima fibroze, ili prema vrijednostima NAFLD Activity Score (NAS). Ovime je dokazano da nema razlike u težini bolesti, histološkom spektru i pojedinim značajkama bolesti kod bolesnika s NAFLD kod kojih su izolirano povišene vrijednosti GGT u odnosu na bolesnike kod kojih su povišene vrijednosti ALT. U ispitivanju koreliranja, ni vrijednosti GGT niti ALT nisu pokazale korelaciju sa stupnjem nekroinflamatorne aktivnosti, stadijem fibroze, ili vrijednostima NAS. Bila je vidljiva tendencija da uznapredovaliju fibrozu prati viša vrijednost AST, a AST je bio jasno povezan s vrijednosti NAS. Broj sastavnica metaboličkog sindroma najbolje je korelirao sa stupnjem nekroinflamatorne aktivnosti i vrijednostima NAS.

U zaključku, prevalencija izolirano povišenog GGT je visoka, a obzirom da su histološki uznapredovaliji oblici bolesti jednako zastupljeni kod bolesnika s takvim nalazom, on se ne bi trebao zanemarivati. Nadalje, kod 3 od ukupno 24 bolesnika s izolirano povišenim GGT i sumnjom na NAFLD biopsija jetre je u konačnici uputila na autoimunu bolest jetre kao uzrok povišenja enzima, iako je sva prethodno učinjena serologija bila negativna. Taj podatak dodatno naglašava važnost pažljivog pristupa bolesnicima kod kojih su vrijednosti GGT izolirano povišene.

## 9. SUMMARY

### **Importance of elevated gamma-glutamyl transpeptidase in detection and prediction of severity of non-alcoholic steatohepatitis**

In NAFLD, the only method that distinguishes between simple steatosis (benign prognosis) and NASH (potentially progressive course) is liver biopsy. Patient selection for biopsy varies significantly. ALT is often considered the most reliable marker of potential NASH or other serious liver disease, and it often influences the decision to perform biopsy. However, several studies have demonstrated that the full spectrum of NAFLD can be present with normal ALT. On the other hand, we have noticed that patients in whom NAFLD is suspected have elevated GGT more often than other enzymes, while in clinical as well as scientific practice GGT levels are often disregarded – an attitude which isn't backed by any evidence. Indeed, some studies have demonstrated GGT to best correlate with pathohistological disease severity. Aim of our study was to prove that GGT is significantly more often elevated than ALT in patients with NAFLD and that pathohistological disease severity is the same in patients with isolated GGT elevation and those with elevated ALT. We also wanted to test if GGT correlates better with pathohistological severity than ALT. Prevalence of elevation of liver enzymes was analyzed in a population of type 2 diabetics, which has the highest NAFLD prevalence (up to 70%). In the 892 patients included in the study, prevalence of enzyme elevation was high, and GGT was significantly more frequently elevated than ALT or AST (33.4% vs. 16.1% vs. 10.5%). In the prospective part of our study, we included 98 patients who underwent liver biopsy with suspicion of NAFLD, and NAFLD was proved in 84 of them. In the detailed comparison of patients with isolated GGT elevation and those with elevated ALT, there was no difference in severity, histological spectrum or individual characteristics of the disease. In the analysis of the correlation, neither GGT nor ALT demonstrated the correlation with

necroinflammatory activity grade, fibrosis stage, or NAS values. AST demonstrated a tendency of correlation with fibrosis stage, and it was clearly associated with NAS values. Number of metabolic syndrome components correlated best with necroinflammatory grade and NAS values. In conclusion, prevalence of isolated GGT elevation is high, and it should definitely not be disregarded.

## 8. LITERATURA

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434–8.
2. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005;42:132–8.
3. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi PH. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2042–7.
4. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL i sur. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* 2006;44:865-73.
5. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;34:274-85.
6. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413–9.
7. Bugianesi E, Leone N, Vanni E i sur. Expanding the Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Cryptogenic Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2002;123:134–40.
8. Marrero JA, Fontana RJ, Su GL, Conjeevaram HS, Emick DM, Lok AS. NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 2002;36:1349-1354.



9. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2011;43:617-49.
10. Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004;40:578–84.
11. Browning JD, Kumar KS, Saboorian MH, Thiele DL. Ethnic differences in the prevalence of cryptogenic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2004;99:292–8.
12. Hashimoto E, Yatsuji S, Tobari M i sur. Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2009;44Suppl 19:89-95.
13. Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma: our case series and literature review. *World J Gastroenterol* 2010;16:1436-41.
14. Cortez-Pinto H, Baptista A, Camilo ME, De Moura MC. Nonalcoholic steatohepatitis--a long-term follow-up study: comparison with alcoholic hepatitis in ambulatory and hospitalized patients. *Dig Dis Sci* 2003;48:1909-13.
15. Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C i sur. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006;42:132–8.
16. Bhala N, Angulo P, van der Poorten D i sur. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis. An International Collaborative Study. *Hepatology* 2011;54:1208–16.
17. Kim WR, Poterucha JJ, Porayko MK, Dickson ER, Steers JL, Wiesner RH. Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation. *Transplantation* 1996;62:1802-5.
18. Ratziu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010;53:372-84.

19. Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005;42:44–52.
20. Lonardo A, Bellini M, Tartoni P, Tondelli E. The bright liver syndrome. Prevalence and determinants of a “bright” liver echopattern. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:351–6.
21. Williams CD, Stenger J, Asike MI i sur. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140:124–31.
22. Minervini MI, Ruppert K, Fontes P i sur. Liver biopsy findings from healthy potential living liver donors: reasons for disqualification, silent diseases and correlation with liver injury tests. *J Hepatol* 2009;50:501–10.
23. Nadalin S, Malago M, Valentin-Gamazo C i sur. Preoperative donor liver biopsy for adult living donor liver transplantation: risks and benefits. *Liver Transpl* 2005;11:980–6.
24. Ryan CK, Johnson LA, Germin BI, Marcos A. One hundred consecutive hepatic biopsies in the workup of living donors for right lobe liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:1114–22.
25. Tran TT, Changsri C, Shackleton CR i sur. Living donor liver transplantation: histological abnormalities found on liver biopsies of apparently healthy potential donors. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:381–3.
26. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R i sur. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387–95.
27. Soderberg C, Stal P, Askling J i sur. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology* 2010;51:595–602.

28. Fracanzani AL, Valenti L, Bugianesi E i sur. Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology* 2008;48:792-8.
29. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2006;45:600-6.
30. Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009;29:113-9.
31. Prashanth M, Ganesh HK, Vima MV i sur. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Assoc Physicians India* 2009;57:205-10.
32. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
33. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005;115:1343-51.
34. Kim HJ, Kim HJ, Lee KE i sur. Metabolic significance of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese, nondiabetic adults. *Arch Intern Med* 2004;164:2169-75.
35. Duvnjak M, Lerotić I, Baršić N, Tomašić V, Virović Jukić L, Velagić V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:4539-50.
36. Chalasani N, Gorski JC, Asghar MS i sur. Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:544-50.
37. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F i sur. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-92.

38. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P i sur. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003;125:437-43.
39. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S i sur. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1708-17.
40. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004;8:445-54.
41. Cortez-Pinto H, de Moura MC, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. *J Hepatol* 2006;44:197-208.
42. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003;112:91-100.
43. Bataller R, Schwabe RF, Choi YH i sur. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1383-94.
44. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE i sur.; American Association for the Study of Liver Diseases; American College of Gastroenterology; American Gastroenterological Association. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol* 2012;107:811-26.
45. Palmentieri B, de Sio I, La Mura V i sur. The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis. *Dig Liver Dis* 2006;38:485-9.
46. Mottin CC, Moretto M, Padoin AV i sur. The role of ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2004;14:635-7.

47. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM i sur. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:745-50.
48. Vuppalanchi R, Gould RJ, Wilson LA i sur.; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN). Clinical significance of serum autoantibodies in patients with NAFLD: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. *Hepatol Int* 2011;6:379-85.
49. Liangpunsakul S, Chalasani N. What should we recommend to our patients with NAFLD regarding alcohol use? *Am J Gastroenterol* 2012;107:976-8.
50. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE i sur. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2011;54:344-53.
51. Ratziu V, Charlotte F, Heurtier A i sur. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2005;128:1898-906.
52. Tsochatzis EA, Gurusamy KS, Ntaoula S, Cholongitas E, Davidson BR, Burroughs AK. Elastography for the diagnosis of severity of fibrosis in chronic liver disease: a meta-analysis of diagnostic accuracy. *J Hepatol* 2011;54:650-9.
53. Baršić N, Lerotić I, Smirčić-Duvnjak L, Tomašić V, Duvnjak M. Overview and developments in noninvasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012;18:3945-54.
54. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, Ehman RL. Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology* 2011;259:749-56.
55. Yin M, Talwalkar JA, Glaser KJ, Manduca A, Grimm RC, Rossman PJ, Fidler JL, Ehman RL. Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:1207-13.

56. Skelly MM, James PD, Ryder SD. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J Hepatol* 2001;35:195–9.
57. Mathiesen UL, Franzen LE, Fryden A, Foberg U, Bodemar G. The clinical significance of slightly to moderately increased liver transaminase values in asymptomatic patients. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:85–91.
58. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-19.
59. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:5286-96.
60. Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:643-50.
61. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.
62. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M i sur. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
63. Suzuki A, Lindor K, St Saver J i sur. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatology* 2005;43:1060–6.
64. Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM i sur. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2804–9.
65. Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Heilbronn LK i sur. Effect of 6-month calorie restriction and exercise on serum and liver lipids and markers of liver function. *Obesity* 2008;16:1355–62.

66. Lazo M, Solga SF, Horska A i sur., Fatty Liver Subgroup of the Look Ahead Research Group. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33:2156–63.
67. Wang R, Koretz R, Yee H. Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver? A systematic review. *Am J Med* 2003;115:554–9.
68. Harrison SA, Fecht W, Brunt EM, Neuschwander-Tetri BA. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, prospective trial. *Hepatology* 2009;49:80–6.
69. Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM i sur. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:121–9.
70. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW i sur. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology* 2009; 50:1105–12.
71. van der Heijden GJ, Wang ZJ, Chu ZD i sur. A 12-week aerobic exercise program reduces hepatic fat accumulation and insulin resistance in obese, Hispanic adolescents. *Obesity* 2010;18:384–90.
72. Uygun A, Kadayifci A, Isik AT i sur. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:537–44.
73. Nair S, Diehl AM, Wiseman M i sur. Metformin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:23–8.
74. Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R i sur. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1082–90.
75. Haukeland JW, Konopski Z, Eggesb HB i sur. Metformin in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:853–60.

76. Idilman R, Mizrak D, Corapcioglu D i sur. Clinical trial: insulin-sensitizing agents may reduce consequences of insulin resistance in individuals with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:200–8.
77. Omer Z, Cetinkalp S, Akyildiz M i sur. Efficacy of insulin-sensitizing agents in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:18–23.
78. Musso G, Gambino R, Cassader M i sur. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:79–104.
79. Belfort R, Harrison SA, Brown K i sur. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006;355:2297–307.
80. Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV i sur. Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008;135:1176–84.
81. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV i sur. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2010;362:1675–85.
82. Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K i sur. Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1667–72.
83. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P i sur. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2485–90.
84. Dufour JF, Oneta CM, Gonvers JJ i sur. Swiss Association for the Study of the Liver. Randomized placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid with vitamin E in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1537–43.
85. Sanyal AJ, Mofrad PS, Contos MJ i sur. A pilot study of vitamin E versus vitamin E and pioglitazone for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:1107–15.



86. Lindor KD, Kowldley KV, Heathcote EJ i sur. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology* 2004;39:770–8.
87. Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC. Review article: omega-3 fatty acids - a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:679–92.
88. Gomer-Dominguez E, Gisbert JP, Moreno-Monteagudo A i sur. A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipid, non-alcoholic fatty liver patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1643–7.
89. Antonopoulos S, Mikros S, Mylonopoulos M i sur. Rosuvastatin as a novel treatment of non-alcoholic fatty liver disease in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis* 2006;184:233–4.
90. Nelson A, Torres DM, Morgan AE i sur. A pilot study using simvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:990–4.
91. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059-62.
92. Haukeland JW, Konopski Z, Linnestad P i sur. Abnormal glucose tolerance is a predictor of steatohepatitis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:1469-77.
93. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G i sur. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917-923.
94. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G i sur. Non-alcoholic steatohepatitis in patients cared in metabolic units. *Diabetes Res Clin Pract* 2004;63:143–151.
95. Kang H, Greenson JK, Omo JT i sur. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2247-53.

96. Ryan MC, Wilson AM, Slavin J i sur. Associations between liver histology and severity of the metabolic syndrome in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care* 2005;28:1222-4.
97. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-62.
98. Neuschwander-Tetri BA, Clark JM, Bass NM i sur.; NASH Clinical Research Network. Clinical, laboratory and histological associations in adults with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010;52:913-24.
99. Sorrentino P, Tarantino G, Conca P i sur. Silent non-alcoholic fatty liver disease-a clinical-histological study. *J Hepatol* 2004;41:751-7.
100. Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology* 2004;40:820-6.
101. Younossi ZM, Gramlich T, Matteoni CA, Boparai N, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004;2:262-5.
102. Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001;38:263-355.
103. Goldberg DM, Martin JV. Role of gamma-glutamyl transpeptidase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease. *Digestion* 1975;12:232-46.
104. Penn R, Worthington DJ. Is serum gamma-glutamyltransferase a misleading test? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286:531-5.
105. Goldberg DM. Structural, functional, and clinical aspects of  $\gamma$ -glutamyltransferase. *CRC Crit Rev Clinl Lab Sci* 1980;12:1-58.
106. Rosalki SB, Tarlow D, Rau D. Plasma gamma-glutamyl transpeptidase elevation in patients receiving enzyme-inducing drugs. *Lancet* 1971;2:376-7.

107. Moussavian SN, Becker RC, Piepmeyer JL, Mezey E, Bozian RC. Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism. Influence of alcohol ingestion and liver disease. *Dig Dis Sci* 1985;30:211-4.
108. Colloredo-Mels G, Bettale G, Bellati G i sur. Gamma-glutamyl-transpeptidase in diabetics: a case control study. *Clin Chim Acta* 1988;175:189-95.
109. Balogun WO, Adeleye JO, Akinlade KS, Adedapo KS, Kuti M. Frequent occurrence of high gamma-glutamyl transferase and alanine amino transferase among Nigerian patients with type 2 diabetes. *Afr J Med Med Sci* 2008;37:177-83.
110. Miyake Y, Eguchi H, Shinchi K, Oda T, Sasazuki S, Kono S. Glucose intolerance and serum aminotransferase activities in Japanese men. *J Hepatol* 2003;38:18-23.
111. Wen J, Liang Y, Wang F i sur. C-reactive protein, gamma-glutamyltransferase and type 2 diabetes in a Chinese population. *Clin Chim Acta* 2010;411:198-203.
112. Ren J, Pang ZC, Gao WG i sur. C-reactive protein and gamma-glutamyltransferase concentrations in relation to the prevalence of type 2 diabetes diagnosed by glucose or HbA1c criteria in Chinese adults in Qingdao, China. *Exp Diabetes Res* 2010;2010:761715.
113. Wong CA, Araneta MR, Barrett-Connor E, Alcaraz J, Castañeda D, Macera C. Probable NAFLD, by ALT levels, and diabetes among Filipino-American women. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;79:133-40.
114. Lee DH, Ha MH, Kim JH i sur. Gamma-glutamyltransferase and diabetes--a 4 year follow-up study. *Diabetologia* 2003;46:359-64.
115. Meisinger C, Löwel H, Heier M, Schneider A, Thorand B; KORA Study Group. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of type 2 diabetes mellitus in men and women from the general population. *J Intern Med* 2005;258:527-35.

116. André P, Balkau B, Born C, Charles MA, Eschwège E; D.E.S.I.R. study group. Three-year increase of gamma-glutamyltransferase level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the D.E.S.I.R. cohort. *Diabetologia* 2006;49:2599-603.
117. Lee DS, Evans JC, Robins SJ i sur. Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:127-33.
118. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. Gamma-glutamyltransferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2729-35.
119. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-31.
120. Wieckowska A, McCullough AJ, Feldstein AE. Noninvasive diagnosis and monitoring of nonalcoholic steatohepatitis: present and future. *Hepatology* 2007;46:582-9.
121. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2002;123:1702-04.
122. AGA Technical Review on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2002;123:1705-25.
123. Schreuder TC, Verwer BJ, van Nieuwkerk CM, Mulder CJ. Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol* 2008;14:2474-86.
124. Krakoff J, Clark JM, Crandall JP i sur.; The Diabetes Prevention Program Research Group. Effects of Metformin and Weight Loss on Serum Alanine Aminotransferase Activity in the Diabetes Prevention Program. *Obesity* 2010;18:1762-7.
125. Rocha R, Cotrim HP, Bitencourt AG i sur. Nonalcoholic fatty liver disease in asymptomatic Brazilian adolescents. *World J Gastroenterol* 2009;15:473-7.

126. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003;98:960-7.
127. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001;121:91-100.
128. Fotiadu A, Gagalis A, Akriviadis E i sur. Clinicopathological correlations in a series of adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Pathol Int* 2010;60:87-92.
129. Mofrad P, Contos MJ, Haque M i sur. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. *Hepatology* 2003;37:1286–92.
130. Amarapurkar DN, Patel ND. Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. *Trop Gastroenterol* 2004;25:130-4.
131. Uslusoy HS, Nak SG, Gülten M, Biyikli Z. Non-alcoholic steatohepatitis with normal aminotransferase values. *World J Gastroenterol* 2009;15:1863-8.
132. Canbakan B, Senturk H, Canbakan M i sur. Is alanine aminotransferase level a surrogate biomarker of hepatic apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease? *Biomark Med* 2010;4:205-14.
133. Patton HM, Lavine JE, Van Natta ML, Schwimmer JB, Kleiner D, Molleston J; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Clinical correlates of histopathology in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2008;135:1961-1971.
134. Kunde SS, Lazenby AJ, Clements RH, Abrams GA. Spectrum of NAFLD and diagnostic implications of the proposed new normal range for serum ALT in obese women. *Hepatology* 2005;42:650-6.

135. Wong VW, Wong GL, Tsang SW i sur. Metabolic and histological features of non-alcoholic fatty liver disease patients with different serum alanine aminotransferase levels. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:387-96.
136. Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Weight loss and non-alcoholic fatty liver disease: falls in gamma-glutamyl transferase concentrations are associated with histologic improvement. *Obes Surg* 2006;16:1278-86.
137. Tahan V, Canbakan B, Balci H i sur. Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk. *Hepatogastroenterology* 2008;55:1433-8.
138. Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive. *Semin Liver Dis* 2008;28:386–95.
139. Pantsari MW, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease presenting with an isolated elevated alkaline phosphatase. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:633–5.

## 9. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1980. godine u Zagrebu gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Nakon mature u zagrebačkoj V. Gimnaziji i srednjoj glazbenoj školi „Pavao Markovac“, 1998. godine upisao sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem sam diplomirao 2004. godine. Tijekom studija boravio sam na jednomjesečnim studentskim razmjenama u Njemačkoj i Španjolskoj, te sam bio stipendist Vlade Republike Francuske za jednomjesečno jezično usavršavanje u Parizu. Nakon studija i obaveznog pripravničkog staža, 2006. godine položio sam državni ispit. Od listopada 2005. godine zaposlen sam kao znanstveni novak – asistent na istraživačkim projektima prof. dr. sc. Marka Duvnjaka, inicijalno na KBC „Sestre milosrdnice“, a od 2007. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2006. upisao sam znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Zagrebu, a u siječnju 2008. godine započeo sam s programom specijalizacije iz interne medicine na Klinici za unutarnje bolesti KBC „Sestre milosrdnice“. Od početka rada na mjestu znanstvenog novaka prisustvovao sam na više međunarodnih stručnih i znanstvenih tečaja, skupova i radionica vezanih uz područje gastroenterologije i hepatologije i istraživački rad u ovoj grani medicine. Autor sam ili koautor 11 znanstvenih članaka objavljenih u indeksiranim časopisima (od toga 6 u časopisima indeksiranim u Current Contents).