

Učinak trojedne dijeta izrazito niskog sadržaja energije na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja dna u pretilih osoba

Ožvald, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:396389>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivan Ožvald

**UČINAK TROTJEDNE DIJETE IZRAZITO
NISKOG SADRŽAJA ENERGIJE NA
PRIMARNA, OKSIDACIJSKA I TRAJNA
OŠTEĆENJA DNA U PRETILIH OSOBA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivan Ožvald

**UČINAK TROTJEDNE DIJETE IZRAZITO
NISKOG SADRŽAJA ENERGIJE NA
PRIMARNA, OKSIDACIJSKA I TRAJNA
OŠTEĆENJA DNA U PRETILIH OSOBA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Mirta Milić, znan. savj.
Izv. prof. dr. sc. Martina Bituh

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND
BIOTECHNOLOGY

Ivan Ožvald

**THE EFFECT OF A THREE WEEK VERY
LOW CALORIE DIET ON PRIMARY,
OXIDATIVE AND PERMANENT DNA
DAMAGE IN OBESE INDIVIDUALS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Mirta Milić, PhD, Scientific Advisor
Martina Bituh, PhD, Associate Professor

Zagreb, 2023

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Nutricionizam

UDK: 577.213.7:591.134.5:613.25:639.3.043.2(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstvena polje: Nutricionizam

UČINAK TROTJEDNE DIJETE IZRAZITO NISKOG SADRŽAJA ENERGIJE NA PRIMARNA, OKSIDACIJSKA I TRAJNA OŠTEĆENJA DNA U PRETILIH OSOBA

Ivan Ožvald, mag. med. biokemije

Rad je izrađen u Specijalnoj bolnici za produženo liječenje Duga Resa, Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Službi za javno zdravstvo Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ i Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentori: dr. sc. Mirta Milić, znanstvena savjetnica i izv. prof. dr. sc. Martina Bituh

Kratki sažetak: Pretilost je metabolička bolest koja doprinosi nastanku brojnih komorbiditeta poput dijabetesa tipa 2, kronične upale i dislipidemije koji mogu uzrokovati oštećenja DNA. Redukcijska dijeta jedan je od temelja liječenja pretilosti. Svrha rada bila je utvrditi i usporediti trodnevni učinak dijeta izrazito niskog sadržaja energije (engl. *very-low-calorie diet*, VLCD) (~ 600 kcal dnevno, 26 ispitanika, eksperimentalna grupa) sa standardnom redukcijskom dijetom (SRD) (~1500 kcal dnevno, 27 ispitanika, kontrolna grupa) u osoba s pretilošću s indeksom tjelesne mase (ITM) $\geq 35 \text{ kg m}^{-2}$. Uspoređene su vrijednosti primarnih, oksidacijskih i trajnih oštećenja DNA (mjenjenih komet, FPG-komet i mikronukleus *cytome* testom), antropometrijskih (ITM, tjelesna masa, masa masnog i mišićnog tkiva te udio masnog tkiva) i biokemijskih parametara (inzulinska rezistencija: glukoza, inzulin, HOMA-IR; lipidni status: ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceridi; upala: leukociti, visokoosjetljiv C-reaktivni protein). Obje dijetete su pokazale povoljan učinak na zdravlje osoba s pretilošću s ITM $\geq 35 \text{ kg m}^{-2}$, posebice smanjenjem mjerenih antropometrijskih parametara, te povoljnim djelovanjem na neke biokemijske parametre (inzulinsku rezistenciju, lipidni status te upalu). U odnosu na SRD, VLCD je značajnije utjecala na antropometrijske parametre i parametre lipidnog statusa, te trajna oštećenja DNA, dok je učinak SRD na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja DNA izostao što je posljedica kompleksnih interakcija ITM, komorbiditeta pretilosti, prehrane, nutritivnog statusa pojedinca i promjena uzrokovanih smanjenjem tjelesne mase.

Broj stranica: 153

Broj slika: 11

Broj tablica: 42

Broj literaturnih navoda: 159

Broj priloga: 5

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: DNA, komet test, mikronukleus test, pretilost, VLCD

Datum obrane: 25.7.2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo
3. dr. sc. Martina Matovinović, viša znanstvena suradnica

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Zagrebu, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb, te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14, Zagreb.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Nutrition

UDK: 577.213.7:591.134.5:613.25:639.3.043.2(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Branch: Nutrition

THE EFFECT OF A THREE WEEK VERY LOW CALORIE DIET ON PRIMARY, OXIDATIVE AND PERMANENT DNA DAMAGE IN OBESE INDIVIDUALS

Ivan Ožvald, master of medical biochemistry

Thesis was done in Special Hospital for Extended Treatment of Duga Resa, Mutagenesis Unit at the Institute for Medical Research and Occupational Health, Andrija Stampar Teaching Institute of Public Health and Laboratory for Food Science, Faculty of Food Technology and Biotechnology of University of Zagreb

Supervisors: Mirta Milić, PhD, Scientific Advisor and Martina Bituh, PhD, Associate Professor

Summary: Obesity is a metabolic disease that contributes to numerous comorbidities such as type 2 diabetes, chronic inflammation and dyslipidemia that can cause DNA damage. Reduction diet is one of the foundations of obesity treatment. The study aimed to determine and compare the three-week effects of a very-low-calorie diet (VLCD) (~ 600 kcal per day, 26 subjects, experimental group) with a standard reduction diet (SRD) (~ 1500 kcal per day, 27 subjects, control group) in obese persons with body mass index (BMI) $\geq 35 \text{ kg m}^{-2}$. The values of primary, oxidative and permanent DNA damage (measured by comet, FPG-comet and micronucleus *cytome* assay), anthropometric (BMI, body weight, weight of adipose and muscle tissue and proportion of fat tissues) and biochemical parameters (insulin resistance: glucose, insulin, HOMA-IR; lipid profile: total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides; inflammation: leukocytes and high-sensitivity C-reactive protein). Both diets showed a beneficial health effects, especially in the reduction of anthropometric parameters, and having a favorable effect on some biochemical parameters (insulin resistance, lipid status and inflammation). Compared to SRD, VLCD had a more significant effect on anthropometric and lipid status parameters, as well as on permanent DNA damage, while the effect of SRD on primary, oxidative and permanent DNA damage was absent which is a consequence of the complex interrelationships of BMI, comorbidity of obesity, diet, nutritional status of the individual, and changes caused by weight loss

Number of pages: 153

Number of figures: 11

Number of tables: 42

Number of references: 159

Number of supplements: 5

Original in: Croatian

Key words: comet assay, DNA, micronucleus assay, obesity, VLCD

Date of the thesis defense: 25.7.2023.

Reviewers:

1. PhD. Ines Panjkota Krbavčić, Full Professor
2. PhD. Ksenija Durgo, Full Professor
3. PhD. Martina Matovinović, Senior Scientific Associate

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, University of Zagreb, Trg maršala Tita 14. Zagreb.

Rad je izrađen u Odjelu medicinsko-biokemijskog laboratorija i Odjelu za produženo liječenje II – interna medicina Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa, Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Službi za javno zdravstvo Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ i Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane Zavoda za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Mirte Milić, znanstvene savjetnice i izv. prof. dr. sc. Martine Bituh.

Tema doktorskog rada pod nazivom „Učinak trotjedne dijeta izrazito niskog sadržaja energije na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja DNA u pretilih osoba“ na temelju izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanje mentora je prihvaćena 28. listopada 2021. godine na 10. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Senat Sveučilišta u Zagrebu je na sjednici održanoj 12. travnja 2022. godine donio odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti.

Informacije o mentorima

Dr. sc. Mirta Milić, znanstvena savjetnica

Dr. sc. Mirta Milić rođena je 24. kolovoza 1980. godine u Zagrebu, gdje je također završila osnovnu i srednju školu, diplomirala (2004. godine, Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (PMF), kao diplomirana inženjerka molekularne biologije), iste godine se zaposlila u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (Institut), Zagreb, te doktorirala 2010. godine (poslijediplomski doktorski studij na PMF-u). Trenutno je u zvanju i na radnom mjestu znanstvene savjetnice.

Od 2004. godine osnovno područje rada su joj ekogenetička toksikologija i humani biomonitoring (ispitivanja i procjene genotoksičnih, oksidativnih i citotoksičnih učinaka *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo* nakon izlaganja različitim fizikalnim i kemijskim agensima), te unaprjeđenje metoda korištenih u genotoksičnim procjenama u svrhu standardizacije metoda i određivanja mjernih nesigurnosti, što dokazuju protokoli i ostali objavljeni radovi u primjerice časopisima *Nature* izdavača.

Sudjelovala je kao suradnica ili voditeljica na više (14) domaćih, međunarodnih bi- i multi- lateralnih znanstveno-istraživačkih ili stručnih projekata, te u radu različitih međunarodnih tijela i povjerenstava vezanih uz znanstvenu djelatnost. Neposredna voditeljica/suvoditeljica je na sedam diplomskih radova. Od 2021. godine članica je Panela za evaluaciju internih projekata Instituta.

Članica je uredništva međunarodnih znanstvenih časopisa, *Heliyon* (2019. i 2020. godine), *Toxics* (2021. godine), *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (od 2020. godine do danas), *Frontiers* (od 2020. godine do danas). Bila je/jest gost urednik posebnih izdanja: *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (2019. godine), *Toxics-* (2022. i 2023. godine), *Frontiers- Radiation and Health section* (2023. godine), a od 2020. godine do danas je članica savjetodavnog odbora časopisa *Heliyon- Biology*, te od 2022. godine pomoćni urednik časopisa *Frontiers -Public Health- Radiation and Health section*.

Osim recenziranja radova u brojnim međunarodnim časopisima, koautorica je na 6 poglavlja u knjigama, te urednica 2 zbornika radova s domaćeg skupa s međunarodnim sudjelovanjem. Članica je: Hrvatskog toksikološkog društva (HTD) (od 2004. godine) i Predsjedništva HTD-a (od 2019. godine), Hrvatskog genetičkog društva i Europskog genetičkog društva (EEMGS), te Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja (od 2010. godine). Za postignuća ostvarena tijekom dosadašnje karijere dobila je nagradu IUTOX Junior

Fellowship Award 2012. godine; nagradu Instituta za godišnji najveći broj objavljenih znanstvenih radova citiranih u bazi radova WoSC 2018. godine, te 2 nagrade Instituta za objavu radova u vrhunskim časopisima s visokim čimbenikom odjeka 2020. g.

Dr. sc. Mirta Milić je dosad objavila 88 radova u časopisima prema bazi Web of Science Core Collection (WoSCC) (34 u Q1, 22 u Q2, 19 u Q3, te 13 u Q4 kvartilima prema klasifikaciji u pripadnim kategorijama Journal Citation Report (JCR) od WoSCC-a), 78 sažetaka sa skupova, te 17 radova u zbornicima skupova. Radovi su joj citirani ukupno 1264 puta, a njezin h-indeks prema WoSCC iznosi 22.

Izv. prof. dr. sc. Martina Bituh

Izv. prof. dr. sc. Martina Bituh, rođena je 12. siječnja 1980. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, smjer Nutricionizam, diplomirala je 2005. godine. Bila je među deset najboljih studenata koji su diplomirali te godine na smjeru Nutricionizam. Poslijediplomski doktorski studij Nutricionizam upisala je u akademskoj godini 2005./2006., a doktorski rad obranila je 21. prosinca 2011. godine pod mentorstvom prof. dr.sc. Irena Colić Barić i izv. prof. dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić. Od 2005. godine radi prvo kao asistent na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda u Laboratoriju za kemiju hrane i prehranu tj. Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane, a od 2012. u suradničkom zvanju i na radnom mjestu viši asistent. U zvanje docenta izabrana je 2015. godine, a 2020. godine na radno mjesto i zvanje izvanredni profesor. Nositeljica je izbornog predmeta Fitokemikalije u zaštiti zdravlja na prijediplomskom studiju Nutricionizam, te temeljnih predmeta Edukacija i komunikacijske vještine u nutricionizmu, Hrana, prehrana i zdravlje na diplomskom studiju Nutricionizam, te predmeta Uloga prehrane u procesu liječenja na doktorskom studiju. Uključena je u izvođenju nastave u obliku seminara i/ili vježbi na predmetima prijediplomskog studija Nutricionizam (Kemija i biokemija hrane, Osnove dijetoterapije) i Prehrambena tehnologija (Kemija i biokemija hrane) te diplomskog studija Nutricionizam (Dodaci prehrani).

Tijekom dosadašnjeg rada kao autorica i koautorica objavila je 33 izvorna znanstvena rada. Sudjelovala je na 26 međunarodnih i 3 nacionalna znanstvena skupa. Pod njezinim mentorstvom do sada je obranjeno 14 završnih i 13 diplomskih radova.

Dobitnica je potpore Biotehničke zaklade za postignute rezultate u području biotehničkih znanosti s mogućom primjenom u gospodarstvu (2009.), te tri nagrade na međunarodnim i domaćim konferencijama kao koautor za najbolju poster-prezentaciju. Odlukom Fakultetskog vijeća PBF-a 2022. godine, prigodom 66. obljetnice Fakulteta, dobitnica je Nagrade fakulteta za izvrsnost u nastavnoj djelatnosti.

Tijekom 2007. godine boravila je na kraćem stručnom usavršavanju na Faculty of Food Technology, Krakow, Poljska, a tijekom 2008. godine boravila je na tromjesečnom znanstvenom usavršavanju na Faculty of Bioscience Engineering, University of Ghent, Belgija. U sklopu Erasmus + projekta u rujnu 2022. godine usavršavala se na University of Parma, Department of Food and Drug. Također se usavršavala na nekoliko radionica i sastanaka u Hrvatskoj i inozemstvu. Nastavničke kompetencije unaprijedila je radionicom Aktivno učenje i kritičko mišljenje u visokoškolskoj nastavi u trajanju od 80 h u organizaciji Foruma za slobodu odgoja 2016. godine.

Osim na nacionalnom znanstvenom projektu (Prehrana, homocistein i kvaliteta koštanog tkiva) bila je suradnik i na međunarodnom znanstvenom FP6 projektu („Freshly baked breads with improvement of nutritional quality and low energy demanding for the benefit of the consumer and of the environment“). Od 2015. do 2021. bila je istraživač na EU Horizont 2020 projektu Strengthening European Food Chain Sustainability by Quality and Procurement Policy (Strangh2Food). Od studenog 2021. do siječnja 2023. bila je partner na projektu Organizacijom i znanjem do zdravlja oboljelih od celijakije i dijabetesa financiran iz Europskih socijalnih fondova te Nacionalne zaklade za razvoj civilnog društva.

Od 2019. godine članica je Radne skupine za poboljšanje kvalitete prehrane u osnovnim školama Grada Zagreb, a od 2020. godine članica je Stručne radne skupine za dodatne oblike nutritivnog označavanja hrane pri Ministarstvu poljoprivrede. Od 2019. godine članica je uredništva časopisa International Journal of Food Science and Nutrition.

Članica je Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista.

Zahvale

Iskreno zahvaljujem mentorici dr. sc. Mirti Milić, znanstvenoj savjetnici, na velikoj podršci, strpljenju, optimizmu, znanju i vremenu te što me stručnim vođenjem i u prijateljskom ozračju usmjeravala na dugačkom putu od razvoja ideje doktorskog rada, prijave teme do izrade doktorata.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Bituh na prenesenom znanju i stručnom vođenju pri izradi i pisanju ovog rada,

Hvala članovima Stručnog povjerenstva prof. dr. sc. Ines Panjkoti Krbavčić, prof. dr. sc. Kseniji Durgo i dr. sc. Martini Matovinović, višoj znanstvenoj suradnici, na savjetima i primjedbama koji su unaprijedili ovaj rad.

Hvala prijateljima doc. dr. sc. Ivani Čelap, doc. dr. sc. Domagoju Marijančeviću i izv. prof. dr. sc. Ivanu Kodrinu na strpljenju, savjetima, pomoći, poticaju i ohrabrenju. Dodatno Ivani na iščitavanju prvih verzija rada, Domagoju na sugestijama za hodogram rješavanja obaveza te Ivanu na tehničkoj i grafičkoj podršci prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se djelatnicima Jedinice za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada dr. sc. Nevenki Kopljar, znanstvenoj savjetnici u trajnom zvanju, dr. sc. Vileni Kurbaši, znanstvenoj savjetnici u trajnom zvanju, i Maji Nikolić, višoj tehničarki na ugodnoj radnoj atmosferi i prijateljskom okruženju, te mr. sc. Hrvoju Radaševiću, prof. s Nastavnog zavoda za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar, za antropometrijska mjerenja.

Posebno se zahvaljujem Draganu Božičeviću, dr. med., spec. interne med., Lidiji Duh, mag. nutr. clin. i dr. sc. Martini Matovinović, višoj znanstvenoj suradnici, na pomoći u odabirom ispitanika te svim ispitanicima koji su dragovoljno pristupili ovom istraživanju.

Hvala djelatnicama Odjela medicinsko-biokemijskog laboratorija Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa Davorki Stojković, Gordani Drobilović i Ani Polović što su mi svojim odgovornim i profesionalnim pristupom poslu pomogle u pripremi i biokemijskoj analizi dijela uzoraka.

Zahvaljujem se dr. sc. Domagoju Kiferu za pomoć sa statističkim nedoumicama, a Bojani Bajić, mag. philol. angl. i germ. na pravopisnim savjetima i lekturi.

Hvala mojim roditeljima koji su uvijek tu za mene.

Sažetak

Pretilost je bolest koja je najčešće povezana s komorbiditetima i većim stupnjem oštećenja DNA u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase. Temelj liječenja pretilosti je promjena životnih navika i prehrambenih navika. Uspješno liječenje pretilosti dovodi do gubitka tjelesne mase i smanjenja komorbiditeta. Male promjene tjelesne mase imaju zdravstvene koristi za osobe s pretilošću, te osim što mogu smanjiti komorbiditete i/ili rizik za njihovu progresiju, djeluju i motivirajuće na pacijente.

Cilj ovog rada je bio ispitati i usporediti učinak dviju trotjednih dijeta: 1) izrazito niskog sadržaja energije (engl. *very-low-calorie diet*, VLCD) (od oko 600 kcal) u ispitanika eksperimentalne grupe u odnosu na 2) standardnu redukcijsku dijetu (SRD) (od oko 1500 kcal) u ispitanika kontrolne grupe. Ispitani su i uspoređeni učinci na razinu primarnih, oksidacijskih i trajnih oštećenja DNA (mjerenih komet i FPG komet testom (engl. *formamido pyrimidine glycosylase*, FPG) te mikronukleus testom), antropometrijske (indeks tjelesne mase, tjelesna masa, masa mišićnog i masnog tkiva te udio masnog tkiva) i biokemijske parametre (ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceridi, glukoza, inzulin, homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*, HOMA-IR), leukocite i visokoosjetljivi C-reaktivni protein (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*, hsCRP)).

U istraživanje su bila uključena 53 ispitanika indeksa tjelesne mase (ITM) $\geq 35 \text{ kg m}^{-2}$ (26 ispitanika eksperimentalne grupe i 27 ispitanika kontrolne grupe). Zbog mogućih zdravstvenih komplikacija VLCD, eksperimentalna grupa je za vrijeme dijeta bila u bolnici, dok je kontrolna grupa SRD provodila u kućnim uvjetima bez drugih promjena u životnim navikama. Pridržavanje kontrolne skupine SRD provjereno je nenajavljenim 24-satnim prisjećanjem unosa hrane i pića.

Rezultati ovog rada pokazali su smanjenje tjelesne mase i ITM, promjene sastava tijela u obje grupe ispitanika, te poboljšanje mjerenih biokemijskih parametara eksperimentalne grupe (izuzev inzulina ($p = 0,05$) i hsCRP ($p = 0,38$)) i kontrolne grupe (izuzev glukoze ($p = 0,272$), LDL-kolesterola ($p = 0,097$), triglicerida ($p = 0,062$) i hsCRP-a ($p = 0,944$)). VLCD je utjecala na smanjenje trajnih oštećenja DNA, dok je učinak na primarna i oksidacijska oštećenja DNA izostao. SRD nije dovela do promjena u mjerenim DNA oštećenjima. Rezultati usporedbe učinka dijeta različitih sadržaja energije pokazuju da je VLCD u kratkom vremenskom periodu značajnije smanjila tjelesnu masu i ITM, poboljšala lipidni status te utjecala na smanjenje trajnog oštećenja DNA u odnosu na SRD.

Izostanak značajnijeg učinka VLCD na stabilnost DNA u usporedbi sa SRD posljedica je kompleksnih međusobnih odnosa ITM, komorbiditeta pretilosti, prehrane, nutritivnog statusa pojedinca i promjena uzrokovanih smanjenjem tjelesne mase. Kompleksnost navedenih interakcija dodatno ističe potrebu za individualnim pristupom liječenju pretilosti u kojoj važnu ulogu ima multidisciplinarni tim sastavljen od liječnika obiteljske medicine, endokrinologa, medicinske sestre, psihologa/psihijatra, nutricionista, kineziologa, fizijatra, fizioterapeuta, kirurga te ovisno o komorbiditetima i drugih specijalista. Uz standardnu obradu bolesnika prije početka liječenja pretilosti, trebali bi se određivati i markeri oštećenja DNA radi identifikacije osoba s većim rizikom nastanka komorbiditeta i/ili tumora u svrhu dodatne individualizacije liječenja pretilosti.

Ključne riječi: pretilost, VLCD, DNA, komet test, mikronukleus test

Summary

Compared to normal weight individuals, obesity is a disease most often associated with comorbidities and increased DNA damage. The basis of obesity treatment is a change in lifestyle and diet. Successful treatment of obesity leads to weight loss and the reduction of comorbidities. Even small changes in body weight have health benefits for obese people, and, in addition to the reduction of comorbidities and/or the risk of their progression, they have also a motivating effect on patients.

This work aimed to examine and compare the effect of two three-week diets: 1) very-low-calorie diet (VLCD) (about 600 kcal) in subjects of the experimental group and 2) standard reduction diet (of about 1500 kcal) in subjects of the control group. Diets were examined and compared on the level of: primary, oxidative, and permanent DNA damage (measured by the comet and FPG (formamido pyrimidine glycosylase) comet assay and the micronucleus assay), anthropometric (body mass index, body mass, mass of muscle and adipose tissue and proportion of adipose tissue) and biochemical parameters (total cholesterol, HDL - cholesterol, LDL - cholesterol, triglycerides, glucose, insulin, Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR), leukocytes and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP)).

The research included 53 subjects with a body mass index (BMI) $\geq 35 \text{ kg m}^{-2}$ (26 subjects in the experimental group and 27 subjects in the control group). Due to the possible health complications of VLCD, the experimental group stayed in the hospital during the diet. The control group followed the nutritionally balanced diet at home without any other lifestyle changes. An unannounced 24-hour recall verified adherence to this reduced dietary approach.

The results of this work showed a decrease in body weight and BMI, changes in body composition in both groups of subjects, as well as an improvement in the measured biochemical parameters of the experimental group (except insulin ($p = 0.05$) and hsCRP ($p = 0.38$)) and the control group (except glucose ($p = 0.272$), LDL-cholesterol ($p = 0.097$), triglycerides ($p = 0.062$) and hsCRP ($p = 0.944$)). VLCD affected the reduction of permanent DNA damage, while the influence of the nutritionally balanced diet on primary and oxidative damage DNA was absent. The standard reduction diet did not lead to changes in DNA stability. Comparing the results of the effects of two diets with different energy contents, it was demonstrated that even within a short period, VLCD significantly reduced body mass and BMI, improved lipid status, and reduced permanent DNA damage when compared to the nutritionally balanced diet.

The absence of a more significant effect of VLCD on DNA stability when compared to a nutritionally balanced diet is a consequence of the complex interrelationships of BMI, comorbidity of obesity, diet, nutritional status of the individual, and changes caused by weight loss. The complexity of the mentioned interactions further highlights the need for an individual approach to the treatment of obesity in which a multidisciplinary team composed of general practitioner, endocrinologists, nurses, psychologists/psychiatrists, nutritionists, kinesiologists, physiatrists, physiotherapists, surgeons and, depending on comorbidities, other specialists plays an important role. In addition to standard clinical obesity pre-treatment evaluation, DNA damage markers should be also determined for identification of people with a higher comorbidity and/or tumor risk for further obesity treatment individualisation.

Keywords: obesity, VLCD, DNA, comet assay, micronucleus assay

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio	3
2.1. Pretilost.....	4
2.1.1. Definicija.....	4
2.1.2. Etiologija.....	7
2.1.3. Epidemiologija.....	9
2.1.4. Kronične komplikacije pretilosti.....	10
2.1.5. Uzroci nastanka oštećenja DNA u osoba s pretilošću	12
2.1.5.1. Hiperglikemijom i hiperinzulinemijom inducirani oksidacijski stres i oštećenja DNA	12
2.1.5.2. Dislipidemijom uzrokovani oksidacijski stres i lipidnom peroksidacijom uzrokovana oštećenja DNA.....	17
2.1.5.3. Upalom inducirani oksidacijski stres i oštećenja DNA.....	18
2.1.5.4. Utjecaj prehrane na upalu i upalni indeks prehrane	19
2.1.5.5. Utjecaj prehrane na oštećenja DNA	20
2.2. Liječenje pretilosti	23
2.2.1. Uloga nutricionista.....	24
2.2.2. Tjelesna aktivnost	25
2.2.3. Liječenje farmakoterapijom	25
2.2.4. Kirurško liječenje.....	26
2.2.5. Očekivani ishodi liječenja pretilosti.....	27
2.2.6. Dijeta izrazito niskog sadržaja energije	27
2.2.7. Standardna redukcijaska dijeta	30
2.3. Metode mjerenja oštećenja DNA	32
2.3.1 Komet test	32
2.3.2. Mikronukleus cytome test.....	34
3. Ciljevi i hipoteze istraživanja	38
4. Ispitanici i metode	40
4.1. Dizajn studije.....	41
4.2. Ispitanici	43
4.2.1. Eksperimentalna skupina	43
4.2.2. Kontrolna skupina.....	44
4.3. Metode	45
4.3.1.Primjena VLCD	45

4.3.2. Izrada i primjena SRD	45
4.3.2. Antropometrijske metode.....	46
4.3.3 Analiza kompletne krvne slike, biokemijske/spektrofotometrijske i imunokemijske metode.....	47
4.3.3.1. Uzorkovanje, transport i priprema uzoraka krvi	47
4.3.3.2 Kompletna krvna slika	48
4.3.3.3 Biokemijske/spektrofotometrijske metode.....	48
4.3.3.4. Imunokemijske metode	50
4.3.3.5. Izračun HOMA-IR	50
4.3.4. Metode za procjenu oštećenja DNA	51
4.3.4.1. Alkalni komet test i FPG komet test	51
4.3.4.2. Mikronukleus test.....	54
4.3.5. Dijetetičke metode	56
4.3.5.1. 24-satno prisjećanje unosa hrane i pića.....	56
4.3.5.2. Upitnik o učestalosti unosa hrane i pića.....	56
4.5.4. Upalni indeks prehrane	57
4.4. Statistička obrada podataka	59
5. Rezultati	61
5.1. Podatci prikupljeni iz upitnika.....	63
5.1.1 Podatci za eksperimentalnu grupu prikupljeni iz upitnika o životnim navikama i zdravstvenom stanju.....	63
5.1.2. Podatci za kontrolnu grupu prikupljeni iz upitnika o životnim navikama i zdravstvenom stanju.....	65
5.1.3. Prosječan dnevni unos energije i hranjivih tvari u ispitanika kontrolne i eksperimentalne grupe procijenjen upitnikom o učestalosti konzumacije hrane i pića....	67
5.1.4. Usporedba SRD i podataka 24-satnog upitnika	75
5.2. Podatci dobiveni mjerenjima	77
5.2.1. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe.....	77
5.2.1.1 Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe	77
5.2.1.2. Usporedba vrijednosti rezultata antropometrijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe	78
5.2.1.3 Usporedba vrijednosti rezultata biokemijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe	79

5.2.2. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije i nakon nutritivnih intervencija u ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe	80
5.2.2.1. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije i nakon VLCD u eksperimentalnoj grupi	80
5.2.2.2. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije i nakon SRD u kontrolnoj grupi	81
5.2.2.3. Učinci VLCD na antropometrijske parametre eksperimentalne grupe	82
5.2.2.4. Učinci SRD na antropometrijske parametre kontrolne grupe	83
5.2.2.5. Učinci VLCD na biokemijske parametre eksperimentalne grupe.....	84
5.2.2.6. Učinci SRD na biokemijske parametre kontrolne grupe.....	85
5.2.3. Usporedba razlika učinaka nutritivnih intervencija na parametre oštećenja DNA, antropometrijske i biokemijske parametre eksperimentalne i kontrolne grupe	86
5.2.3.1. Usporedba razlika učinaka nutritivnih intervencija na oštećenja DNA	86
5.2.3.1. Usporedba razlike učinaka nutritivnih intervencija na antropometrijske parametre	87
5.2.3.2. Usporedba razlike učinaka nutritivnih intervencija na biokemijske parametre	87
5.2.4. Povezanost rezultata skupina namirnica i nutrijenata s parametrima oštećenja DNA dobivenih iz FFQ-a i 24-satnog prisjećanja unosa hrane i pića	89
6. Rasprava	97
6.1. Povezanost oštećenja DNA i hranjivih sastojaka dobivenih iz FFQ-a i 24-satnog prisjećanja unosa hrane i pića	98
6.2. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe.....	100
6.2.1. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe.....	100
6.3. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije i nakon nutritivnih intervencija u ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe	104
6.3.1. Utjecaj VLCD na oštećenja DNA	104
6.3.2. Utjecaj SRD na oštećenja DNA	107
6.3.3. Utjecaj VLCD na biokemijske i antropometrijske parametre.....	109
6.3.4. Utjecaj SRD na biokemijske i antropometrijske parametre.....	112
6.4. Učinci dijeta na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja DNA, antropometrijske i biokemijske parametre u eksperimentalne i kontrolne grupe.....	116
7. Zaključci.....	118
8. Popis literature.....	121

9. Popis kratica	139
Prilozi	143
Životopis i popis objavljenih radova	154

1. Uvod

Pretilost je kronična endokrino-metabolička bolest u kojoj rizik nastanka komorbiditeta raste s porastom indeksa tjelesne mase (ITM), a osobito značajno kod osoba s $ITM \geq 35,0 \text{ kg m}^{-2}$. Česti komorbiditeti pretilosti su inzulinska rezistencija/dijabetes tipa 2, dislipidemija i kronična upala. Navedeni komorbiditeti te pretilost imaju sinergijski učinak na stabilnost DNA jer mogu uzrokovati preveliku količinu nastalih reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta koje fiziološki antioksidacijski sustav ne može neutralizirati, a što može dovesti do oksidacije, alkilacije, metilacije, nitracije, deaminacije DNA baza, jednostrukih i dvostrukih DNA lomova, križnog povezivanja lanaca DNA, te stvaranja različitih adukata s molekulom DNA. Genomsku nestabilnost, odnosno primarna, oksidativna i trajna oštećenja DNA moguće je mjeriti komet testom (primarna) i njegovim varijantama (oksidacijska DNA oštećenja) te mikronukleus *cytome* testom (trajna oštećenja) iz lako dostupnih uzoraka kao što je venska krv.

Osim što kronični prekomjerni energijski unos dugoročno uzrokuje pretilost, prehrana ima i značajan učinak na upalu. Upalni potencijal prehrane može se utvrditi izračunom upalnog indeksa prehrane (engl. *Dietary Inflammatory Index*, DII). Promjena prehranbenih navika i načina života temeljno je liječenje pretilosti. Važnu ulogu u multidisciplinarnom liječenju pretilosti ima nutricionist koji educira, motivira i izrađuje individualne smjernice za dugoročne promjene u prehrani koje uzimaju u obzir individualne potrebe svakog pojedinca, preferencije u odabiru hrane, prehranbene navike i financijsko stanje pojedinca, te time povećava vjerojatnost uspješnog liječenja pretilosti koje je najčešće dugoročno. U cilju smanjenja tjelesne mase primjenjuju se dijetete različitog sadržaja energije. Postavljeni cilj smanjenja tjelesne mase brže se postiže dijetama izrazito niskog sadržaja energije (engl. *very-low-calorie diet*, VLCD) u odnosu na dijetete kojim se postiže dnevni deficit energije od 500 kcal u pojedinaca.

Osobe s pretilošću i osobe s prekomjernom tjelesnom masom imaju veća oštećenja DNA u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase. Istraživanja gubitka tjelesne mase na stabilnost DNA mjerena komet ili mikronukleus *cytome* testom u ispitanika s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$ nisu brojna niti imaju jednoznačne zaključke, niti su isti testovi provedeni na istim ljudima da bi se mogli usporediti. Osim po zaključcima, istraživanja se međusobno razlikuju i u trajanju te primijenjenoj metodi liječenja pretilosti.

Temeljni cilj ovog doktorskog rada je ispitati učinak VLCD (od oko 600 kcal) u odnosu na standardnu redukcijsku dijetu (SRD) (od oko 1500 kcal) na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja DNA, te na antropometrijske parametre, homeostazu glukoze, lipidni status i upalne parametre u osoba s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$. Time bi se dobio jasniji uvid koje promjene doprinose poboljšanju genoma i zdravlja primjenom dijeta različitog sadržaja energije.

2. Opći dio

2.1. Pretilost

2.1.1. Definicija

Pretilost je bolest definirana kao prekomjerno nakupljanje masnog tkiva (Musić Milanović i Bukal, 2018), a prema 10.-toj međunarodnoj klasifikaciji bolesti i srodnih zdravstvenih problema određena je šiframa E65 (lokalizirana pretilost) i E66 (pretilost) (WHO, 2012).

Obzirom na nepostojanje preciznih, praktičnih, ekonomski isplativih i prihvatljivih metoda za rutinsko određivanje masnog tkiva, pretilost te stupanj pretilosti određuju se indirektno mjerenjem tjelesne mase i tjelesne visine (Sharma i Kushner, 2009). Omjer tjelesne mase (u kilogramima) i tjelesne visine (u kvadratnim metrima) daje indeks tjelesne mase (ITM), kojeg su po prvi put službeno upotrijebili Keys i sur. 1972. godine pod nazivom BMI (engl. *Body Mass Index*) (Keys i sur., 1972). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je zatim 1997. godine prihvatila taj indeks kao najkorisniju metodu utvrđivanja pretilosti, te je prema ITM-u, pretilost podijeljena u tri stupnja: I stupanj pretilosti ($30,0 - 34,9 \text{ kg m}^{-2}$), II stupanj pretilosti ($35,0 - 39,9 \text{ kg m}^{-2}$) i III stupanj pretilosti ($> 40,0 \text{ kg m}^{-2}$) (WHO, 1997).

Europske i hrvatske smjernice, te smjernice Ujedinjenog Kraljevstva za liječenje pretilosti u odraslih preporučuju također dodatno antropometrijsko mjerenje opsega struka kao nezavisnog i dodatnog čimbenika rizika za kardiometabolički sindrom (Yumuk i sur., 2015; NICE, 2020; Štimac i sur., 2022). Obzirom da je opseg struka u korelaciji s visceralnim (abdominalnim) masnim tkivom, a taj je tip masnog tkiva praćen jačim poremećajem izlučivanja hormona iz masnog tkiva i metaboličkim promjenama te zdravstvenim rizicima povezanih s pretilosti, on kao takav predstavlja neovisan indikator za liječenje prekomjerne tjelesne mase i pretilosti bez obzira na to kolika je vrijednost ITM-a pojedinca (Jelčić i sur., 2010; Yumuk i sur., 2015; Durrer Schutz i sur., 2019; NICE, 2020; Štimac i sur., 2022). Opseg struka mjeri se u horizontalnoj ravni na sredini udaljenosti između donjeg ruba posljednjeg rebra i gornjeg ilijačnog grebena. Vrijednost opsega struka određuje centralnu (abdominalnu) pretilost, a njegove granične vrijednosti ovise o etničkoj skupini, spolu i zdravstvenoj organizaciji (Powell i sur., 2010; Garvey i sur., 2016). Međunarodna federacija za dijabetes definirala je centralnu pretilost vrijednostima opsega struka $\geq 94 \text{ cm}$ kod muškaraca i $\geq 80 \text{ cm}$ za europsku populaciju (IDF, 2006). Mjerenje opsega struka u pojedinaca s ITM $\geq 35,0 \text{ kg m}^{-2}$ se ne preporuča budući da nema dodatnu kliničku vrijednost jer je zdravstveni rizik povezan s pretilosti u navedenih pojedinca vrlo visok bez obzira na vrijednost opsega struka (tablica 4) (Garvey i sur., 2016; Durrer Schutz i sur., 2019; NICE, 2020).

Pretilost je povezana s većim stupnjem smrtnosti. Mjerenje ITM-a je jednostavno i ima široku primjenu, no vrijednost ITM-a je slab pokazatelj zdravstvenog stanja pojedinca, kvalitete života, komorbiditeta, fizičkih mogućnosti i količine masnog tkiva (Kodsi i sur., 2022). Kombinacijom antropometrijskih mjerenja (ITM i opseg struka) povećana je predikcija mortaliteta i komorbiditeta. Edmontonski sustav klasifikacije pretilosti (EOSS, engl. *Edmonton Obesity Staging System*) temelji se na fizičkim, psihičkim i fiziološkim posljedicama pretilosti na pojedince i kao takav bolje korelira sa smrtnošću od antropometrijskih mjerenja i metaboličkog sindroma (Canning i sur., 2015; Wharton i sur., 2020; Kodsi i sur., 2022). EOSS ima 5 kategorija u koje se pacijente svrstava obzirom na stupanj komorbiditeta, a uspostavili su ga Sharma i Kushner 2009. godine u gradu Edmontonu (Sharma i Kushner, 2009) (tablica 1).

Tablica 1. Primjeri čimbenika rizika prema edmontonskom sustavu klasifikacije pretilosti, prilagođeno prema Canning i sur. (2015)

EOSS kategorija	Definicija prema Sharma i Kushner, 2009	Primjeri prema radu Canningu i sur., 2015		
0	Bez čimbenika rizika povezanih s pretilosti, bez fizičkih, psihičkih i fizioloških problema i/ili narušenog zdravlja	Bez čimbenika rizika prema EOSS klasifikaciji		
1	Prisutnost bilo kojeg od navedenih subkliničkih čimbenika rizika povezanih s pretilosti, blagi fizički, fiziološki problemi, blaga funkcionalna ograničenja	Glukoza $\geq 5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ Kolesterol $\geq 5,2 \text{ mmol L}^{-1}$ Trigliceridi $\geq 1,7 \text{ mmol L}^{-1}$ HDL-kolesterol $\leq 1,6 \text{ mmol L}^{-1}$	LDL-kolesterol $\geq 3,3 \text{ mmol L}^{-1}$ Sistolički tlak $\geq 130 \text{ mm Hg}$ Dijastolički tlak $\geq 85 \text{ mm Hg}$	
2	Prisutnost bilo kojeg od navedenih komorbiditeta povezanih s pretilosti, umjerena fizička ograničenja	Glukoza $\geq 6,9 \text{ mmol L}^{-1}$ Dijabetes tip 2 ili korištenje antidijabetika Ukupni kolesterol $\geq 6,2 \text{ mmol L}^{-1}$ Dijagnosticirana hiperkolesterolemija Trigliceridi $\geq 2,2 \text{ mmol L}^{-1}$ HDL-kolesterol $\leq 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ LDL-kolesterol $\geq 4,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Hiperlipidemija ili korištenje antilipemika Sistolički tlak $\geq 140 \text{ mm Hg}$	Dijastolički tlak $\geq 90 \text{ mm Hg}$ Apneja u snu Giht Artritis Anksioznost/depresija Ateroskleroza Upotreba antikoagulanasa Nealkoholna masna bolest jetre	
3	Utvrđeno bilo kojeg od navedenih oštećenja organa, značajna patofiziološka stanja i fizička ograničenja	Angina Srčani i moždani udar Koronarna bolest	Zatajenje srca Kronična opstruktivna bolest pluća	Tromboza Dispneja Srčane prenosnice
4	Invaliditet i završne faze bolesti uzrokovane pretilošću	Nema dostupnih podataka o ovim čimbenicima za procjenu ove kategorije		

EOSS - Edmontonski sustav klasifikacije pretilosti (EOSS, engl. *Edmonton Obesity Staging System*)

2.1.2. Etiologija

Kao kronična endokrino-metabolička bolest, pretilost se razvija pod utjecajem različitih endogenih i egzogenih čimbenika, te njihovih međusobnih interakcija (Durrer Schutz i sur., 2019; Štimac i sur., 2022). Najčešći endogeni čimbenici su: genetska predispozicija, epigenetika, obiteljska anamneza, fiziološke promjene (npr. trudnoća), endokrine abnormalnosti, mikrobiom i druge, dok su najčešći egzogeni čimbenici koji dovode do pretilosti: okoliš, socioekonomski čimbenici (razina prihoda i formalna edukacija), životne navike, energijski unos hrane i pića, prehrambene navike (npr. brzina konzumiranja hrane), smanjena tjelesna aktivnost i/ili sjedilački način života, poremećaji spavanja (insomnija, hipersomnija), kronični stres, poremećaji hranjenja (bulimija, kompulzivno prejedanje, sindrom noćnog jedenja), različiti psiho-socijalni čimbenici (depresija, anksioznost, psihoza, nisko samopouzdanje), droge i drugi (Yumuk i sur., 2015; Musić Milanović i Bukal, 2018; Durrer Schutz i sur., 2019; Lin i Li, 2021). Monogenska pretilost je poremećaj koji nastaje kao posljedica mutacije jednog gena, a mutacije se nalaze u genima leptinskomelanokortinskog puta koji ima ključnu ulogu u energetske homeostazi u tijelu čovjeka i danas znamo za dvadesetak genskih defekata koje rezultiraju autosomnim oblikom pretilosti. Primjer takvih gena može se vidjeti u tablici 2. No, niska prevalencija mutiranih gena, te spore genetske promjene u populaciji (osoba s pretilošću), zajedno s velikim porastom pretilosti u svijetu, upućuju na ipak značajniji utjecaj egzogenih čimbenika na razvoj pretilosti (Bouchard, 2021).

Pretilost je rezultat kronično većeg unosa energije od njihove potrošnje bez obzira na tip i broj čimbenika rizika koji uzrokuju istu.

Tablica 2. Mutirani geni koji dovode do pretilosti i njihova prevalencija u svijetu, prilagođeno prema Bouchard (2021)

Mutirani gen	Prevalencija
Leptin	<100 bolesnika u svijetu
LEPR	< 3 % bolesnika s pretilošću
MC4R	Oko 5 % djece i 1 % odraslih s pretilošću te 0,1 % u općoj populaciji
NTRK2	<10 bolesnika u svijetu
PCSK1	<20 bolesnika u svijetu
POMC	<10 bolesnika u svijetu
SIM1	<50 bolesnika u svijetu

Leptin- hormon koji uglavnom stvaraju masne stanice i njegova je primarna uloga vjerojatno reguliranje dugoročne energijske ravnoteže. Kao jedan od glavnih signala energijskog statusa, razine leptina utječu na apetit, sitost i motivirana ponašanja usmjerena na održavanje energijskih rezervi, leptin je također i uzvodni regulator sistema melanokortina u mozgu; LEPR- leptinski receptor, njegova deficijencija uzrokuje autosomalno-recesivni endokrini poremećaj koji uzrokuje ranu tešku pretilost, hiperfagiju i nedostatak hormona hipofize; MC4R- gen koji kodira melanokortin-4 receptor, autosomalne dominantne mutacije u tom genu su vodeći uzrok monogenske teške pretilosti koja se javlja u djetinjstvu; NTRK2- gen koji kodira za neurotrofni receptor tirozin kinaze 2 koji pomaže u oblikovanju i stimulaciji neurogeneze, mutacije su povezane s pretilošću, hiperfagijom i kašnjenjem u razvoju; PCSK1- gen koji kodira prohormon konvertazu 1/3, mutacije su povezane s razvojem pretilosti i gastrointestinalnim poremećajima; SIM1 (engl. *Single-minded homolog 1*)- je gen koji kodira za transkripcijski faktor koji ima ulogu u razvoju hipotalamusa i hipofize te su mutacije povezane s pretilošću (Bouchard, 2021).

2.1.3. Epidemiologija

Prema podacima SZO, prevalencija pretilosti u svijetu se gotovo utrostručila od 1975. godine (WHO, 2016). U 2016. godini više od 1,9 milijardi odraslih ljudi je imalo prekomjernu tjelesnu masu, od čega je više od 650 milijuna bilo pretilo. Od toga broja, 39 % starijih od 18 godina imalo je prekomjernu tjelesnu masu, a 13 % je bilo pretilo.

Trend porasta tjelesne mase zabilježen je i u Republici Hrvatskoj. Prekomjernu tjelesnu masu 2014. godine u Hrvatskoj je imalo 57,4 % odraslih, a 2019. godine 64,8 % dok je prevalencija pretilosti za navedene godine bila 18,7 % odnosno 23,0 % (Eurostat, 2022). Navedeni podatci ukazuju da smo iznad svjetskog prosjeka, ali i prosjeka zemalja Europske Unije koji je 2019. za prekomjernu tjelesnu masu iznosio 52,7 %, a za pretilost 16,5 % (Eurostat, 2022). Stratifikacijom podataka prema spolu prekomjernu tjelesnu masu u Hrvatskoj ima 58,5 % žena te 73,2 % muškaraca, dok je pretilih 22,6 % žena i 23,7 % muškaraca. Prema podacima Eurostata objavljenih 2022. godine za 2019. godinu, najmanji broj žena u Europskoj uniji s prekomjernom tjelesnom masom zabilježen je u Italiji (37,1 %), Luksemburgu (38,4 %) i Cipru (40,8 %), a najveći u Hrvatskoj (58,5 %), Malti (58,0 %) i Latviji (56,9 %). Zemlje s najmanje zabilježenih pretilih žena su Italija (10,7 %), Rumunjska (10,8 %) i Bugarska (11,9 %), a zemlje s najviše zabilježenih pretilosti su Malta (26,7 %), Irska (26,0 %) i Latvija (25,7 %). Muškaraca s prekomjernom tjelesnom masom najviše je u Hrvatskoj (73,2 %), Malti (71,0 %) i Češkoj (69,8 %), a najmanje u (Francuskoj 52,9 %), Nizozemskoj (55,1 %) i Italiji (55,3 %). Najviše pretilih muškaraca je u Malti (30,6 %), Mađarskoj (25,8 %) i Irskoj (25,7 %), a najmanje u Italiji (12,9 %), Nizozemskoj (13,2 %) i Francuskoj (14,3 %). Stratifikacijom podataka po dobi, vidljiv je porast tjelesne mase s dobi te je najveća prevalencija pretilih zabilježena u skupini između 65 i 74 godina i iznosi 29,3 % (tablica 3) (Eurostat, 2022). Porast tjelesne mase s dobi zabilježen je i u drugim zemljama Europske unije.

U svim zemljama Europske unije zabilježeno je smanjenje udjela osoba s prekomjernom tjelesnom masom s porastom stupnja obrazovanja (Eurostat, 2022).

Tablica 3. Stratifikacija prevalencije pretilosti po dobnim skupinama u Hrvatskoj za 2019. godinu (Eurostat, 2022)

Raspon (godine)	20 – 24	25 – 29	25 – 34	35 – 44	45 – 54	55 – 64	65 – 74
Prevalencija (%)	6,7	12,0	13,1	18,5	22,8	27,0	29,3

2.1.4. Kronične komplikacije pretilosti

Rizik nastanka komorbiditeta povećava se s porastom ITM i opsegom struka. Vrijednosti opsega struka ≥ 88 cm za žene i ≥ 102 cm za muškarce povećava značajno kardiovaskularni rizik osobama s prekomjernom tjelesnom masom i pretilosti I. stupnja (Durrer Schutz i sur., 2019). Opseg struka u osoba s II. i III. stupnjem pretilosti ne pridonosi porastu rizika od nastanka komorbiditeta (tablica 4) (Garvey i sur., 2016; NICE, 2020).

Tablica 4. Ovisnost nastanka rizika komorbiditeta o ITM i opsegu struka, prilagođeno prema Garvey i sur. (2016), Durrer Schutz i sur. (2019), NICE (2020)

Stupanj uhranjenosti	ITM (kg m ⁻²)	Opseg struka/rizik		
		Rizik	M \leq 102 cm Ž \leq 88 cm	M \geq 102 cm Ž \geq 88 cm
Pothranjenost	< 18,5	Nizak		
Normalna tjelesna masa	18,5 – 24,9	Prosječan		
Prekomjerna tjelesna masa	25,0 – 29,9	Povećan	Povećan	Visok
Pretilost I. stupnja	30,0 – 34,9	Visok	Visok	Vrlo visok
Pretilost II. stupnja	35,0 – 39,9	Značajan	Vrlo visok	Vrlo visok
Pretilost III. stupnja	\geq 40,0	Vrlo značajan	Ekstremno visok	Ekstremno visok

ITM -indeks tjelesne mase; M-muškarci; Ž-žene

Pretilost je čimbenik rizika razvoja različitih komplikacija. Komplikacije povezane s pretilosti su: **metaboličke komplikacije** (hiperinulinemija/inzulinska rezistencija, dijabetes tipa 2, dislipidemija, metabolički sindrom, hiperuricemija, giht, porast vrijednosti leptina, citokina/upala), **kardiovaskularni poremećaji** (hipertenzija, ateroskleroza, koronarna bolest srca i infarkt miokarda, cerebrovaskularna bolest i ishemijski moždani udar, zatajivanje srca, venska tromboembolija), **respiratorne bolesti** (astma, hipoksemija, opstruktivna apneja u snu, hipoventilacija), **zloćudne bolesti** (jednjak, želudac, štitnjača, tanko crijevo, debelo crijevo, rektum, jetra, žučni mjehur, gušterača, bubreg, leukemija, multipli mijelom i limfom, kod žena: endometrij, vrat maternice, jajnik, dojka nakon menopauze; a kod muškaraca: prostata), **bolesti lokomotornog sustava** (osteoartritis (koljena, kuka), križbolja), **gastrointestinalni i hepatobilijarni poremećaji** (žučni kamenci, nealkoholna masna bolest jetre, nealkoholni steatohepatitis, pankreatitis, kolelitijaza, gastroezofagealni refluks, hernija), **genitourinarni sustav/reproduktivno zdravlje** (urinarna inkontinencija, nepravilnosti menstrualnog ciklusa, neplodnost, hirzutizam, sindrom policističnih jajnika, spontani pobačaji, gestacijski

dijabetes, hipertenzija u trudnoći, preeklampsija, fetalna makrosomija, fetalni distress, fetalne malformacije, distopija i primarni carski rez), **psihološke i socijalne posljedice** (nisko samopoštovanje, anksioznost i depresija, stigmatizacija, diskriminacija pri zapošljavanju, odabiru fakulteta, zaradi na poslu itd., poremećaji prehrane (poremećaj prejedanja, sindrom noćnog jedenja, negativna slika tijela), **razno** (idiopatska intrakranijalna hipertenzija, albuminurija, glomerulopatija povezana s debljinom, nefrotski sindrom, infekcije kože, limfedem, komplikacije pri anesteziji, parodontne bolesti) (NIH National Cancer Institute,; Manna i Jain, 2015; Gulin i Budinčević, 2018; Durrer Schutz i sur., 2019; Štimac i sur., 2022). Pretilost skraćuje pojedincu vrijeme bez bolesti, ali i sam životni vijek za 6 do 14 godina (Wharton i sur., 2020).

Nastanak navedenih komorbiditeta posljedica je samog porasta mase masnog tkiva (fizičke promjene) i hipertrofije adipocita koje dovode do endokrinoloških i metaboličkih promjena ili njihove kombinacije. Komorbiditeti koji nastaju kao posljedica porasta mase masnog tkiva su: osteoartritis, poremećaji disanja u snu i psihološki problemi. Osteoartritis koljena i gležnja posljedica su biomehaničkih opterećenja zglobova i izvanzglobnih tkiva zbog povećane mase, dok je uzrok poremećaja disanja u snu posljedica smanjenog rezidualnog volumena pluća zbog abdominalnog pritiska masnog tkiva na dijafragmu (Schnurrer-Luke-Vrbanić i Novak, 2000; Bray, 2004). Stigmatizacija osobama s pretilošću uzrokuje značajan emocionalni distress što može dovesti do depresije (Brewis i sur., 2018). Arterijska hipertenzija nastaje kao kombinacija porasta mase masnog tkiva koji mehaničkom kompresijom bubrega i kompresijom dišnih puteva pridonosi aktivaciji simpatičke aktivnosti te aktivaciji renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava dok hipertrofija adipocita pridonosi vaskularnoj disfunkciji, inzulinskoj rezistenciji i upali (Gulin i Budinčević, 2018). Ostali komorbiditeti su posljedica endokrinoloških i metaboličkih promjena koje uzrokuju hipertrofirani adipociti (Manna i Jain, 2015). Navedene promjene između ostalog dovode do oštećenja DNA te akumulacije oštećenja DNA koja se povezuju s razvojem komorbiditeta pretilosti (Włodarczyk i Nowicka, 2019). Oštećenje DNA dovodi do aktivacije nuklearnog faktora kappa B (engl. *nuclear factor -κB*, NF-κB) i pojačane ekspresije tumor supresorskog proteina p53 (p53) koji aktivira protein p21 u hipertrofiranim adipocitima. Protein p21 štiti stanice od ulaska u apoptozu uzrokovane proteinom p53 koji dovodi do diferencijacije i hipertrofije adipocita, upale, inzulinske rezistencije i dijabetesa (Inoue i sur., 2008; Vergoni i sur., 2016; Włodarczyk i Nowicka, 2019). Oštećenje DNA je značajan događaj na putu razvoja kroničnih nezaraznih bolesti što za posljedicu može imati i smrtni ishod (Bonassi i sur., 2021). DNA oštećenja koja nisu popravljena ili su krivo popravljena prije stanične proliferacije mogu dovesti do mutacija

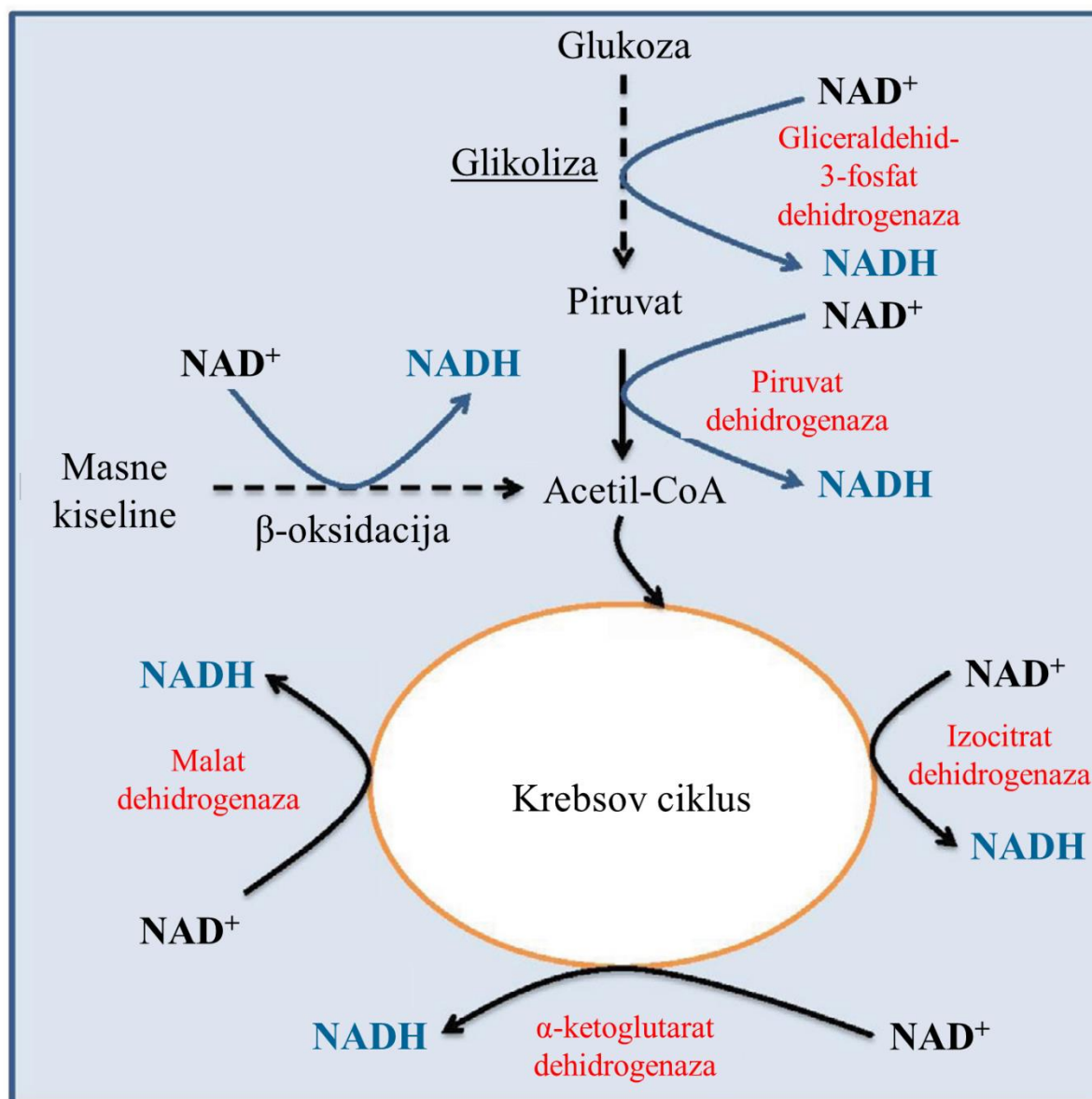
koje su nužne, ali same nisu dovoljne za nastanak tumora, te se povezuju sa starenjem i nizom kroničnih bolesti (Nilsson i Liu, 2020; Bonassi i sur., 2021).

2.1.5. Uzroci nastanka oštećenja DNA u osoba s pretilošću

Različiti molekularni mehanizmi uzrokuju oštećenja DNA u osoba s pretilošću (Setayesh i sur., 2018). Pretilost dovodi do fiziološke neravnoteže što rezultira hiperglikemijom, dislipidemijom i kroničnom upalom (Usman i Volpi, 2018). Navedena stanja su podloga za iste patofiziološke procese koji mogu dovesti do oštećenja DNA. U osoba s pretilošću hiperglikemija, dislipidemija i kronična upala uzrokuju nastanak velikih količina reaktivnih kisikovih (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i dušikovih (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) vrsta koje fiziološki antioksidacijski sustav ne može neutralizirati, što dovodi do oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres uzrokuje oštećenja svih molekula uključujući i DNA (Tangvarasittichai, 2015; Usman i Volpi, 2018). Oštećenja DNA uzrokovana izravno ili neizravno oksidacijskim stresom su: oksidacija, alkilacija, metilacija, nitracija, deaminacija DNA baza, jednostruki i dvostruki DNA lančani lomovi, križno povezivanje lanaca DNA te stvaranje različitih adukata s molekulom DNA (Włodarczyk i Nowicka, 2019; Nilsson i Liu, 2020).

2.1.5.1. Hiperglikemijom i hiperinzulinemijom inducirani oksidacijski stres i oštećenja DNA

Više je uzroka nastanka oksidacijskog stresa i oštećenja DNA u hiperglikemiji. U mitohondriju, respiracijski lanac je glavni izvor reaktivnih kisikovih vrsta, te u njemu, u fiziološkim uvjetima, nastane od 0,1 – 2,0 % reaktivnih kisikovih vrsta (Tangvarasittichai, 2015). Glikoliza, β -oksidacija masnih kiselina i ciklus limunske kiseline rezultiraju nastankom energijom bogatih molekula nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i flavin-adenin dinukleotida (FADH₂) koje respiracijskom lancu mitohondrija predaju elektrone za redukciju molekule kisika u molekulu vode (slika 1). Oksidacijski stres u hiperglikemiji nastaje kao posljedica pomaka ravnoteže u sintezi molekula NADH i FADH₂ zbog čega veći broj elektrona reducira kisik do superoksid aniona (O₂^{·-}) koji superoksid-dismutaza pretvara u vodikov peroksid (H₂O₂) (Li i sur., 2013; Tangvarasittichai, 2015).



Slika 1. Nastanak energijom bogatih molekula NADH glikolizom, β -oksidacijom masnih kiselina i Krebsovim ciklusom, prilagođeno prema Wu i sur. (2016)

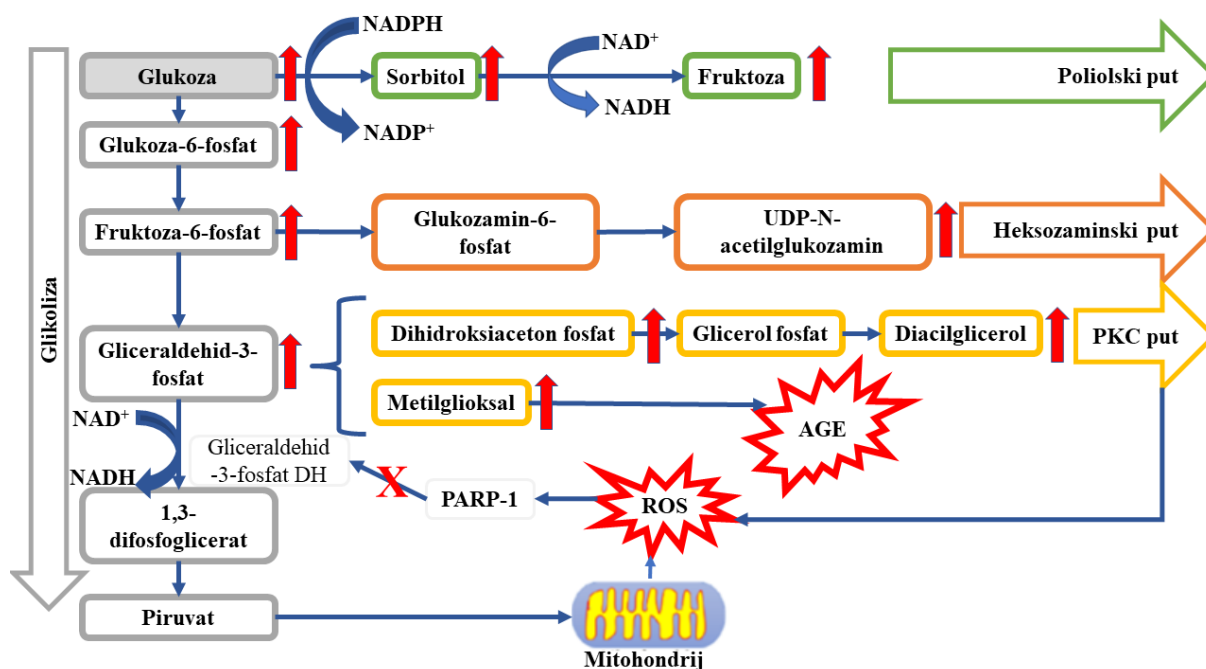
Neizravno su mitohondriji odgovorni za nastanak oksidacijskog stresa izvan samog organela i to posredstvom upalnih citokina i upale. Mitohondrijski ROS (bez obzira na etiologiju nastanka istog) dovodi do nastanka NF- κ B, protein-kinaze aktivirane mitogenom (engl. *Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), interferon regulatornog faktora 3 (engl. *interferon regulatory factor 3*, IRF3) i interferon regulatornog faktora 7 (engl. *interferon regulatory factor 7*, IRF7) koji uzrokuju nastanak niza proupalnih citokina poput interleukina 1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-12, faktora tumorske nekroze α (engl. *Tumour Necrosis Factor α* , TNF- α), i još mnogih drugih (West i sur., 2011; Li i sur., 2013; Liu i sur., 2017). Još jedan proupalni put nastaje u mitohondriju posredstvom oksidacijskog stresa. Naime, oksidacijski stres

uzrokuje oštećenja mitohondrijske DNA, koja se ne može popraviti, budući da mitohondriji ne sadrže enzime za navedeni popravak (popravak izrezivanjem nukleotida) (Włodarczyk i Nowicka, 2019). Tako oštećena mitohondrijska DNA inducira sintezu proupalnih citokina IL-6, TNF- α i pro-IL-1 β (Shimada i sur., 2012; Pazmandi i sur., 2014).

Hiperglikemija uzrokuje nastanak oksidacijskog stresa i oštećenja DNA: a) promjenom redoks potencijala stanice, b) sintezom diacilglicerola i aktivacijom protein kinaze C (PKC, engl. *protein kinase C*), c) poliolskim putem, d) formiranjem AGE spojeva (engl. *advanced glycation endproducts*, konačni produkt glikacije), a sve zbog razgradnje glukoze različitim metaboličkim putevima uslijed visoke koncentracije iste (slika 2) (Singh i sur., 2022).

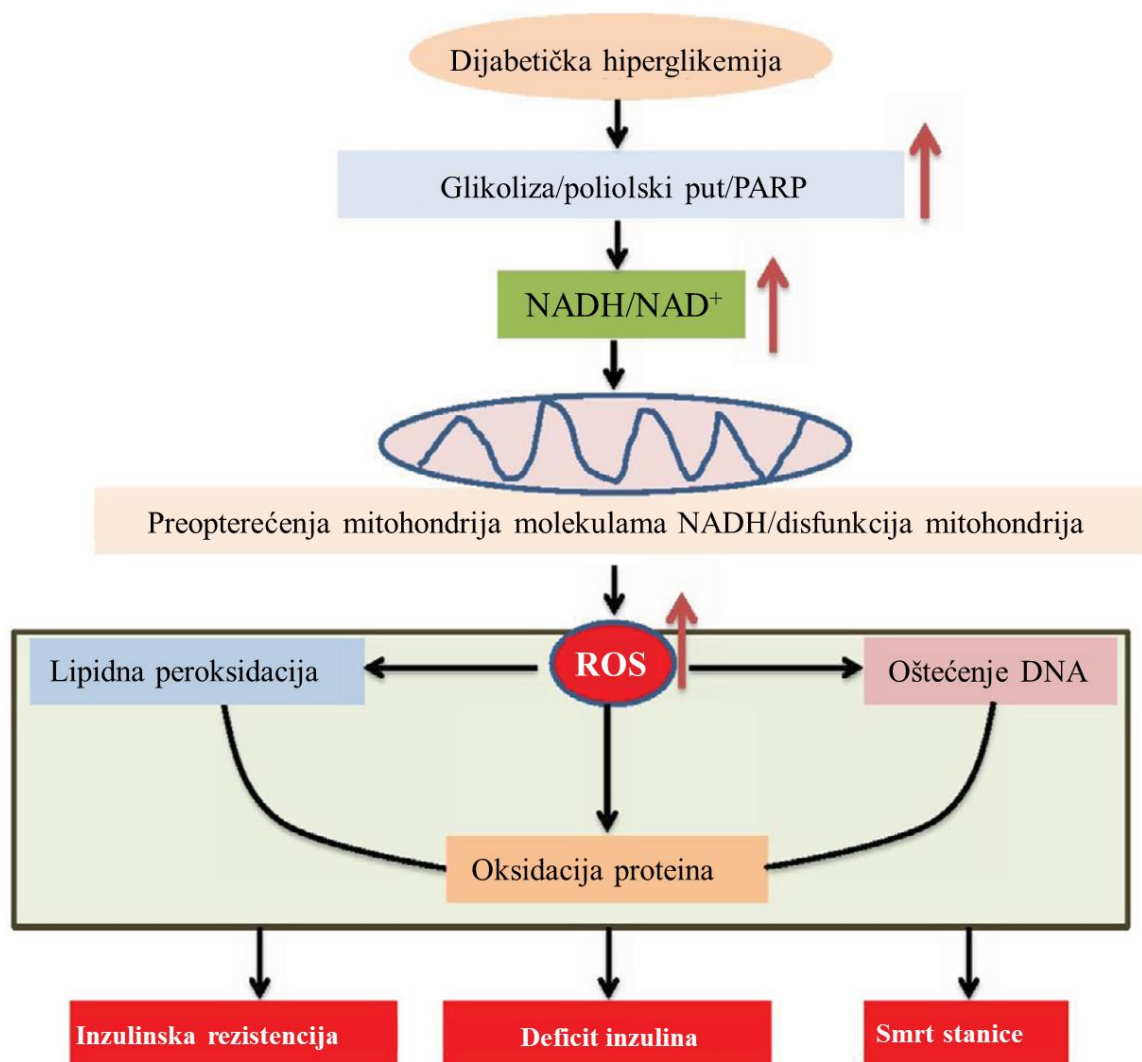
- a) U uvjetima hiperglikemije zbog visoke koncentracije glukoze dolazi do pomaka ravnoteže i nastanka većih količina NADH te promjene omjera NADH/NAD⁺ i time redoks potencijala stanice. Suvišak NADH predaje elektrone na respiracijski lanac mitohondrija što rezultira nastankom ROS-a i oksidacijskim stresom (Wu i sur., 2016).
- b) ROS i/ili RNS aktiviraju enzim PARP-1 (engl. *poly-ADP-ribose polymerase-1*, poli-ADP-ribozil polimeraza 1) koji inhibira enzim gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu što dovodi do porasta gliceraldehid -3 fosfata. Gliceraldehid 3-fosfat aktivira PKC (protein kinaza C) put koji aktivira između ostalog dušik-oksida sintetazu, NADPH oksidazu i NF- κ B. NADPH oksidaza je značajno zastupljena osim u fagocitima i u stanicama poput glatkih mišića, endotelnih stanica, fibroblasta i drugih stanica koji u uvjetima hiperglikemije postaju važni izvori ROS-a. Uslijed gomilanja gliceraldehid 3-fosfata u stanicama dolazi do promjene u ravnoteži te nastanka većih količina metilglioksala i povećanog metabolizma glukoze poliolskim putem (Singh i sur., 2022).
- c) U uvjetima hiperglikemije 30 – 35 % metabolizma glukoze se odvija poliolskim putem koji na dva načina utječe na nastanak oksidacijskog stresa: nastankom NADH i potrošnjom NADPH (Tangvarasittichai, 2015; Wu i sur., 2016). NADPH je odgovoran za regeneraciju glutationa koji je važan antioksidans te se na taj način smanjuje antioksidativni kapacitet stanica (Tangvarasittichai, 2015). NADPH je ujedno i važan supstrat u sintezi NO, no u nedostatku NADPH, dušik-oksida sintetaza generira O₂^{·-} (Singh i sur., 2022). Jedan od produkata poliolskog puta glukoze je fruktoza koja zajedno s drugim reducirajućim šećerima uzrokuje ne-enzimske reakcije glikacije, nitracije, dehidracije i oksidacije slobodnih amino skupina proteina pri čemu nastaje heterogena skupina spojeva-AGE (Lee i Chan, 2015).

d) U uvjetima hiperglikemije (ali i upale te hipoksije) glikolizom nastaje više metilglioksala nego u fiziološkim uvjetima. Metilglioksal je glavni reaktant u nastanku AGE-a (Schalkwijk i Stehouwer, 2020), aktivaciji PKC, NADPH oksidaze, NF- κ B i MAPK (Singh i sur., 2022). AGE spojevi mogu uzrokovati lomove DNA i oksidaciju nukleotida (Lee i Chan, 2015). Metilglioksal lako prolazi jezgrinu membranu gdje može ireverzibilno modificirati nukleotide stvarajući s njima niz različitih adukata što može dovesti do lomova lanaca DNA, međusobnog povezivanja lanaca DNA, povezivanja DNA s proteinima, kromosomskih aberacija, može utjecati na izmjenu sestrinskih kromatida i uzrokovati nastanak mikronukleusa (Schalkwijk i Stehouwer, 2020; Nilsson i Liu, 2020). Metilglioksal sudjeluje u epigenetskoj regulaciji DNA modificiranjem sva 4 histona (H2B, H2A, H3 i H4) i time mijenja ekspresiju brojnih gena između ostalog i inducira sintezu NF- κ B koji dovodi do upale i inzulinske rezistencije (Schalkwijk i Stehouwer, 2020).



Slika 2. Putevi razgradnje glukoze u hiperglikemiji, prilagođeno prema Singh i sur. (2022)

Oksidacijski stres oštećuje proteine, lipide i nukleinske kiseline koji se s vremenom akumuliraju te mogu dovesti do stanične smrti (Wu i sur., 2016). Stanice gušterače podložnije su oštećenjima uzrokovanim oksidacijskim stresom budući da sadrže nisku razinu antioksidansa što može pogodovati nastanku inzulinske rezistencije, disfunkcije i smrti β stanica gušterače, te deficitu inzulina (slika 3) (Lima i sur., 2019).



Slika 3. Mehanizam nastanka oštećenja stanica u hiperglikemiji, prilagođeno prema Wu i sur. (2016)

U uvjetima hiperglikemije povećana je proizvodnja proteina (proinzulin) u endoplazmatskom retikulumu gušterače što dovodi do stresa endoplazmatskog retikuluma. Stres endoplazmatskog retikuluma uzrokuje disfunkciju i/ili smrt β stanica gušterače, te time uzrokuje smanjenje lučenja inzulina, ali i aktivaciju JNK (JUN N-terminal kinaze) i inhibitora kappa B kinaze β (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit β* , IKK β). Produkt IKK β aktivira NF- κ B koji stimulira proizvodnju proinflammatoryh citokina TNF- α i IL-1 β odgovornih za inzulinsku rezistenciju. Još jedan mehanizam dovodi do smanjenja funkcije β stanica gušterače. Citokini IL-6, TNF- α i IL-1 β uzrokuju disfunkciju β stanica gušterače što može dovesti do smanjenja lučenja inzulina te uz inzulinsku rezistenciju može dovesti do dijabetesa tipa 2 i hiperglikemije (Lima i sur., 2019).

Inzulinska rezistencija je stanje u kojoj je smanjen učinak inzulina u periferiji što dovodi do povećane koncentracije glukoze te posljedično većeg lučenja inzulina iz gušterače (hiperinulinemija). Prije nastanka dijabetesa tipa 2 hiperinzulinemija održava normalne koncentracije glukoze u krvi. Isti stupanj inzulinske rezistencije nađen je u otprilike 25 % ispitanika bez dijabetesa tipa 2 kao i u ispitanika s dijabetesom tipa 2 (Tangvarasittichai, 2015).

Na razvoj inzulinske rezistencije osim upalnih citokina utječe i ROS. ROS aktivira kazein kinazu 2 koja aktivira retromer. Retromer aktivira Golgijevo tjelešce koje prenosi receptor transportera glukoze 4 (engl. *Glucose transporter type*, GLUT4) u lizosom gdje se razgrađuje umjesto da završi na staničnoj membrani mišićnog, jetrenog ili masnog tkiva. Smanjen broj receptora GLUT4 na staničnim membranama smanjuje unos glukoze u stanice mišića, jetre i masnog tkiva te time uzrokuje porast glukoze i potom inzulina. Porast inzulina izvan optimalnih koncentracija dovodi do smanjenja broja receptora GLUT4 na membranama i nastanka ROS-a. Mehanizam navedene pozitivne povratne sprege posredovan je također nastankom ROS-a. Naime, hiperinzulinemija dovodi do promjene u unutarstaničnim signalnim putevima gdje se nakon aktivacije PI3-kinaze aktivira Rac umjesto PIP2 koji se aktivira u fiziološkim uvjetima (uvjetima optimalnih koncentracija inzulina). Rac zatim pojačava aktivnost NADPH oksidaze 4 (NOX4) koja proizvodi ROS.

Visoka koncentracija glukoze negativno utječe na popravak DNA. Istraživanje Simone i sur. (2008) pokazalo je da visoke koncentracije glukoze aktiviraju fosfatidilinozitol 3-kinazu i aktivaciju Akt/protein kinaze 3 koja u konačnici smanjuje sintezu enzima 8-oksoG DNA glikozilaze odgovornog za popravak oksidacijskog oštećenja DNA izrezivanjem nukleotida (Simone i sur., 2008; Włodarczyk i Nowicka, 2019).

2.1.5.2. Dislipidemijom uzrokovani oksidacijski stres i lipidnom peroksidacijom uzrokovana oštećenja DNA

Dislipidemija je abnormalnost u vrijednostima kolesterola i/ili triglicerida, te uključuje: visoke koncentracije vrijednosti kolesterola, triglicerida, LDL-kolesterola i niske vrijednosti HDL-kolesterola (Berberich i Hegele, 2021). Visoke vrijednosti triglicerida uzrokuju pomak ravnoteže i nastanka većih količina energijom bogatih molekula NADH što za posljedicu ima nastanak oksidacijskog stresa (slika 1) (Li i sur., 2013; Tangvarasittichai, 2015; Włodarczyk i Nowicka, 2019). Povišene vrijednosti lipida u plazmi podložne su oksidacijskim promjenama izravnim ROS-om i oksidacijskim promjenama npr. iz upalom aktiviranih leukocita budući da je plazma homogeni medij (Usman i Volpi, 2018; Nilsson i Liu, 2020).

Produkti lipidne peroksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina (bilo iz staničnih

membrana ili plazme) uzrokovanih ROS-om su reaktivni aldehidi koji pojačavaju učinak ROS-a nastankom niza različitih toksičnih produkata od kojih se mnogi vežu za druge molekule poput proteina i DNA (Román-Pintos i sur., 2018). Povećana genotoksičnost produkata lipidne peroksidacije posljedica je njihove mogućnosti ulaska u staničnu jezgru (Nilsson i Liu, 2020). Najčešći produkti lipidne peroksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina je malondialdehid, 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE), 4-okso-2-nonenal (4-ONE), 4-hidroksi-2-heksenal (4-HHE), 4-okso-2-heksenal i akrolein. Malondialdehid je izrazito mutagen budući da uzrokuje inserciju, deleciju i supstituciju nukleotida (pogotovo parove baza gvanin-citozin) te stvara adukte s DNA i uzrokuje unakrsno povezivanje lanaca DNA te time onemogućuje transkripciju i replikaciju DNA (Jairam i sur., 2012; Usman i Volpi, 2018; Nilsson i Liu, 2020; Cordelli i sur., 2021). 4-HNE može uzrokovati međusobno povezivanje lanaca DNA (Nilsson i Liu, 2020).

2.1.5.3. Upalom inducirani oksidacijski stres i oštećenja DNA

Adipozno tkivo se sastoji od adipocita, endotelnih stanica i stanica imunološkog sustava. Hipertrofija adipocita uzrokuje smanjeni protok krvi u masnom tkivu, dovodeći do hipoksije koja rezultira nekrozom adipocita i infiltracijom makrofaga. Infiltracija makrofaga u adipozno tkivo karakteristična je za pretilost. Adipociti i infiltrirani makrofagi u adipoznom tkivu luče medijatore upale: TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1, monocitni kemotaktični protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), leptin, adiponektin i rezistin, te visoke koncentracije dušikovog oksida (NO) (Ellulu i sur., 2017; Usman i Volpi, 2018).

Masne kiseline u adipocitima aktiviraju proupalne serinske kinaze koje stimuliraju lučenje IL-6. IL-6 stimulira hepatocite na proizvodnju C-reaktivnog proteina (CRP-a), te koštanu srž na proizvodnju leukocita kao markera upale (Ellulu i sur., 2017). Medijatori upale djeluju sinergijski uzrokujući kroničnu upalu organizma aktiviranjem makrofaga, neutrofila i dendritičnih stanica u različitim dijelovima tijela koje dodatno luče medijatore upale, ali i proizvode cikloksigenazu 2, dušik-oksidad sintazu i NADPH oksidazu, reaktivne kisikove vrste i reaktivne dušikove vrste poput $O_2^{\cdot-}$, peroksinitrit aniona (ONO_2^-), nitrozoperoksikarbonat aniona ($ONOOCO_2^-$), didušikovog oksida (N_2O), didušikovog trioksida (N_2O_3), te kiselina kao što su hipoklorasta kiselina (HOCl) i hipobromna kiselina (HOBr) (Usman i Volpi, 2018; Włodarczyk i Nowicka, 2019).

Učinak $O_2^{\cdot-}$ na DNA je minimalan zbog kratkog poluživota molekule, visoke reaktivnosti s drugim molekulama te udaljenosti i odvojenosti mjesta nastanka $O_2^{\cdot-}$ i DNA. Ukoliko i dođe do reakcije ona rezultira nastankom 8-okso-7,8 dihidro-2'-deoksigvanozina.

Veći toksični učinak po organizam ima reakcija O_2^- i relativno stabilne molekule NO koja rezultira nastankom ONO_2^- koji reagira s deoksigvaninom u molekuli DNA tvoreći 8-nitrogvanin, 8-okso-7,8 dihidro-2'-deoksigvanozin i 5-nitro-4-gvanidinohidantion. Reakcije ONO_2^- s ostalim nukleinskim bazama DNA su minimalne. Najveći genotoksični učinak ima $ONOOCO_2^-$ koji nastaje reakcijom ugljičnog dioksida i ONO_2^- , a koji u interakciji s DNA uzrokuje nastanak 8-nitrogvanozina, 5-gvanidino-4-nitroimidazola te 8-okso-7,8 dihidro-2'-deoksigvanozin. Zbog svoje nestabilnosti $ONOOCO_2^-$ se raspada na karbonatni radikal koji uzrokuje unakrsno povezivanje lanaca DNA kovalentnim povezivanjem C8 gvanina i N3 timidina (Nilsson i Liu, 2020). Hipoklorasta kiselina (HOCl) u prisustvu ONO_2^- dovodi do značajnog nastanka timin glikola (5,6 dihidroksi-6-hidrotimin), 5-hidroksihidantoina, 8-hidroksiadenina i 5-klorouracila, dok hipobromna kiselina (HOBr) uzrokuje nastanak adukata poput 8-bromoadenina na nukleotidima i dvolančanog molekuli DNA (Nilsson i Liu, 2020).

2.1.5.4. Utjecaj prehrane na upalu i upalni indeks prehrane

Prehrana ima važnu ulogu u razvoju kronične upale (Kord Varkaneh i sur., 2018). Mediteranska prehrana dovodi do smanjenja upale, a za nju je karakteristična velika konzumacija voća, povrća, cjelovitih žitarica, orašastih plodova, sjemenki i maslinovog ulja te umjeren unos morskih plodova, mliječnih proizvoda, jaja i peradi te male količine crvenog i prerađenog mesa (Norde i sur., 2021; Liang i sur., 2022). Zapadnjački način prehrane za koji je karakterističan veliki unos crvenog i prerađenog mesa, rafiniranih žitarica, brze hrane, krumpira, slatkiša, šećera i energetskih napitaka dovodi do porasta upale (Norde i sur., 2021). Upalni indeks prehrane (engl. *Dietary Inflammatory Index*, DII) razvijen je 2009. godine, a 2014. godine su ga nadopunili Shivappa i sur. (2014). Sam indeks je kreiran korištenjem rezultata iz istraživanja različitih populacija koja su koristila različite dijetetičke metode, ali također korištenjem i podataka dobivenih iz istraživanja na laboratorijskim životinjama i staničnim linijama čime je navedeni indeks postao primjenjiv za sva istraživanja s adekvatno prikupljenim nutritivnim podacima (Cavicchia i sur., 2009; Shivappa i sur., 2014; Park i sur., 2019; Hébert i sur., 2019). Izračun DII-a temelji se na 45 prehrambenih parametara od kojih 9 parametara ima proupalni potencijal, a preostalih 36 protuupalni potencijal. Što je izračunata vrijednost upalnog indeksa prehrane pozitivnija, to je proupalni potencijal prehrane veći, a negativne vrijednosti upalnog indeksa ukazuju na protuupalni potencijal prehrane (Shivappa i sur., 2014). Kronični prekomjerni unos energije dovodi do pretilosti, dok proupalni način prehrane doprinosi nastanku i/ili održavanju upale, prekomjerne tjelesne mase, dijabetesa i dislipidemije, te povećane smrtnosti u osoba s dijabetesom i osoba s prekomjernom tjelesnom

masom i pretilosti koji imaju dva ili više kardiometabolička komorbiditeta (Park i sur., 2019; Yuan i sur., 2022).

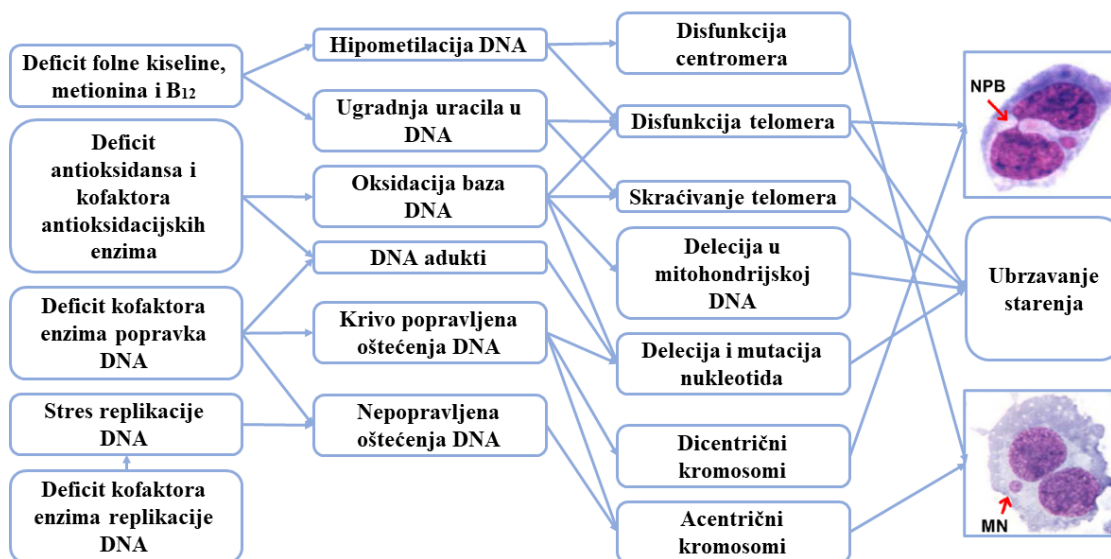
Rezultati prospektivnog kohortnog istraživanja Ramallala i sur. (2017) ukazuju da je proupalna dijeta povezana s većim rizikom klinički značajnog dobivanja na tjelesnoj masi te da je ista povezana s većim rizikom nastanka prekomjerne tjelesne mase i pretilosti. Rezultati također sugeriraju da bi proupalna dijeta mogla biti neovisni čimbenik rizika za nastanak pretilosti, neovisna o ukupnom unosu energije, tjelesnoj aktivnosti, obiteljskoj anamnezi ili početnoj tjelesnoj masi (Ramallal i sur., 2017). Postoji uzajamni odnos upale i pretilosti. Upala uzrokuje inzulinsku i leptinsku rezistenciju, dvaju hormona odgovornih za regulaciju gladi, što može dovesti do porasta tjelesne mase i u konačnici do pretilosti. Pretilost pak uzrokuje nastanak upale (Ramallal i sur., 2017). Upotrebom protuupalne dijetete moguć je izlaz iz ovog začaranog kruga, ali i smanjenje rizika od nastanka drugih komorbiditeta povezanih s pretilošću budući da je prehrana jedna od glavnih komponenti koji utječu na upalu, a smatra se da je upravo upala odgovorna za komorbiditete povezane s pretilošću (Corley i sur., 2019).

2.1.5.5. Utjecaj prehrane na oštećenja DNA

Utjecaj prehrane na oštećenja DNA je vrlo kompleksan budući da se hrana sastoji od hranjivog dijela (makronutrijenti i mikronutrijenti) i ne-hranjivog dijela (toksini, zaostali herbicidi i sl.) (Ladeira i sur., 2017). Nekoliko je načina na koji prehrana utječe na oštećenje DNA: izravnim oštećenjem molekula DNA, neadekvatnim unosom prehrambenih komponenti odgovornih za sintezu, obnovu i metilaciju DNA te neizravno utjecajem na balans slobodnih radikala i nastanak oksidacijskog stresa (Ladeira i sur., 2014; 2017; Fenech, 2020a).

Genotoksini su odgovorni za izravno oštećenje DNA. Oni mogu uzrokovati nastanak točkastih mutacija, delecija i insercija nukleotida DNA, amplifikaciju gena te kromosomske aberacije. Genotoksini u hrani mogu biti posljedica pripreme hrane npr. kuhanjem pri čemu nastaju heterociklički amini, policiklički aromatski ugljikovodici i sl. ili posljedica kontaminacije hrane ostacima herbicida ili mikotoksinima poput aflatoksina B₁ i okratoksina A (Ladeira i sur., 2014).

Deficit mikronutrijenata koji sudjeluju u sintezi i obnovi DNA može imati jednako snažan utjecaj na oštećenja DNA kao utjecaj genotoksina i zračenja (Fenech, 2020a). Utjecaj deficita mikronutrijenata na stabilnost DNA prikazana je u tablici 8 i slici 4. Genotoksični efekti su aditivni, kumulativni i ponekad ireverzibilni (Ladeira i sur., 2014).



Slika 4. Utjecaj deficita mikronutrijenata na stabilnost DNA, prilagođeno prema Fenech (2020a); MN-mikronukleus, NPB- nukleoplazmatski most (engl. nucleoplasmic bridge)

Nekoliko je načina na koji hrana utječe na ravnotežu slobodnih radikala i nastanak oksidacijskog stresa. Hrana je jedna od važnih komponenti koje utječu na upalu, a upala je jedan od izvora slobodnih radikala što može dovesti do oksidacijskog stresa. Osim što prekomjerni unos hrane dovodi do pomaka ravnoteže u nastanku energijom bogatih molekula NADH i FADH₂ i time nastanka ROS-a, sama probava, apsorpcija, metabolizam i izlučivanje prekomjernog unosa hrane dovodi do nastanka ROS-a (Ladeira i sur., 2014). Hrana bogata vitaminima C i E te polifenolima može utjecati na smanjenje utjecaja ROS-a oštećenja DNA i lipida (tablica 5, slika 4) (Fenech, 2020a). S druge strane, kalorijski deficit uzrokuje očuvanje i/ili porast popravka oštećenja DNA bez obzira na izvor i prirodu oštećenja DNA (Ladeira i sur., 2017).

Tablica 5. Utjecaj mikronutrijenata na stabilnost DNA, prilagođeno prema Fenech (2020a)

Mikronutrijent	Uloga u stabilnosti DNA	Posljedice deficita
Vitamin C, E, polifenoli	Prevenција lipidne oksidacije DNA i lipida	Porast lomova lanaca DNA, kromosoma, oksidacijskih oštećenja DNA i lipidnih adukata na DNA
Folna kiselina, vitamini B ₂ , B ₆ i B ₁₂	Metilacija DNA i sinteza nukleotida	Stres replikacije DNA, ugradnja uracila u DNA i hipometilacija DNA, skraćenje i disfunkcija telomera
Niacin	Substrat enzima PARP	Porast jednostrukih lomova DNA, lomova kromosoma porast vjerojatnosti mutacija. Smanjena regulacija dužine telomera
Cink	Kofaktor enzima odgovornih za antioksidacijski učinak i popravak oštećenja DNA	Stres replikacije DNA, porast oksidacijskog oštećenja DNA, lomovi DNA, oštećenje kromosoma
Željezo	Sastavni dio enzima odgovornih za replikaciju i obnovu DNA te mitohondrijskih citokroma	Stres replikacije DNA, smanjenje kapaciteta obnove DNA i regulacije dužine telomera, porast oksidacijskog oštećenja mitohondrijske DNA
Magnezij	Sastavni dio DNA polimeraza odgovornih za više različitih tipova obnove DNA. Nužan za polimerizaciju mikrotubula diobenog vretena i razdvajanje kromosoma	Smanjena mogućnost replikacije i obnove DNA. Greške u razdvajanju kromosoma.
Mangan	Sastavni dio mitohondrijske superoksid dizmutaze	Porast oštećenja mitohondrijske DNA slobodnim radikalima i smanjena otpornost na oštećenja DNA izazvanih radijacijom
Kalcij	Kofaktor enzima odgovornih za mitozu	Disfunkcija mitoze
Selenij	Kofaktor enzima uključenih u metabolizam metionina i antioksidacijskih enzima	Porast oksidacijskih oštećenja i lomova lanaca DNA, skraćivanje telomera

PARP - poli (ADPribozil) polimeraza-1 (engl. *poly-ADP-ribose polymerase-1*)

2.2. Liječenje pretilosti

U liječenju pretilosti sudjeluje multidisciplinarni tim sastavljen od liječnika obiteljske medicine, endokrinologa, nutricionista-dijetetičara, medicinske sestre, psihologa i/ili psihijatra, kineziologa, fizijatra i fizioterapeuta, kirurga i liječnika ostalih specijalnosti ovisno o komorbiditetima (Štimac i sur., 2022). Prema smjernicama za liječenje pretilosti odraslih Europskog udruženja za proučavanje pretilosti (engl. *European Association for the Study of Obesity*, EASO) i Hrvatskim smjernicama za liječenje odraslih osoba s debljinom, vrsta intervencije u liječenju pretilosti donosi se temeljem inicijalnog pregleda koji uključuje određivanje ITM-a, mjerenje opsega struka, mjerenje krvnog tlaka te procjenu i utvrđivanje komorbiditeta. Među ostalim, određuju se i laboratorijski parametri: glukoza natašte; lipidni profil (ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceridi, lipoprotein a); testovi oštećenja jetre (mjerenjem alanin amino-transaminaze ili AST, aspartat-aminotransferaze ili ALT, gama glutaryl transferaze ili GGT te alkalne fosfataze ili ALP); funkcije bubrega (kreatinin, albumini u urinu); upalni parametri (CRP); mokraćna kiselina kod gihta; te funkcija štitnjače (mjerenje tiroidnog stimulirajućeg hormona ili TSH) (Yumuk i sur., 2015; Štimac i sur., 2022). Ciljeve liječenja treba prilagoditi komplikacijama pretilosti te uzeti u obzir psihološke aspekte bolesti (samopoštovanje, slika vlastitog tijela) i kvalitetu života (Štimac i sur., 2022). U tablici 6 su prikazane preporuke liječenja osoba s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću s obzirom na opseg struka i komorbiditete (Yumuk i sur., 2015).

Tablica 6. Smjernice za liječenje pretilosti odraslih osoba, prilagođeno prema Yumuk i sur., 2015.

ITM (kg m^{-2})	Opseg struka		Komorbiditeti
	M <94 cm; Ž <80 cm	M >94 cm; Ž >80 cm	
25 – 30	ŽN	ŽN	ŽN ± F
30 – 35	ŽN	ŽN ± F	ŽN ± F ± K*
35 – 40	ŽN ± F	ŽN ± F	ŽN ± K
>40	ŽN ± F ± K	ŽN ± F ± K	ŽN ± F ± K

M - muškarci; Ž - žene; ŽN - životne navike; F- farmakoterapija; K- kirurška terapija

*individualan pristup za pacijente s dijabetesom tipa 2

2.2.1. Uloga nutricionista

Pristup i temelj liječenja prekomjerne tjelesne mase i pretilosti neovisan je o ITM, opsegu struka i prisutnosti komorbiditeta, a započinje promjenom životnih i prehrambenih navika. Preporuka je da glavnu ulogu u navedenom procesu ima nutricionist kako bi se povećala vjerojatnost pozitivnog ishoda liječenja pretilosti za pacijenta. Nakon uzimanja nutritivne anamneze (određivanje prehrambenih i životnih navika pacijenta, uvida u kliničke podatke i povijest bolesti, mjerenja ili uvida u antropometrijske i laboratorijske podatke), nutricionist educira pacijenta i izrađuje individualne smjernice za dugoročne promjene u prehrani koje uzimaju u obzir individualne potrebe svakog pacijenta, preferencije u odabiru hrane, prehrambene navike, životni ritam, te za individuu financijski prihvatljive namirnice što u konačnici dovodi do smanjenja unosa energije redovitom i uravnoteženom prehranom te promjene životnih navika, povećanja potrošnje energije tjelesnim aktivnostima ukoliko osoba nema značajna fizička ograničenja (Durrer Schutz i sur., 2019; Wharton i sur., 2020; Pajtak i sur., 2020; Štimac i sur., 2022). Nutricionist svojim znanjem prilagođava prehranu komorbiditetima pretilosti (npr. dijabetes tipa 2, hipertenzija, upala), a sve kako bi učinak prehrane bio sinergijski tj. utjecao i na smanjenje pretilosti i komorbiditet(e) istovremeno (Wharton i sur., 2020). Edukacijom se osobe s pretilošću uče prepoznavanju fizioloških osjećaja gladi i sitosti budući da ih osobe s pretilošću često ne prepoznaju. Glad se progresivno pojavljuje 4 do 5 sati nakon obroka. Preveliki vremenski razmak između dva obroka može biti kontraproduktivan tj. dovesti do većeg unosa energije stoga je bitan i raspored obroka koji bi trebali biti podijeljeni na tri ili pet manjih obroka (doručak, užina, ručak, užina, večera). Edukacijom se uči da bi se obroci trebali konzumirati polako i pažljivo, budući da se sitost javlja 20 minuta nakon početka obroka, da treba dobro sažvakati hranu, te hranu držati u ustima kako bi se svi okusi osjetili, i da je važno jesti mirno, bez smetnji i drugih distrakcija, a sve kako bi se prepoznala sitost i smanjio količinski unos hrane (Durrer Schutz i sur., 2019; Štimac i sur., 2022). Individualnim pristupom utvrđuju se i ciljevi liječenja te izbor terapije, ukoliko je potreban, a što ovisi o spolu, životnoj dobi, trajanju bolesti i komorbiditetima, genetici, bihevioralnim čimbenicima, psihosocijalnim i socijalnoekonomskim okolnostima, te očekivanom trajanju života (Štimac i sur., 2022). Razgovor s nutricionistom, osim što ima informativnu i edukativnu vrijednost, trebao bi biti i motivirajući, budući da promjena prehrambenih i životnih navika iziskuje disciplinu i odricanje, a liječenje pretilosti je cjeloživotno (Jelčić i sur., 2010; Durrer Schutz i sur., 2019; Pajtak i sur., 2020). Motivacijski

razgovor jača suradnju s pacijentom i osigurava prilagodbu u životnim navikama pacijenta (Štimac i sur., 2022).

2.2.2. Tjelesna aktivnost

Tjelesna aktivnost važan je segment u redukciji tjelesne mase. Preporuka je da osobe s pretilošću imaju tjedno oko 300 minuta aktivnosti umjerenog intenziteta ili 150 minuta intenzivnije aktivnosti, te tri puta tjedno vježbe snage (Yumuk i sur., 2015; Durrer Schutz i sur., 2019; Štimac i sur., 2022). Aerobne aktivnosti i vježbe snage imaju višestruke koristi za bolesnike s pretilošću i smanjuju rizik od komplikacija pretilosti (Yumuk i sur., 2015). Povećana tjelesna aktivnost mobilizira i smanjuje visceralnu mast, povećava ili održava mišićnu masu, ublažava smanjenje bazalnog metabolizma zbog gubitka tjelesne mase, smanjuje krvni tlak, povoljno utječe na inzulinsku osjetljivost i lipidni status, dugoročno pozitivno utječe na održavanje tjelesne mase i samopouzdanje te smanjuje anksioznost i depresiju (Yumuk i sur., 2015; Štimac i sur., 2022). Osobe s pretilošću s visokom kardiorespiratornom kondicijom imaju manji rizik od smrtnosti svih etiologija u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase koji žive sjedilačkim načinom života (Štimac i sur., 2022). Prije napornih vježbi osobe s pretilošću bi trebale napraviti kardiološku procjenu, dok umjereno opterećenje to ne zahtijeva, osim u osoba s komorbiditetima (Štimac i sur., 2022). Hodanje je najbolja tjelesna aktivnost bez obzira na ITM jer ne zahtijeva specifičnu opremu, besplatna je, te se brzina i intenzitet lako mogu prilagoditi (Durrer Schutz i sur., 2019).

2.2.3. Liječenje farmakoterapijom

U liječenju pretilosti moguće je primijeniti farmakoterapiju kao dodatak dijeti sa smanjenim unosom energije i povećanom tjelesnom aktivnošću. Indikacije za farmakoterapiju su: $ITM \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$ ili $ITM \geq 27 \text{ kg m}^{-2}$ uz druge komorbiditete, smanjena pokretljivost pacijenta i neuspjeh u ranijim liječenjima, te ukoliko promjena životnih navika nije dala zadovoljavajuće rezultate (Jelčić i sur., 2010; Yumuk i sur., 2015; Pajtak i sur., 2020). Lijekovi se mogu primijeniti i za održavanje tjelesne mase postignute promjenama u životnim navikama. Ne preporuča se primjena lijekova za liječenje pretilosti koji za to nisu registrirani (Wharton i sur., 2020).

Prema Registru lijekova iz 2022. godine, u Hrvatskoj su registrirana 2 lijeka za liječenje pretilosti (anoreksika), naltrekson+bupropion i orlistat. Naltrekson+bupropion je kombinacija dva lijeka s centralnim djelovanjem koji suprimiraju apetit u arkuatnoj jezgri hipotalamusa. Liječenje se prekida ukoliko pacijent nakon 16 tjedna nije izgubio barem 5 % tjelesne mase

izmjerene na početku terapije (HALMED, 2007a). Orlistat djeluje periferno inhibiranjem pankreatične lipaze i onemogućuje razgradnju lipida u crijevima, te time njihovu apsorpciju. Može uzrokovati manjak vitamina topljivih u mastima, stoga se isti moraju nadoknaditi preparatima multivitamina (Yumuk i sur., 2015; Pajtak i sur., 2020). Liječenje orlistatom se prekida ukoliko pacijent nakon 12 tjedana nije izgubio barem 5 % tjelesne mase izmjerene na početku terapije (HALMED, 2007b). Osim anoreksika, u liječenju pretilosti koriste se i dva lijeka koji se nalaze u skupini lijekova za liječenje šećerne bolesti, ali su indicirani i za liječenje pretilosti, a to su liraglutid i semaglutid. Oba su lijeka analozi glukagonu sličnog peptida-1 (GLP-1) koji stimulira lučenje inzulina, ali i odgađa pražnjenje želuca, smanjuje apetit pojačavanjem osjećaja punoće i sitosti, što dovodi do smanjenja unosa hrane te dugoročno do smanjenja tjelesne mase (HALMED, 2007c; HALMED, 2007d). Terapija za liraglutid (3 mg) se prekida ukoliko nema smanjenja tjelesne mase većeg od 5 % nakon 12 tjedana liječenja (Pajtak i sur., 2020). Lijek semaglutid u dozi od 2,4 mg je odobren za liječenje pretilosti od strane Europske komisije 06.01.2022., u ovom trenutku lijek još nije dostupan u Hrvatskoj (HALMED, 2007c; HALMED, 2007d).

2.2.4. Kirurško liječenje

Kao zadnja opcija i najučinkovitija metoda liječenja pretilosti koristi se kirurško liječenje (barijatrijska kirurgija), ukoliko se nijedna od navedenih metoda ne pokaže uspješnom, a koristi se najčešće u pacijenata s ITM > 40 kg m⁻² starosti od 18 do 60 godina ili u pacijenata s ITM između 35 i 39,9 kg m⁻² s komorbiditetima (Jelčić i sur., 2010; Yumuk i sur., 2015; Štimac i sur., 2022). Barijatrijska kirurgija obuhvaća niz različitih kirurških postupaka koji se koriste u liječenju pretilosti. Operacijom se smanjuje volumen želuca i/ili premošćuje dio crijeva kako bi se samanjila količina hrane koja se može apsorbirati. Najčešće korištena operacija je *sleeve* reskcija želuca kojom se uklanja dio želuca i time smanjuje volumen istog (Rogers, 2020). Stopa smrtnosti povezana s barijatrijskom kirurgijom iznosi od 0,1 % do 2,0 % te ovisi o iskustvu kirurga, dobi osobe, spolu, stupnju pretilosti i komorbiditetima (Štimac i sur., 2022). Prije kirurškog liječenja uputno je privremeno stavljanje intragastičkog balona (u trajanju do 6 mjeseci) kao privremene pomoćne metode (Jelčić i sur., 2010). Postavljanje intragastičkog balona najčešća je endoskopska metoda liječenja, a koristi se za smanjenje obujma želuca (Štimac i sur., 2022). Nakon kirurškog liječenja pretilosti preporuka je da se osigura odgovarajuća prehrana, te uzimaju dodatci prehrani u obliku vitamina i mineralnih tvari pod nadzorom nutricionista (Wharton i sur., 2020).

2.2.5. Očekivani ishodi liječenja pretilosti

Postoje značajne razlike u gubitku tjelesne mase među pojedincima koje ovise, uz uloženi individualni napor, i o biološkim te psihološkim čimbenicima. Na primjer, kod pacijenata s depresijom i anksioznosti na gubitak tjelesne mase može utjecati terapija za navedene bolesti, ili emocionalno prejedanje, ili fizička ograničenja, i kronična bol koja onemogućuju pacijentima bavljenje tjelesnim aktivnostima koje su sastavni dio terapije pretilosti i doprinose gubitku tjelesne mase (Canning i sur., 2015; Štimac i sur., 2022). Uspješno liječenje pretilosti, bez obzira na primijenjenu metodu dovodi do gubitka tjelesne mase i smanjenja komorbiditeta. Zdravstveni doprinos gubitka tjelesne mase dokazan je već kod gubitka od 2,5 % tjelesne mase, dok se gubitak od 5 % smatra klinički značajnim (Ryan i Yockey, 2017a). U smjernicama za liječenje pretilosti odraslih, EASO-a definirani su očekivani ishodi u smanjenju komorbiditeta s obzirom na udio gubitaka tjelesne mase (tablica 7) (Durrer Schutz i sur., 2019).

Tablica 7. Očekivani ishod gubitka tjelesne mase u pojedinim komorbiditetima u osoba s pretilošću, prilagođeno prema Durrer Schutz i sur. (2019)

Dijagnoza	Gubitak TM	Očekivani ishod
Metabolički sindrom	10 %	Prevenција šećerne bolesti tipa 2
Šećerna bolest tipa 2	5 – 15 %	Smanjenje HbA1c; smanjenje antidijetika; remisija bolesti (ukoliko šećerna bolest traje kraće vrijeme)
Dislipidemija	5 – 15 %	Smanjenje triglicerida i LDL-kolesterola, povećanje HDL-kolesterola
Hipertenzija	5 – 15 %	Smanjenje krvnog tlaka; smanjenje antihipertenziva
NAFLD	10 – 40 %	Smanjenje intrahepatocelularnih lipida i upale
Policistični jajnici	5 – 15 %	Ovulacija; smanjenje hirzutizma; smanjenje razine androgena; povećanje inzulinske osjetljivosti
Smanjenje apneje u snu	7 – 11 %	Smanjenje indeksa apneja/hipopneja
Astma	7 – 8 %	Poboljšanje u forsiranom izdisajnom volumenu 1
GERB	≥ 10 %	Smanjeni simptomi

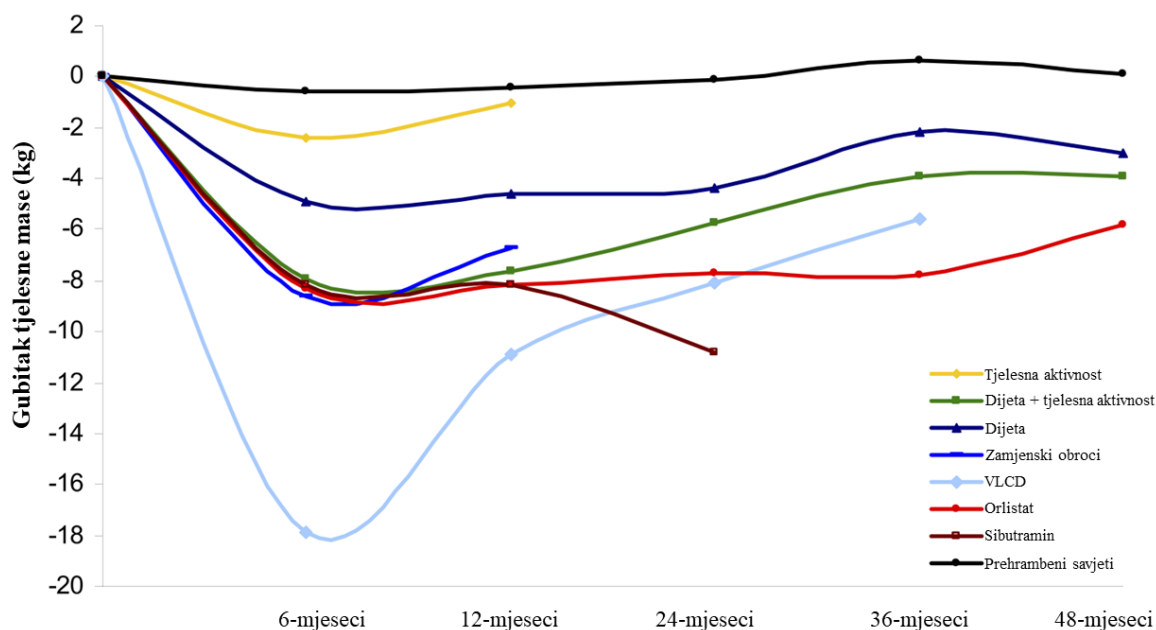
TM – tjelesna masa; NAFLD – nealkoholna bolest masne jetre (eng. *Non-alcoholic fatty liver disease*); GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

2.2.6. Dijeta izrazito niskog sadržaja energije

Smanjenje unosa energije sastavni je dio liječenja prekomjerne tjelesne mase i pretilosti. Preporuka je da se dijete postigne dnevni energijski deficit od 600 kcal, no postoje dijete koje se koriste u kliničkoj praksi kojima se postiže značajno veći dnevni energijski deficit. Primjeri takvih dijeta su: dijete niskog sadržaja energije (engl. *low-calorie diet*, LCD) s dnevnim

energijskim unosom od 800 do 1200 kcal i dijete izrazito niskog sadržaja energije (engl. *very-low-calorie diet*, VLCD) s dnevnim energijskim unosom manjim od 800 kcal (Yumuk i sur., 2015).

VLCD se može koristiti u liječenju odraslih s pretilošću $ITM \geq 30 \text{ kg m}^{-2}$ kod kojih promjena u životnim navikama nije dovela do uspješne redukcije tjelesne mase, te osoba s $ITM > 27 \text{ kg m}^{-2}$ s pridruženim komorbiditetima poput dijabetesa tipa 2 (Sumithran i Proietto, 2015). Dijeta bi se trebala primjenjivati kao sastavni dio programa liječenja pretilosti pod nadzorom liječnika odgovarajuće specijalizacije u kraćem vremenskom periodu (Yumuk i sur., 2015). Osim što u kratkom vremenskom periodu dovodi do brzog gubitka tjelesne mase i mase masnog tkiva, dovodi i do niza značajnih metaboličkih promjena koje rezultiraju smanjenjem komorbiditeta. Sistemskim pregledom i meta analizom koja je uključivala 80 radova, Franz i sur. (2007) su pokazali izrazito brz gubitak tjelesne mase primjenom VLCD u periodu od 6 mjeseci u usporedbi s drugim intervencijama koje su uključivale: samo savjetovanje, tjelesnu aktivnost, redukcijsku dijetu i tjelesnu aktivnost, redukcijsku dijetu, zamjenske obroke, VLCD, te upotrebu dva lijeka za liječenje pretilosti (slika 5) (Franz i sur., 2007).



Slika 5. Prosječni gubitak tjelesne mase nakon minimalno godinu dana primjene različitih intervencija, prilagođeno prema Franz i sur. (2007)

U osoba s pretilošću s dijabetesom tipa 2, VLCD snižava vrijednosti glukoze, poboljšava inzulinsku osjetljivost, dovodi do normalizacije funkcije β stanica gušterače, što smanjuje potrebu za liječenjem dijabetesa tipa 2 lijekovima, a to može dovesti i do remisije dijabetesa tipa 2. VLCD utječe i na poboljšanje lipidnog statusa snižavanjem vrijednosti

triglicerida, kolesterola i LDL-kolesterola (Škrha i sur., 2005; Mraz i sur., 2011; Sumithran i Proietto, 2015; Román-Pintos i sur., 2018). VLCD pozitivno utječe na smanjenje kronične upale u osoba s pretilošću s dijabetesom tipa 2 budući da VLCD mijenja ekspresiju citokina iz makrofaga infiltriranih u masno tkivo (Mraz i sur., 2011). Škrha i sur. (2005) su dokazali da dolazi do smanjenja oksidacijskog stresa primjenom VLCD u svega tjedan dana (Škrha i sur., 2005).

VLCD dovodi do nastanka ketonskih tijela i do smanjenog lučenja inzulina što za posljedicu ima supresiju gladi kod pacijenata s pretilošću i dovodi do bolje suradnje pacijenata za vrijeme liječenja. Takav način liječenja pretilosti je jednostavan, jeftin i učinkovit, a značajni gubitak kilograma u relativno kratkom vremenskom periodu motivira pacijente na ustrajnost u održavanju dijete, ali i zahtijeva praćenje pacijenata zbog kontrole komorbiditeta i zbog mogućih komplikacija (disbalansa elektrolita, srčane aritmije, hiperuricemija, žučnih kamenaca, smanjenja mineralne gustoće kostiju, intoleranciju na hladnoću, grčeve, suhu kožu, gubitak kose, konstipaciju, vrtoglavicu, glavobolju i slabost, promjena u ponašanju i raspoloženju) koje nastaju naglim i značajnim gubitkom tjelesne mase (Tsai i Wadden, 2006; Sumithran i Proietto, 2015; Panuganti KK, Nguyen M, 2018; Koliaki i sur., 2018).

Zbog mogućih komplikacija, VLCD se ne preporuča osobama sa srčanim aritmijama, disbalansom elektrolita, cerebrovaskularnim bolestima, porfirijom, metaboličkim bolestima, sistemskim infekcijama, osobama s aktualnim tumorskim oboljenjima ili značajnim renalnim i jetrenim bolestima. VLCD doprinosi značajnom gubitku tjelesne mase te time može dovesti do smanjenja mineralne gustoće kostiju što može dovesti do prijeloma istih. Značajna restrikcija proteina i energije može dovesti do različitih kardijalnih promjena (atrofija miokarda, prolongacija QT-intervalu, ventrikularna aritmija) i smrti. (Sumithran i Proietto, 2015). Zbog energijskog deficita, ali i zbog mogućeg deficita mikronutrijenata, VLCD je kontraindiciran u osoba s povećanim nutritivnim potrebama poput trudnica, dojilja, djece i adolescenata, dok se u osoba s dijabetesom tipa 1 i starijih od 65 godina preporuča isključivo ako je korist primjene same dijete veća od rizika koje sama dijeta nosi (Aggarwal i sur., 2012; Sumithran i Proietto, 2015).

Primjena VLCD dovodi do velikog gubitka tjelesne mase u kratkom roku, ali i do velikog i značajnog porasta iste u kratkom roku (slika 5) (Tsai i Wadden, 2006; Franz i sur., 2007). Psihički umor zbog pridržavanja rigorozne dijete, ali i disbalans u hormonima koji reguliraju apetit i potrošnju energije razlozi su neuspjeha VLCD (Tsai i Wadden, 2006). Jedan od glavnih ciljeva liječenja pretilosti je prevencija vraćanja izgubljene tjelesne mase, bez obzira na način liječenja (Durrer Schutz i sur., 2019). Dugoročno održavanje smanjene tjelesne mase

je vrlo izazovno zbog kompenzacijskih mehanizama koji potiču unos hrane povećanjem gladi (Štimac i sur., 2022). Stoga u održavanju tjelesne mase/daljnem gubitku iste, važnu ulogu ima nutricionist prilagođavanjem dijete individualnim prehrabnim preferencijama osobe što povećava vjerojatnost dugoročnog uspjeha budući da je prehrana temelj kontrole tjelesne mase (Yumuk i sur., 2015; Štimac i sur., 2022).

2.2.7. Standardna redukcijska dijeta

Ciljevi liječenja pretilosti moraju biti realni, ostvarivi i progresivni (Durrer Schutz i sur., 2019). U tu svrhu se primjenjuju dijete kojima je cilj prosječni gubitak otprilike 0,5 kg tjedno što se postiže dnevnim energijskim deficitom od 600 kcal. Dijeta se kreira na način da se od procijenjenih energijskih potreba osobe oduzme 600 kcal tj. između 15 – 25 % od procijenjenih energetske potreba (Yumuk i sur., 2015). Dinamika gubitka kilograma od otprilike 0,5 kg tjedno prisutna je u prvih nekoliko mjeseci nakon čega brzina gubitka tjelesne mase pada zbog fiziološke adaptacije organizma (Koliaki i sur., 2018). Nutritivno uravnotežena hipokalorijska dijeta rezultira klinički značajnim gubitkom kilograma bez obzira na sastav makronutrijenata od kojih je ista sastavljena. Preporuka je da se smanji hrana bogata energijom i mastima pogotovo ona bogata zasićenim masnim kiselinama, da se koriste mliječni proizvodi i meso sa smanjenim udjelom masti, poveća unos voća, povrća, grahorica, žitarica, leguminoza, riba i morskih plodova, vlakana, smanji unos rafiniranih ugljikohidrata, šećera te zaslađenih i alkoholnih napitaka (Yumuk i sur., 2015; Durrer Schutz i sur., 2019). Hipokalorijska dijeta koja zadovoljava navedene preporuke i koja se u tu svrhu može se primjenjivati je i standardna redukcijska dijeta (SRD). Za bolničko liječenje preuhranjenih i bolesnika s pretilošću u Republici Hrvatskoj primjenjuje se redukcija dijeta koja je definirana Odlukom o standardu prehrane bolesnika u bolnicama (NN 59/2015). Karakteristike dijete prema navedenoj Odluci su da sadrži između 1200 – 1700 kcal dnevno te da u ukupnom energijskom unosu proteini čine 20 – 25 %, ugljikohidrati 50 – 55 %, te masti ≤ 30 % energije. Preporuka je unos lagane hrane koja se obrađuje pirjanjem, kuhanjem na pari ili pečenjem bez dodatka masnoće. Kod izbora namirnica treba se voditi računa o njihovoj kvaliteti (visokokvalitetan izvor proteina i ugljikohidrata). Preporuka je smanjiti unos zasićenih masnih kiselina životinjskog porijekla i jednostavnih ugljikohidrata, te povećati unos složenih ugljikohidrata iz voća, povrća i mahunarki. Masa konzumiranog voća i povrća u danu bi trebala biti veća od 500 g. Dijeta treba biti kreirana na način da je povećan unos vlakana iz voća, povrća i cjelovitih žitarica, čime se ujedno ostvaruje unos različitih esencijalnih mikronutrijenata, ali se i povećava sitost (Koliaki i sur., 2018). Unos tekućina iz nezaslađenih čajeva, vode, voćnih sokova bez dodanih šećera

trebao bi biti adekvatan. U definiranim okvirima SRD nužno je prilagoditi dijetu individualnim prehrambenim preferencijama osobe budući da se zbog relativno male dinamike gubitka kilograma djeteta koriste u dužem vremenskom roku, a dijeta prilagođena individualnim prehrambenim preferencijama osobe povećava vjerojatnost dugoročnog pridržavanja djeteta, a time i uspjeha u liječenju pretilosti (Yumuk i sur., 2015; Koliaki i sur., 2018). Velika prednost SRD je da je ista kreirana da bude nutritivno uravnotežena i time nema nikakvih negativnih posljedica dugoročne primjene na pojedinca (NICE, 2020).

2.3. Metode mjerenja oštećenja DNA

2.3.1 Komet test

Prvi rad u kojem se koristi elektroforeza DNA u agaroznom gelu za detekciju oštećenja DNA objavili su Ostling and Johanson 1984. godine (Ostling i Johanson, 1984), a 1988. godine Singh i sur. (1988) korištenjem alkalnih uvjeta povećali su točnost i reproducibilnost, te su time unaprijedili tehniku (Singh i sur., 1988). Naziv „komet“ su prvi puta 1990. godine upotrijebili Olive i sur. (1990) zbog karakterističnog izgleda oštećene DNA u agaroznom gelu, te su za mjerenje oštećenja DNA koristili repni moment (umnožak dužine repa i postotka intenziteta fluorescencije u repu) (Olive i Banáth, 2006). Korištenje repnog momenta DNA dodatno je unaprijedilo metodu koja je do tada koristila dužinu repa kao mjeru oštećenja DNA, ali i uvelo računalne programe u analizu mikroskopskih slikovnih podataka. Uz repni moment i dužinu repa koristi se još i % DNA u repu kao deskriptor komet testa koji je možda najlakše razumjeti (Møller, 2018). Od otkrića metode broj istraživanja koja koriste komet test godinama se povećavao te je komet test postao danas jedan od najčešće korištenih testova za mjerenje oštećenja DNA u pojedinačnim eukariotskim stanicama te za mjerenje DNA popravka (Langie i sur., 2015; Møller, 2018; Milić i sur., 2019; Azqueta i sur., 2019). Test je jednostavan, jeftin, brz, zahtijeva mali broj stanica koji omogućavaju statističku obradu, za analizu se mogu koristiti lako dostupne stanice poput leukocita i epitelnih stanica, ali i stanice iz gotovo iz svih tkiva, stanice ne moraju imati sposobnost diobe, sam test ima visoku osjetljivost detekcije niskih razina oštećenja DNA (od oko 50 lomova DNA po stanici), a upotrebom specifičnih enzima omogućena je i detekcija specifičnih oštećenja DNA (npr. DNA oštećena ROS-om) i mogućnost određivanja oštećenja DNA iz svježih i smrznutih uzoraka što su ujedno razlozi popularnosti i velike raširenosti primjene komet testa za mjerenje DNA oštećenja (Olive i Banáth, 2006; Azqueta i sur., 2013; Sreelatha i sur., 2015; Langie i sur., 2015; Milić i sur., 2019; Azqueta i sur., 2019; Cordelli i sur., 2021).

Od nastanka metode 80-tih godina prošlog stoljeća do danas nastalo je niz različitih verzija komet testa, no sve se one u konačnici baziraju na istim koracima za određivanje oštećenja DNA (Olive i Banáth, 2006; Azqueta i sur., 2019). U svrhu smanjenja međulaboratorijske varijabilnosti u rezultatima i njihove međusobne usporedivosti, objavljeno je niz preporuka za izradu alkalnog komet testa i enzimskih verzija alkalnog komet testa i njihovog izvještavanja (Azqueta i sur., 2019; Møller i sur., 2020). Princip elektroforeze je da se molekule razdvajaju u električnom polju temeljem svog električkog naboja i veličine. Primjenom električnog polja manje i čestice s većim brojem električkih naboja putuju dalje.

DNA molekula ima električki negativno nabijene krajeve, a njezini fragmenti nastali oštećenjem su manji od intaktne DNA s identičnim električkim nabojem na krajevima. Elektroforezom fragmenti DNA se razdvajaju prema veličini i naboju pri čemu manji fragmenti putuju brže prema pozitivno nabijenoj anodi od većih fragmenata DNA te nastaje karakterističan izgled kometa. Ukoliko je DNA intaktna zbog zanemarivog naboja, ona ostaje kompaktna na mjestu u agaroznom gelu kružnog a ne kometnog oblika (Olive i Banáth, 2006).

Prednost alkalnog komet testa je što omogućuje otkrivanje oštećenih stanica unutar veće populacije stanica koje ne pokazuju nužno znakove oštećenja, te se smatra „indikatorskim testom“ budući da detektira primarna DNA oštećenja koja mogu biti potencijalno mutagena (Kopjar i sur., 2010b; Azqueta i sur., 2013). Alkalnim komet testom moguće je detektirati niz različitih primarnih DNA oštećenja poput jednostrukih i dvostrukih lomova DNA, te apurinskih i apirimidinskih dijelova DNA na čijim mjestima u lužnatim uvjetima nastaju lomovi DNA (Kopjar i sur., 2010b; Ladeira i Smajdova, 2017; Cordelli i sur., 2021). Većina uzročnika oštećenja DNA ne uzrokuje izravno lomove DNA i gubitak nukleinskih baza, već stvara adukte s DNA i promjene na nukleinskim bazama u obliku oksidacije, alkilacije, metilacije, nitracije, deaminacije DNA baza te ukriženo povezivanje lanaca DNA (Azqueta i sur., 2013; Włodarczyk i Nowicka, 2019). Navedena oštećenja najčešće nastaju kao posljedica slobodnih radikala (oksidacijskog stresa) (slika 6) (Cordelli i sur., 2021). Karakteristika alkalnog komet testa je da uz lomove DNA i mjesta bez nukleinskih baza detektira i sva oštećenja nastala na DNA koja su prepoznata i odstranjena različitim endonukleazama *in vivo*, dakle mjesta nepotpunog popravka DNA nastalih isijecanjem nukleinskih baza (Kopjar i sur., 2010b; Cordelli i sur., 2021). Alkalni komet test detektira ukupna oštećenja te njime nije moguće pouzdano utvrditi uzrok i tip oštećenja DNA te se iz tog razloga koriste modifikacije alkalnog komet testa koje omogućuju otkrivanje specifični(ji)h oštećenja DNA molekule (Kopjar i sur., 2010b). Najčešće korištena modifikacija uključuje korištenje enzima formamidopirimidin DNA-glikozilaza (FPG) koja otkriva i uklanja oksidacijski izmijenjene purinske baze: 8-okso-7,8-dihidrogvanin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin i 4,6-diamino-5-formamidopirimidin, te druge purinske baze s otvorenim prstenovima (Kopjar i sur., 2010b; Cordelli i sur., 2021). Budući da enzim formamidopirimidin DNA-glikozilaza nije u potpunosti specifičan, njime se mogu detektirati i ukloniti adukti na DNA, ali i apurinska i apirimidinska mjesta te alkilacija guanina (Kopjar i sur., 2010b; Azqueta i sur., 2013). DNA oštećenja ne moraju nužno nastati kao izravna posljedica genotoksičnih učinaka već mogu nastati i kao posljedica procesa apoptoze i nekroze stanica koje nastaju oštećenjem mitohondrija ili stanične membrane (Donmez-Altuntas i sur., 2014)

Tip oštećenja	Jednolančani lom DNA	Abazična mjesta	Krivo sparene baze	Oksidirana baza	Metilirana baza	Dvolančani lom DNA
Procjenjena učestalosti (stanica/dan)	40 000 – 70 000	500 / 10 000	192	450 – 6 300	600	25
Uzrok oštećenja	ROS, ionizirajuće zračenje	Alkilirajući agensi	Alkilirajući i oksidirajući agensi	ROS, ionizirajuće zračenje	Alkilirajući agensi	Ionizirajuće zračenje

Slika 6. Prikaz DNA oštećenja s najčešćim uzrocima istih (Cordelli i sur., 2021)

Zbog svega navedenog komet test je postao jedna od standardnih metoda za određivanje oštećenja DNA sa širokom primjenom kao što je biološki nadzor (engl. *biomonitoring*), kliničke studije, molekularna epidemiologija, ekotoksikologija, do znanstvenih istraživanja utjecaja različitih bolesti, dijeta, hrane, te komponenti hrane na (oksidacijsko) oštećenje DNA (Langie i sur., 2015; Ladeira i Smajdova, 2017; Włodarczyk i sur., 2018). U svrhu dobivanje potpunije slike o prirodi oštećenja DNA primjenjuju se kombinacije više metoda (Kopjar i sur., 2010b).

2.3.2. Mikronukleus *cytome* test

Mikronukleusi (MN) su male, samostalne, okrugle kromatinske strukture odvojene nuklearnom membranom vidljive u citoplazmi interfaznih stanica koje nastaju nakon diobe/kariokineze (Ocde, 2014; Sommer i sur., 2020; Sioen i sur., 2020; Fenech, 2020b). Nastaju kao posljedica loma dijela kromosoma ili gubitka cijelog kromosoma, i taj gubitak čini mikronukleus, a samim gubitkom genomske materijala, stanica postaje genomske nestabilna. Veličina MN je od 1/16 do 1/3 promjera jezgre te su identičnog obojenja kao jezgra (tek ponekad nešto intenzivnije boje) i nikada ne reflektiraju svjetlost (Fenech, 2007). Upotrebom limfocita iz periferne krvi koji se mogu *ex vivo* i *in vitro* stimulirati na diobu, omogućena je analiza MN iz lako dostupnih uzoraka te je time navedeni test postao standardan i jedan od najčešće upotrebljivanih u genotoksičnim istraživanjima (Fenech, 2020b). Dodatna prednost upotrebe limfocita je da cirkuliraju cijelim tijelom te se na njima može manifestirati potencijalan genotoksičan utjecaj iz svih tkiva u tijelu (Ladeira i Smajdova, 2017).

Postoji nekoliko različitih testova za analizu frekvencija MN koji se međusobno razlikuju u korištenim protokolima (npr. upotreba citohalazina B), svrsi ispitivanja (npr. testiranje genotoksičnosti, životnih navika poput ispijanja alkohola i pušenja) i korištenim stanicama (npr. limfociti, nezreli eritrociti, bukalne stanice, stanice glodavaca, stanične linije) (Sommer i sur., 2020). Najčešće korištena metoda za analizu frekvencija MN u ljudi je metoda

blokiranja citokineze upotrebom citohalazina B (CBMN test, engl. *Cytokinesis Block Micronucleus Cytome Assay*) koja je zahvaljujući projektu HUMN (engl. *HUMAN MicroNucleus*) ujedno standardizirana te su izrađene smjernice Europske agencije za lijekove (EMA, engl. *European Medicines Agency*) ICHS2(R1) i Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD, engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) TG 487 za *in vitro* testiranja genotoksičnosti (Hayashi, 2016; Sommer i sur., 2020). Riječ „*cytome*“ u nazivu testa se odnosi na činjenicu da se svaka stanica analizira i broji prema svojoj vijabilnosti (apoptične i nekrotične stanice), sposobnosti dijeljenja (mononuklearne, binuklearne i multinuklearne), te oštećenju kromosoma/DNA (MN, nuklearni pupovi i nukleoplazmatski mostovi) i time ovaj sveobuhvatni test omogućuje mjerenje citotoksičnih (apoptoza i nekroza), citostatičnih učinaka (mononuklearne, binuklearne i multinuklearne) i različitih trajnih oštećenja DNA (MN, nuklearni pupovi i nukleoplazmatski mostovi) (Fenech, 2007). Dodatna prednost testa je što je brži i zahtijeva manje educirano osoblje za analizu u usporedbi s ostalim citogenetskim testovima (Sioen i sur., 2020). Blokiranjem citokineze uklanja se najznačajnija varijabla nepouzdanosti testa (stanice bez mogućnosti diobe koje ne ekspimiraju MN), time se povećava točnost, pouzdanost i reproducibilnost metode jer se frekvencija MN broji isključivo u binuklearnim stanicama (stanicama koje nastaju nakon kariogeneze i bez citokineze) budući da najveći dio MN *in vitro* nastaje nakon diobe jezgre (Fenech, 2007; Fenech, 2020b). Dodatna prednost blokiranja citokineze je očuvanje nukleoplazmatskih mostova koji bi bili pokidani diobom stanica i razdvajanjem stanica kćeri (Fenech, 2007).

Nukleoplazmatski mostovi (engl. *nucleoplasmic bridges*, NPB) nastaju od dicentričnih kromosoma nastalih fuzijom krajeva (kratkih) telomera ili grešaka u obnovi lomova lanaca DNA (Fenech, 2020b). Greške u obnovi dvostrukih lomova lanaca DNA najčešće rezultiraju nastankom dicentričnih kromosoma i acentričnih kromosoma što se u citoplazmi manifestira kao NPB i kao MN (Fenech, 2007).

Nastanak MN iz acentričnih kromosoma rezultat je djelovanja klastogena (npr. adukata na DNA, unakrsnog povezivanja DNA), dok MN iz cijelih kromosoma nastaje kao posljedica djelovanja aneugena (uzrokuju dsifunkciju centromera, kinetohora i sl.) (Ladeira i Smajdova, 2017; Sommer i sur., 2020). Uz navedeni proces MN nastaje kao posljedica hipometilacije DNA što dovodi do nedovoljne kondenzacije heterokromatina kromosoma 1, 9 i 16 i njihovog specifičnog gubitka u humanim limfocitima *in vitro*. I druge epigenetske promjene mogu dovesti do formiranja MN poput hipermetilacije gena APC, BUBR1 i hCDC4 odgovornih za provjeru diobe. Utišavanje ili gubitak funkcije gena odgovornih za obnovu DNA poput ATM, FANC, BRCA1 i BRCA2 dovode do porasta učestalosti MN (Fenech, 2007).

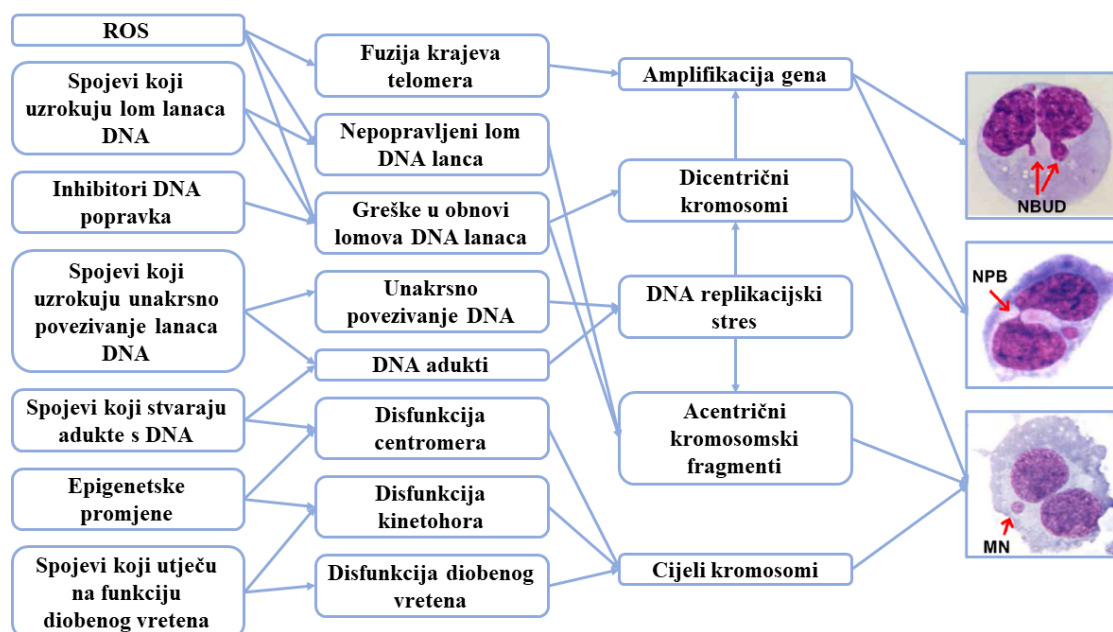
Nuklearni pupovi (engl. *nuclear buds*, NBUD) su također indikatori nestabilnosti kromosoma/DNA koji nastaju uklanjanjem amplificirane DNA iz jezgre stanice što je najčešće posljedica dvostrukog loma DNA te nedostatka folne kiseline (Fenech, 2007; Mukherjee i Storici, 2012; Fenech, 2020b). NBUD morfološki su vrlo slični mikronuleusima. Dok su MN samostalne kromatinske strukture u citoplazmi stanice, NBUD su vezani za jezgru stanice nukleoplazmatskim materijalom različitih širina. NBUD mogu biti preteča nastanka MN (slika 7) (Fenech, 2007).

Glavni uzroci nastanka oštećenja DNA i formiranja navedenih markera oštećenja DNA su: 1) oštećenje DNA na mjestu koje je odgovorno za sintezu proteina koji sudjeluju u mitozu i kontroli staničnog ciklusa, 2) oštećenje DNA na mjestu koje je odgovorno za sintezu enzima koji sudjeluju u popravku DNA, 3) pretjerana izloženost egzogenim (različite kemijske tvari) i endogenim (npr. oksidacijski stres) genotoksinima, 4) ionizirajuće zračenje, 5) deficit u esencijalnim mikronutrijentima koji sudjeluju u replikaciji i obnovi DNA. Navedeni uzorci imaju aditivni i/ili sinergijski učinak na formiranje markera oštećenja DNA (Fenech, 2020b).

Kopjar i sur. (2016) su ustanovili normalne i granične vrijednosti mikronukleus testa na limfocitima periferne krvi u ispitanika opće populacije oba spola Republike Hrvatske te su utvrdili da je prosječna frekvencija MN $6,90 \pm 3,32$ u 1000 binuklearnih stanica s medijanom od 7 MN. Gornja granična vrijednost iznosi 12,5 MN na 1000 binuklearnih stanica. Autori su također utvrdili da MN frekvencija raste s dobi i pušenjem te su zabilježili više vrijednosti u žena (Kopjar i sur., 2010a). Na nastanak mikronukleusa značajno utječe i prehrana i životne navike, ali i različite bolesti poput dijabetesa, sindroma policističnih jajnika prekomjerne tjelesne mase i pretilosti (Kopjar i sur., 2010a; Zaguia i sur., 2020; Franzke i sur., 2020). Očekivane vrijednosti za vrijednosti citostatičnih, citotoksičnih i DNA oštećenja su sljedeća:

- Indeks proliferacije: 1,3 – 2,2
- Nekrotične stanice: 0 – 9 %
- Apoptotične stanice: 0 – 7 %
- Stanice s NPM: 0 – 10
- Stanice s NP: 0 – 5 (Fenech, 2007).

Povećana frekvencija MN povezana je s većim rizikom od nastanka tumora te se koristi i kao prediktivni test za nastanak istih, dok *in vivo* lom membrane MN oslobađa DNA koja postaje dostupna DNA-zama iz citoplazme koje induciraju imunološku reakciju te time i porast oksidacijskog stresa čime se zatvara krug koji uključuje nastanak MN, NPM, NP, mutacije, nastanak upale i oksidacijskog stresa (Zaguia i sur., 2020; Sommer i sur., 2020; Fenech, 2020b).



Slika 7. Primjeri mehanizama koje dovode nastanka mikronukleusa (MN) i ostalih anomalija jezgre kao što su nukleoplazmatski most (NPB) ili nuklearni pup (NBUD) (Fenech, 2020b)

3. Ciljevi i hipoteze istraživanja

Temeljni cilj istraživanja je ispitati učinak VLCD u odnosu na SRD od 1500 kcal na poboljšanje stabilnosti genoma mjerenjem primarnih, oksidacijskih i trajnih oštećenja DNA primjenom komet, FPG komet i mikronukleus testa.

Na temelju navedenih ciljeva postavljene su hipoteze.

H1: VLCD će u odnosu na standardnu redukciju dijetu od 1500 kcal uzrokovati značajnije promjene i veću stabilnost genoma (DNA).

H2: VLCD će uzrokovati značajno smanjenje antropometrijskih i biokemijskih parametara povezanih s pretilosti posebice tjelesne mase, ITM-a, triglicerida, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, ukupnog kolesterola, glukoze i inzulina u odnosu na standardnu redukciju dijetu od 1500 kcal.

H3: VLCD će u odnosu na standardnu redukciju dijetu od 1500 kcal uzrokovati značajnije promjene na razine leukocita i visokoosjetljivog C-reaktivnog proteina (*engl. high-sensitivity C-reactive protein*, hsCRP).

4. Ispitanici i metode

4.1. Dizajn studije

Istraživanje je provedeno u 3 faze. Tijek istraživanja prikazan je na slici 8.

U prvom dijelu istraživanja izračunat je korištenjem statističkog programa (Brant, 2019), statističke značajnosti ($\alpha = 5\%$), snage studije ($\beta = 0,2$) i veličine učinka iz rada autora Soares i sur. (2016) minimalni broj ispitanika koji moraju završiti ispitivanje kako bi se potvrdila hipoteza istraživanja, osmišljen je 21 jelovnik redukcije dijete, kreirani su obrasci za suglasnost za sudjelovanje u istraživanju, upitnici o učestalosti unosa hrane i pića (prilog 1.) te upitnik o životnim navikama (prilog 2), a tražena su i odobrenja triju etičkih povjerenstava.

Cjelokupno istraživanje bilo je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom. Istraživanje je odobreno od strane Etičkih povjerenstava Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa (urudžbeni broj: 08-08-970/19 od 15. travnja 2019.) (prilog 3), Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu (urudžbeni broj: 100-21/19-10 od 6. lipnja 2019.) (prilog 4) i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (urudžbeni broj: 380-59-10106-20-111/174; klasa: 641-01/20-02/01 od 14. prosinca 2020.) (prilog 5). Ispitanici su bili upoznati sa svrhom i tijekom istraživanja te činjenicom da u svakom trenutku mogu odustati od sudjelovanja u istraživanju što su i potvrdili potpisanim informiranim pristancima.

Drugi dio istraživanja započeo je ispunjavanjem suglasnosti ispitanika za sudjelovanje u istraživanju nakon čega su uslijedila mjerenja antropometrijskih i biokemijskih parametara te parametara oštećenja DNA. U ovoj fazi započeta je nutritivna intervencija. Ispitanici su za vrijeme ove faze istraživanja ispunili upitnike o učestalosti unosa hrane i pića, te upitnik o životnim navikama, a pridržavanje kontrolne skupine SRD provjereno je nenajavljenim 24-satnim prisjećanjem unosa hrane i pića. Na kraju ove faze, nakon trotjedne nutritivne intervencije ponovljena su mjerenja antropometrijskih i biokemijskih parametara te parametara oštećenja DNA.

Treća faza istraživanja obuhvaćala je unos svih podataka u Excel tablicu, izračune upalnih indeksa prehrane i na kraju statističku obradu svih mjerenih i izračunatih parametara eksperimentalne i kontrolne skupine te njihovu usporedbu.



Slika 8. Shematski prikaz tijeka istraživanja

4.2. Ispitanici

U ispitivanju je sudjelovalo 53 ispitanika oba spola s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$. Ispitanici su bili podijeljeni s obzirom na način pristupanja ispitivanju i intervenciju na: eksperimentalnu i kontrolnu skupinu.

Kriteriji za uključivanje u istraživanje bili su:

- $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$
- Stabilna tjelesna masa u posljednja tri mjeseca
- Završeno trotjedno sudjelovanje u istraživanju koje uključuje antropometrijska mjerenja i uzorkovanja venske krvi na početku i na kraju istraživanja
- Ispunjen informirani pristanak, upitnik o životnim navikama i zdravstvenom stanju te upitnik o učestalosti konzumiranja hrane i pića

Kriteriji za isključivanje iz istraživanja bili su:

- Trudnoća
- Maloljetnost
- Akutna i tumorska oboljenja
- Operativni zahvati s i bez lokalne i opće anestezije 6 mjeseci prije sudjelovanja u istraživanju
- Dijagnostičke procedure koje su uključivale ionizirajuće i neionizirajuće zračenje 6 mjeseci prije sudjelovanja u istraživanju

Prije početka istraživanja izračunat je minimalni broj ispitanika koji moraju završiti ispitivanje kako bi se potvrdila hipoteza istraživanja. Minimalni broj ispitanika koji mora završiti ispitivanje dobiven je statističkim programom o veličini grupe (Brant, 2019), s 5 %-tnom razinom statističke značajnosti (α) te 80 %-tnom snagom studije ($\beta = 0,2$), a veličina učinka procijenjena je prema Soares i sur. (2016). Navedenim izračunom je dobiveno da je minimalni broj ispitanika 52 koji su podjednako raspoređeni u dvije skupine.

4.2.1. Eksperimentalna skupina

Odabir ispitanika za eksperimentalnu skupinu provodio je liječnik specijalist interne medicine, subspecijalist dijabetologije i endokrinologije Dragan Božičević u Dijabetološkoj i endokrinološkoj ambulanti Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa od pacijenata koji su bili na ambulantnom liječenju pretilosti, a koji nisu ostvarili gubitak tjelesne mase, te

koji su pristali na bolničko liječenje pretilosti. Dodatni isključujući kriterij za sudjelovanje u istraživanju, u ovoj skupini, je bio rizik od razvoja pothranjenosti za vrijeme liječenja pretilosti u Specijalnoj bolnici za produženo liječenje Duga Resa. Ispitanici za koje je liječnik specijalist interne medicine, subspecijalist dijabetologije i endokrinologije utvrdio da bi mogli razviti pothranjenost bili su isključeni od bolničkog liječenja pretilosti i time i iz istraživanja. Sudjelovanje u istraživanju bilo je isključivo dobrovoljno, a pacijenti su mogli u bilo kojoj fazi odustati od sudjelovanja u istraživanju bez posljedica za nastavak ambulantnog i/ili bolničkog liječenja. Bolničko liječenje pretilosti provedeno je primjenom VLCD. Hrana se pripremala u bolničkoj kuhinji. Zbog mogućih zdravstvenih komplikacija ispitanici su bili pod konstantnim 24-satnim liječničkim nadzorom.

Prvi dan hospitalizacije je ujedno bio i prvi dan ispitivanja. Ispitanici su došli natašte u bolnicu, te su neposredno nakon dolaska u bolnicu u jutarnjim satima (između 7 i 9 sati) napravljena prva antropometrijska mjerenja i uzorkovanje krvi. Nakon 21. dana neposredno prije otpusta iz bolnice ponovljena su antropometrijska mjerenja i uzorkovanje krvi. Zbog ograničenog broja mjesta u bolnici (bolnički kreveti i osigurani nadzor), ispitanici nisu pristupili istraživanju istovremeno, ali je sastav obroka kojeg su dobivali i cjelokupni proces istraživanja bili ujednačeni.

4.2.2. Kontrolna skupina

Ispitanici kontrolne skupine regrutirani su putem poznanika, osobnim kontaktima, javnim objavama na društvenim mrežama, liječnika specijalista interne medicine, subspecijalista dijabetologije i endokrinologije Dragana Božičevića u endokrinološkoj ambulanti Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa i liječnice specijalistice interne medicine sa subspecijalizacijom iz endokrinologije i dijabetologije dr. sc. Martine Matovinović sa Zavoda za endokrinologiju KBC Zagreb. Ispitanici su bili na SRD (1500 kcal) koju su provodili u kućnim uvjetima na svoj trošak, bez drugih uvedenih i predloženih promjena u životnim navikama. Dodatni uključujući kriterij za skupinu bila je suglasnost da ih se može nazvati dva puta tijekom istraživanja na broj telefona koji je naveden kao ispitanikov kontakt kako bi se utvrdio unos hrane i pića u periodu od 24 sata za prethodna dva dana dijete od kojih je jedan od tih dana bio za vrijeme vikenda.

4.3. Metode

4.3.1. Primjena VLCD

Dijeta izrazito niskog sadržaja energije (VLCD) kreirana je u Specijalnoj bolnici za produženo liječenje te se koristi za liječenje pretilosti. Dnevni jelovnik sadržavao je 50 – 60 % složenih ugljikohidrata niskog glikemijskog indeksa, 20 – 25 % proteina i 25 – 30 % masti s ukupnim sadržajem energije od oko 600 kcal dnevno. Hranu su ispitanici konzumirali u tri obroka, a tijekom dana su unosili veće količine nezaslađenih tekućina (poglavito vode). Zbog ograničenog broja mjesta u bolnici, pacijenti nisu pristupili istraživanju istovremeno, ali su im sastav i obroci bili ujednačeni, kao i cjelokupni proces istraživanja. Navedeni obroci predstavljaju jedini izvor hrane jer su pacijenti pod konstantnim medicinskim nadzorom, u bolnici ne postoji aparat za hranu niti kantina/kuhinja za pacijente, niti su dozvoljene posjete.

4.3.2. Izrada i primjena SRD

Za potrebe ovog istraživanja osmišljen je 21 jelovnik redukcijske dijeta energijske vrijednosti oko 1500 kcal. Jelovnici su napravljeni uz pomoć računalnog programa Prehrana (Infosistem d.d., Zagreb). Kontrolna skupina je sama pripremala obroke prema, za njih osmišljenom, detaljnim jelovnikom redukcijske dijeta koji je bio raznovrstan, nutritivno uravnotežen i sukladan redukcijskoj dijeti prema Odluci o standardu prehrane bolesnika u bolnicama (NN 59/2015). SRD je izrađena na način da je udio ugljikohidrata bio između 50 – 55 %, proteina 20 – 25 % a masti ≤ 30 %, a ukupni sadržaj energije bio je oko 1500 kcal dnevno uz preporuku da se hrana konzumira kroz 5 obroka. Izvor ugljikohidrata je uključivo voće, povrće, žitarice i mahunarke, dok je su glavni izvor proteina bili perad, riba, mahunarke i rijetko nemasna teletina. Izvor masti je uključivao biljna ulja: maslinovo, suncokretovo i bučino te su ispitanici mogli birati između vrste ulja uz uvjet da količine ostanu sukladne količinama navedenim u SRD. Način pripreme namirnica u dijeti je uključivao kuhanje, pirjanje, pečenje s minimalnim dodatkom masti te minimalno dva kuhana obroka dnevno. Od ispitanika se tražio povećani unos tekućine (oko 2 L) u obliku nezaslađenih čajeva i voda. Navedena dijeta je uključivala povećani unos vlakana budući da je konzumacija voća i povrća iznosila više od 500 g na dan.

4.3.2. Antropometrijske metode

Stadiometrom je određena tjelesna visina ispitanika, a vagom InBody 270 (Kalifornija, SAD) određeni su ostali antropometrijski parametri: masa mišićnog i masnog tkiva te je izračunat udio masnog tkiva i ITM. Za određivanje antropometrijskih parametara vaga koristi bioelektričnu impedanciju koristeći dvije različite frekvencije (20 kHz, 100 kHz) na 5 segmenata tijela (desna i lijeva ruka, trup, desna i lijeva noga). Upotrebom različitih frekvencija omogućeno je određivanje volumena izvanstanične i unutarstanične tekućine tj. ukupnog volumena tjelesnih tekućina. Budući da su tjelesne tekućine jedine komponente tijela koje provode električnu energiju moguće je odrediti ukupni volumen istih. Ukupni volumen tjelesnih tekućina određuje se mjerenjem napona (U) i jakosti (I) struje nakon primjene izmjenične struje. Primjenom Ohmova zakona iz napona i jakosti struje izračuna se impedancija (R) prema formuli:

$$R = \frac{U}{I}$$

Dobivena vrijednost za impedanciju proporcionalna je duljini (l) i specifičnoj konstanti (q) te obrnuto proporcionalna površini presjeka (S), prikazano slijedećom formulom:

$$R = \frac{q \cdot l}{S}$$

Iz formule se izračuna površina presjeka. Visina je određena mjerenjem ispitanika. Iz visine i površine presjeka izračuna se volumen tjelesne tekućine formulom:

$$V = l \cdot S$$

Iz volumena tjelesne tekućine moguće je izračunati masu tijela bez masnog tkiva budući da je udio vode u takvom tkivu uvijek 0,733. Dakle, masa tijela bez masnog tkiva dobiva se dijeljenjem volumena tjelesne tekućine s konstantom 0,733, a oduzimanjem ukupne mase tijela od izračunate mase tijela bez masnog tkiva dobiva se ukupna vrijednost masnog tkiva.

Udio masnog tkiva izračunava se dijeljenjem mase masnog tkiva s masom tijela te množenjem sa 100.

Izračun mase skeletnog mišićnog tkiva tijela temelji se na određivanju mase tijela bez masnog tkiva mjereći otpore apendikularne nemasne mase (engl. *appendicular lean mass ALM*) na 4 segmenata tijela (desna i lijeva ruka, desna i lijeva noga) i koristeći se pretpostavkama da se u nemasnim masama ruku i nogu nalazi isključivo skeletna mišićna masa te da se 75 %

ukupne skeletne mišićne mase tijela nalazi u rukama i nogama. Iz navedenog proizlaze formule za izračun ukupne skeletne mišićne mase (SMM) tijela (InBody, 2022).

$$ALM = m(\text{desne ruke}) + m(\text{lijeve ruke}) + m(\text{desne noge}) + m(\text{lijeve noge})$$

$$SMM = \frac{ALM}{0,75}$$

4.3.3 Analiza kompletne krvne slike, biokemijske/spektrofotometrijske i imunokemijske metode

4.3.3.1. Uzorkovanje, transport i priprema uzoraka krvi

Uzorkovanje krvi izvedeno je u sjedećem položaju iz ruke koja je bila polegnuta na osloncu. Mjesto uboda je bila antekubitalna vena odnosno ukoliko je ista bila nedostupna uzorkovanje je izvršeno iz vene nadlaktice. Uzorkovanje krvi su radili educirani zdravstveni radnici (zdravstveno-laboratorijski tehničari i medicinske sestre) u skladu s Nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi (Nikolac i sur., 2014). Lokacije uzorkovanja krvi bile su: Odjel za produženo liječenje I-interna medicina i prijem Odjela medicinsko-biokemijskog laboratorija Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa, te Jedinica za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Bez obzira na lokaciju, uzorkovanje je izvršeno u jednokratne epruvete s podtlakom proizvođača BD - Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, SAD) sljedeći upute proizvođača o redoslijedu epruveta i njihovom miješanju. Ukupno je izvađeno 5 epruveta krvi (2 s antikoagulansom Na₃EDTA, 2 epruvete s aktivatorom zgrušavanja i 1 s Li-heparin antikoagulansom). Ukupni maksimalni volumen krvi koji je uzet je 24 mL. Svi uzorci krvi s Odjela za produženo liječenje I-interna medicina i prijema Odjela medicinsko-biokemijskog laboratorija odmah su bili dostavljeni u analitički dio Odjela medicinsko-biokemijskog laboratorija, dok su uzorci krvi (1 epruveta s antikoagulansom Na₃EDTA i 2 epruvete s aktivatorom zgrušavanja) iz Jedinice za mutagenezu dostavljeni u okomitom položaju u prijenosnom hladnjaku s temperaturom od 4 °C unutar vremena stabilnosti svakog analiziranog parametra. Transport uzoraka (epruveta s antikoagulansom EDTA i epruveta s Li-heparin antikoagulansom) iz Odjela medicinsko-biokemijskog laboratorija u Jedinicu za mutagenezu odvijao se pod istim uvjetima. Uzorci krvi su korišteni na sljedeći način:

- epruveta s antikoagulansom Na₃EDTA iskorištena je za analizu kompletne krvne slike te alkalni komet test i FPG komet test. Neposredno prije analiza uzorci su promiješani.

- epruveta s aktivatorom zgrušavanja za analizu triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, glukoze, visokoosjetljivog C-reaktivnog proteina te inzulin. Uzorci krvi u epruvetama s aktivatorom zgrušavanja su neposredno prije analize, a nakon formiranja ugruška, centrifugirani 10 minuta na sobnoj temperaturi na 3500 okretaja u minuti u centrifugi Hettich, Rotofix 32. Iz seruma dobivenih centrifugiranjem određene su koncentracije svih navedenih pretraga.
- epruveta s Li-heparin antikoagulansom za mikronukleus test. Neposredno prije analize uzorci su promiješani.

Kompletna krvna slika, trigliceridi, ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, glukoza, visokoosjetljivi C-reaktivni protein (CRP) i inzulin određeni su u Odjelu medicinsko-biokemijskog laboratorija Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa.

4.3.3.2 Kompletna krvna slika

Kompletna krvna slika određena je neposredno nakon dostave uzoraka u analitički dio Odjela medicinsko-biokemijskog laboratorija na analizatoru Sysmex XS-1000i (Kobe, Japan), reagensima proizvođača analizatora, metodama fluorescentne protočne citometrije, impedancije s hidrodinamičkim fokusiranjem i spektrofotometrijom korištenjem SLS (engl. *sodium lauryl sulphate*) reagensa. Određeni su sljedeći parametri: broj leukocita i diferencijacija subpopulacije leukocita koja uključuje broj neutrofilnih, eozinofilnih i bazofilnih granulocita, limfocita i monocita te broj eritrocita i koncentracija hemoglobina, prosječni volumen eritrocita, raspodjela eritrocita po volumenu, prosječna količina hemoglobina u eritrocitu, prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu, broj trombocita i njihov prosječni volumen.

4.3.3.3 Biokemijske/spektrofotometrijske metode

Trigliceridi, ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, glukoza, visokoosjetljivi CRP određeni su na analizatoru Beckman Coulter AU 480 (Brea, Kalifornija, SAD) reagensima Beckman Coulter (Brea, Kalifornija, SAD).

4.3.3.3.1 Trigliceridi

Trigliceridi su određeni spektrofotometrijskom metodom, testom koji se temelji na nizu povezanih enzimskih reakcija. U prvom koraku trigliceridi se hidroliziraju mikrobnim lipazama pri čemu nastaje glicerol i masne kiseline. Glicerol se pomoću glicerol kinaze i adenzin

trifosfata fosforilira te nastaje glicerol-3-fosfat. U sljedećem koraku glicerol fosfat oksidaza oksidira glicerol-3-fosfat molekulom kisika i kao produkti nastaju vodikov peroksid i dihidroksiaceton fosfat. Vodikov peroksid u prisutnosti peroksidaze i 4-aminofenazona i N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilin dinatrijevom soli stvara kromofor koji se očitava na 660/800 nm. Povećanje apsorpcije na navedenim valnim duljinama proporcionalno je koncentraciji triglicerida u uzorku.

4.3.3.3.2. Ukupni kolesterol

Ukupni kolesterol je određen spektrofotometrijskom metodom. Kolesterol esteraze u reagensu hidroliziraju estere kolesterola nakon čega kolesterol oksidaza oksidira slobodni kolesterol pri čemu nastaje kolesten-3-on i vodik peroksid. Vodik peroksid u prisutnosti peroksidaze, 4-aminoantipirina i fenola stvara crvenu kinoniminsku boju koja se spektrofotometrijski određuje na 540/600 nm.

4.3.3.3.3. HDL-kolesterol

HDL-kolesterol je određen nakon vezanja humanih β -lipoproteinskih antitijela za lipoproteine koji nisu HDL-kolesterol (LDL-kolesterol, VLDL i hilomikroni). Stvoreni kompleksi omogućuju razgradnju samo HDL-kolesterola do masnih kiselina, kolesten-3ona i vodikovog peroksida. U zadnjoj enzimskoj reakciji nastaje plavo obojenje koje se mjeri spektrofotometrijski.

4.3.3.3.4. LDL-kolesterol

LDL-kolesterol je izračunat prema Friedewaldovoj jednadžbi (Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma):

$$\text{LDL – kolesterol} = \frac{\text{konc. ukupnog kolesterola} - \text{konc. HDL} - \text{konc. trigliceridi}}{2,2}$$

kad su vrijednosti triglicerida bile $< 3,5 \text{ mmol L}^{-1}$ odnosno mjeren LDL-kolesterol reagensom za vrijednosti triglicerida $> 3,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Prvi korak u određivanju LDL-kolesterola je zaštita istog od enzimska kolesterol esteraze i kolesterol oksidaze koje razgrađuju sve ne-LDL lipoproteine. U dugom koraku određivanja LDL-kolesterola otpušta se zaštitni reagens i reakcijom s kolesterol esterazom i kolesterol oksidazom nastaje vodikov peroksid koji pomoću katalaze daje plavo obojeni produkt koji se mjeri spektrofotometrijski.

4.3.3.3.4. Glukoza

Glukoza je određena testom koji se temelji na nizu povezanih enzimskih reakcija. U prvoj reakciji glukoza se fosfolizira enzimom heksokinaza u prisutnosti adenozin trifosfata i iona magnezija pri čemu nastaje glukoza-6-fosfat i adenozin difosfat. U drugoj reakciji glukoza-6-fosfat dehidrogenaza oksidira glukozu-6-fosfat u glukonat-6-fosfat uz redukciju NAD^+ u NADH. Spektrofotometrijski se mjeri povećanje NADH na 340 nm koje je proporcionalno koncentraciji glukoze u serumu.

4.3.3.3.5. Visokoosjetljivi CRP

Visokoosjetljivi CRP je određen imunokemijskom metodom. CRP specifično reagira s antitijelima u reagensu pri čemu nastaju netopljivi agregati koji se mjere spektrofotometrijski.

4.3.3.4. Imunokemijske metode

Inzulin je određen kemiluminiscentnom mikročestičnom imunokemijskom metodom na analizatoru Architect i1000sr Abbott (Illinois, SAD) s originalnim Abbott reagensima (Illinois, SAD). Miješanjem uzorka seruma s reagensom u kojem se nalaze paramagnetske mikročestice obilježene antitijelima na inzulin i anti-inzulin konjugatima obilježenih akridinom dolazi do vezanja inzulina iz uzorka s obilježenim antitijelima. Nakon ispiranja smjese, pri čemu se uklanjaju nevezane čestice, u otopinu se dodaju predaktivacijska i aktivacijska otopina što rezultira kemiluminiscencijom koja se mjeri i izražava u relativnim svjetlosnim jedinicama. Koncentracija inzulina u uzorku proporcionalna je vrijednostima relativnih svjetlosnih jedinica izmjerenih ARCHITECT iSystem optikom.

4.3.3.5. Izračun HOMA-IR

HOMA-IR izračunat je korištenjem koncentracija glukoze i inzulina određenih natašte, a prema formuli (Matthews i sur., 1985):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glukoze /mmol/L} \cdot \text{inzulina / mIU}}{22,5}$$

4.3.4. Metode za procjenu oštećenja DNA

Sve metode za procjenu oštećenja DNA su rađene u Jedinici za mutagenezu Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Metode korištene za utvrđivanje oštećenja DNA su: alkalni komet test, FPG komet test i mikronukleus test.

4.3.4.1. Alkalni komet test i FPG komet test

Prije postupka izrade alkalnog komet testa i FPG komet testa napravljena su predmetna stakalca s agarozom normalnog tališta; PBS pufer; 0,6 %-tna otopina agaroze niskog tališta, otopina za liziranje membranskih struktura i otopina za denaturaciju DNA. Vrijeme izrade predmetnih stakalaca i otopina prije alkalnog i FPG komet testa ovisilo je o stabilnosti svake pojedine komponente. Postupci izrade su sljedeći:

- **Priprema predmetnog stakalca s agarozom normalnog tališta**

Predmetno stakalce presvučeno s 300 μ L 1 %-tnom vodenom otopinom agaroze normalnog tališta pripremljeno je na način da se 0,1 g NMP (engl. *normal melting point*) agaroze (Sigma Aldrich, St Louis, SAD, A9539-250G, molecular biology tested, CAS 9012-36-6) otopilo u 10 mL destilirane vode (Yasenka, Hrvatska) zagrijanoj do vrenja i ohlađenoj to 60 °C. Pripremljena otopina agaroze je nanijeta na adhezivna predmetna stakla za mikroskopiju dimenzija 26x76 mm (Vitrognost Plus Ultra, 72 kom, REF 103001A72, Biognost, Zagreb, Hrvatska) te je pokrivena s pokrovnim staklom dimenzija 24x60mm (Vitrognost, 100 kom, REF 10212460C, Biognost, Zagreb, Hrvatska) prethodno potopljenim u 100 %-tni dimetilsulfoksid (DMSO) (Kemika, Hrvatska). Tako pripremljena stakla stavljena su 10 minuta na neizravni led. Nakon 10 minuta na neizravnom ledu, skinuta su pokrovna stakalca, a predmetna stakalca stavljena su na grijač temperature 50 – 60 °C dok se gel nije posušio. Osušena predmetna stakalca pohranjena su na sobnoj temperaturi na suho i tamnom mjestu do trenutka upotrebe i nanošenja novog sloja agaroze.

- **Priprema PBS pufera**

U 800 mL destilirane vode (Yasika, Vukovar, Hrvatska) otopljeno je 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O i 0,24 g KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) izvaganih na analitičkoj vagi. Kloridnom kiselinom podešen je pH na 7,4 nakon čega je dodana destilirana voda do ukupnog volumena od 1 L. Pufer je steriliziran u autoklavu. Pufer je izrađen na dan pripreme 0,6 %-tne otopine agaroze niskog tališta s PBS-om.

- **Priprema 0.6 %-tne otopine agaroze niskog tališta**

U 10 mL PBS pufera dodano je 0,6 g agaroze niskog tališta (Sigma Aldrich, 100 g, A-9414) izvaganog na analitičkoj vagi, te je otopina zagrijana do temperature vrelišta i nakon što je otopina postala vizualno homogena, ohlađena je na konstantnu temperaturu od 37 °C (u vodenoj kupelji). Takva otopina je je alikvotirana po 600 µL u Eppendorf mikro epruvete od 1,5 mL, te su epruvete pohranjene u hladnjaku na 4 °C do upotrebe.

- **Priprema otopine za liziranje membranskih struktura**

Temeljna standardna otopina za liziranje membranskih struktura dobivena je otapanjem 146,4 g NaCl (2,5 M); 37,2 g Na₂EDTA (100 mmol L⁻¹) i 1,2 g TrisHCl (Trizma, Sigma Aldrich, SAD) u 890 mL destilirane vode. pH tako dobivene otopine je podešen na pH 10 te je dodano 10 g Na-laurylsarkozinata (Sigma Aldrich) i nadopunjeno destiliranom vodom do 1 L.

Radna otopina za liziranje membranskih struktura dobivena je miješanjem 89 mL temeljne standardne otopine za liziranje membranskih struktura, 10 mL 10 %-tnog DMSO (Kemika), 1 mL Triton X-100 (Sigma Aldrich). Do upotrebe otopina se drži u hladnjaku na 4 °C. Otopina je rađena na dan izrade komet testa.

- **Priprema otopine za denaturaciju DNA**

Prvo je napravljeno 200 mM Na₂EDTA otopine otapanjem 7,5 g soli Na₂EDTA u 100 mL destilirane vode (Yasika, Hrvatska). Nakon toga, u 965 mL hladne (4 °C) destilirane vode (Yasika, Hrvatska) dodano je 30 mL 10 mol L⁻¹ NaOH i 5 ml 200 mmol L⁻¹ Na₂EDTA. Otopina se radila na dan izrade komet testa i čuvala se u hladnjaku na 4 °C do upotrebe.

- **Protokol izrade alkalnog komet test i FPG komet test**

Na dan pokusa uključena je vodena kupelj na 37 °C. U čašicu s vodom, koja je zagrijana do vrenja u mikrovalnoj pećnici, na 2 minute su stavljene zatvorene Eppendorf epruvete s pripremljenom 0.6 %-tnom agarozom niskog tališta. Nakon otapanja agaroze, Eppendorf epruvete su stavljene u vodenu kupelj dok nisu postigle temperaturu od 37 °C. Iz epruveta s antikoagulansom K₂EDTA (Becton Dickinson, NJ, SAD) uzeto je 30 µl pune krvi i pomiješano je s 600 µl 0,6 %-tne agaroze niskog tališta ohlađene na 37 °C. Budući da je rađen sistem dva gela na jednoj predmetnici, iz tako pripremljene mješavine krvi i agaroze uzeto je 70 µL i nanoseno na gornji dio već unaprijed pripremljene s osušenim slojem 1 %-tne agaroze normalnog tališta, te je gel pokriven s pokrovnicom dimenzija 24x24mm (Vitrognost pokrovnica stakla, Biognost, Zagreb, Hrvatska). Na isto predmetno staklo nanoseno je novih 70 µL mješavine pune krvi i agaroze u razmaku od minimalno pola centimetra od prije apliciranog

uzorka, te je i taj drugi gel pokriven s pokrovnicom dimenzija 24x24mm, nakon čega je cijelo predmetno staklo stavljeno 10 minuta na neizravni led iznad kojeg je strujao topli zrak. Na navedeni način napravljena su po tri predmetna stakalca za svakog ispitanika. Po jedno predmetno stakalce služilo je za određivanje komet testa, kometa nakon inkubacije s enzimom FPG te kometa nakon inkubacije s FPG reakcijskim puferom bez enzima FPG. Nakon 10 minuta skinute su pokrovnice sa svih predmetnih stakalaca koja su zatim uronjena u već pripremljenu, svježju i ohlađenu otopinu (4 °C) za liziranje membranskih struktura. U otopini za liziranje membranskih struktura predmetna stakalca su bila sat vremena na temperaturi od 4 °C. Poslije liziranja membranskih struktura procesi izrade komet testa i FPG komet testa se razdvajaju.

Komet test

Poslije liziranja membranskih struktura, predmetna stakalca su nježno isprana destiliranom vodom, te su stavljena u svježju hladnu otopinu za denaturaciju DNA 20 minuta na 4 °C. Nakon 20 minuta, kadica za horizontalnu elektroforezu je napunjena svježjom hladnom otopinom za denaturaciju DNA te su u istu stavljena horizontalno predmetna stakalca na način da je kraj stakla orijentiran prema anodi, a dio stakla s natpisom prema katodi. Uvjeti za elektroforezu su bili: 24 V (1V/cm), 400 mA te trajanje 20 minuta. Nakon elektroforeze, stakalca su stavljena na ljestvice iznad kadice i prekrivena su otopinom za neutralizaciju (Tris HCl pH 7,5) u trajanju od 5 minuta. Preparati su pregledani isti dan, te se prije samog mikroskopiranja na predmetna stakla nanosio etidijev bromid masene koncentracije 20 µg L⁻¹.

Komet test nakon inkubacije s FPG enzimom/FPG reakcijskim puferom

Poslije liziranja membranskih struktura i ispiranja destiliranom vodom (Yasika, Hrvatska), predmetna stakalca uronjena su u otopinu FPG reakcijskog pufera bez FPG enzima 5 minuta. Navedeno je ponovljeno još dva puta, svaki put koristeći novu otopinu FPG reakcijskog pufera bez FPG enzima. Nakon ispiranja, na jedno predmetno stakalce s gelovima u duplikatu nanoseno je po 70 µL FPG enzima na svaki gel te je svaki gel pokriveno s potkrovnicom dimenzija 24x24mm. Isti postupak je ponovljen na drugom staklu ali samo s FPG reakcijskim puferom bez FPG enzima. Tako pripremljena stakla stavljena su u vlažnu komoru na 37 °C na sat vremena. Poslije inkubacije u komori, stakalca su nježno isprana destiliranom vodom, te je uslijedila denaturacija, elektroforeza, neutralizacija i bojanje DNA kao i u koracima komet testa.

Mikroskopiranje

Nakon bojanja, preparati su pregledani pomoću povećanja 200x na epifluorescencijskom mikroskopu BX 51 (Olympus, Tokyo, Japan) spojenog preko CCD s računalnim softverskim programom Comet IV, prijašnji Perceptive Instruments a sadašnji Instem, London, Ujedinjeno Kraljevstvo). Kometi su vidljivi na ekranu računala te je na svakom gelu označeno 55 kometa/stanica po gelu (ukupno 110 kometa/stanica po predmetnom staklu). Označeni kometi/stanice automatski su bile obrađene programom koji automatski izračunava dužinu repa, postotak DNA u repu kometa i repni moment. Za analize koristili smo samo %DNA u repu kometa ili intenzitet repa kometa (TI).

4.3.4.2. Mikronukleus test

Za izradu mikronukleus testa napravljene su otopine fitohemaglutinina, citohalazina B i otopina za fiksiranje na sljedeći način:

- **Otopina fitohemaglutinina**

U bočicu s liofilizatom (Phytohemagglutinin, Remel Inc, Santa Fe Drive, SAD, REF 30852701HA15) u sterilnim uvjetima dodano je 5 mL 0,9 %-tne sterilne otopine natrijevog klorida (Hrvatski zavod za transfuziju, Zagreb, 500 mL) i promiješano. Tako pripremljena otopina spremna je za upotrebu. Nakon upotrebe ostatak otopine fitohemaglutinina koji se nije upotrijebio pohranjen je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do sljedeće upotrebe.

- **Otopina citohalazina B**

U sterilnim uvjetima dodano je 2 mL sterilne otopine DMSO u bočicu s 5 mg citohalazina B (Sigma Aldrich C6762-5MG), promiješano, te je izdvojen po 1 mL tako pripremljene otopine u koju je u sterilnim uvjetima dodano 9 mL sterilnog staničnog RPMI medija. Sve je dobro promiješano. Dio koji nije iskorišten pohranjen je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do sljedeće upotrebe.

- **Otopina za fiksiranje**

U omjeru 1:3 pomiješana je ledena octena kiselina (Kemika, Zagreb) i metanol (Kemika, Zagreb). Otopina je stabilna u hladnjaku na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

Protokol izrade mikronukleus testa

U sterilnim uvjetima u flask (Eppendorf, filter cap, Hamburg, Njemačka, sterile, cat no. 0030710029) je stavljeno 6 mL RPMI medija (RPMI 1640 with L-glutamine and sodium bicarbonate, sterile, Sigma Aldrich, St Louis SAD-Thermo Fisher R8758-500 mL), 1mL seruma (foetal bovine serum Sigma Aldrich, SAD, St Louis, F7524, sterile), 100 μL

fitohemaglutinina PHA (Phytoheamagglutinin, Remel Inc, Santa Fe Drive, USA, REF 30852701HA15) i 0,5 mL pune krvi s heparinskim antikoagulansom. Za svaki uzorak napravljeni su flaskovi u duplikatu. Tako pripremljene kulture stanica inkubirane su u 5 %-tnom CO₂ i vlazi od 95 % na 37 °C u inkubatoru Hera Cell 240 (Heraeus, Njemačka) 44 sata. Nakon 44-og sata, u sterilnim uvjetima dodano je 100 µL citohalasin B (Sigma Aldrich C6762-5MG) u svaki flask, lagano je izmiješan novi sadržajem kulture stanica u flasku i flaskovi su stavljeni natrag u inkubator Hera Cell 240, Heraeus na inkubaciju od sljedećih 28 sati.

Nakon 72 sata inkubacije, cjelokupni sadržaj svakog flaska je prebačen staklenim Pasteurovim pipetama (s odlomljenim vrhom) u staklenu kivetu sa širim konusnim dnom. Uzorci su centrifugirani 8 minuta na sobnoj temperaturi na 800 okretaja u minuti u centrifugi Hettich, Rotofix 32. Nakon centrifugiranja većina supernatanta je usisana vakuum sisaljkom. Talog stanica s dijelom supernatanta nježno je promiješan s Pasteurovim pipetama i tako izmiješan sadržaj je ostavljen u Pasteurovim pipetama u kivetama s konusnim dnom. U svaku kivetu je dodano 5 mL hladne (4 °C) otopine 0.075 mmol L⁻¹ kalijevog klorida. Iz Pasteurovih pipeta je ispušten talog stanica i lagano izmiješan s dodanom hladnom otopinom, te su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi 7 minuta. Nakon toga su uzorci centrifugirani 8 minuta na sobnoj temperaturi na 800 okretaja u minuti u centrifugi Hettich, Rotofix 32, nakon čega je većina supernatanta usisana vakuum sisaljkom. Talog stanica s dijelom supernatanta opet je nježno promiješan s Pasteurovim pipetama i tako izmiješan sadržaj je ostavljen u Pasteurovim pipetama u staklenim kivetama s konusnim dnom. U kivete je tada dodano 5 mL hladnog fiksira i tri kapi formaldehida, sve je izmiješano i centrifugirano 8 minuta na sobnoj temperaturi na 800 okretaja u minuti u centrifugi Hettich, Rotofix 32. Postupak usisavanja supernatanta i miješanje taloga s 5 mL hladnog fiksira te centrifugiranje 8 minuta na sobnoj temperaturi na 800 okretaja u minuti u centrifugi Hettich, Rotofix 32 napravljen je još minimalno dva puta odnosno do pojave bijelog taloga nakon centrifugiranja. Nakon pojave bijelog taloga objedinjeni su sadržaji kiveta za svakog ispitanika na način da je na jedan talog dodano 5mL hladnog fiksira, sadržaj je promiješan Pasteurovom pipetom i prebačen u drugu kivetu s drugi talogom iste osobe, te su oba taloga izmiješana sa sadržajem iz Pasteurove pipete. Tako objedinjeni sadržaji su centrifugirani 8 minuta na sobnoj temperaturi na 800 okretaja u minuti u centrifugi Hettich, Rotofix 32. Nakon što se supernatant usisao s vakuum sisaljkom na talog je dodano par kapi svježeg fiksira te se izmiješani sadržaj nanio na čista predmetna stakalca. Stakla su osušena na sobnoj temperaturi i nakon toga su bojana u 3 %-tnoj vodenoj otopini Giemse 10 minuta. Poslije bojanja stakla su isprana vodom i osušena na zraku. Svjetlosnim mikroskopom korištenjem povećanja od 1000 puta određen je broj mononuklearnih (M1),

binuklearnih (M2), trinuklearnih (M3) i tetranuklearnih (M4) stanica na ukupno 1000 stanica s jezgrom te je izračunat mitotski ili proliferacijski indeks (engl. *nuclear division indeks* NDI) formulom:

$$\text{NDI} = \frac{M1 + 2 \cdot M2 + 3 \cdot M3 + 4 \cdot M4}{1000}$$

Na tih tisuću stanica zabilježen je i broj apoptotičnih i nekrotičnih stanica. Također su zatim izbrojana i (frekvencije) genomska oštećenja (mikronukleus, nuklearni pup i nukleoplazmatski most) na 2000 binuklearnih stanica, te izražene kao frekvencije na 1000 binuklearnih stanica.

4.3.5. Dijetetičke metode

4.3.5.1. 24-satno prisjećanje unosa hrane i pića

Pridržavanje kontrolne skupine SRD provjereno je nenajavljenim 24-satnim prisjećanjem unosa hrane i pića. Navedenom metodom prikupljeni su podatci o konzumiranoj hrani i piću tijekom 24 sata za dva dana (unutar tri tjedna koliko je ujedno trajalo sudjelovanje ispitanika) od kojih je jedan dan bio dan vikenda. U razgovoru su se od ispitanika tražile količine, vrste i načini pripreme pojedinih namirnica, korišteni začini i vrijeme konzumacije pojedinih obroka unutar jednog dana. Za gotove obroke osim količine i vremena konzumacije, od ispitanika je ujedno traženo da navedu proizvođača obroka što je najčešće rezultiralo fotografiranjem proizvoda. Većina ispitanika je obroke vagala, a dio je i samoinicijativno vodio dnevnik prehrane. Ispitanici koji obroke nisu vagali, mase su izražavali kroz udio pakirane namirnice (npr. četvrtina pakiranja pilećih prsa ukupne mase od 400 g), veličine kuhinjskog pribora (najčešće žlice) ili temeljem dosadašnjeg iskustva budući da već imaju iskustva u pripremi obroka. Sve vrijednosti su upisane u gramima u Excel tablicu nakon čega su izračunate vrijednosti prehrambenih komponenti pomoću prehrambenih tablica (Neveu V i sur., 2010; USDA, 2018; DTU, 2022). Samo dio tako izračunatih prehrambenih komponenti koristio se u daljnjem radu.

4.3.5.2. Upitnik o učestalosti unosa hrane i pića

Za procjena prehrambenih navika ispitanika prije nutritivne intervencije korišten je prilagođeni upitnik o učestalosti konzumiranja hrane i pića Mulligan i sur. (2014) (engl. *Food Frequency Questionnaire*, FFQ) (Mulligan i sur., 2014). Na početku ispitivanja upitnik je zajedno s ostalim obrascima i upitnicima dan ispitanicima uz napomenu da isti ispunjen upitnik moraju vratiti najkasnije na kraju ispitivanja (prilikom drugog uzorkovanja krvi/vaganja ili

prilikom otpusta iz bolnice) što im je omogućilo dovoljno vremena da ispune upitnik. Tijekom tri tjedna uvijek su imali mogućnost za postavljanje pitanja. Upitnici koji su bili neispunjeni ili neadekvatno ispunjeni (npr. izrazito niski ili visoki energijski unos, učestalost konzumacije koji je za sve vrste namirnica bio identičan) bili bi vraćeni ispitanicima s molbom da isti nadopune ili korigiraju.

Upitnik o učestalosti unosa hrane i pića sadrži 126 namirnica podijeljenih u sljedeće skupine namirnica: mesa i ribe; kruh i pekarski proizvodi; žitarice; mliječni proizvodi i masti; namazi; slastice i grickalice; juhe, umaci i namazi; pića; voće i povrće. Navedenim upitnikom se procjenjivalo prosječno godišnje konzumiranje pojedine namirnice unaprijed definirane masom, porcijom (šnita, keks) i/ili veličinom kuhinjskog pribora (žlica, šalica, čaša) i dinamikom konzumiranja koja je unaprijed definirana sljedećim vrijednostima: nikad ili manje od 1 mjesečno; 1 do 3 puta mjesečno; 1 tjedno; 2 do 4 puta tjedno; 5 do 6 puta tjedno; 1 dnevno; 2 do 3 puta dnevno; 4 do 5 puta dnevno, te 6 ili više puta dnevno (Prilog 4.). Za obradu FFQ korišten je računalni program FETA (engl. *FFQ EPIC Tool for Analysis*) za Windows-e verzija v2.53 koja je zadnji put nadograđena 15.3.2013. godine, preuzet s mrežne stranice <https://www.epic-norfolk.org.uk/for-researchers/feta-download/>.

4.5.4. Upalni indeks prehrane

Temeljem podatka prikupljenih FFQ-om za svakog ispitanika izračunati je upalni indeks prehrane (DII). Navedeni indeks korišten je za procjenu upalnog potencijala prehrane ispitanika prije nutritivne intervencije. DII nutritivne intervencije za eksperimentalnu skupinu je izračunat temeljem prosjeka trotjedne VLCD, a za kontrolnu skupinu izračunat je temeljem 24 -satnog prisjećanja unosa hrane i pića. Upalni indeks prehrane izračunat je prema radu Shivappa i sur. (2014), a izračun se temelji na 45 prehrambenih komponenti od kojih 9 komponenti ima proupalni učinak (energija, proteini, ukupne masti, ugljikohidrati, zasićene masne kiseline, trans masne kiseline, kolesterol, željezo i vitamin B₁₂), a preostalih 36 komponenti protoupalni učinak (mononezasićene masne kiseline, višestrukonezasićene masne kiseline, ω-3 masne kiseline, ω-6 masne kiseline, prehrambena vlakna, alkohol, vitamini A, D, E, C i B₆, β-karoten, tiamin, riboflavin, niacin, folna kiselina, Mg, Se, Zn, flavan-3-oli, flavoni, flavonoli, flavononi, antocijanidini, izoflavoni, kofein, češnjak, luk, papar, origano, ružmarin, eugenol, šafran, đumbir, kurkuma). Prehrambene komponente za izračune upalnih indeksa prehrane preuzete su iz baza koje sadrže kemijski sastav hrane i pića (Neveu V i sur., 2010; USDA, 2018; DTU, 2022). Ovisno o načinu pripreme, vrijednosti za flavan-3-ole, flavone, flavonole, flavonone, antocijanidine i izoflavone u sirovim namirnicama množile su se s retencijskim faktorima.

Retencijski faktor za kuhanje iznosi 0,59, za prženje 0,50 te za pečenje 1,09 (Rothwell i sur., 2013). Za svaku prehrambenu komponentu najprije je izračunat specifični upalni indeks pojedine komponente na način da je od dobivene prosječne vrijednosti unosa prehrambene komponente oduzet globalni prosječni unos za računatu prehrambenu komponentu te je tako dobivena vrijednost podijeljena sa standardnom devijacijom računate pojedinačne prehrambene komponente čime je dobivena specifična z-vrijednost. Dobivena z-vrijednost prehrambene komponente pretvorena je u percentile centralizirane u nuli te je udvostručena. Od tako dobivene vrijednosti oduzeta je vrijednost jedan koja se u konačnici pomnožila s vrijednosti proupalnog ili protuupalnog učinka računate komponente. Zbrojem svih 45 upalnih indeksa pojedinih komponenti dobiven je upalni indeks prehrane. Rasponi dobivenih vrijednosti moraju biti između 7,98 što predstavlja maksimalni proupalni efekt i $-8,87$ što predstavlja maksimalni protuupalni efekt prehrane. Vrijednosti za globalni prosječni unos, standardnih devijacija i proupalnih/protuupalnih učinaka svih 45 prehrambenih komponenti kao i način izračuna DII-a preuzet je iz rada Shivappa i sur. (2014).

4.4. Statistička obrada podataka

Statistička je analiza napravljena u R programskom jeziku (verzija 4.2.2) (R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija).

Za svakog ispitanika, za sve mjerene numeričke varijable izračunata je razlika između podatka prikupljenog nakon i podatka prikupljenog prije dijete. Izravno izmjereni podatci i izračunate razlike su sažete medijanom, prvim i trećim kvartilom za svaku grupu. Iznimno, razdioba po spolu i broj nekrotičnih stanica su zbog svojih specifičnih razdioba kategorizirane te sažete i analizirane kao kategorijske varijable. Kategorijske su varijable sažete relativnim i apsolutnim frekvencijama.

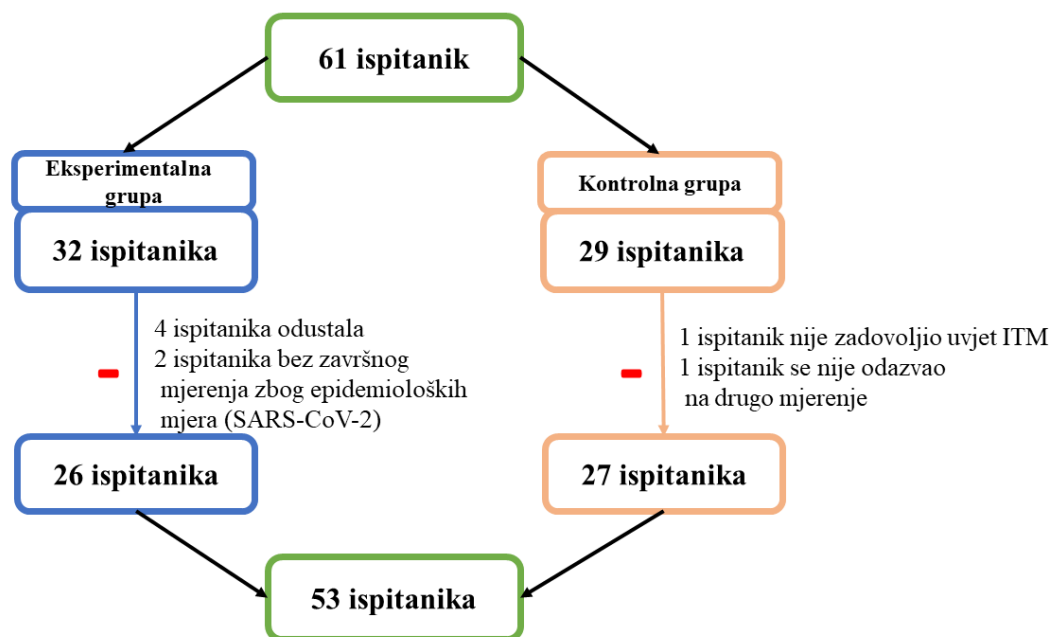
Podacima je prilagođen mješoviti model s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom (ugniježđenom u grupu) kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom (R paket lme4) (Bates i sur., 2015). Prilagođeni modeli su korišteni u svrhu specifičnih usporedbi od interesa u ovom istraživanju: (1) usporedba dviju skupina ispitanika u vremenskoj točki prije dijete, (2, 3) usporedba vremenskih točaka poslije i prije dijete za obje ispitivane skupine te (4) usporedba opaženih razlika poslije-prije između dviju ispitivanih skupina. Usporedbe prosječnih vrijednosti su temeljene na t-testu (R paket emmeans) (Lenth R (2023). *_emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means_*. R package version 1.8.4-1). U svrhu stabilizacije modela, a zbog odstupanja od normalne razdiobe, numeričke su varijable transformirane reverznom transformacijom rangova u standardnu normalnu razdiobu prije analize. Dodatno, spol i dob su uključeni kao kovarijable. S ciljem sprečavanja lažno statistički značajno različitih rezultata sve dobivene p vrijednosti su korigirane na višestruko testiranje prema Benjamini-Hochbergovoj metodi (Benjamini i Hochberg, 1995). Razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Međusobna povezanost markera DNA oštećenja i prehrambenih komponenti za ispitivane skupine prije i nakon dijete je određena Spearmanovim korelacijskim koeficijentom. I u ovom slučaju korekcija na višestruko testiranje je napravljena prema Benjanini-Hochbergovoj metodi (Benjamini i Hochberg, 1995). Jačina povezanosti rezultata, nakon utvrđivanja statističke značajnosti ($p < 0,05$), temeljena je prema kriteriju prikazanom u tablici 8. (Udovičić i sur., 2007).

Tablica 8. Stupanj povezanosti podataka izraženog koeficijentom korelacije

Stupanj povezanosti	r
Nema povezanosti	0 – 0,25
Slaba povezanosti	0,26 – 0,50
Umjerena do dobra povezanost	0,51 – 0,75
Vrlo dobra do izvrsna povezanost	0,76 – 1,00

5. Rezultati

Od ukupno 61 ispitanika koji su pristupili istraživanju njih 53 tj. 87 % je završilo ispitivanje. Od ukupno 32 ispitanika eksperimentalne grupe koji su pristupili bolničkom liječenju pretilosti za njih 26 (74 %) prikupljeni su kompletni podaci. Četiri su ispitanika za vrijeme liječenja odustala od bolničkog liječenja pretilosti, jedan ispitanik je prije završetka liječenja/ispitivanja otpušten doma s bolničkog liječenja pretilosti zbog pojave virusa SARS - CoV - 2 u Specijalnoj bolnici za produženo liječenje Duga Resa, a uzorci jednog ispitanika nisu analizirani na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada zbog tadašnjih epidemioloških mjera donesenih u svrhu smanjenja širenja virusa SARS - CoV - 2. Od ukupno 29 ispitanika kontrolne grupe koji su se odazvali na istraživanje njih 27 (93 %) je zadovoljilo sve kriterije istraživanja. Jedan ispitanik je isključen jer mu je ITM na početku istraživanja bio manji od 35 kg m^{-2} , a jedna ispitanica se nije odazvala na antropometrijsko mjerenje i uzorkovanje krvi tri tjedna nakon početka ispitivanja (slika 9).



Slika 9. Dijagram sudionika u istraživanju

5.1. Podatci prikupljeni iz upitnika

Svi ispitanici su morali ispuniti upitnik o životnim navikama i zdravstvenom stanju te upitnik o učestalosti konzumiranja hrane i pića što je bio jedan od uključujućih kriterija.

5.1.1 Podatci za eksperimentalnu grupu prikupljeni iz upitnika o životnim navikama i zdravstvenom stanju

Od 26 ispitanika koji su završili istraživanje bilo je 13 (50 %) žena i 13 (50 %) muškaraca. Medijan dobi eksperimentalne skupine je bio 58,5 godina (interkvartilni raspon od 51,3 do 64,0 godina). Prema stupnju obrazovanja najviše je bilo ispitanika sa završenom srednjom školom, njih 22 (85 %) te 2 (7,5 %) sa završenom osnovnom školom i 2 (7,5 %) s višom/visokom stručnom spremom. U anamnezi njih 8 (31 %) navodi postojanje tumora dok ih 18 (69 %) do vremena ispitivanja nije imalo dijagnosticiranu tumorsku bolest. Najveći dio ispitanika, njih 24 (92 %) navodi da boluje od više kroničnih bolesti/komorbiditeta pretilosti od kojih samo 2 (8 %) ne navodi postojanje kroničnih bolesti (izuzev pretilosti). Najčešći komorbiditeti su hipertenzija koju navodi 23 (88 %) ispitanika, zatim dijabetes tipa 2 19 (66 %) ispitanika te dislipidemiju koju navodi 18 ispitanika (69 %). Među ispitanicima je 24 (92 %) nepušača i 2 (8 %) pušača. Ispitanici su najčešće bili izloženi pesticidima, herbicidima i insekticidima prilikom radova u vrtu i to svega nekoliko puta godišnje i to njih 6 (23 %), uz navedenu izloženost njih 4 navodi i izloženost drugim ksenobioticima. Najveći broj ispitanika ima sjedilački način života, njih 16 (62 %), dok njih 10 (38 %) najčešće navodi za tjelesnu aktivnost šetnju i fizički rad u kući. Detaljan prikaz podataka prikazan je u tablici 9.

Tablica 9. Podatci za eksperimentalnu grupu prikupljeni iz upitnika o životnim navikama i zdravstvenom stanju

	S	Dob	St.sp.	Tumori	Kronične bolesti	Pušenje	Izloženost/trajanje	Tjelesna aktivnost
1	Ž	60	SSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
2	M	55	SSS	Ne	Hipertenzija, dislipidemija	Ne	1.)7.) /par mj. u g.	Ne
3	Ž	64	SSS	Štitnjača	DT2 hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Ne
4	M	48	VSS	Ne	Astma, PTSP, dislipidemija	Ne	Ne	Šetanje, vožnja biciklom
5	M	66	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Fizički rad
6	Ž	65	NSS	Ne	astma, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Ne
7	M	42	SSS	Ne	Hipertenzija, hipotireoza	Ne	1.)4.)11.)12.) / 2 – 3x g.	Ne
8	M	66	SSS	Štitnjača	Hipotireoza hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Ne
9	M	51	SSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
10	Ž	61	VSS	Kolon, nos	DT2, hipertenzija	Ne	1.)4.) / 2 – 3x g.	Ne
11	Ž	52	SSS	Ne	Hipertenzija, DT2, dislipidemija	Da	Ne	Šetanje
12	M	55	SSS	Ne	Sinusitis, psorijaza, artritis, DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	1.)7.) / 2 – 3x g.	Fizički rad, vožnja biciklom, folklor
13	Ž	56	NSS	Maternica	Astma, DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Ne
14	Ž	67	SSS	Jajnik, dojaka	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Rekreacija za žene
15	M	57	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Ne
16	Ž	46	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Ne
17	M	50	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	1.)/ 2 – 3x g.	Fizički rad
18	M	68	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Šetanje
19	M	59	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, osteoartritis	Ne	Ne	Ne
20	Ž	61	VSS	Kolon	DT2, hipertenzija	Ne	Ne	Ne
21	M	41	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Da	Ne	Ne
22	Ž	64	SSS	Štitnjača, fibroadenom	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Šetanje
23	Ž	64	SSS	Štitnjača	DT2, hipertenzija, dislipidemija	Ne	Ne	Šetanje
24	M	43	SSS	Ne	DT2, hipertenzija	Ne	1.)/ 2 – 3x g.	Ne
25	Ž	58	SSS	Ne	DT2, Hipertenzija, fibrilacija atrijska, dislipidemija, hiperuricemija	Ne	Ne	Ne
26	Ž	60	SSS	Ne	DT2, hipertenzija, dislipidemija, hipotireoza	Ne	Ne	Šetanje

S – spol; Ž – žensko; M – muško; St.sp. – stručna sprema; NSS – niža stručna sprema; SSS – srednja stručna sprema; VSS – viša/visoka stručna sprema; DT2 – dijabetes tipa 2; 1.) proizvodnja/upotreba pesticida, herbicida, fungicida ili insekticida, 4.) Piljenje, pjeskarenje/brušenje lakiranog ili impregniranog drveta; 7.) Rad sa životinjama; 11.) bojama; 12.) lakovima za drvo, kemijskim tretmanima drva

5.1.2. Podatci za kontrolnu grupu prikupljeni iz upitnika o životnim navikama i zdravstvenom stanju

Od ukupno 27 ispitanika u kontrolnoj grupi je bilo 23 žena i 4 muškaraca s medijanom dobi od 45,5 godina (interkvartilni raspon od 37,4 do 54,8 godina). Stratifikacijom prema stupnju obrazovanja najviše je bilo ispitanika sa završenom višom/visokom stručnom spremom, njih 15 (56 %), 9 (33 %) sa srednjom stručnom spremom, te 3 (11 %) sa završenom osnovnom školom. Jedna osoba (4 %) navodi postojanje tumora u anamnezi, a 12 (44 %) ih navodi kronične bolesti od kojih najčešće hipertenziju njih 6 (22 %). Unutar grupe je bilo svega 3 pušača (11 %) i 24 nepušača (89 %). Izloženost ksenobioticima unutar godine dana navodi svega 5 ispitanika i to različitim izvorima i trajanju izloženosti. Nikakvu tjelesnu aktivnost nije navelo 13 (48 %) ispitanika, a 14 njih navodi niz različitih aktivnosti te dužine i dinamike trajanja istih (tablica 10).

Tablica 10. Podatci za kontrolnu grupu prikupljeni iz upitnika o životnim navikama i zdravstvenom stanju

	S	Dob	St.sp.	Tumori	Kronične bolesti	Pušenje	Izloženost/trajanje	Tjelesna aktivnost
1	Ž	29	SSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Povremeno joga, hodanje 2 – 3 x tj.
2	Ž	41	SSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	Ž	39	SSS	Ne	Ne	Ne	7.) svakodnevno	Povremeno šetnja
4	Ž	44	VSS	Ne	Hipertenzija	Ne	1.) povremeno	Povremeno šetnja cca 5 km
5	Ž	46	VSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
6	Ž	46	VSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Hodanje 2x tj. zimi, proljeće i ljeto 5x
7	M	26	NSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
8	Ž	65	VSS	Ne	Hipertenzija	Ne	Ne	Povremeno šetnja
9	Ž	64	VSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
10	Ž	49	VSS	Ne	Endometrijoza	Ne	1.) 12.) 5 - 10 x god.	Vježbanje 1 - 2 x tj.
11	Ž	36	VSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Rekreativno teretana 8 x mj.
12	Ž	41	VSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Svakodnevna šetnja, planinarenje 1x tj.
13	M	51	SSS	Ne	Ne	Ne	4.) 12.) 2 - 3x god	Planinarenje vikendom
14	Ž	36	SSS	Ne	Hashimoto tireoiditis	Da	Ne	Šetnja 4x mj.
15	Ž	63	NSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Šetnja 3x tj.
16	Ž	35	SSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Svakodnevna šetnja 3 - 4 km
17	Ž	30	VSS	Ne	Hipotireoza	Ne	Ne	Ne
18	Ž	38	SSS	Ne	Hipertenzija, anksioznost	Da	Ne	Ne
19	Ž	61	NSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
20	Ž	48	VSS	Jajnici	Hipotireoza	Ne	Ne	Ne
21	Ž	58	VSS	Ne	Sarkoidoza pluća, hipotireoza, hipertenzija	Ne	Ne	Ne
22	M	61	VSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
23	M	60	VSS	Ne	Hipertenzija	Ne	Ne	Vježbanje 2 x tj., bazen 2 x mj.
24	Ž	49	SSS	Ne	Hipertenzija	Ne	Ne	Ne
25	Ž	40	VSS	Ne	Astma	Ne	Ne	Ne
26	Ž	46	SSS	Ne	Anksioznost s paničnim napadima, hipertenzija, policistični jajnici	Da	5.) 5 x tjedno	Ne
27	Ž	27	VSS	Ne	Ne	Ne	Ne	Vježbanje 30 min dnevno

S – spol; Ž – žensko; M – muško; St.sp. – stručna sprema; NSS – niža stručna sprema; SSS – srednja stručna sprema; VSS – viša/visoka stručna sprema; DT2 – dijabetes tipa 2; 1.) proizvodnja/upotreba pesticida, herbicida, fungicida ili insekticida, 4.) Piljenje, pjeskarenje/brušenje lakiranog ili impregniranog drveta; 7.)Rad sa životinjama; 11.) bojama; 12.) lakovima za drvo, kemijskim tretmanima drva

Stratifikacijom ispitanika pa dobi i spolu nije utvrđena razlika prema spolu između dvije grupe ispitanika dok je nađena statistički značajna razlika ispitanika prema dobi (tablica 11).

Tablica 11. Stratifikacija ispitanika prema spolu¹ i dobi²

	Eksperimentalna grupa		Kontrolna grupa		p-vrijednost*
	M	Ž	M	Ž	
Spol					
Broj (udio %)	13 (50 %)	13 (50 %)	4 (15 %)	23 (85 %)	0,622
Dob	58,5 (51,3 – 64,0)		45,5 (37,4 – 54,8)		0,001

¹Vrijednosti su izražene apsolutnim vrijednostima (udjelima); ²vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon) *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). S – spol; Ž – žensko; M – muško

5.1.3. Prosječan dnevni unos energije i hranjivih tvari u ispitanika kontrolne i eksperimentalne grupe procijenjen upitnikom o učestalosti konzumacije hrane i pića

Sva 53 ispunjena i prikupljena prehrambena upitnika obrađena su predloženim računalnim programom FETA. Analizom su dobiveni podatci o prosječnom dnevnom unosu energije, proteina, masti, ugljikohidrata, alkohola, vitamina i mineralnih tvari, ali i podatci o prosječnom dnevnom unosu određenih prehrambenih kategorija. Analizom unosa energije ispitanika iz daljnje analize, zbog nerealnog unosa, su izostavljena dva prehrambena upitnika iz eksperimentalne grupe i to zbog izrazito niskog prosječnog dnevnog unosa energije (479 kcal) te zbog izrazito visokog prosječnog dnevnog unosa energije (12728 kcal) (Willett, 2013).

Analizom podataka dobivenih računalnim programom FETA nije nađena statistički značajna razlika u prosječnom dnevnom unosu energije, proteina, masti, ugljikohidrata, alkohola, vitamina i mineralnih tvari, niti u unosu određenih prehrambenih kategorija definiranih programom FETA između dvije grupe prije ispitivanja (tablica 12–15).

Tablica 12. Prosječni dnevni unos pojedine skupine namirnica procijenjene FFQ-om eksperimentalne i kontrolne grupe¹

Parametar	Ekperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Alkoholna pića (g)	8,68 (0 – 23)	3,5 (0 – 35,77)	0,934
Žitarice i proizvodi od žitarica (g)	177,67 (139,16 – 228,62)	202,87 (142,41 – 305,94)	0,944
Jaja i proizvodi od jaja (g)	21,5 (7 – 21,5)	14 (3,5 – 21,5)	0,644
Masti i ulja (g)	6,7 (3,1 – 11,09)	5,91 (3,99 – 12,21)	0,957
Ribe i riblji proizvodi (g)	19,25 (14,77 – 46,43)	27,23 (16,17 – 35,35)	0,713
Voće (g)	130,675 (81,98 – 189,15)	129,55 (78,88 – 224,08)	0,663
Meso i mesni proizvodi (g)	147,4 (113,07 – 177,97)	114,98 (89,23 – 160,76)	0,069
Mlijeko i mliječni proizvodi (g)	69,79 (27,1 – 122,96)	78,88 (26,66 – 132,21)	0,994
Bezalkoholna pića (g)	490,6 (413,4 – 605,33)	626,76 (300 – 826,4)	0,573
Orašasti plodovi i sjemenke (g)	2,1 (1,58 – 4,2)	10,27 (2,1 – 19,36)	0,150
Krumpir (g)	71,39 (52,31 – 113,04)	77,69 (38,33 – 89,35)	0,512
Juhe i umaci (g)	84,3 (56,75 – 117,33)	76,4 (32,2 – 127,1)	0,844
Šećeri, konzervirana hrana i grickalice (g)	13,51 (9,45 – 37,92)	27,77 (14,75 – 71,07)	0,887
Povrće (g)	231,205 (132,34 – 285,01)	195,36 (110,48 – 318,27)	0,876

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 13. Prosječni dnevni unos energije i makronutrijenata procijenjen FFQ-om eksperimentalne i kontrolne grupe¹

Parametar	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Energija (kcal)	1468,25 (1116,92 – 1920,55)	1465,19 (1231,27 – 1975,18)	0,992
Ukupni ugljikohidrati (g)	1855,14 (127,51 – 219,12)	178,01 (131,65 – 237,1)	0,994
Ukupni šećeri (g)	71,19 (55,79 – 84,05)	77,50 (61,92 – 108,91)	0,749
Proteini (g)	77,14 (62,58 – 96,18)	74,76 (57,26 – 87,11)	0,569
Ukupna mast (g)	46,83 (34,28 – 64,31)	57,29 (42,93 – 79,51)	0,823
MUFA (g)	17,23 (13,63 – 23,74)	23,05 (16,06 – 32,58)	0,713
PUFA (g)	8,68 (6,15 – 10,33)	8,04 (6,79 – 12,93)	0,830
Zasićene masne kiseline (g)	16,41 (11,97 – 20,66)	21,51 (16,13 – 30,24)	0,826
Kolesterol (mg)	289,81 (232,49 – 321,29)	231,41 (188,39 – 368,9)	0,770
Alkohol (g)	1,12 (0 – 4,28)	0,51 (0 – 3,09)	0,770

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). MUFA - mononezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated fatty acids*); PUFA - višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*); FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 14. Prosječni dnevni unos mineralnih tvari procijenjen FFQ-om eksperimentalne i kontrolne grupe¹

Parametar	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p- vrijednost*
Natrij (mg)	2211,47 (1819,09 – 2911,16)	2148,63 (1647,97 – 3111,68)	0,826
Kloridi (mg)	3128,30 (2682 – 4366,22)	3041,22 (2403,5 – 4518,47)	0,894
Kalcij (mg)	485,06 (385,46 – 639,2)	571,35 (479,75 – 775,65)	0,713
Fosfor (mg)	1094,64 (831,04 – 1303,61)	1078,83 (833,07 – 1367,82)	0,980
Magnezij (mg)	253,77 (201,95 – 286,14)	258,45 (186,67 – 308,46)	0,927
Kalij (mg)	2625,24 (2148,09 – 3622,11)	2715,74 (2192,71 – 3678,72)	0,944
Željezo (mg)	10,77 (7,94 – 12,18)	7,98 (7,27 – 12,26)	0,830
Bakar (mg)	1,39 (1,19 – 1,63)	1,06 (0,92 – 1,69)	0,826
Cink (mg)	8,35 (6,76 – 10,23)	8,29 (5,65 – 9,79)	0,392
Selen (µg)	71,56 (54,97 – 83,82)	51,30 (42,91 – 78,75)	0,497
Mangan (mg)	2,78 (2,04 – 3,21)	2,69 (1,86 – 4,02)	0,830

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 15. Prosječni dnevni unos vitamina procijenjen FFQ-om eksperimentalne i kontrolne grupe¹

Parametar	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
α-karoten (μg)	100,99 (20,62 – 135,97)	106,70 (97,92 – 199,07)	0,336
β-karoten (μg)	1663,94 (994,68–2461,67)	1549,72 (1057,37 – 2002,78)	0,998
Vitamin A - retinol (μg)	1033,91 (285,91–1766,39)	595,43 (211,96 – 1463,79)	0,944
Vitamin B2 - riboflavin (mg)	1,36 (1 – 1,75)	1,08 (0,84 – 1,83)	0,830
Vitamin B1 - tiamin (mg)	1,28 (0,85 – 1,59)	1,08 (0,85 – 1,74)	0,992
Vitamin B12 (μg)	7,44 (3,38 – 9,17)	5,45 (3,19 – 7,1)	0,917
Ukupni folati (μg)	247,84 (178,53 – 300,9)	186,69 (154,33 – 316,72)	0,790
Niacin (mg)	23,57 (18,63 – 25,59)	20,32 (16,11 – 28,84)	0,830
Vitamin B6 (mg)	1,70 (1,28 – 2,02)	1,52 (1,25 – 1,78)	0,562
Vitamin C (mg)	81,88 (63,16 – 115,88)	60,84 (51,44 – 98,76)	0,715
Vitamin D (μg)	2,29 (1,55 – 3,02)	1,96 (1,52 – 3,06)	0,944
Vitamin E (mg)	7,82 (5,94 – 9,77)	8,47 (6,89 – 12,68)	0,330

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Kako bi se utvrdilo eventualno podcjenjivanje i/ili neprijavlivanje ukupne konzumirane hrane dobiveni podatci o prosječnom dnevnom unosu dobiveni analizom FFQ-a podijeljeni su s vrijednostima bazalnog metabolizma dobivenog analizom sastava tijela vagom InBody 270 (Kalifornija, SAD) te uspoređeni s prosječnim dnevnim energijskim potrebama stratificiranima prema spolu i dnevnim aktivnostima. Dnevne energijske potrebe su korigirane s obzirom na stupanj aktivnosti koji su ispitanici prijavili u upitniku o životnim navikama i zdravstvenom stanju. Za osobe koje nisu prijavile tjelesnu aktivnost granične vrijednosti za usporedbu rezultata omjera prosječnog dnevnog unosa energije i vrijednosti bazalnog metabolizma su iznosile 1,55 za muškarce te 1,56 za žene, a za osobe koje su navele bilo kakvu tjelesnu aktivnost vrijednost za procjenu podcjenjivanja i/ili neprijavlivanje ukupne konzumirane hrane iznosile su 1,78 za muškarce i 1,64 za žene (WHO, 1981; Bedard i sur., 2004). Usporedbom

dobivenih rezultata o prosječnom dnevnom unosu energije s vrijednostima individualnih dnevnih potreba za energijom prilagođenih prema spolu i tjelesnoj aktivnosti ukazuju na neprijavlivanje ukupne konzumirane hrane i/ili podcjenjivanja prehrambenog unosa u FFQ-u neovisno o spolu, stupnju obrazovanja, stupnju ITM, dobi ispitanika i mjestu ispunjavanja upitnika (eksperimentalna skupina upitnike je ispunjavala u bolnici, dok je kontrolna skupina upitnike ispunjavala doma) budući da je svega troje ispitanika (kontrolne grupe) imalo vrijednosti koje su bile više od individualno postavljenih graničnih vrijednosti tj. njih 5,6 % (tablica 16 i 17).

Tablica 16. Karakteristike eksperimentalne grupe i procjena podejnjivanja prehrambenog unosa izraženog omjerom prosječnog dnevnog unosa energije i bazalnog metabolizma u usporedbi s individualnim graničnim vrijednostima dnevnih energijski potreba prilagođenih prema spolu i stupnju tjelesnih aktivnosti

	S	TA	K	U/BM	FFQ	BM (kcal)	D (g.)	SS	ITM (kg m ⁻²)		S	TA	K	U/BM	FFQ	BM (kcal)	D (g.)	SS	ITM (kg m ⁻²)
1	Ž	Ne	1,56	0,571	971	1702	60	SSS	50,9	14	Ž	Um	1,64	1,635	2536	1551	67	SSS	45,0
2	M	Ne	1,55	0,852	1995	2341	55	SSS	54,2	15	M	Ne	1,55	0,453	863	1903	57	SSS	44,7
3	Ž	Ne	1,56	1,244	2264	1820	64	SSS	56,1	16	Ž	Ne	1,56	7,075	12728	1799	46	SSS	50,5
4	M	Um	1,78	0,968	1983	2049	48	VSS	41,7	17	M	Um	1,78	0,551	1160	2106	50	SSS	35,7
5	M	Um	1,78	0,226	479	2120	66	SSS	50,2	18	M	Um	1,78	0,543	895	1647	68	SSS	43,6
6	Ž	Ne	1,56	1,169	1863	1594	65	NSS	50,0	19	M	Ne	1,55	0,772	1511	1958	59	SSS	36,4
7	M	Ne	1,55	0,879	2096	2385	42	SSS	54,8	20	Ž	Ne	1,56	0,932	1588	1704	61	VSS	41,3
8	M	Ne	1,55	0,479	988	2060	66	SSS	37,5	21	M	Ne	1,55	0,549	1197	2180	41	SSS	43,8
9	M	Ne	1,55	0,645	1425	2209	51	SSS	49,8	22	Ž	Um	1,64	0,745	1299	1744	64	SSS	52,2
10	Ž	Ne	1,56	0,960	1698	1769	61	VSS	46,6	23	Ž	Um	1,64	0,832	1369	1645	64	SSS	49,1
11	Ž	Um	1,64	0,465	845	1815	52	SSS	57,5	24	M	Ne	1,55	0,758	1720	2269	43	SSS	50,9
12	M	Um	1,78	0,452	989	2188	55	SSS	41,3	25	Ž	Ne	1,56	1,153	1900	1648	58	SSS	51,6
13	Ž	Ne	1,56	1,225	2056	1679	56	NSS	51,7	26	Ž	Um	1,64	0,814	1361	1672	60	SSS	46,1

S – spol (Ž – žensko; M – muško); SS – stručna sprema (N – niža; S – srednja; V – viša/visoka); ITM – indeks tjelesne mase; U/BM – omjer prosječnog dnevnog energijskog unosa i bazalnog metabolizma; Um – umjerena tjelesna aktivnost; TA – tjelesna aktivnost; K – kriterij; D – dob; g – godine; BM – bazalni metabolizam dobiven analizom sastava tijela vagom InBody 270

Tablica 17. Karakteristike kontrolne grupe i procjena podejnjivanja prehrambenog unosa izraženog omjerom prosječnog dnevnog energijskog unosa i bazalnog metabolizma u usporedbi s individualnim graničnim vrijednostima dnevnih energijski potreba prilagođenih prema spolu i stupnju tjelesnih aktivnosti s obilježenim vrijednostima višim od graničnih vrijednosti (*).

	S	TA	K	U/BM	FFQ	BM (kcal)	D (g.)	SS	ITM (kg m ⁻²)		S	TA	K	U/BM	FFQ	BM (kcal)	D (g.)	SS	ITM (kg m ⁻²)
1	Ž	Um	1,64	0,531	871	1638	29	SSS	39,4	15	Ž	Um	1,64	0,993	1289	1299	63	NSS	42,1
2	Ž	Ne	1,56	0,677	1347	1990	41	SSS	42,5	16	Ž	Um	1,64	0,594	1011	1702	35	SSS	49,2
3	Ž	Um	1,64	2,791*	4564	1635	39	SSS	42,1	17	Ž	Ne	1,56	0,710	1409	1984	30	VSS	45,3
4	Ž	Um	1,64	0,951	1465	1541	44	VSS	45,3	18	Ž	Ne	1,56	1,391	2255	1621	38	SSS	43,4
5	Ž	Ne	1,56	0,815	1156	1418	46	VSS	36,3	19	Ž	Ne	1,56	0,427	656	1537	61	NSS	42,7
6	Ž	Um	1,64	0,826	1173	1420	46	VSS	36,2	20	Ž	Ne	1,56	1,006	1710	1700	48	VSS	43,2
7	M	Ne	1,55	1,180	2906	2462	26	NSS	37,7	21	Ž	Ne	1,56	0,969	1651	1703	58	VSS	41,6
8	Ž	Um	1,64	0,685	927	1354	65	VSS	41,5	22	M	Ne	1,55	0,819	1934	2363	61	VSS	52,7
9	Ž	Ne	1,56	1,157	1713	1481	64	VSS	37,3	23	M	Um	1,78	0,719	1305	1816	60	VSS	45,3
10	Ž	Um	1,64	2,372*	3472	1464	49	VSS	37,8	24	Ž	Ne	1,56	0,964	1410	1463	49	SSS	35,4
11	Ž	Um	1,64	0,927	1420	1532	36	VSS	45,9	25	Ž	Ne	1,56	1,180	1822	1544	40	VSS	38,0
12	Ž	Um	1,64	1,540	2723	1768	41	VSS	40,9	26	Ž	Ne	1,56	1,568*	2744	1750	46	SSS	43,6
13	M	Um	1,78	0,770	1631	2117	51	SSS	40,9	27	Ž	Um	1,64	0,571	886	1551	27	VSS	42,4
14	Ž	Um	1,64	1,275	2016	1581	36	SSS	40,7										

S – spol (Ž – žensko; M – muško); SS – stručna sprema (N – niža; S – srednja; V – viša/visoka); ITM – indeks tjelesne mase; U/BM – omjer prosječnog dnevnog energijskog unosa i bazalnog metabolizma; Um – umjerena tjelesna aktivnost; TA – tjelesna aktivnost; K – kriterij; D – dob; g – godine; BM – bazalni metabolizam dobiven analizom sastava tijela vagom InBody 270

Tako prikupljeni podatci iz FFQ-a poslužili su i za izračun DII-a. Budući da nije nađena statistički značajna razlika između prehrambenih navika dvije grupe ispitanika, očekivano nije bilo ni statistički značajne razlike u vrijednostima DII-a između dvije grupe na početku ispitivanja. DII za eksperimentalnu grupu je izračunat iz dnevnog prosjeka namirnica trodnevnog VLCD, dok je za kontrolnu grupu izračunat iz podataka prikupljenih 24-satnim prisjećanjem unosa hrane i pića. Usporedbom vrijednosti DII nakon nutritivnih intervencija, nađena je statistički značajna razlika u DII u eksperimentalnoj grupi prije i nakon nutritivne intervencije te između dijeta eksperimentalne i kontrolne grupe. Statistički značajna razlika DII izračunatog iz FFQ-a kontrolne grupe i vrijednosti DII SRD u ne postoji. Vrijednosti DII dijete primijenjene za bolničko liječenje pretilosti više su u usporedbi s vrijednostima DII-a SRD i u usporedbi s DII-om eksperimentalne grupe prije ispitivanja izračunatih iz FFQ-a (tablica 18).

Tablica 18. Usporedba vrijednosti DII između grupa, prije i nakon nutritivnih intervencija¹

Parametar	Prije VLCD	Nakon VLCD	p ₁ *	Prije SRD	Nakon SRD	p ₂ *	p ₃ *	p ₄ *
DII	1,94 (0,23 – 3,34)	6,25 (6,25 – 6,25)	<0,001	2,26 (0,92 – 3,23)	2,74 (1,21 – 4,28)	0,714	0,871	<0,001

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). VLCD – dijeta izrazito niskog sadržaja energije (engl. *Very Low Calorie Diet*); SRD – standardna redukcijaska dijeta; DII – upalni indeks prehrane (engl. *Dietary Inflammatory Index*); p₁ – prije i nakon VLCD; p₂ – prije i nakon SRD; p₃ – prije nutritivnih intervencija između grupa; p₄ – nakon nutritivnih intervencija između grupa

5.1.4. Usporedba SRD i podataka 24-satnog upitnika

Usporedbom sastava predložene SRD i sastava stvarno konzumirane hrane dobivene iz prosjeka dva dana temeljem podataka prikupljenih 24-satnim prisjećanjem unosa hrane i pića ispitanika kontrolne grupe nađene su znatne razlike (tablica 19). Sve tako provjerene vrijednosti su niže u usporedbi s predloženom SRD osim količine konzumiranog kolesterola.

Tablica 19. Razlika predloženog dnevnog unosa energije i hranjivih tvari SRD i ostvarenog unosa procijenjenog metodom 24-satnog prisjećanja unosa hrane i piće¹

Parametar	Razlika SRD i podataka iz 24-satnog prisjećanja hrane i pića	p-vrijednost*
Energija (kcal)	140,88 ± 332,60	0,001
Ukupni ugljikohidrati (g)	22,47 ± 43,22	0,001
Ukupni proteini (g)	12,79 ± 17,05	<0,001
Ukupne masti (g)	6,44 ± 16,39	0,005
Udio ugljikohidrata (%)	0,67 ± 7,92	0,515
Udio proteina (%)	1,04 ± 3,49	0,346
Udio masti (%)	1,93 ± 6,62	0,031
Kolesterol (mg)	-19,62 ± 95,68	0,031
MUFA (g)	4,94 ± 6,18	<0,001
PUFA (g)	5,67 ± 3,57	<0,001
Zasićene masne kiseline (g)	0,78 ± 4,96	<0,001
Vlakna (g)	-8,80 ± 16,40	0,006

¹Vrijednosti su izražene kao razlika srednjih vrijednosti odstupanja sa standardnim devijacijama. te statističkom značajnosti. *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). SRD – standardna redukcijska dijeta; MUFA – mononezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*); PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

5.2. Podatci dobiveni mjerenjima

Učinci nutritivnih intervencija promatrali su se parametrima oštećenja DNA, antropometrijskim i biokemijskim parametrima. U svrhu procjene učinka nutritivnih intervencija na DNA određivana su: primarna DNA oštećenja (medijan intenziteta repa kometa), oksidacijska oštećenja (medijan FPG intenziteta repa kometa), trajna DNA oštećenja (učestalost MN, NPB, NBUD), citoksični učinci (učestalost apoptoza i nekroza) i citostatični učinak (indeks proliferacije). Učinci nutritivnih intervencija na antropometrijske parametre promatrani su mjerenjem tjelesne mase, ITM, masom masnog i mišićnog tkiva te udjelom masnog tkiva, a na biokemijske parametre određivanjem glukoze, inzulina, izračunom HOMA-IR, triglicerida, ukupnim kolesterolom, LDL-kolesterolom, HDL-kolesterolom, leukocitima i hsCRP-om.

Vrijednosti rezultata svih navedenih parametra uspoređivani su na sljedeći način:

- vrijednosti eksperimentalne i kontrolne grupe prije nutritivnih intervencija
- vrijednosti rezultata prije i nakon VLCD u eksperimentalne grupe te prije i nakon SRD u kontrolne grupe
- vrijednosti između eksperimentalne i kontrolne grupe nakon nutritivnih intervencija
- te je određena povezanost rezultata dobivenih obradom prehrambenih upitnika i parametara oštećenja DNA eksperimentalne i kontrolne grupe

5.2.1. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe

5.2.1.1 Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe

Razlika u vijabilnosti stanica između dvije grupe ispitanika nađena je na razini primarnog oštećenja DNA (mjereno medijanom intenziteta komet repa dok kod oksidacijskog oštećenja navedena razlika nije nađena) i jednom parametru trajnog oštećenja DNA (mjereno učestalosti NBUD), citotoksičnosti (indeks proliferacije) te učestalosti nekroza. Na razini grupe, primarna oštećenja DNA i učestalost nekroza su veće u eksperimentalnoj grupi, dok je biljeg trajnog oštećenja veći u kontrolnoj grupi promatrano medijanima (tablica 20).

Rezultati obje grupe uspoređeni su i s referentnim intervalima. Navedenom usporedbom za sve parametre utvrđen je veći udio pacijenata s vrijednostima iznad gornje granice referentnih intervala u eksperimentalnoj grupi u usporedbi s kontrolnom grupom (osim za vrijednosti NBUD kao biljega trajnog oštećenja DNA).

Tablica 20. Usporedba rezultata biljega oštećenja DNA eksperimentalne i kontrolne grupe prije nutritivnih intervencija¹

Parametar	Referentni interval	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Biljezi primarnog oštećenja DNA				
Medijan intenziteta repa kometa (%)	0 – 9	9,78 (58 %) (7,91 – 12,26)	6,12 (22 %) (4,33 – 8,31)	0,005
Medijan intenziteta FPG repa kometa (%)	0 – 4	3,98 (50 %) (2,08 – 10,16)	4,45 (56 %) (2,33 – 8,42)	0,944
Biljezi trajnog oštećenja DNA				
Učestalost MN	< 12,5	10,0 (35 %) (7,1 – 13,4)	6,5 (15 %) (4,8 – 9,0)	0,356
Učestalost NPB	0 – 10	5,0 (27 %) (2,6 – 10,4)	4,5 (0 %) (2,5 – 6,5)	0,715
Učestalost NBUD	0 – 5	2,5 (8 %) (1,5 – 3,4)	8,0 (63 %) (3,5 – 10,8)	0,001
Biljeg citostatičnosti				
Indeks proliferacije (NDI)	1,3 – 2,2	1,2 (65 %) (1,1 – 1,4)	2,0 (0 %) (1,8 – 2,3)	<0,001
Biljezi citotoksičnosti				
Učestalost apoptoza (%)	0 – 7	8,5 (58 %) (4,3 – 11,8)	5,0 (26 %) (3,0 – 7,5)	0,714
Učestalost nekroza (%)	= 0	16 (61,5 %)	26 (96,3 %)	0,020
	> 0	10 (38,5 %)	1 (3,7 %)	
	0 – 9	(19 %)	(0 %)	

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon), a za kategorijske varijable apsolutnim i relativnim frekvencijama te za sve parametre udjelom rezultata izvan referentnih intervala (%). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). FPG- formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN- mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPM – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*)

5.2.1.2. Usporedba vrijednosti rezultata antropometrijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe

Gotovo svi mjereni parametri izraženi medijanom su bili niži u kontrolnoj grupi u usporedbi s eksperimentalnom grupom na početku ispitivanja (izuzetak je udio masnog tkiva), a statistički značajna razlika je nađena u tjelesnoj masi, ITM i masi mišićnog tkiva (tablica 21).

Tablica 21. Antropometrijski parametri eksperimentalne i kontrolne grupe prije nutritivnih intervencija¹

Parametar	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Tjelesna masa (kg)	131,2 (123,3 – 142,7)	118,2 (103,5 – 128,8)	0,005
ITM (kg m ⁻²)	49,5 (43,7 – 51,4)	42,1 (38,7 – 43,5)	0,005
Masa masnog tkiva (kg)	64,9 (56,4 – 70,0)	58,0 (49,8 – 64,8)	0,101
Masa mišićnog tkiva (kg)	38,1 (33,9 – 46,3)	32,5 (29,4 – 36,2)	0,004
Udio masnog tkiva (%)	0,46 (0,42 – 0,52)	0,50 (0,48 – 0,52)	0,859

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). ITM – indeks tjelesne mase

5.2.1.3 Usporedba vrijednosti rezultata biokemijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe

Podatci biokemijskih parametara određenih na početku istraživanja ne ukazuju na razlike u koncentracijama parametara homeostaze glukoze, lipidnog statusa i upale između eksperimentalne i kontrolne grupe. Iako nitko od sudionika kontrolne grupe nije naveo u upitniku o životnim navikama i zdravstvenom stanju da boluje od dijabetesa, njih 33 % imalo je vrijednosti glukoze natašte veće od gornje granice referentnog intervala što može upućivati ili na dijabetes ili predijabetes (temeljem pojedinačnih izmjerenih vrijednosti glukoze natašte). U obje skupine ispitanika više od polovice njih imalo je vrijednosti kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida i hsCRP-a izvan granica referentnog intervala. Granična vrijednost od 1,82 za izračunate vrijednosti HOMA-IR ukazuje da 92 % ispitanika eksperimentalne grupe ima inzulinsku rezistenciju te 96 % kontrolne grupe. Raspon vrijednosti HOMA-IR za predijabetes iznose od 1,82 do 3,63, a vrijednosti rezultata HOMA-IR unutar navedenog raspona prije dijete imalo je 77 % ispitanika eksperimentalne grupe i 48 % kontrolne grupe (tablica 22) (Horáková i sur., 2019).

Tablica 22. Vrijednosti biokemijskih parametara eksperimentalne i kontrolne grupe prije nutritivnih intervencija¹

Parametar	Referentni interval	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Homeostaza glukoze				
Glukoza (mmol L ⁻¹)	4,4 – 6,4	7,5 (62 %) (6,2 – 9,1)	6,2 (33 %) (5,6 – 6,8)	0,141
Inzulin (mU L ⁻¹)	2 – 22	16,4 (19 %) (12,4 – 20,1)	14,1 (22 %) (11,7 – 19,6)	0,933
HOMA-IR	< 1,82	5,1 (92 %) (4,1 – 7,7)	3,8 (96 %) (3,0 – 5,6)	0,754
Lipidni status				
Kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 5	5,3 (62 %) (4,6 – 5,9)	6,0 (67 %) (4,6 – 7,0)	0,944
HDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	Ž > 1,2 M > 1,0	1,2 (23 %) (0,9 – 1,5)	1,2 (30 %) (1,1 – 1,4)	0,831
LDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 3	3,1 (58 %) (2,5 – 3,9)	4,1 (67 %) (2,8 – 4,6)	0,811
Trigliceridi (mmol L ⁻¹)	< 1,7	2,10 (69 %) (1,63 – 2,68)	1,80 (52 %) (1,35 – 2,30)	0,239
Upalni parametri				
Leukociti (10 ⁹ L ⁻¹)	3,4 – 9,7	7,31 (23 %) (6,63 – 9,02)	8,08 (19 %) (7,14 – 9,30)	0,917
hsCRP (mg L ⁻¹)	< 5	6,63 (62 %) (3,51 – 14,75)	7,09 (67 %) (4,00 – 10,68)	0,898

¹Vrijednosti su izražene medijanima, udjelom ispitanika s rezultatima izvan referentnih intervala u postotku i interkvartilnim rasponima. *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom (p < 0,05). M – muško; Ž – žensko; HOMA-IR – Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*)

5.2.2. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije i nakon nutritivnih intervencija u ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe

5.2.2.1. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije i nakon VLCD u eksperimentalnoj grupi

Rezultati svih mjerenih parametara oštećenja DNA u eksperimentalnoj grupi nakon VLCD ukazuju na poboljšanje parametara, no samo su razlike vrijednosti za učestalost MN i NPB (biljezi trajnih oštećenja DNA), te apoptoza (citotoksični učinci) prije i nakon dijete bili statistički značajno različiti. Nakon dijete udio ispitanika s rezultatima unutar referentnih intervala je povećan u svim mjerenim parametrima osim za učestalost nekroza gdje nije došlo

do promjene. Nakon dijete svi ispitanici grupe imali su vrijednosti parametara trajnog oštećenja DNA unutar referentnih intervala (tablica 23).

Tablica 23. Rezultati parametara oštećenja DNA¹

Parametar	Referentni interval	Prije VLCD	Nakon VLCD	P-vrijednost*
Biljezi primarnog oštećenja DNA				
Medijan intenziteta repa kometa (%)	0 – 9	9,78 (58 %) (7,91 – 12,26)	8,21 (38 %) (5,74 – 11,64)	0,258
Medijan intenziteta FPG repa kometa (%)	0 – 4	3,98 (50 %) (2,08 – 10,16)	2,18 (42 %) (0,28 – 7,76)	0,241
Biljezi trajnog oštećenja DNA				
Učestalost MN	< 12,5	10,0 (35 %) (7,1 – 13,4)	5,0 (0 %) (3,1 – 6,5)	<0,001
Učestalost NPB	0 – 10	5,0 (27 %) (2,6 – 10,4)	2,3 (0 %) (1,0 – 4,4)	0,002
Učestalost NBUD	0 – 5	2,5 (8 %) (1,5 – 3,4)	1,5 (0 %) (0,6 – 2,4)	0,063
Biljeg citostatičnosti				
Indeks proliferacije (NDI)	1,3 – 2,2	1,2 (65 %) (1,1 – 1,4)	1,3 (38 %) (1,2 – 1,7)	0,912
Biljezi citotoksičnosti				
Učestalost apoptoza (%)	0 – 7	8,5 (58 %) (4,3 – 11,8)	4,0 (23 %) (2,0 – 5,8)	<0,001
Učestalost nekroza (%)	= 0	16 (61,5 %)	15 (57,7 %)	0,703
	> 0	10 (38,5 %)	11 (42,3 %)	
	0 – 9	(19 %)	(19 %)	

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon), a za kategorijske varijable apsolutnim i relativnim frekvencijama te za sve parametre udjelom rezultata izvan referentnih intervala (%). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). VLCD - dijeta izrazito niskog sadržaja energije (engl. *Very Low Calorie Diet*); FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN -mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*)

5.2.2.2. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije i nakon SRD u kontrolnoj grupi

SRD je u kontrolnoj grupi dovela je do poboljšanja gotovo svih mjerenih parametara oštećenja DNA osim vrijednosti za MN, no samo su razlike vrijednosti za učestalost apoptoza (citotoksični učinci) prije i nakon dijete bile statistički značajno različite kada se rezultati promatraju medijanom. Učinak dijete na udio ispitanika s rezultatima izvan referentnih intervala doveo je do smanjenja udjela ispitanika s rezultatima MN izvan referentnog intervala

i povećanja udjela ispitanika s rezultatima NPB i indeksa proliferacija izvan referentnog intervala (tablica 24).

Tablica 24. Rezultati parametara oštećenja DNA¹

Parametar	Referentni interval	Prije SRD	Nakon SRD	p-vrijednost*
Biljezi primarnog oštećenja DNA				
Medijan intenziteta repa kometa (%)	0 – 9	6,12 (22 %) (4,33 – 8,31)	5,60 (11 %) (4,06 – 7,50)	0,760
Medijan intenziteta FPG repa kometa (%)	0 – 4	4,45 (56 %) (2,33 – 8,42)	3,39 (44 %) (1,48 – 5,80)	0,351
Biljezi trajnog oštećenja DNA				
Učestalost MN	< 12,5	6,5 (15 %) (4,8 – 9,0)	8,5 (11 %) (5,0 – 9,8)	0,592
Učestalost NPB	0–10	4,5 (0 %) (2,5 – 6,5)	3,0 (11 %) (1,5 – 6,3)	0,313
Učestalost NBUD	0–5	8,0 (63 %) (3,5 – 10,8)	7,0 (52 %) (2,0 – 9,0)	0,181
Biljeg citostatičnosti				
Indeks proliferacije (NDI)	1,3 – 2,2	2,0 (0 %) (1,8 – 2,3)	2,1 (4 %) (1,7 – 2,3)	0,969
Biljezi citotoksičnosti				
Učestalost apoptoza (%)	0 – 7	5,0 (26 %) (3,0 – 7,5)	2,0 (4 %) (1,0 – 4,0)	<0,001
Učestalost nekroza (%)	= 0	26 (96,3 %)	27 (100 %)	0,944
	> 0	1 (3,7 %)	0 (0 %)	
	0 – 9	(0 %)	(0 %)	

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon), za kategorijske varijable apsolutnim i relativnim frekvencijama te za sve parametre udjelom rezultata izvan referentnih intervala (%). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). SRD – standardna redukcijaska dijeta; FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN - mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*)

5.2.2.3. Učinci VLCD na antropometrijske parametre eksperimentalne grupe

Rezultati dobiveni mjerenjem antropometrijskih parametara prije i nakon VLCD pokazali su sniženje svih mjerenih parametara izuzev udjela masnog tkiva u ispitanika eksperimentalne grupe. Sve razlike vrijednosti su bile statistički značajne osim za udio masnog tkiva (tablica 25).

Tablica 25. Vrijednosti antropometrijskih parametara eksperimentalne skupine prije i nakon VLCD¹

Parametar	Prije VLCD	Nakon VLCD	p-vrijednost*
Tjelesna masa (kg)	131,2 (123,3 – 142,7)	121,8 (115,4 – 131,6)	<0,001
ITM (kg m ⁻²)	49,5 (43,7 – 51,4)	46,1 (40,5 – 48,7)	<0,001
Masa masnog tkiva (kg)	64,9 (56,4 – 70,0)	61,4 (53,3 – 66,6)	<0,001
Masa mišićnog tkiva (kg)	38,1 (33,9 – 46,3)	36,4 (31,9 – 44,4)	<0,001
Udio masnog tkiva (%)	46,4 (42,2 – 52,3)	47,5 (40,6 – 52,1)	0,167

¹Vrijednosti su izražene medijanom (interkvartilnim rasponima). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). VLCD – dijeta izrazito niskog sadržaja energije (engl. *Very Low Calorie Diet*); ITM – indeks tjelesne mase

5.2.2.4. Učinci SRD na antropometrijske parametre kontrolne grupe

Rezultati učinka SRD na antropometrijske parametre u kontrolnoj grupi identični su rezultatima učinka VLCD u eksperimentalnoj grupi. Dakle i SRD uzrokovala je statistički značajno sniženje svih mjerenih antropometrijskih parametara izuzev udjela masnog tkiva u ispitanika kontrolne grupe (tablica 26).

Tablica 26. Vrijednosti antropometrijskih parametara kontrolne skupine prije i nakon SRD¹

Parametar	Prije SRD	Nakon SRD	p-vrijednost*
Tjelesna masa (kg)	118,2 (103,5 – 128,8)	115,1 (100,2 – 122,6)	<0,001
ITM (kg m ⁻²)	42,1 (38,7 – 43,5)	40,0 (37,1 – 42,3)	<0,001
Masa masnog tkiva (kg)	58,0 (49,8 – 64,8)	56,6 (47,4 – 62,1)	<0,001
Masa mišićnog tkiva (kg)	32,5 (29,4 – 36,2)	31,5 (28,5 – 35,7)	<0,001
Udio masnog tkiva (%)	50,3 (48,3 – 51,6)	50,2 (48,1 – 51,3)	0,431

¹Vrijednosti su izražene medijanom (interkvartilnim rasponima). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). SRD – standardna redukcijska dijeta; ITM – indeks tjelesne mase

5.2.2.5. Učinci VLCD na biokemijske parametre eksperimentalne grupe

Analizom biokemijskih podataka utvrđeno je da su nakon VLCD vrijednosti svih biokemijskih parametara u eksperimentalnoj grupi statistički značajno snižene izuzev koncentracija inzulina i hsCRP-a te da je broj ispitanika čiji se rezultati nalaze unutar referentnog intervala povećan tj. broja ispitanika čiji se rezultati nalaze izvan referentnog intervala smanjen. Jedini porast broja ispitanika čije su vrijednosti izvan referentnog intervala je kod HDL-kolesterola (tablica 27). Udio ispitanika koji su unutar raspona graničnih vrijednosti HOMA-IR kojima je definiran predijabetes, smanjen je s 77 % na 31 % nakon dijete.

Tablica 27. Vrijednosti biokemijskih parametara eksperimentalne grupe prije i nakon VLCD¹

Parametar	Referentni interval	Prije VLCD	Nakon VLCD	p-vrijednost*
Homeostaza glukoze				
Glukoza (mmol L ⁻¹)	4,4 – 6,4	7,5 (58 %) (6,2 – 9,1)	5,5 (42 %) (5,3 – 7,3)	<0,001
Inzulin (mU L ⁻¹)	2 – 22	16,4 (19 %) (12,4 – 20,1)	12,0 (15 %) (8,4 – 16,2)	0,050
HOMA-IR	< 1,82	5,1 (92 %) (4,1 – 7,7)	3,1 (81 %) (2,0 – 5,6)	0,001
Lipidni status				
Kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 5	5,3 (62 %) (4,6 – 5,9)	4,0 (19 %) (3,0 – 4,8)	<0,001
HDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	Ž > 1,2 M > 1,0	1,2 (23 %) (0,9 – 1,5)	0,9 (69 %) (0,8 – 1,2)	<0,001
LDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 3	3,1 (58 %) (2,5 – 3,9)	2,3 (23 %) (1,4 – 2,9)	<0,001
Trigliceridi (mmol L ⁻¹)	< 1,7	2,10 (69 %) (1,63 – 2,68)	1,65 (42 %) (1,40 – 2,10)	0,002
Upalni parametri				
Leukociti (10 ⁹ L ⁻¹)	3,4 – 9,7	7,31 (23 %) (6,63 – 9,02)	6,92 (4 %) (5,86 – 7,73)	0,016
hsCRP (mg L ⁻¹)	< 5	6,63 (62 %) (3,51 – 14,75)	7,00 (54 %) (2,42 – 11,72)	0,380

¹Vrijednosti su izražene medijanima, udjelom ispitanika s rezultatima izvan referentnih intervala u postotku i interkvartilnim rasponima. *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). VLCD - dijeta izrazito niskog sadržaja energije (engl. *Very Low Calorie Diet*); M – muško; Ž – žensko; HOMA-IR - Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*)

5.2.2.6. Učinci SRD na biokemijske parametre kontrolne grupe

Slično kao i kod VLCD, SRD je dovela do poboljšanja svih mjerenih biokemijskih parametara no broj parametara koji je statistički značajno smanjen je manji u usporedbi s eksperimentalnom grupom i to su: vrijednosti za HOMA-IR, inzulin, kolesterol, HDL-kolesterol i leukocite (tablica 28). Udio ispitanika s vrijednostima unutar referentnog intervala za sve parametre je povećan osim za HDL-kolesterol gdje je isti smanjen. Udio pacijenta čije su vrijednosti za HOMA-IR indeks unutar raspona zabilježenih kod predijabetesa je smanjen sa 48 % na 37 %.

Tablica 28. Vrijednosti biokemijskih parametara kontrolne grupe prije i nakon SRD¹

Parametar	Referentni interval	Prije SRD	Nakon SRD	p-vrijednost*
Homeostaza glukoze				
Glukoza (mmol L ⁻¹)	4,4 – 6,4	6,2 (33 %) (5,6 – 6,8)	5,7 (26 %) (5,3 – 6,5)	0,272
Inzulin (mU L ⁻¹)	2 – 22	14,1 (22 %) (11,7 – 19,6)	11,8 (7 %) (9,0 – 18,0)	0,049
HOMA-IR	< 1,82	3,8 (96 %) (3,0 – 5,6)	3,0 (85 %) (2,3 – 4,8)	0,025
Lipidni status				
Kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 5	6,0 (67 %) (4,6 – 7,0)	5,2 (52 %) (4,3 – 6,2)	0,009
HDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	Ž > 1,2 M > 1,0	1,2 (30 %) (1,1 – 1,4)	1,1 (48 %) (0,9 – 1,3)	<0,001
LDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 3	4,1 (67 %) (2,8 – 4,6)	3,3 (63 %) (2,6 – 4,2)	0,097
Trigliceridi (mmol L ⁻¹)	< 1,7	1,80 (52 %) (1,35 – 2,30)	1,40 (30 %) (1,20 – 1,80)	0,062
Upalni parametri				
Leukociti (10 ⁹ L ⁻¹)	3,4 – 9,7	8,08 (19 %) (7,14 – 9,30)	7,06 (7 %) (6,28 – 8,00)	0,005
hsCRP (mg L ⁻¹)	< 5	7,09 (67 %) (4,00 – 10,68)	5,78 (56 %) (3,75 – 10,34)	0,944

¹Vrijednosti su izražene medijanima, udjelom ispitanika s rezultatima izvan referentnih intervala u postotku i interkvartilnim rasponima. *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom (p < 0,05). SRD – standardna redukcijska dijeta; M – muško; Ž – žensko; HOMA-IR – Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*)

5.2.3. Usporedba razlika učinaka nutritivnih intervencija na parametre oštećenja DNA, antropometrijske i biokemijske parametre eksperimentalne i kontrolne grupe

5.2.3.1. Usporedba razlika učinaka nutritivnih intervencija na oštećenja DNA

Rezultati učinka nutritivnih intervencija (VLCD i SRD) na primarna i trajna oštećenja DNA, citotoksični i citostatični efekt ukazuju da je VLCD dovela do statistički značajnog smanjenja frekvencije MN u usporedbi sa SRD, dok kod drugih mjerenih parametara nije postojala razlika (tablica 29).

Tablica 29. Razlika vrijednosti parametara oštećenja DNA nakon nutritivnih intervencija¹

Parametar	Referentni i interval	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Biljezi primarnog oštećenja DNA				
Medijan intenziteta repa kometa (%)	0 – 9	–2,91 (38 %) (–5,06 – 1,86)	–0,41(11 %) (–1,92 – 144)	0,716
Medijan intenziteta FPG repa kometa (%)	0 – 4	–0,41 (42 %) (–5,16 – 1,48)	–0,50 (44 %) (–5,86 – 2,74)	0,944
Biljezi trajnog oštećenja DNA				
Učestalost MN	< 12,5	–5,5 (0 %) (–8,1 – –2,6)	1,0 (11 %) (–2,0 – 2,0)	0,001
Učestalost NPB	0 – 10	–3 (0 %) (–7,3 – 0,0)	–1,0 (11 %) (–3,5 – 2,3)	0,205
Učestalost NBUD	0 – 5	–0,5 (0 %) (–2,0 – 0,5)	–1,0 (52 %) (–6,8 – 2,8)	0,831
Biljeg citostatičnosti				
Indeks proliferacije (NDI)	1,3 – 2,2	0,04 (38 %) (–0,04 – 0,16)	–0,02 (4 %) (–0,29 – 0,31)	0,958
Biljezi citotoksičnosti				
Učestalost apoptoza (%)	0 – 7	–4,0 (23 %) (–9,0 – –1,0)	–3,0 (4 %) (–4,5 – –0,5)	0,937
Učestalost nekroza (%)	= 0 u = 0	12 (46,2 %)	26 (96,3 %)	0,943
	> 0 u = 0	3 (11,5 %)	1 (3,7 %)	
	= 0 u > 0	4 (15,4 %)	/	
	> 0 u > 0	7 (26,9 %)	/	
	0 – 9	(19 %)	(0 %)	

¹Vrijednosti su izražene kao medijan (interkvartilni raspon), a za kategorijske varijable apsolutnim i relativnim frekvencijama te za sve parametre udjelom rezultata izvan referentnih intervala (%). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*)

5.2.3.1. Usporedba razlike učinaka nutritivnih intervencija na antropometrijske parametre

Usporedbom rezultata nakon nutritivnih intervencija vrijednosti za tjelesnu masu i ITM statistički su značajno razlikovale između dvije grupe ispitanika, dok u ostalim vrijednostima nije nađena statistički značajna razlika (tablica 30).

Tablica 30. Razlika vrijednosti antropometrijskih parametara nakon nutritivnih intervencija¹

Parametar	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Tjelesna masa (kg)	-7,5 (-10,6 – -6,7)	-4 (-4,9 – -2,4)	0,010
ITM (kg m ⁻²)	-2,8 (-3,5 – -2,2)	-1,5 (-1,8 – -0,9)	<0,001
Masa masnog tkiva (kg)	-4,4 (-5,3 – -3,0)	-2,5 (-3,2 – -1,1)	0,138
Masa mišićnog tkiva (kg)	-2,1 (-2,9 – -1,4)	-0,8 (-1,5 – -0,4)	0,150
Udio masnog tkiva (%)	-1,1 (-1,7 – -0,4)	-0,3 (-1,1 – 0,3)	0,830

¹Vrijednosti su izražene medijanom (interkvartilnim rasponima). *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). ITM – indeks tjelesne mase

5.2.3.2. Usporedba razlike učinaka nutritivnih intervencija na biokemijske parametre

Iako su obje djetete pokazale povoljan učinak na biokemijske parametre, rezultati VLCD u odnosu na SRD statistički se značajno razlikuju u vrijednostima kolesterola, HDL-kolesterola i LDL-kolesterola (tablica 31).

Tablica 31. Razlike vrijednosti biokemijskih parametara nakon nutritivnih intervencija¹

Parametar	Referentni interval	Eksperimentalna grupa	Kontrolna grupa	p-vrijednost*
Homeostaza glukoze				
Glukoza (mmol L ⁻¹)	4,4 – 6,4	– 1,1 (42 %) (– 1,8 – –5,3)	– 0,2 (26 %) (– 0,7 – 0,1)	0,059
Inzulin (mU L ⁻¹)	2 – 22	– 3,2 (15 %) (– 7,6 – 0,1)	– 4,0 (7 %) (– 7,5 – 0,1)	0,994
HOMA-IR	< 1,82	– 1,4 (81 %) (– 4,0 – –0,5)	– 1,1 (85 %) (– 2,1 – 0,0)	0,564
Lipidni status				
Kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 5	– 1,3 (19 %) (– 1,5 – –0,8)	– 0,6 (52 %) (– 1,0 – –0,1)	0,008
HDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	Ž > 1,2 M > 1,0	– 0,2 (69 %) (– 0,3 – –0,1)	– 0,1 (48 %) (– 0,2 – –0,1)	0,025
LDL-kolesterol (mmol L ⁻¹)	< 3	– 0,8 (23 %) (– 1,4 – –0,4)	– 0,3 (63 %) (– 0,8 – 0,1)	0,002
Trigliceridi (mmol L ⁻¹)	< 1,7	– 0,55 (42 %) (– 0,80 – – 0,05)	– 0,20 (30 %) (– 0,50 – 0,20)	0,562
Upalni parametri				
Leukociti (10 ⁹ L ⁻¹)	3,4 – 9,7	– 1,05 (4 %) (– 1,68 – – 0,10)	– 0,78 (7 %) (– 1,69 – – 0,31)	0,889
hsCRP (mg L ⁻¹)	< 5	– 0,98 (54 %) (– 3,31 – 1,46)	– 1,49 (56 %) (– 2,36 – 0,77)	0,645

¹Vrijednosti su izražene medijanima, udjelom ispitanika s rezultatima izvan referentnih intervala u postotku i interkvartilnim rasponima. *Razlika između grupa testirana je post hoc testom nakon prilagodbe modela s varijablom od interesa kao zavisnom varijablom, grupom i vremenskom točkom kao nezavisnim faktorima te identifikatorom ispitanika kao nasumičnim odsječkom ($p < 0,05$). M – muško; Ž – žensko; HOMA-IR – Homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*)

5.2.4. Povezanost rezultata skupina namirnica i nutrijenata s parametrima oštećenja DNA dobivenih iz FFQ-a i 24-satnog prisjećanja unosa hrane i pića

Povezanost rezultata dobivenih obradom FFQ-a i parametara oštećenja DNA eksperimentalne i kontrolne grupe nije pokazala nikakvu međusobnu povezanost (tablica 32 – 37)

Tablica 32. Povezanost prosječnog unosa pojedine skupine namirnica procijenjene FFQ-om s parametrima oštećenja DNA u eksperimentalnoj grupi iskazani koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti (0,999)

Parametar	Apoptoza	FPG	MN	NBUD	NPB	NDI	Komet
Alkoholna pića (g)	-0,32	0,02	0,16	0,10	-0,04	0,29	0,00
Žitarice i proizvodi od žitarica (g)	-0,30	-0,32	-0,13	-0,10	0,03	-0,07	-0,21
Jaja i proizvodi od jaja (g)	0,00	-0,04	0,23	0,33	0,10	0,15	0,19
Masti i ulja (g)	0,43	-0,16	-0,20	0,10	0,14	0,20	0,12
Ribe i riblji proizvodi (g)	-0,33	-0,13	0,17	0,32	0,33	0,15	-0,08
Voće (g)	-0,04	0,05	0,16	-0,18	0,07	-0,49	0,13
Meso i mesni proizvodi (g)	-0,37	0,02	-0,01	-0,17	0,06	-0,23	-0,21
Mlijeko i mliječni proizvodi (g)	-0,03	-0,28	-0,13	-0,46	0,03	0,03	-0,02
Bezalkoholna pića (g)	-0,24	-0,18	0,08	-0,40	0,08	0,07	-0,14
Orašasti plodovi i sjemenke (g)	0,18	-0,03	-0,44	0,07	-0,21	0,20	0,24
Krumpir (g)	-0,20	0,00	-0,26	-0,01	-0,13	0,05	0,21
Juhe i umaci (g)	-0,02	-0,28	-0,13	0,19	0,37	-0,02	-0,10
Šećeri, konzervirana hrana i grickalice (g)	-0,08	-0,04	-0,03	0,29	0,42	-0,39	-0,33
Povrće (g)	-0,17	-0,14	-0,25	0,08	0,19	-0,38	0,10

FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division index*); FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 33. Povezanost prosječnog unosa energije i hranjivih tvari procijenjenog FFQ-om s parametrima oštećenja DNA u eksperimentalnoj grupi iskazanima koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti (0,999)

Parametar	Apoptoza	FPG	MN	NBUD	NPB	NDI	Komet
Energija (kcal)	-0,53	-0,21	-0,01	-0,06	0,34	-0,25	-0,23
Ukupni ugljikohidrati (g)	-0,43	-0,35	-0,04	-0,05	0,21	-0,33	-0,21
Ukupni šećeri (g)	-0,27	-0,24	0,11	-0,17	0,17	-0,35	-0,07
Proteini (g)	-0,55	-0,25	-0,03	-0,05	0,30	-0,36	-0,06
Ukupna mast (g)	-0,36	-0,07	-0,12	0,13	0,40	-0,06	-0,09
MUFA (g)	-0,36	-0,01	-0,11	0,15	0,31	0,00	0,01
PUFA (g)	-0,31	0,03	-0,09	0,23	0,37	0,06	-0,01
Zasićene masne kiseline (g)	-0,30	-0,09	-0,13	0,08	0,40	-0,07	-0,12
Kolesterol (mg)	-0,31	-0,15	0,06	0,19	0,48	-0,10	-0,02
Alkohol (g)	-0,27	0,07	0,25	0,11	-0,01	0,39	0,00
Natrij (mg)	-0,23	-0,14	-0,23	0,10	0,22	0,13	-0,15
Kloridi (mg)	-0,22	-0,16	-0,28	0,06	0,20	0,15	-0,12
Kalcij (mg)	-0,45	-0,32	-0,13	-0,14	0,23	-0,18	-0,06
Fosfor (mg)	-0,44	-0,26	-0,10	-0,12	0,35	-0,26	-0,09
Magnezij (mg)	-0,44	-0,17	-0,10	-0,10	0,40	-0,21	0,01
Kalij (mg)	-0,45	-0,08	-0,12	-0,14	0,19	-0,28	0,04
Željezo (mg)	-0,34	-0,06	-0,11	0,00	0,42	-0,08	-0,03
Bakar (mg)	-0,24	0,10	0,19	0,35	0,56	0,24	-0,22
Cink (mg)	-0,38	-0,23	-0,10	-0,24	0,22	-0,20	-0,06
Selen (µg)	-0,38	-0,23	0,05	0,07	0,34	-0,10	-0,21
Mangan (mg)	-0,03	-0,31	-0,46	-0,08	0,21	0,03	0,07

FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division indeks*); MUFA i PUFA – mononezasićene i višestruko zasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids* i engl. *polyunsaturated fatty acids*); FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 34. Povezanost prosječnog unosa vitamina procijenjenih FFQ-om s parametrima oštećenja DNA u eksperimentalnoj grupi iskazani koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti (0,999)

Parametar	Apoptoza	FPG	MN	NBUD	NPB	NDI	Komet
α -karoten (μg)	-0,23	-0,19	-0,29	0,31	0,22	-0,37	-0,05
β -karoten (μg)	-0,23	-0,25	-0,20	-0,12	0,05	-0,40	0,21
Vitamin A - retinol (μg)	0,02	0,04	0,25	0,29	0,48	0,32	-0,07
Vitamin B ₂ (mg)	-0,20	-0,11	0,06	0,05	0,42	0,05	-0,12
Vitamin B ₁ (mg)	-0,25	0,01	-0,16	0,12	0,04	-0,03	-0,02
Vitamin B ₁₂ (μg)	-0,14	-0,02	0,21	0,06	0,46	0,28	-0,01
Ukupni folati (μg)	-0,29	-0,25	-0,22	0,03	0,27	-0,22	0,03
Niacin (mg)	-0,41	-0,14	-0,06	-0,02	0,26	-0,11	0,00
Vitamin B ₆ (mg)	-0,44	-0,11	-0,17	-0,12	0,13	-0,40	0,10
Vitamin C (mg)	-0,28	-0,24	0,02	-0,30	0,01	-0,36	0,10
Vitamin D (μg)	-0,30	-0,04	0,00	-0,07	0,23	0,10	0,01
Vitamin E (mg)	-0,32	-0,02	-0,08	0,29	0,40	-0,12	-0,03

FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division index*); FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 35. Povezanost prosječnog unosa pojedine skupine namirnica procijenjene FFQ-om s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazani koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti (0,999)

Parametar	Apoptoza	FPG	MN	NBUD	NPB	NDI	Komet
Alkoholna pića (g)	-0,03	0,40	-0,13	-0,07	0,31	0,01	-0,01
Žitarice i proizvodi od žitarica (g)	-0,14	-0,39	0,01	0,02	-0,15	0,12	-0,10
Jaja i proizvodi od jaja (g)	-0,22	-0,09	0,31	0,27	0,07	-0,07	-0,02
Masti i ulja (g)	-0,07	-0,09	-0,04	0,10	-0,05	0,20	-0,12
Ribe i riblji proizvodi (g)	0,08	-0,55	0,18	0,27	0,10	-0,50	0,12
Voće (g)	0,13	-0,17	0,26	0,22	0,28	-0,25	0,01
Meso i mesni proizvodi (g)	-0,12	0,11	-0,15	-0,04	0,01	-0,08	0,12
Mlijeko i mliječni proizvodi (g)	0,09	-0,06	0,13	0,19	0,08	-0,20	0,42
Bezalkoholna pića (g)	0,15	-0,17	-0,01	0,24	0,13	-0,47	0,05
Orašasti plodovi i sjemenke (g)	0,18	-0,17	0,10	0,20	-0,09	-0,07	0,17
Krumpir (g)	-0,22	-0,01	-0,31	-0,29	0,36	0,07	-0,21
Juhe i umaci (g)	0,16	-0,24	0,00	0,49	0,13	-0,11	-0,02
Šećeri, konzervirana hrana i grickalice (g)	0,02	-0,18	-0,16	-0,28	0,05	0,10	-0,14
Povrće (g)	-0,13	-0,23	0,17	0,09	0,11	0,05	0,04

FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division index*); FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 36. Povezanost prosječnog unosa energije i hranjivih tvari procijenjenog FFQ-om s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazani koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti (0,999)

Parametar	Apoptoza	FPG	MN	NBUD	NPB	NDI	Komet
Energija (kcal)	0,03	-0,23	0,06	0,08	0,15	0,13	-0,10
Ukupni ugljikohidrati (g)	-0,05	-0,26	0,02	0,00	0,21	0,11	-0,18
Ukupni šećeri (g)	0,01	-0,26	0,06	-0,06	0,26	0,02	-0,22
Proteini (g)	-0,02	-0,13	0,19	0,26	0,08	-0,09	0,13
Ukupna mast (g)	0,17	-0,31	0,00	0,10	-0,11	-0,01	0,02
MUFA (g)	0,16	-0,32	-0,06	0,08	-0,14	-0,01	0,03
PUFA (g)	0,23	-0,36	0,07	0,16	-0,15	-0,07	0,17
Zasićene masne kiseline (g)	0,10	-0,29	0,05	0,04	-0,04	0,01	-0,03
Kolesterol (mg)	-0,18	-0,18	0,22	0,25	-0,03	-0,03	0,13
Alkohol (g)	-0,11	0,40	-0,09	0,05	0,37	0,05	-0,07
Natrij (mg)	-0,02	-0,21	0,20	0,33	0,11	0,02	0,03
Kloridi (mg)	-0,03	-0,25	0,19	0,31	0,06	0,02	0,04
Kalcij (mg)	0,00	-0,17	0,17	0,17	0,09	-0,06	0,09
Fosfor (mg)	-0,09	-0,17	0,25	0,21	0,10	-0,06	0,17
Magnezij (mg)	-0,03	-0,13	0,11	0,15	0,11	-0,07	0,05
Kalij (mg)	-0,13	-0,06	0,17	0,12	0,23	-0,07	-0,02
Željezo (mg)	-0,16	-0,14	0,15	0,13	0,09	0,04	-0,03
Bakar (mg)	-0,07	-0,11	0,09	0,08	0,14	0,13	0,04
Cink (mg)	-0,15	-0,12	0,17	0,14	-0,02	-0,02	0,06
Selen (µg)	-0,21	-0,12	0,24	0,20	0,02	0,02	0,13
Mangan (mg)	-0,06	-0,37	0,15	0,13	-0,02	-0,12	-0,05

FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division indeks*); MUFA i PUFA – mononezasićene i višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated fatty acids* i engl. *Polyunsaturated fatty acids*); FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Tablica 37. Povezanost prosječnog unosa vitamina procijenjenih FFQ-om s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazani koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti (0,999)

Parametar	Apoptoza	FPG	MN	NBUD	NPB	NDI	Komet
α -karoten (μg)	-0,15	-0,43	0,07	-0,02	-0,25	0,05	0,10
β -karoten (μg)	0,00	-0,39	0,11	0,17	0,05	-0,09	0,10
Vitamin A – retinol (μg)	-0,01	0,04	0,07	0,07	-0,02	0,19	0,14
Vitamin B ₂ – riboflavin (mg)	0,00	-0,05	0,25	0,24	0,21	-0,14	0,27
Vitamin B ₁ – tiamin (mg)	-0,06	-0,01	0,14	0,15	0,26	-0,03	0,10
Vitamin B ₁₂ (μg)	-0,05	-0,04	0,11	0,14	0,00	0,01	0,42
Ukupni folati (μg)	-0,17	-0,28	0,27	0,14	0,07	-0,05	0,08
Niacin (mg)	0,01	0,04	-0,03	0,16	0,16	-0,10	0,19
Vitamin B ₆ (mg)	-0,25	-0,04	0,11	0,07	0,07	0,05	0,01
Vitamin C (mg)	0,00	-0,28	0,10	0,14	0,19	-0,15	0,05
Vitamin D (μg)	0,05	0,05	-0,14	0,11	-0,03	-0,02	0,16
Vitamin E (mg)	0,14	-0,22	0,06	0,08	0,04	-0,01	0,06

FPG – formamido-pirimidin-DNA-glikozilaza (engl. *formamidopyrimidine-DNA glycosylase*); MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division indeks*); FFQ – upitnik o učestalosti unosa hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*)

Povezanost rezultata dobivenih obradom 24-satnog upitnika unosa hrane i pića i parametara oštećenja DNA kontrolne grupe nije pokazala nikakvu međusobnu povezanost (tablica 38 – 42).

Tablica 38. Povezanost prosječnog unosa energije i makronutijenata procijenjenih metodom 24-h prisjećanja s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazani koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti

Parametar	Apoptoza	MN	NBUD	NPB	Komet	NDI
Energija (kcal)	0,100 0,985	0,141 0,985	0,100 0,985	0,089 0,985	0,167 0,985	-0,275 0,863
Ukupni ugljikohidrati (g)	0,289 0,844	-0,121 0,985	0,035 0,992	-0,032 0,995	0,134 0,985	-0,350 0,789
Prehrambena vlakna (g)	0,080 0,985	0,281 0,863	0,185 0,982	0,188 0,982	-0,221 0,938	-0,382 0,732
Proteini (g)	0,004 0,998	0,009 0,998	0,001 0,998	0,007 0,998	0,110 0,985	-0,094 0,985
Ukupna mast (g)	0,045 0,992	0,178 0,985	0,223 0,938	0,093 0,985	0,085 0,985	-0,096 0,985
MUFA (g)	-0,172 0,985	0,158 0,985	0,100 0,985	0,097 0,985	0,256 0,868	0,048 0,992
PUFA (g)	0,186 0,982	0,277 0,863	0,417 0,732	0,083 0,985	-0,299 0,821	-0,247 0,868
Omega-3 masne kiseline (g)	-0,037 0,992	-0,158 0,985	0,102 0,985	-0,304 0,811	0,198 0,957	-0,082 0,985
Omega-6 masne kiseline (g)	0,200 0,954	0,382 0,732	0,317 0,811	0,207 0,938	-0,513 0,732	-0,345 0,789
Zasićene masne kiseline (g)	-0,106 0,985	0,207 0,938	0,163 0,985	0,209 0,938	0,068 0,985	-0,118 0,985
Trans masne kiseline	0,046 0,992	-0,013 0,998	-0,135 0,985	0,209 0,938	-0,055 0,992	-0,258 0,868
Kolesterol (mg)	-0,065 0,985	0,078 0,985	0,114 0,985	-0,095 0,985	0,016 0,998	0,042 0,982
Alkohol (g)	-0,385 0,732	0,402 0,732	0,390 0,732	0,027 0,995	-0,323 0,811	-0,040 0,992

MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division indeks*); MUFA i PUFA – mononezasićene i višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *Monounsaturated fatty acids* i engl. *Polyunsaturated fatty acids*)

Tablica 39. Povezanost prosječnog dnevnog unosa odabranih parametara¹ procijenjenih metodom 24-h prisjećanja s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazanima koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti

Parametar	Apoptoza	MN	NBUD	NPB	Komet	NDI
Češnjak (g/dan)	-0,206 0,938	0,139 0,985	-0,077 0,985	-0,112 0,985	-0,132 0,985	-0,053 0,992
Đumbir (g/dan)	-0,028 0,995	-0,372 0,745	-0,502 0,732	-0,349 0,789	0,181 0,985	-0,307 0,811
Eugenol (g/dan)	/	/	/	/	/	/
Kofein (g/dan)	-0,200 0,954	-0,223 0,938	0,000 0,998	-0,332 0,811	-0,064 0,985	0,155 0,985
Kurkuma (g/dan)	/	/	/	/	/	/
Luk (g/dan)	-0,227 0,938	-0,216 0,938	-0,165 0,985	0,022 0,998	0,016 0,998	0,309 0,811
Origano (mg/dan)	0,061 0,985	-0,155 0,985	-0,412 0,732	-0,036 0,992	0,049 0,992	-0,320 0,811
Papar (g/dan)	-0,015 0,998	-0,216 0,938	-0,220 0,938	0,174 0,985	0,126 0,985	0,095 0,985
Ružmarin (mg/dan)	0,158 0,985	-0,098 0,985	0,064 0,985	0,149 0,985	0,067 0,985	0,255 0,868
Šafran (g/dan)	/	/	/	/	/	/
Zeleni/Crni čaj (g/dan)	-0,051 0,992	-0,328 0,811	-0,328 0,811	-0,328 0,998	-0,328 0,938	-0,328 0,998

¹ Prikazani parametri koriste se za izračun upalnog indeksa prehrane

MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division indeks*)

Tablica 40. Povezanost prosječnog unosa odabranih bioaktivnih spojeva¹ procijenjenih metodom 24-h prisjećanja s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazanima koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti

Parametar	Apoptoza	MN	NBUD	NPB	Komet	NDI
Antocijanidini (mg)	0,053 0,992	0,010 0,998	0,345 0,789	-0,054 0,992	0,028 0,995	0,092 0,985
Flav.-3-oli (mg)	0,008 0,998	-0,006 0,998	0,143 0,985	-0,078 0,985	-0,085 0,985	-0,385 0,732
Flavanoni (mg)	0,392 0,732	0,202 0,954	0,303 0,811	0,234 0,924	-0,038 0,992	-0,096 0,985
Flavoni (mg)	0,168 0,985	-0,063 0,985	-0,041 0,992	-0,028 0,995	0,035 0,992	-0,141 0,985
Flavonoli (mg)	-0,152 0,985	-0,135 0,985	-0,034 0,992	-0,113 0,985	0,081 0,985	-0,109 0,985
Izoflavoni (mg)	0,084 0,985	0,060 0,985	0,278 0,863	0,101 0,985	-0,269 0,868	-0,263 0,868

¹ Prikazani parametri koriste se za izračun upalnog indeksa prehrane

MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. *nuclear bud*); NPB – nukleoplazmatski most (engl. *nucleoplasmic bridge*); NDI – indeks proliferacije (engl. *nuclear division indeks*)

Tablica 41. Povezanost prosječnog dnevnog unosa vitamina¹ procijenjenih metodom 24-h prisjećanja s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazanima koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti

Parametar	Apoptoza	MN	NBUD	NPB	Komet	NDI
β-karoten (μg)	-0,130 0,985	-0,098 0,985	-0,233 0,924	-0,076 0,985	-0,187 0,982	-0,092 0,985
Niacin (mg)	0,372 0,745	-0,069 0,985	0,333 0,811	0,044 0,992	-0,067 0,985	0,014 0,998
Ukupni folati (μg)	-0,021 0,998	0,262 0,868	0,060 0,985	-0,016 0,998	-0,310 0,811	-0,269 0,868
Riboflavin (Vitamin B ₂) (mg)	-0,163 0,985	0,264 0,868	0,227 0,938	-0,023 0,998	-0,091 0,985	-0,395 0,732
Tiamin (Vitamin B ₁) (mg)	-0,008 0,998	0,253 0,868	0,150 0,985	0,088 0,985	0,189 0,982	-0,292 0,838
Vitamin A (RE)	-0,114 0,985	-0,047 0,992	-0,111 0,985	-0,060 0,985	-0,261 0,868	-0,156 0,985
Vitamin B ₁₂ (μg)	-0,434 0,732	0,038 0,992	0,176 0,985	-0,392 0,732	0,048 0,992	0,114 0,985
Vitamin B ₆ (mg)	0,286 0,850	0,110 0,985	0,350 0,789	0,085 0,985	-0,072 0,985	-0,138 0,985
Vitamin C (mg)	0,464 0,732	0,133 0,985	0,210 0,938	0,126 0,985	0,023 0,998	-0,174 0,985
Vitamin D (μg)	0,260 0,868	-0,119 0,985	0,249 0,868	-0,142 0,985	0,239 0,917	0,080 0,985
Vitamin E (mg)	0,351 0,789	0,237 0,923	0,414 0,732	0,040 0,992	-0,294 0,837	-0,150 0,985

¹Prikazani parametri koriste se za izračun upalnog indeksa prehrane

MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. nuclear bud); NPB – nukleoplazmatski most (engl. nucleoplasmic bridge); NDI – indeks proliferacije (engl. nuclear division indeks)

Tablica 42. Povezanost prosječnog dnevnog unosa odabranih mineralnih tvari¹ procijenjenih metodom 24-h prisjećanja s parametrima oštećenja DNA u kontrolnoj grupi iskazanima koeficijentom korelacije i statističkom značajnosti

Parametar	Apoptoza	MN	NBUD	NPB	Komet	NDI
Željezo (mg)	-0,030 0,995	0,188 0,982	0,068 0,985	0,036 0,992	0,004 0,998	-0,250 0,868
Magnezij (mg)	0,083 0,985	0,103 0,985	0,003 0,998	0,014 0,998	0,063 0,985	-0,422 0,732
Selen (μg)	-0,089 0,985	0,007 0,998	-0,109 0,985	-0,112 0,985	0,317 0,811	0,013 0,998
Cink (mg)	-0,128 0,985	0,170 0,985	0,062 0,985	0,143 0,985	0,001 0,998	-0,103 0,985

¹prikazani parametri koriste se za izračun upalnog indeksa prehrane

MN – mikronukleus; NBUD – nuklearni pup (engl. nuclear bud); NPB – nukleoplazmatski most (engl. nucleoplasmic bridge); NDI – indeks proliferacije (engl. nuclear division indeks)

6. Rasprava

6.1. Povezanost oštećenja DNA i hranjivih sastojaka dobivenih iz FFQ-a i 24-satnog prisjećanja unosa hrane i pića

Utjecaj prehrane na stabilnost DNA je višestruk i složen. Poznat je učinak pojedinih makronutrijenata i mikronutrijenata u brojnim metaboličkim putevima koji utječu na stabilnost DNA (Fenech, 2020a; Kaźmierczak-Barańska i sur., 2020; Del Bo' i sur., 2021). Ladeira i sur. su 2017. godine istraživali utjecaj 23 komponente hrane dobivenih obradom FFQ upitnika na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja DNA mjerena komet, FPG komet i mikronukleus testom u 44 zdrava ispitanika (Ladeira i sur., 2017). Među najznačajnijih 23 komponenti iz hrane u tom istraživanju pokazana je: začuđujuća značajna negativna korelacija unosa energije i vrijednosti komet testa; pozitivna korelacija MN i NBUD s proteinima; pozitivna korelacija frekvencije NP s količinom ukupnih ugljikohidrata, vlakana, niacinom, kalcijem, magnezijem i cinkom. Iako nije doseglo značajnost, istraživanje je također pokazalo negativnu korelaciju omega-3 masnih kiselina s vrijednostima komet, FPG komet testa, te NBUD i NPB frekvencijama; negativnu korelaciju vitamina B₁₂ i folata sa svim parametrima triju genotoksičnih testova; a za sve njih je dobro poznat učinak na stabilnost DNA. Najvažniji vitamini i ostale komponente hrane nisu prelazili statistički značajnu korelacijsku vrijednost od 0,5; što ukazuje na slabu međusobnu povezanost podataka komponenata hrane i oštećenja DNA u zdravih pojedinaca. Iako su autori zaključili da je mogući razlog izostanka očekivanih korelacija subjektivno ispunjavanje FFQ upitnika koje je moglo dovesti do krivog unosa količina namirnica koje nije moguće ispraviti (Ladeira i sur., 2017), i to kod ispitivanja zdravih pojedinaca, slični učinak je nađen i kod osoba s pretilošću u istraživanju Włodarczyk i sur. iz 2018. U tom istraživanju na 88 pretilih žena s ITM-om većim od 30 kg m⁻² ali ne i većim od 35 kg m⁻² pokazano je da nakon višestrukih regresijskih analiza, jedino dob, i unos energije utječu (koreliraju) na oštećenja DNA, te da vitamin C i E možda imaju potencijalni učinak, ali ništa drugo iz upitnika o hrani.

Ovo istraživanje na osobama s pretilošću s ITM preko 35 kg m⁻² je pokazalo izostanak povezanosti komponenata hrane i oštećenja DNA. U ovom slučaju, utvrđeno je postojanje podcjenjivanja ili neprijavlivanja ukupne konzumirane hrane nakon obrade ispunjenih FFQ upitnika, vjerojatno radi srama ili neshvaćanja samih ispitanika o stvarnoj količini hrane (namirnica) koju konzumiraju, kao što su sugerirali i Ladeira i sur. u svom istraživanju iz 2017. godine. U nizu objavljenih znanstvenih radova do sada, zaključeno je da je podcjenjivanje ili neprijavlivanje ukupne količine hrane češće u osoba s pretilošću i u osoba s većom tjelesnom

masom (Voss i sur., 1997; Mendez i sur., 2004; Bedard i sur., 2004; Pfrimer i sur., 2015; Kanellakis i sur., 2021).

Obzirom da je analizom SRD i 24-satnih prisjećanja unosa hrane i pića sudionika kontrolne grupe nađena statistički značajna razlika, napravljena je dodatna analiza povezanosti prehrambenih komponenti i oštećenja DNA usporedbom navedenih upitnika i oštećenja DNA. Rezultati ove analize također nisu utvrdili povezanost prehrambenih komponenti i oštećenja DNA. Włodarczyk i sur. (2018) su također u svom istraživanju na pretilim ženama koristili 24-satno prisjećanje unosa hrane i pića, s vrijednostima i ustrojem istraživanja slično ovom istraživanju, pa smo rezultate pokušali usporediti s njihovima. I oni su nakon višestrukih regresijskih analiza utvrdili samo slabu negativnu korelaciju ($r < 0,5$) vitamina C i E na primarna oštećenja DNA u osoba s pretilošću, dok vrijednosti energije, udjela proteina, ugljikohidrata, masti, zasićenih masnih kiselina, MUFA, PUFA, retinola i β -karotena nisu pokazale statistički značajnu povezanost s oštećenjima DNA. Iako dob može imati utjecaj na veću pojavnost DNA oštećenja u starijih osoba, Del Bo' i sur. (2021) su pokazali analizom dnevnika prehrane uz vaganje, da je samo 29 komponenti prehrane pokazalo neki utjecaj, ali da su od svih njih folna kiselina, vitamin C, E i B₆ pokazali negativnu korelaciju sa pojavnošću oksidacijskih oštećenja DNA, te da je kolesterol pokazao pozitivnu korelaciju s primarnim oštećenjima DNA (Del Bo' i sur., 2021). Ostale komponente iz prehrambenog upitnika ponovno nisu pokazale značajni učinak, potvrđujući opet da je ukupan unos energije jedan je od važnijih promjenjivih čimbenika koji utječu na stabilnost DNA.

Učinak različitih nutritivnih intervencija na stabilnost DNA promatran je u narednim poglavljima doktorskog rada.

6.2. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe

Razlika između dvije grupe ispitanika prije nutritivnih intervencija nađena je u parametrima oštećenja DNA, antropometrijskim mjerenjima i dobi. Unutar parametara grupe oštećenja DNA razlike su nađene na razini primarnog oštećenja mjenog komet testom, trajnog oštećenja mjenog NBUD, citostatičnosti mjenog indeksom proliferacije te učestalosti nekrotičnih stanica. Statistički značajne razlike u vrijednostima oksidacijskog oštećenja DNA, učestalosti MN, NPB te apoptotičnih stanica nisu nađene. Antropometrijska mjerenja koja su se razlikovala između dvije grupe su: tjelesna masa, ITM, te masa mišićnog tkiva. Unutar cijele grupe biokemijskih parametara nije nađena razlika između dvije grupe, kao ni u podacima dobivenih obradom prehrambenih upitnika te stratifikacijom podataka po spolu. Iako su postojale razlike između dvije grupe prije ispitivanja, u nastavku rada se promatrao učinak svake dijete prije i nakon nutritivne intervencije te na kraju i usporedba razlike učinaka dvije dijete.

6.2.1. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA prije nutritivnih intervencija eksperimentalne i kontrolne grupe

Više vrijednosti primarnog oštećenja DNA nađene su u eksperimentalnoj grupi koja je također imala više vrijednosti tjelesne mase, ITM te godine starosti u usporedbi s kontrolnom grupom. Takve razlike ukazuju na mogući endogeni utjecaj navedenih antropometrijskih parametara i dobi na stabilnost DNA. Veća oštećenja DNA u osoba s pretilošću i osoba s prekomjernom tjelesnom masom u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase nađena su u nekoliko radova no provjerom aktualne literature nisu nađeni radovi koji su uspoređivali vrijednosti antropometrijskih podataka u osoba s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$ s markerima oštećenja DNA (Hofer i sur., 2006; Bukhari i sur., 2010; Donmez-Altuntas i sur., 2014; Luperini i sur., 2015; Włodarczyk i sur., 2018; Santovito i Gendusa, 2020)

Istraživanja koja su uključivala usporedbu primarnog oštećenja DNA osoba s pretilošću i osoba s prekomjernom tjelesnom masom s osobama normalne tjelesne mase ukazuju na mogućnost linearnog odnosa ITM i primarnog oštećenja DNA (Bukhari i sur., 2010; Luperini i sur., 2015). U dva istraživanja linearnost odnosa je i potvrđena. U istraživanju Włodarczyk i sur. (2018) utvrđena je umjerena do dobra povezanost primarnog oštećenja DNA te tjelesne

mase i ITM unutar cijele promatrane grupe koju su činile osobe prekomjerne tjelesne mase i osobe s pretilošću (srednja vrijednosti ITM $33,05 \pm 2,17 \text{ kg m}^{-2}$), dok vrijednosti povezanosti oštećenja DNA s dobi nije nađena (Włodarczyk i sur., 2018). U drugom istraživanju koji je uključivao širok raspon vrijednosti ITM (od < 25 do $> 50 \text{ kg m}^{-2}$), autori Bankoglu i sur. (2022) zaključili su da postoji linearni odnos između ITM i primarnih oštećenja DNA, ali bez utjecaja dobi, spola i pušenja na oštećenja DNA (Bankoglu i sur., 2022). Rezultati navedenih istraživanja sukladni su početnim vrijednostima i razlikama između dvije grupe ispitanika na početku ovog ispitivanja; što ukazuje da dob kao varijabla ne utječe na tu razinu oštećenja DNA. Treba također napomenuti da je u eksperimentalnoj skupini prije dijete 58 % ispitanika bilo izvan referentnih vrijednosti za primarna oštećenja. Obzirom da takve vrijednosti otkrivaju pojedince koji su skloni razvoju bolesti, različitih komorbiditeta te tumora, a da su ispitanici eksperimentalne skupine već imali razvijene neke komorbiditete i bolesti, kojih je u kontrolnoj skupini bilo manje, sam komet test pomaže u otkrivanju takvih osjetljivih pojedinaca, a potvrđeno je da su kod takvih pojedinaca u bližih srodnika bili prisutni i određeni tumori. No, slično se pokazalo i kod kontrolne skupine, kod onih koji su također imali veće vrijednosti od referentnih kojih je u toj skupini bilo manje nego u eksperimentalnoj, ali ih je ipak bilo prisutno u udjelu od 22 %.

Usporedba rezultata dobivenih mikronukleus *cytome* testom kod eksperimentalne i kontrolne grupe u ovom istraživanju ukazuje na postojanje statistički značajne razlike u učestalosti NBUD i nekrotičnih stanica te proliferacijskog indeksa. Učestalost NBUD je veća u kontrolnoj grupi, a učestalost nekrotičnih stanica u eksperimentalnoj grupi, dok je proliferacijski indeks niži u eksperimentalnoj skupini. Iako nije bila značajno veća, i učestalost apoptotičnih stanica je bila veća u eksperimentalnoj skupini, a to je oznaka koliko stanica kreće u programiranu staničnu smrt zbog nemogućnosti popravka prevelikih oštećenja DNA koja su se nakupila u stanicima.

Istraživanje Donmez-Altuntas i sur. (2014) nije pokazalo razlike u učestalosti MN, NPB, te NBUD između osoba različitog stupnja pretilosti niti u oksidacijskim oštećenjima DNA (Donmez-Altuntas i sur., 2014). Oksidacijska DNA oštećenja nisu bila različita niti u ovom istraživanju između dvije skupine. Iako je uključujući kriterij za sudjelovanje u ovom istraživanju bio $\text{ITM} \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$, razlika između dvije grupe ispitanika u ITM prije ispitivanja je postojala, no razlike u učestalosti MN i NPB između dvije grupe nije nađena kao ni u navedenom istraživanju. No opet, veće su bile vrijednosti u eksperimentalnoj skupini, s 35 % pojedinaca izvan referentnih vrijednosti, dok ih je u kontrolnoj skupini bilo 15 %. Potrebno je naglasiti da usporedbom rezultata komet testa za one s višim vrijednostima od onih za zdravu

populaciju i onih vrijednosti za komet za zdravu populaciju, potvrđeni su gotovo svi pojedinci koji su u obitelji imali povijest tumora. Iako možda na prvi pogled činjenica da u kontrolnoj skupini nije bilo većih vrijednosti za MN od dopuštenih, a onda opet ta skupina ima značajno veće vrijednosti za NBUD, s pojedincima koji imaju vrijednosti veće od referentnih (63 %) samo govori o nestabilnosti genoma i te tzv. kontrolne skupine s ITM većim od 35 kg m^{-2} , ali koja ne posjeduje još trajnu genomsku nestabilnost u obliku MN koji predstavlja gubitak dijela kromosoma ili cijelog kromosoma, dok NPB, osim što može biti i preteča nastanka MN, je zapravo marker kojim se pokazuje stvaranje i izbacivanje prekomjerno umnožene (nepotrebne) DNA koja može ometati stabilnost samo genoma, ali ujedno pokazuje da i mehanizmi popravka DNA još uvijek dobro funkcioniraju i rade svoju ulogu. Također postoje nova istraživanja koja pokazuju da mehanizmi popravaka kod osoba s ITM preko 30 kg m^{-2} slabije ili sporije rade, a s ITM preko 35 kg m^{-2} se čak neki mehanizmi popravka i gase (Setayesh i sur., 2018).

Moguće objašnjenje viših vrijednosti NBUD u kontrolnoj skupini je velika interindividualna razlika u obnovi DNA zbog polimorfizama gena odgovornih za obnovu DNA i gena koji reguliraju dostupnost mikronutrijenata/kofaktora enzima ključnih za metabolizam i obnovu DNA (Ladeira i sur., 2014; Santovito i Gendusa, 2020). Nedostatak folne kiseline i/ili vitamina B₁₂, kao važnih građevnih elemenata i elemenata u popravku DNA, može uzrokovati nastanak MN i NBUD (Ladeira i sur., 2017; Fenech, 2020b). Medijan koncentracije folne kiseline kontrolne grupe prije istraživanja iznosio je $11,7 \text{ nmol L}^{-1}$ što je statistički značajno niže ($p=0,047$) u usporedbi s medijanom eksperimentalne grupe od $16,65 \text{ nmol L}^{-1}$ (navedeni podatci nisu prikazani u radu) te ja navedeno vjerojatno utjecalo na brzinu i mogućnost popravka, a samim time i vjerojatno dijelom i na učestalost i razlike u NBUD između dvije grupe sudionika ovog istraživanja, iako se pravi utjecaj na mikronukleus *cytome* test osjeti kada je velika i dugotrajna deficijencija folata ili kada se napravi intervencija (Fenech, 2001; Wagner i sur., 2021). Također manjak folata, veća nestabilnost genoma (mjereno MN frekvencijom) utječu također i na smanjenje brzine proliferacije stanica. Kada je indeks proliferacije 2, to govori da u staničnoj kulturi postoji među mono-, bi-, tri- i tetranuklearnim stanicama najviše onih koje su binuklearne, tj. koje su prošle uspješno prvu diobu u kulturi. Za vrijeme diobe, kada se umnožava sadržaj DNA koji će biti podijeljen u dvoje nove stanice kćeri, popravljaju se DNA oštećenja, te nepopravljena oštećenja dolaze (izlaze) u obliku MN, NBUD i NPB. Smanjeni indeks govori da bi vjerojatnost da se uspjelo natjerati stanice da se podijele i da NDI bude bliže broju 2, učestalost oštećenja u eksperimentalnoj grupi vjerojatno bila i veća, a također i pokazuje da ITM, i ostala stanja i drugi antropometrijski i biokemijski parametri utječu na to da se stanice sporije dijele ili prestaju dijeliti, što također ukazuje na promjene u stabilnosti

genoma i zdravoj održivosti samog organizma (organa, čovjeka). U radu Donmez-Altuntas i sur. (2014) pronađena je negativna korelacija između ITM i NDI, što potvrđuje ono što je već napisano za eksperimentalnu grupu (Donmez-Altuntas i sur., 2014).

Iako komet test i mikronukleus *cytome* test otkrivaju različite tipove oštećenja DNA, njihovo zajedničko korištenje međusobno se upotpunjuje, ali i pruža potencijalna objašnjenja razlika i sličnosti eksperimentalne i kontrolne grupe, te otkriva pojedince koji bi se trebali individualizirano pratiti radi mogućeg pogoršanja ili razvoja komorbiditeta.

6.3. Usporedba rezultata parametara oštećenja DNA, antropometrijskih i biokemijskih parametara prije i nakon nutritivnih intervencija u ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe

6.3.1. Utjecaj VLCD na oštećenja DNA

Zdravstveni doprinos gubitka tjelesne mase dokazan je već kod gubitka od 2,5 % tjelesne mase, dok se gubitak od 5 % smatra klinički značajnim (Ryan i Yockey, 2017a). Gubitak tjelesne mase od 5 do 10 % značajno smanjuje niz kardiometaboličkih rizičnih čimbenika što bi moglo ujedno doprinijeti smanjenju oštećenja DNA tj. genetskoj stabilnosti (Soares i sur., 2016; Durrer Schutz i sur., 2019). Utjecaj pretilosti na oštećenja DNA u osoba s pretilošću je dokumentiran, no malo je istraživanja o utjecaju gubitka tjelesne mase na oštećenja DNA (Bankoglu i Stopper, 2022). Mogući razlozi za mali broj takvih istraživanja su: učinkovit gubitak tjelesne mase i održavanje iste teško je postići na razini grupe u istraživanju, jer do smanjenja oštećenja DNA najčešće dolazi tek nakon značajnog gubitka tjelesne mase, te je promjenu oštećenja DNA moguće otkriti u pojedinaца s izrazito visokim ITM (Bankoglu i sur., 2018b), ili nakon dugog vremenskog perioda, u kojem i dosta pojedinaца i odustane od dijete. Iako je u ovom istraživanju došlo do značajnog gubitka tjelesne mase u izrazito pretilih osoba, trojedni VLCD nije doveo do značajnog smanjenja primarnog oštećenja DNA, ali je značajni utjecaj na trajna oštećenja DNA zabilježen mjerenjem MN, te NPB, iako nije štetno naglasiti da se i učestalost apoptotičnih stanica smanjila za pola. VLCD je time u promatranom vremenskom periodu imao utjecaj (doduše ne statistički značajan) na citotoksičnost, i vrlo malim dijelom na citostatičnost (NDI se za 0,1 poboljšao), ali bez utjecaja na učestalost nekrotičnih stanica čija se frekvencija nije smanjila. Pregledom literature nisu nađena istraživanja o utjecaju VLCD na parametre oštećenja DNA u osoba s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$, te također nisu nađena istraživanja o učinku bilo kakve intervencije u tako kratkom vremenskom periodu. Ovdje isključujemo jedan rad na 300 kcal dnevnoj dijeti u kojem je sudjelovalo 100-injak osoba s ITM preko 35 kg m^{-2} a u kojoj su mnogi morali odustati od dijete zbog narušenog zdravlja ili smrti (Mancini i sur., 2016).

Postoje radovi o kirurškom liječenju pretilosti kao najučinkovitijoj i ujedno preporučenoj metodi liječenja II. i III. stupnja pretilosti koja kao i VLCD u kratkom vremenu doprinosi značajnom smanjenju tjelesne mase (Yumuk i sur., 2015). Najviše je radova u kojem

je opisan utjecaj gubitka tjelesne mase na oštećenja DNA nakon operacije želučane premosnice, no rezultati istraživanja ne pružaju jednoznačne zaključke. Rezultati autora Bankoglu i sur. (2018) pokazali su malo, ali značajno snižavanje primarnog oštećenja DNA mjerenog komet testom tek 12 mjeseci nakon operacije želučane premosnice, dok razlika u intenzitetu repa komet testa nakon 6 mjeseci nije nađena (Bankoglu i sur., 2018 a i b). Drugo istraživanje autora Bankoglu i sur. (2020) uključivalo je i oksidacijska oštećenja DNA koja se nisu značajno promijenila ni godinu dana nakon operacije želučane premosnice (Bankoglu i sur., 2020). Osim što u kraćem vremenskom periodu nije zabilježena značajna razlika u smanjenju primarnog oštećenja DNA, iako je smanjenja bilo, ovo istraživanje ima još nekih sličnosti s navedenim istraživanjima. Ispitanici koji su bili podvrgnuti operaciji želučane premosnice u prosjeku su imali ITM $51,10 \text{ kg m}^{-2}$ prije operacije, dok su ispitanici eksperimentalne grupe prije provođenja ovog istraživanja imali medijan ITM $49,5 \text{ kg m}^{-2}$. VLCD je utjecala na subpopulaciju leukocita (rezultati nisu prikazani u ovom doktorskom radu) što su također pokazali i već navedeni autori u svom radu. Subpopulacije leukocita zbog svoje fiziološke uloge u organizmu imaju različite mogućnosti nastanka ROS-a te obnove DNA. Ne postoje saznanja da li promjene u udjelima pojedinih subpopulacija leukocita mogu utjecati na mjerenje primarnog oštećenja DNA komet testom i na koji način (Bankoglu i sur., 2018b), ali je zanimljivo da su takva saznanja primijećena u ova dva rada. Obzirom da je komet test rađen na drugačijem postotku gela i različitim softverskim programom, rezultati njihovih studija se nisu mogli usporediti direktno s ovim, samo smo mogli zapaziti određene trendove. Osim toga, i sami su autori naveli da kirurška operacija uzrokuje drugačije metaboličke promjene u tijelu na koje se organizam mora naviknuti nakon takve operacije, a koji mogu utjecati i na subpopulacije leukocita i promjene u njihovom ponašanju što se tiče oštećenja i popravka DNA kao što smo već naveli.

Istraživanje provedeno na ispitanicima s prekomjernom tjelesnom masom pokazalo je značajno sniženje primarnog oštećenja DNA tek nakon 6 mjeseci restriktivne dijeta od 890 kcal dnevno uz gubitak od 10 % do 14 % početne tjelesne mase, dok je prosječan gubitak tjelesne mase ispitanika eksperimentalne grupe nakon trotjedne VLCD iznosio oko 9 % (Heilbronn i sur., 2006). Obzirom da su autori pratili kroz tjedne gubitak početne tjelesne mase, nakon 3 tjedna takve dijeta, prosječni gubitak u tjelesnoj masi je bio nešto viši od 5%. Vrijednosti DNA oštećenja nismo mogli usporediti jer su autori koristili repni moment kometa mjeren drugom tehnikom. Također, u tom radu su se mjerili i različiti parametri oksidacijskog stresa i autori nisu pokazali smanjenje, pa čak navode u radu da i nisu sigurni da li kalorijski restriktivna dijeta može uopće smanjiti razinu oksidacijskog stresa u organizmu. Značajno smanjenje tjelesne

mase i smanjeni unos energije koji je postignut primjenom VLCD doveo je do malog smanjenja u nastanka oksidacijskih DNA oštećenja mjerenih FPG komet testom u ovom istraživanju (iako je kod pojedinaca bio znatno smanjeni postotak vrijednosti FPG kometa nakon VLCD), što bi bilo u skladu s teorijom prethodno navedenog rada. No, treba napomenuti i nešto važno - VLCD kao način prehrane nije osigurao dnevne potrebe mikronutrijenata i antioksidansa koji sudjeluju u prevenciji ne samo oksidacije DNA, već i u sintezi nukleinskih baza i enzima potrebnih za prepoznavanje i popravak oštećenja DNA, a takav način prehrane, iako kratkotrajan, također može utjecati na porast upalnog indeksa prehrane a samim time i na razinu oksidacije u tijelu (Fenech, 2020a). Navedeno bi moglo ukazivati da je pozitivan učinak VLCD na primarna oštećenja DNA dijelom anuliran deficitom ili bolje rečeno smanjenim/limitiranim dnevnim unosom vitamina i/ili mineralnih tvari koji je time bio manji od preporučenog. Iako se nakon dijete smanjio broj, ipak je više od 75 % ispitanika i nakon trojtjedne dijete imalo III. stupanj pretilosti, a medijan ITM grupe nakon istraživanja je bio $46,1 \text{ kg m}^{-2}$ što i dalje može biti značajan izvor oksidacijskog stresa (adipozno tkivo povezano s ITM) koji značajno utječe na nastanak oštećenja DNA i smanjuje mogućnost obnove oštećene DNA (Bankoglu i sur., 2018a). Obzirom da adipociti luče više od 600 hormona i signalnih molekula koji mogu izravno ili neizravno utjecati na stabilnost DNA (Román-Pintos i sur., 2018), takvo aktivno adipozno tkivo ima mogućnost i dalje utjecati na rezultate oštećenja DNA.

Što se tiče biljega trajnog oštećenja DNA, VLCD je utjecao na smanjenje MN i NPB te na učestalost apoptoza već nakon tri tjedna dok je smanjenje MN i učestalost apoptoza nakon operacije želučane premosnice zabilježeno tek nakon 12 mjeseci od operacije (a ne nakon 6 kada su bila prva mjerenja) (Bankoglu i sur., 2018a). Operacija želučane premosnice je invazivna te je, kao što je ranije objašnjeno, povezana s nizom metaboličkih promjena koje mogu biti razlog zašto nije došlo do sniženja MN nakon 6 mjeseci nakon operacije želučane premosnice (Bankoglu i sur., 2018b). Udio ispitanika koji su naveli da boluju od dijabetesa tipa 2 u eksperimentalnoj grupi je bilo 66 %. Istraživanje Bankoglu i sur. (2018) utvrdilo je snažan utjecaj dijabetesa na učestalost MN u svojoj ispitivanoj skupini sa srednjom vrijednosti ITM $51,02 \text{ kg m}^{-2}$ (medijan ITM eksperimentalne grupe $49,5 \text{ kg m}^{-2}$) (Bankoglu i sur., 2018a). Snažan povoljan utjecaj VLCD na homeostazu glukoze i lipidni status, uz značajno smanjenje tjelesne mase, mogao je doprinijeti snižavanju vrijednosti MN i NPB u eksperimentalnoj grupi, te ujedno utjecati na smanjenje učestalosti apoptoza zbog poboljšanih uvjeta mikrookoliša limfocita *in vivo*, čija se oštećenja i mjere ovih testom. Ovi podatci su dosta značajni, obzirom da su u eksperimentalnoj grupi bili pojedinci koji su imali veće vrijednosti od referentnih za hrvatsku populaciju (Kopjar i sur., 2010a) a koji su se što se tiče učestalosti MN nakon dijete

smanjili u referentne vrijednosti. Obzirom da ovakva oštećenja mogu ostati duže u organizmu i stvarati veliki broj genomski nestabilnih stanica, smanjenje učestalosti trajnih DNA oštećenja doprinosi smanjenju pojave daljnjih komorbiditeta kao što su tumorska oboljenja.

6.3.2. Utjecaj SRD na oštećenja DNA

Rezultati učinka SRD u kontrolnoj grupi doveli su do poboljšanja (smanjenja) gotovo svih mjerenih parametara oštećenja DNA osim za učestalost MN, no samo su razlike vrijednosti za učestalost apoptoza (citotoksični učinci) prije i nakon dijete bili statistički značajno različiti. Učinak dijete na udio ispitanika s rezultatima izvan referentnih intervala doveo je do smanjenja udjela ispitanika s rezultatima MN izvan referentnog intervala i povećanja udjela ispitanika s rezultatima NPM i indeksa proliferacija izvan referentnog intervala (tablica 24). Trebamo napomenuti da je u slučaju ove kontrolne grupe, indeks proliferacije bio na odgovarajućem optimumu (brojka 2), te se i zadovoljavajuće povećao za 0,1 nakon dijete.

Pregledom literature nađeno je tek nekoliko istraživanja koja su uključivala nutritivno uravnotežene hipokalorijske dijete i utjecaj istih na oštećenja DNA.

Kontrolna grupa na početku istraživanja je imala niže vrijednosti primarnog oštećenja DNA u usporedbi s eksperimentalnom grupom. Iako je dijeta utjecala na smanjenje primarnog oštećenja DNA ono nije bilo statistički značajno. Udio ispitanika koji je imao vrijednosti komet testa više od gornje granice referentnog intervala prije ispitivanja je bio 22 %, a nakon istraživanja navedeni udio je bio 11 %. Dakle, dijeta je utjecala na visoke vrijednosti komet testa, a zbog visokog udjela osoba s vrijednostima komet testa unutar referentnog intervala moguće je da učinak dijete na primarna oštećenja DNA izostao. U istraživanju Ibero-Baraibar i sur. (2014) nije nađena statistički značajna razlika u primarnom oštećenju DNA nakon hipokalorijske dijete (ni u kontrolnoj grupi ni u eksperimentalnoj grupi koja je konzumirala ekstrakt kaka). Moramo napomenuti da je ustroj njihovog istraživanja bio sličan ovom: trajanje 4 tjedna, kalorijski deficit od otprilike 15 %, u ukupnom energijskom unosu ugljikohidrati su činili 45 %, proteini od 22 do 25 % te masti <30 %, ispitanici ITM od 27,0 do 35,5 kg m⁻², bez promjena u tjelesnoj aktivnosti, 47 ispitanika podijeljenih u dvije grupe. Nakon što su ispitanici stratificirani prema vrijednostima oštećenja DNA, nađena je statistički značajna razlika poslije dijete u ispitanika s visokim vrijednostima primarnog i oksidacijskog DNA oštećenja (Ibero-Baraibar i sur., 2015).

U intervencijskom istraživanju u kojem su sudjelovale ispitanice sa sindromom policističnih jajnika došlo je do sniženja vrijednosti primarnog oštećenja DNA nakon 12 tjedana istraživanja u kojem su ispitanice izgubile oko 2 kg tj. 3,5 % tjelesne mase. Također, došlo je

do značajnog sniženja u koncentraciji spolnih hormona i inzulina te glukoze i time inzulinske rezistencije što su značajni izvori ROS-a. Sinergijski učinak gubitka tjelesne mase i sniženja koncentracije spolnih hormona i poboljšanja homeostaze glukoze doveo je do smanjenja primarnog oštećenja DNA u ispitanica s policističnim jajnicima (Soares i sur., 2016). U ovom ispitivanju u kontrolnoj grupi sudjelovali su ispitanici oba spola, a samo jedna ispitanica u grupi je navela da boluje od sindroma policističnih jajnika, gubitak tjelesne mase kontrolne grupe je bio nešto manji nego u navedenom ispitivanju, a sama dijeta je imala manje pozitivni učinak na inzulinsku rezistenciju nego u navedenom istraživanju (pacijentice s policističnim jajnicima često imaju povećanu inzulinsku rezistenciju) što sve mogu biti razlozi za izostanak učinka dijeta na smanjenje primarnog oštećenja DNA. Mogući dodatni razlog smanjenju primarnog oštećenja DNA je i sadržaju dijeta te u trajanju iste. Dijeta je kreirana na način da se postiže energijski deficit od 500 kcal dnevno. U ukupnom energijskom unosu proteini su činili 15 %, ugljikohidrati 60 %, masti 25 %. Masa dnevno konzumiranog voća i povrća je 400 g te vlakana 25 g uz preporuku za smanjenje unosa zasićenih masnih kiselina. Smanjenje primarnog oštećenja DNA moguća je posljedica povećane konzumacije antioksidansa iz voća i povrća što doprinosi smanjenju ROS-a i posljedično oštećenja DNA. Iako je dijeta koja je primijenjena u ovom istraživanju gotovo identična navedenoj dijeti, trajanja dijeta se značajno razlikuju te je time zaštitni utjecaj antioksidansa, ali i ostalih komponenti nužnih za sintezu i obnovu DNA smanjen. S obzirom na umjerenu do dobru povezanost primarnog oštećenja DNA te tjelesne mase i ITM što su autori Włodarczyk i sur. (2018) u svom radu istakli, smanjenje tjelesne mase od 3,5 % ove kontrolne grupe nakon dijeta doprinijelo je smanjenju primarnog oštećenja DNA, ali ne i statistički značajnom smanjenju (Włodarczyk i sur., 2018).

Istraživanje Heilbronn i sur. (2006) na osobama s pretilošću koje su imale restriktivnu dijetu ili 25 % ili 12,5 % + vježbanje od njihovog proračunatog bazalnog metabolizma, pokazalo je da nakon 3 tjedna takve dijeta obje grupe imaju manje od 2 % ili 1 % gubitka tjelesne mase, a značajno smanjenje primarnih oštećenja DNA se dogodilo tek nakon 6 mjeseci takve dijeta (Heilbronn i sur., 2006). Smanjenje tjelesne mase ispitanika kontrolne skupine je bio 3,5 % (rezultati nisu prikazani u ovom radu).

Do značajne promjene u učestalosti MN, NPB, NBUD i učestalosti nekroza nakon dijeta nije došlo, ali je bitno napomenuti da se smanjio udio pojedinaca izvan referentnih vrijednosti za MN i NBUD. Ne postoje radovi u kojima su opisane promjene navedenih parametara u tako kratkom vremenskom roku ili sa sniženjem tjelesne mase koje bi odgovaralo ovim rezultatima. Utjecaj folne kiseline na nastanak trajnih oštećenja DNA dobro je opisan u radovima (Ladeira i sur., 2017; Fenech, 2020a). Udio ispitanika kontrolne grupe s vrijednostima folne kiseline

ispod preporučenih vrijednosti prije ispitivanja iznosio je 30 % (rezultati nisu prikazani u radu). SRD je povoljno utjecala (povisila razinu nakon dijete) na koncentraciju folne kiseline, ali nije dovela do statistički značajnog porasta koncentracije folne kiseline ($p = 0,131$) (rezultati nisu prikazani u radu) što je mogući uzrok izostanka značajnijeg poboljšanja u biljezima trajnog oštećenja DNA. SRD nije imala utjecaj na učestalost nekroza. Budući da je prije ispitivanja udio ispitanika s učestalosti nekroza bio 0 %, poboljšanja u navedenom parametru nisu ni bila moguća. Poboljšanja u mikrookolišu limfocita smanjenjem broja neutrofila ($p = 0,009$), limfocita ($p = 0,016$) (rezultati nisu prikazani u doktorskom radu) i time leukocita, tjelesne mase, poboljšanja u inzulinskoj rezistenciji te dijelu parametra lipidnog statusa mogući su razlozi smanjenja učestalosti apoptoza nakon SRD. Također to upućuje i na smanjenu potrebu stanica za odlaskom u programiranu staničnu smrt jer se broj genomske nestabilnih nepopravljivih stanica smanjio. Iako ne postoje studije s kojima bi mogli usporediti rezultate, prema revijalnom radu Wagnera i sur. (2021), pokazano je da pretili koji su imali dijabetes tipa 2 i bili na nutritivnim intervencijama s povećanim unosom povrća i biljnog ulja bogatog PUFA, nakon 8 tjedana ovakve intervencije su pokazali povećanje učestalosti MN i NPB (Wagner i sur., 2021). Obzirom da su ovi rezultati povezani s pojavnošću dijabetesa tipa 2, moramo reći da iako su u kontrolnu skupinu ušli pojedinci koji su smatrani zdravima, naknadno im je dijagnosticiran dijabetes ili su stavljeni na neke lijekove od strane nadležnih liječnika za ovo istraživanje, a to su pokazala i ova odstupanja kod nekih pojedinaca u rezultatima, što je opet pokazalo osjetljivost ovih metoda za procjenu oštećenja DNA. Također, isti rad je pokazao da je kod svih intervencija sa suplementima kao što je folna kiselina i drugi i u pretilih s dijabetesom tipa 2 i ostalih došlo do smanjenja trajnih oštećenja DNA u obliku MN, NPB ili NBUD.

6.3.3. Utjecaj VLCD na biokemijske i antropometrijske parametre

Gubitak tjelesne mase ključan je za normalizaciju koncentracije glukoze u osoba s pretilošću (Kim i Kwon, 2022). VLCD ima višestruko pozitivan i brz utjecaj na smanjenje tjelesne mase, metabolizam glukoze, inzulinske rezistencije, funkciju β -stanica gušterače i upalu u usporedbi s drugim dijetama. Dijabetes tipa 2 je česti komorbiditet pretilosti. Cilj liječenja dijabetesa je postići remisiju bolesti tj. normalne koncentracije glukoze (tj. $< 7,0 \text{ mmol L}^{-1}$) u krvi u dužem vremenskom periodu bez antidijabetika. Veće koncentracije inzulina na početku VLCD, očuvanosti β -stanica gušterače i kraće trajanja bolesti dijabetesa tipa 2 povezane su s remisijom dijabetesa tipa 2 nakon 6 mjeseci dijete. No, čak i malo smanjenje koncentracije glukoze u krvi je povezano s značajnim smanjenjem mikrovaskularnih i

makrovaskularnih komplikacija dijabetesa (Román-Pintos i sur., 2018). Koncentracija glukoze i inzulinska rezistencija nakon 3 tjedna VLCD značajno su se smanjile u eksperimentalnoj grupi, a udio pacijenata s vrijednostima koncentracije glukoze izvan referentnog intervala prije dijete je iznosio 58 %, a nakon dijete 42 %. U eksperimentalnoj grupi 66 % ispitanika navodi da boluje od dijabetesa tipa 2 (svi duže od 4 godine ili više-rezultati nisu prikazani u doktorskom radu). U osoba s pretilošću s dugotrajnim trajanjem dijabetesa, učinak gubitaka tjelesne mase s manjom vjerojatnošću pozitivno djeluje na metabolički profil pojedinca (Kim i Kwon, 2022). Radovi pokazuju da je utjecaj primjene VLCD u periodu dužem od 2 mjeseca učinkovit na remisiju dijabetesa tj. metabolizam glukoze, a vjerojatnost postizanja remisije bolesti raste s padom tjelesne mase (Román-Pintos i sur., 2018; Kim i Kwon, 2022). Nema puno istraživanja o učinku VLCD na metabolizam glukoze u osoba s pretilošću u periodu od 3 tjedna. Primjena VLCD pripremljenog u bolnici koji se sastojao od 54 – 65 % ugljikohidrata, 23 – 30 % proteina i 12 – 13 % masti te konzumacija komercijalnog pripravka koji je zamijenio jedan obrok rezultirali su smanjenjem koncentracije glukoze nakon 2 tjedna primjene te inzulina i HOMA-IR nakon 4 tjedna (Umphonsathien i sur., 2019). Dobiveni rezultati kao i primijenjena dijeta slični su rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. U istraživanju Tančić-Gajić i sur. (2012) primjena VLCD, koji su ispitanici sami pripremali prema smjericama nutricionista, rezultirala je značajnim sniženjem vrijednosti tjelesne mase, ITM, ukupnog kolesterola, triglicerida, glukoze, inzulina i HOMA-IR indeksa nakon 6 mjeseci dijete u osoba s pretilošću ($ITM > 40 \text{ kg m}^{-2}$). Autori navode da je došlo do značajnog gubitka tjelesne mase i poboljšanja metaboličkih parametara i već nakon 3 tjedna primjene dijete (Tančić-Gajić i sur., 2012).

Budući da je maksimalni ukupni unos energije koji se unosi VLCD 800 kcal dnevno, promjene u sastavu tijela su brze i značajne (Román-Pintos i sur., 2018). Rezultati učinka trojtjedne VLCD od oko 600 kcal na antropometrijske parametre eksperimentalne grupe u ovom istraživanju dovela je do smanjenje tjelesne mase, ITM, mase masnog tkiva i mišićne mase. Ukupan učinak na sastav tijela ovisi o dnevnom unosu energije i dužini trajanja dijete. Niz je radova u kojima je zabilježena promjena u antropometrijskim parametrima u kratkom vremenskom periodu u osoba s pretilošću. U istraživanju Pires Serafi i sur. (2019) dijeta od 600 kcal dnevno u osoba s pretilošću s $ITM > 40 \text{ kg m}^{-2}$ nakon 7 dana dovela je do sniženja vrijednosti tjelesne mase, ITM, mase masnog tkiva i mišićne mase. Učinak dvotjedne dijete od oko 760 kcal na osobe s pretilošću ($ITM \text{ oko } 40 \text{ kg m}^{-2}$) bio je značajan na smanjenje tjelesne mase i masu visceralnog masnog tkiva (Faria i sur., 2015), dok je učinak trojtjedne dijete od oko 800 kcal također doveo do smanjenja ITM i tjelesne mase osoba s pretilošću ($ITM \text{ oko } 40 \text{ kg m}^{-2}$) (Merino i sur., 2013). Bez obzira na trajanje, ukupni unos energije VLCD te ukupan

gubitak tjelesne mase navedeni radovi su ujedno pokazali da je promjena u tjelesnoj masi dovela i do metaboličkih promjena koji su između ostalih rezultirali poboljšanjem parametara lipidnog statusa na što i ukazuju i rezultati ovog istraživanja.

Kronična upala jedan je od komorbiditeta pretilosti. Gubitak tjelesne mase smanjuje veličinu adipocita, a time sintezu i otpuštanje adipokina koji utječu na upalu (Bianchi, 2018). Različite stanice u tijelu proizvode iste citokine. Citokini imaju redundantni i pleiotropni učinak. Učinak gubitka tjelesne mase različito djeluje na pojedina tkiva i stanice odgovorne za lučenje citokina što može dovesti do smanjenja lučenja pojedinih citokina ali ne mora nužno rezultirati i ukupnim efektom na pojedine parametre upale. Sintezu CRP-a u jetri stimuliraju proupalni citokini, među kojima su najznačajniji TNF α , IL-1 i IL-6 (Phillips i Grayson, 2020). VLCD u eksperimentalnoj grupi dovela je do sniženja leukocita i nije utjecala na koncentraciju hsCRP-a što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja sa sličnim ustrojem istraživanja. U radu Sola i sur. (2008) nije došlo do promjene u upalnim parametrima (hsCRP, fibrinogen, TNF α , IL-6, broj leukocita) primjenom VLCD s ukupnim dnevnim unosom energije od oko 603 kcal u osoba s ITM 46,0 kg m⁻² (Solá i sur., 2009). Dijeta u navedenom istraživanju nije utjecala na broj leukocita što nije u skladu s ovim istraživanjem. Istraživanje koje je uključivalo osobe s ITM između 30 i 45 kg m⁻² koji su 8 tjedana konzumirali tekuće komercijalne pripravke ukupne kalorijske vrijednosti od 600 – 800 kcal također nije pokazalo promjene u upalnim parametrima bez obzira na značajan gubitak tjelesne mase. Istraživanje je pokazalo da je za poboljšanje u vrijednostima CRP-a osim gubitka tjelesne mase nužan i duži vremenski period stabilne tjelesne mase (3 godine) (Madsen i sur., 2008). Statističko sniženje vrijednosti CRP-a, no ne i klinički značajno je postignuto primjenom VLCD u trajanju od 4 – 6 tjedana u osoba s pretilošću (srednja vrijednost ITM ispitanika 38,7 kg m⁻²), ali bez promjene TNF α i adiponektina što je u suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja (Xydakis i sur., 2004). Trojtjedna dijeta od oko 941 kcal dnevno nije utjecala na koncentracije CRP-a i TNF-a u pretilih pacijentica. Dijeta je značajno utjecala na koncentraciju IL-6 u adipoznom tkivu te malom, ali statistički značajnom sniženju IL-6 u cirkulaciji. Iako je nađena vrlo dobra povezanost ($r = 0,683$, $p < 0,001$) koncentracija CRP-a i IL-6 dijeta nije jednako djelovala na sniženje navedenih parametara (Bastard i sur., 2000). Po udjelu makronutrijenata tri različite dijete istih kalorijskih vrijednosti (450 – 500 kcal za žene, 650 – 700 kcal za muškarce) dovele se do sniženja vrijednosti leukocita nakon tri tjedna u osoba s prekomjernom tjelesnom masom i pretilosti što je u skladu s ovim rezultatima. Učinak jedne dijete je smanjio koncentraciju CRP-a, dok druge dvije nisu imale učinak na koncentraciju navedenog upalnog parametra što je i ovo istraživanje pokazalo (Merra i sur., 2017).

Mogući razlozi različitog efekta na leukocite i CRP u navedenim istraživanjima i ovom je u trajanju dijete, ukupnom gubitku tjelesne mase, brzini gubitka tjelesne mase ili periodu mjerenja učinaka dijeta (za vrijeme dijete ili periodu stabilne tjelesne mase) te utjecaju svega navedenog na pojedine adipokine (Bastard i sur., 2000; Madsen i sur., 2008; Solá i sur., 2009). Izrazita restrikcija energije za vrijeme VLCD dovodi do porasta ekspresije mRNA TNF α u adipoznom tkivu (Bastard i sur., 2000). Gladovanje uzrokuje značajnu mobilizaciju masnih kiselina što može uzrokovati metabolički stres jetre i time sintezom reaktanata akutne faze što može biti još jedno dodatno objašnjenje izostanka smanjenja koncentracije hsCRP-a (Madsen i sur., 2008). Značajan gubitak tjelesne mase je nedovoljan za uspostavu normalne funkcije adipocita (medijan ITM grupe nakon istraživanja je bio 46,1 kg m⁻²) te smanjenje lučenja adipokina i njihov parakrini i endokrini utjecaj na druge stanice (Xydakis i sur., 2004). Sastav dijete također može imati utjecaj na upalne parametra gdje dijeta koja čuva mišićnu masu i uzrokuje veći gubitak mase masnog tkiva ima povoljniji učinak na upalne parametre (Merra i sur., 2017). Izračunom upalnog indeksa VLCD ustanovljeno je da je vrijednost dijete izrazito proupalna (DII = 6,25). Iako nije zabilježena statistička razlika u koncentraciji hsCRP-a u ovom istraživanju uočen je trend povećanja koncentracije hsCRP-a nakon dijete, a brojni radovi govore o utjecaju proupalne dijete na koncentraciju CRP-a (Liang i sur., 2022).

6.3.4. Utjecaj SRD na biokemijske i antropometrijske parametre

Gubitak tjelesne mase ima isti učinak na zdravlje pojedinaca s pretilošću bez obzira na početni ITM, a gubitak od 5 % se smatra klinički značajnim. Tako umjeren gubitak tjelesne mase povezan je sa smanjenjem koncentracija glukoze, inzulina, triglicerida, alanin aminotranferaze i leptina, dok se koncentracija npr. CRP-a snižava tek nakon gubitka tjelesne mase od 16 %. Svako povećanje gubitka tjelesne mase povezano je sa smanjenjem komorbiditeta (Ryan i Yockey, 2017b). Uz prosječni gubitak od 4,2 kg odnosno 3,5 % tjelesne mase nakon SRD, ispitanici kontrolne skupine imali su značajno snižene koncentracija inzulina, kolesterola, HDL-kolesterola, vrijednosti HOMA-IR te broja leukocita, bez promjene u koncentracijama glukoze, LDL-kolesterola, triglicerida i hsCRP-a u odnosu na mjerenja prije dijete. U dosadašnjim istraživanjima najviše je podataka o učinkovitosti gubitka tjelesne mase između 5 – 10 % i > 10 %, no to ne znači da su zdravstveni učinci ograničeni na navedene vrijednosti (Brown i sur., 2016). Gubitak jednog kilograma tjelesne mase smanjuje rizik progresije dijabetesa tipa 2 za 16 % (Ryan i Yockey, 2017b). Provjerom aktualne literature nađeno je nekoliko istraživanja koje su ispitale učinak gubitka tjelesne mase < 5 % u ispitanika s pretilošću te ispitivanja s ustrojem istraživanja sličnim ovom istraživanju. Rezultati navedenih

istraživanja nemaju jedinstvene zaključke o utjecaju gubitka tjelesne mase i primjene dijeta u kratkom roku na rezultate biokemijskih parametara. Istraživanje Muramoto i sur. (2013) na ispitanicima s pretilošću pokazalo je povoljan učinak smanjenja udjela tjelesne mase u rasponu od 1 – 3 % nakon godine dana na koncentracije triglicerida, HDL-kolesterola i LDL-kolesterola, a bez utjecaja na koncentracije glukoze. Istraživanje je provedeno na japanskoj populaciji gdje se pretilost definira $ITM > 25 \text{ kg m}^{-2}$, a srednja vrijednost ispitanika koji su završili ispitivanje je bila $27,7 \text{ kg m}^{-2}$ dok je medijan ITM ove skupine nakon ispitivanja iznosio $40,0 \text{ kg m}^{-2}$ (Muramoto i sur., 2014). U istraživanju u kojem su ispitanici bili stratificirani prema udjelu gubitka tjelesne mase, pokazalo je da su jedino koncentracije za trigliceride bile snižene nakon dijete u skupini koja je izgubila $< 5 \%$ tjelesne mase. Dodatnom podjelom ispitanika prema kardiovaskularnom riziku unutar skupine koje je izgubila $< 5 \%$ tjelesne mase, ispitanici s najvećim kardiovaskularnim rizikom imali su značajno sniženje koncentracije kolesterola, bez utjecaja na trigliceride, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol i glukozu. Ispitanici su poticali na tjelesne aktivnosti te su konzumirali komercijalne pripravke u svrhu gubitka tjelesne mase što je također utjecalo na rezultate te iste ne možemo u potpunosti usporediti s ovim rezultatima. U istraživanju u kojem su sudjelovali ispitanici ITM od $27,0$ do $35,5 \text{ kg m}^{-2}$ koji su 4 tjedna konzumirali dijetu s deficitom energije od 15% te nisu imali promjene u svojim tjelesnim aktivnostima došlo je do smanjenja koncentracija triglicerida, ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola bez utjecaja na koncentraciju glukoze (Ibero-Baraibar i sur., 2015). Rezultati kontrolne grupe ovog ispitivanja u većini parametara su slični istraživanju Soares i sur. (2016). U navedenom istraživanju pacijentice s pretilošću sa sindromom policističnih jajnika su uz dnevni deficit energije od oko 500 kcal postigle statistički značajan gubitak tjelesne mase od $3,5 \%$ i ITM te snižavanje koncentracija glukoze, inzulina, LDL-kolesterola i iznosa HOMA-IR, bez promjene u koncentraciji triglicerida i HDL-kolesterola (Soares i sur., 2016).

U kontrolnoj grupi 33% ispitanika prije ispitivanja imalo je vrijednosti glukoze iznad gornje granice referentnog intervala. Budući da dijeta i gubitak tjelesne mase imaju navise učinka na više koncentracije glukoze zbog niskog udjela ispitanika s višim koncentracijama glukoze, promjena vrijednosti glukoze na razini grupe imala je ograničeni učinak na statističku značajnost promjene. Visoki udio ispitanika s koncentracijama glukoze unutar referentnog intervala dijelom je posljedica većeg lučenja inzulina na što ukazuju medijan koncentracije inzulina prije ispitivanja te vrijednosti HOMA-IR koje ukazuju na značajni udio ispitanika s inzulinskom rezistencijom. Dijeta je dovela do značajnog sniženja koncentracije inzulina što je rezultiralo poboljšanjem inzulinske rezistencije na razini grupe (smanjenje vrijednosti HOMA-IR vrijednosti).

Rezultati utjecaja dijete i gubitka tjelesne mase na lipidni status nije jednoznačan u istraživanjima. Učinak SRD od oko 1500 kcal doveo je do sniženja svih navedenih parametara, ali samo su koncentracije kolesterola i HDL-kolesterola bile statistički značajno snižene. Mogući razlozi koji nisu doveli do snižavanja vrijednosti LDL-kolesterola i triglicerida nakon dijete u kontrolnoj grupi su: individualne razlike u početnim koncentracijama, visoki udio ispitanika s koncentracijama triglicerida i LDL-kolesterola unutar preporučenih vrijednosti (gotovo 50 % ispitanika imalo je koncentracije triglicerida i oko 45 % koncentracije LDL-kolesterola unutar preporučenih vrijednosti prije dijete), različit učinak dijete na gubitak tjelesne mase zbog individualnih razlika u bazalnom metabolizmu i dnevnim aktivnostima (smanjenje od 5 % tjelesne mase uzrokuje smanjenje od 13 % triglicerida u jetri (Ryan i Yockey, 2017b)), učinak tjelesnih aktivnosti na navedene parametre, te utjecaj individualnih preferencija u odabiru namirnica za vrijeme dijete koje su bile moguće a da se ne naruši značajno prosječni dnevni unos energije i sastav same dijete (npr. zamjena maslinovog ulja suncokretovim i sl.).

Preporučen i konstantan umjeren deficit od oko 600 kcal dnevno dovodi do smanjenja tjelesne mase za 5 – 15 % u periodu od 6 mjeseci što je ujedno i realan gubitak tjelesne mase s dokazanim zdravstvenim prednostima (Yumuk i sur., 2015). Najveći broj istraživanja, kao i u slučaju promatranih biokemijskih parametra, odnosi se na vremenski period od 6 ili više mjeseci i/ili kombinaciju više različitih intervencija i/ili strategija gubitka tjelesne mase te su stoga ovi rezultati uspoređivani s ispitivanjima u kojima je smanjen relativan ili apsolutan udio tjelesne mase sličan rezultatima ovog ispitivanja te s ispitivanjima koja su provedena u kraćem vremenskom periodu.

U istraživanju Khoo i sur. (2015) s ispitanicima prosječnog ITM $32,1 \text{ kg m}^{-2}$ došlo je do smanjenja koncentracije CRP-a bez promjene adiponektina 6 mjeseci nakon početka istraživanja uz smanjenje prosječne tjelesne mase od 3,3 kg. Ispitanici su nakon početnog gubitka tjelesne mase, vratili dio iste te su u zadnja 4 tjedna održavali konstantnu tjelesnu masu (Khoo i sur., 2015). Početna koncentracija CRP-a u navedenom istraživanju bila niža nego koncentracija CRP-a kontrolne skupine u ovom istraživanju. Koncentracija CRP-a je mjerena u fazi stabilne tjelesne mase što nije primjer u slučaju kontrolne skupine ovog istraživanja. Značajno sniženje koncentracije CRP-a i TNFa bez promjene IL-6 postignuto je nakon 8 tjedana dijete koja je rezultirala i sniženjem prosječne vrijednosti tjelesne mase ispitanika s pretilošću za 6,2 % korištenjem hipokalorijske mediteranske prehrane (Hermsdorff i sur., 2009). U navedenom istraživanju je srednja vrijednost CRP-a na početku istraživanja bila niža nego medijana CRP-a kontrolne grupe ovog istraživanja na početku dijete. Sličan obrazac

prehrane i završno mjerenje koncentracije CRP-a u dinamičnoj fazi gubitka tjelesne mase su sličnosti koje ovo i navedeno istraživanje dijele. U istraživanju u kojem je prosječno sniženje tjelesne mase od 4,6 kg dovelo do sniženja koncentracije CRP-a i leptina bez promjene IL-6 i TNF-a 14 tjedana nakon primjene dijete u ispitanica s pretilošću (Giannopoulou i sur., 2005). Autori istraživanja navode da ispitanice s većim koncentracijama CRP-a nakon ispitivanja i dalje imaju visoke koncentracije CRP-a bez obzira na neznatno sniženje koncentracije, što je u skladu s rezultatima kontrolne grupe ovog istraživanja.

Odnos između ITM, različitih citokina i adipokina i inzulinske rezistencije u osoba s pretilošću je vrlo kompleksan. Utjecaji dijete i sniženje tjelesne mase doveo je do sniženja broja leukocita u ovom istraživanju. Ne postoje istraživanja o promjeni broja leukocita koja su ustrojem istraživanja i dobivenim podacima slična ovom istraživanju, no prethodno navedena istraživanja ukazuju na promjenu koncentracija različitih citokina koji su između ostalih odgovorni za proliferaciju leukocita što može objasniti snižavanje broja leukocita u ovom istraživanju. Iako je došlo do sniženja koncentracije CRP-a u kontrolnoj grupi nakon trotjedne SRD izostanak statistički značajnog sniženja moguća je posljedica nedovoljnog gubitka tjelesne mase i/ili masnog tkiva, kratke primjene same dijete, nedovoljnog poboljšanja inzulinske rezistencije, proupalnog efekta same primijenjene dijete, nedovoljne tjelesne aktivnosti kod dijela ispitanika te relativno visokih koncentracija CRP-a na početku samog istraživanja (kad se rezultati kontrolne grupe uspoređuju s prethodno navedenim istraživanjima) (Giannopoulou i sur., 2005).

6.4. Učinci dijeta na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja DNA, antropometrijske i biokemijske parametre u eksperimentalne i kontrolne grupe

Pregledom dostupne literature nije nađen rad koji je ustrojem ispitivanja imao sličnosti s ovim istraživanjem te su moguća objašnjenja rezultata razlika učinaka dijeta na primarna, oksidacijska i trajna oštećenja DNA, antropometrijske i biokemijske parametre u eksperimentalne i kontrolne skupine donesena na temelju sumarnih zaključaka i podataka prikazanih u prethodnim dijelovima rasprave.

Očekivano se VLCD pokazao učinkovitiji u smanjenju tjelesne mase i ITM u periodu od 3 tjedna u usporedbi sa SRD zbog izrazito nižeg dnevnog sadržaja energije, no navedena razlika nije imala značajan utjecaj na primarna i oksidacijska oštećenja s obzirom na linearni odnos ITM i navedenih parametara na što ukazuju radovi i činjenica da je prije ispitivanja eksperimentalna skupina imala veći stupanj primarnih oštećenja DNA. Povoljni učinak redukcije tjelesne mase veći je kod većih stupnjeva oštećenja DNA. Učinci prehrane na stabilnost DNA su višestruki. Veći deficit energije dovodi do većeg smanjenja tjelesne mase, ali i rizika od deficita unosa mikronutrijenata prehranom, neophodnih za obnovu DNA, sintezu nukleotida *de novo*, nutrijenata koji sudjeluju u antioksidacijskim procesima i time smanjuju nastanak oštećenja DNA. Također, brojni nutrijenti odgovorni su za protuupalni efekt hrane koji se zbog manjka istih kod VLCD pokazao kao izrazito protuupalan. Navedeni razlozi moguća su objašnjenja izostanka značajnijeg efekta VLCD na primarna oštećenja u usporedbi sa SRD. Dio ispitanika kontrolne skupine prije istraživanja je imao koncentracije folne kiseline niže od preporučenih vrijednosti što je ujedno razlogom statistički značajne razlike između eksperimentalne grupe i kontrolne grupe (podatci nisu prikazani u doktorskom radu). Iako je SRD uspjela povećati koncentracije folne kiseline u ispitanika kontrolne grupe (rezultati nisu prikazani u doktorskom radu) efekt nije bio statistički značajan te je to mogući razlog boljem efektu VLCD na trajna oštećenja DNA mjerena MN. Veći gubitak tjelesne mase eksperimentalne grupe je dodatni i značajni čimbenik koji je doprinio povoljnijem učinku VLCD u odnosu na SRD na trajna oštećenja DNA. Obzirom da je VLCD bila provođena u bolnici, pod konstantnim nadzorom, vjerojatno je i sami nadzor imao utjecaja na pridržavanje dijete koje je možda i izostalo u nekim slučajevima u SRD primjerima.

Objekte su dijete imale pozitivan učinak na broj leukocita, koncentracije glukoze, inzulina i inzulinsku rezistenciju, ali ni jedna dijeta nije pokazala značajniji utjecaj na navedene

parametre. VLCD je uzrokovao blagi i statistički neznačajan porast koncentracije hsCRP-a što je moguća posljedica proupalne dijete. Naime, upalni indeks VLCD u usporedbi s upalnim indeksom izračunatim iz prehrambenih navika ispitanika prije istraživanja je statistički značajno viši kao i u usporedbi s upalnim indeksom SRD. Unatoč porastu koncentracije hsCRP-a eksperimentalne skupine te sniženju koncentracije hsCRP-a kontrolne skupine, razlika učinka efekta dvije različite dijete na koncentraciju hsCRP-a nije bila statistički značajna.

Nedostaci istraživanja

Liječenje pretilosti je dugotrajan proces i usprkos dobrim rezultatima dobivenim u relativno kratkom vremenskom periodu, istraživanje nije moglo u potpunosti dati stvarni uvid u učinke dijeta na pojedince a završni rezultati mjerenja nisu određeni u fazi stabilne tjelesne mase već su u obje grupe ispitanika određeni u metabolički dinamičkoj fazi (fazi gubitka mase) što je moglo utjecati na rezultate.

Mogući razlog izostanka učinkovitosti dijeta na sve određivane parametre je nedovoljan broj ispitanika. Naime, prije početka istraživanja utvrđen je minimalni broj ispitanika koji moraju završiti ispitivanje kako bi se utvrdio učinak dijeta na stabilnost DNA, ujedno temeljni cilj ovog rada, stoga je nepostojanje statistički značajne razlike za pojedine biokemijske i antropometrijske parametre nakon dijeta moguća posljedica i nedovoljnog broja ispitanika. Tu su utjecaj zasigurno imali i kratak rok ispitivanja, a i heterogenost skupine što se tiče samih ispitivanih parametara.

Unatoč tome što su ispitanici dobili jasne upute kako ispuniti FFQ upitnike, dobro je poznata činjenica da osobe s pretilošću mogu podcijeniti ili neprijaviti stvarni unos hrane što je i pokazala analiza procjene dnevnih potreba te je stoga potrebno rezultate ispunjenih FFQ-a tumačiti s oprezom. Također navedeno je zasigurno utjecalo na korelacijske analize u kojima su korišteni rezultati navedenih upitnika.

Iako je doktorski rad obuhvatio dio kompleksnih odnosa (ITM, upale, prehrane, lipidnog statusa, inzulinske rezistencije i oštećenja DNA) dio utjecaja na stabilnost DNA nije obuhvaćen poput individualnih karakteristika pojedinca koje mogu imati značajan utjecaj na stabilnost DNA kao što su: mikrobiom i utjecaja prehrane na isti, individualnih razlika u kapacitetu obnove DNA, nutrigenomike, epigenomike, te samih bolesti i sklonosti razvoju određenih bolesti i stanja.

7. Zaključci

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave doneseni su sljedeći zaključci:

1.) o utjecaju VLCD na stabilnost genoma, antropometrijske podatke i komorbiditete pretilosti mjerene odabranim biokemijskim pretragama u osoba s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$ (slika 10)

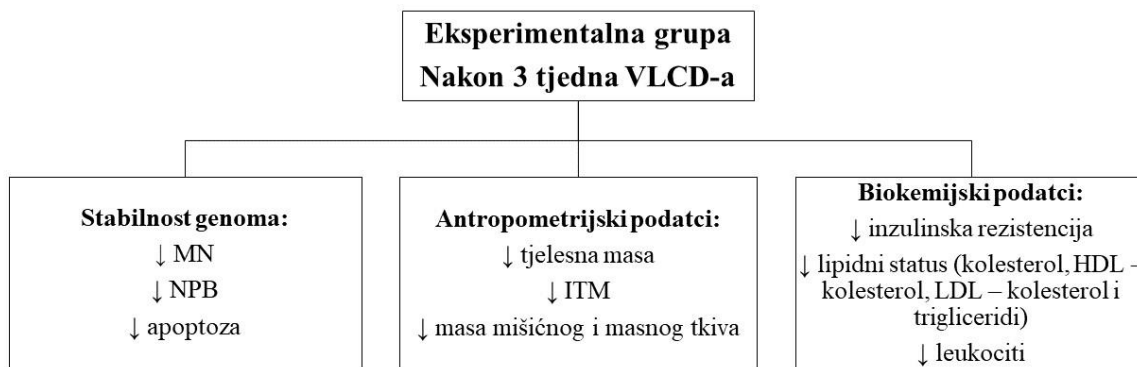
- Trotjedna dijeta izrazito niskog sadržaja energije povoljno utječe na stabilnost genoma (DNA) budući da je smanjila učestalost MN i NPB kao biljega trajnog oštećenja DNA te je utjecala na *in vivo* mikrookoliš leukocita smanjujući citotoksičnost što je rezultiralo smanjenjem učestalosti apoptotičnih stanica, te ja također uočen povoljan učinak na primarna i oksidacijska oštećenja DNA kao i na citostatičnost, ali bez statističke značajnosti
- VLCD značajno snižava tjelesnu masu (7,5 kg (10,6 – 6,7)), ITM (2,8 kg m^{-2} (3,5 – 2,2)) te masu masnog (4,4 kg (5,3 – 3,0)) i mišićnog tkiva (2,1 kg (2,9 – 1,4))
- VLCD proveden u bolničkim uvjetima smanjuje komorbiditete povoljnim učinkom na inzulinsku rezistenciju te parametre lipidnog statusa (kolesterola, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, triglicerida), dok je utjecaj na kroničnu upalu karakterističnu za pretilost ograničen jer dijeta smanjuje broj leukocita no ne i koncentraciju hsCRP-a

2.) o utjecaju SRD na stabilnost genoma, antropometrijske podatke i komorbiditete pretilosti mjerene odabranim biokemijskim pretragama u osoba s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$ (slika 11)

- Dijeta nema značajan učinak na stabilnost genoma (DNA). Povoljan utjecaj dijetete je ograničen na smanjenje citotoksičnosti.
- Dijeta u relativno kratkom vremenskom periodu smanjuje tjelesnu masu (4,0 kg (4,9 – 2,4)), ITM (1,5 kg m^{-2} (1,8 – 0,9)) te masu masnog (2,5 kg (3,2 – 1,1)) i mišićnog tkiva (0,8 kg (1,5 – 0,4)), a i te male promjene tjelesne mase imaju zdravstvene koristi za osobe s pretilošću jer dovode do smanjenja koncentracije inzulina potrebnog za održavanje stabilnih koncentracija glukoze tj. doprinose smanjenju inzulinske rezistencije te povoljno utječu na lipidni status (smanjenje koncentracije kolesterola i HDL-kolesterola) uz ograničen povoljan utjecaj na kroničnu upalu jer dijeta utječe na broj leukocita, ali ne i na koncentraciju hsCRP-a

3.) razlike učinaka dijeta na stabilnost genoma, antropometrijske podatke i komorbiditete pretilosti mjerene odabranim biokemijskim pretragama u osoba s $ITM \geq 35 \text{ kg m}^{-2}$

- Povoljan učinak VLCD u usporedbi sa SRD na tjelesnu masu i ITM, te lipidni status je izraženiji, a bez značajnih razlika između dijeta na inzulinsku rezistenciju i kroničnu upalu nakon tri tjedna primjene dijeta.
- Niti jedna od ovih dviju dijeta nije učinkovitija što se tiče djelovanja na primarna i oksidacijska oštećenja DNA, citotoksičnost i citostatičnost, te na biljege trajnog oštećenja DNA mjerenih NPB i NBUD u periodu od tri tjedna. Izuzetak čini učestalost MN na čije vrijednosti snažniji učinak ima VLCD.
- Na stabilnost DNA utječu kompleksni međusobni odnosi ITM, komorbiditeta pretilosti, prehrane, nutritivnog statusa pojedinca i promjene uzrokovane smanjenjem tjelesne mase



Slika 10. Grafički prikaz utjecaja VLCD-a na stabilnost genoma, antropometrijske i biokemijske podatke



Slika 11. Grafički prikaz utjecaja SRD-a na stabilnost DNA, antropometrijske i biokemijske podatke

8. Popis literature

Aggarwal A, Mehta S, Gupta D, Sheikh S, Pallagatti S, Singh R, i sur. (2012) Clinical & immunological erythematosus patients characteristics in systemic lupus Maryam. *J Dent Educ* **76**, 1532–9. <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR>

Azqueta A, Arbillaga L, López De Cerain A, Collins A (2013) Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis* **28**, 271–277. <https://doi.org/10.1093/mutage/get002>

Azqueta A, Muruzabal D, Boutet-Robinet E, Milic M, Dusinska M, Brunborg G, i sur. (2019) Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* **843**, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.007>

Bankoglu EE, Arnold C, Hering I, Hankir M, Seyfried F, Stopper H (2018a) Decreased Chromosomal Damage in Lymphocytes of Obese Patients After Bariatric Surgery. *Sci Rep* **8**, 11195. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29581-6>

Bankoglu EE, Gerber J, Kodandaraman G, Seyfried F, Stopper H (2020) Influence of bariatric surgery induced weight loss on oxidative DNA damage. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* **853**, 503194. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503194>

Bankoglu EE, Mukama T, Katzke V, Stipp F, Johnson T, Kühn T, i sur. (2022) Short- and long-term reproducibility of the COMET assay for measuring DNA damage biomarkers in frozen blood samples of the EPIC-Heidelberg cohort. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* **874–875**. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2022.503442>

Bankoglu EE, Seyfried F, Arnold C, Soliman A, Jurowich C, Germer CT, i sur. (2018b) Reduction of DNA damage in peripheral lymphocytes of obese patients after bariatric surgery-mediated weight loss. *Mutagenesis* **33**, 61–67. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex040>

Bankoglu EE, Stopper H (2022) Obesity-related genomic instability and altered xenobiotic metabolism: possible consequences for cancer risk and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med* **24**. <https://doi.org/10.1017/erm.2022.22>

Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, i sur. (2000) Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3338–3342. <https://doi.org/10.1210/jc.85.9.3338>

- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw* **67**. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Bedard D, Shatenstein B, Nadon S (2004) Underreporting of energy intake from a self-administered food-frequency questionnaire completed by adults in Montreal. *Public Health Nutr* **7**, 675–681. <https://doi.org/10.1079/PHN2003578>
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B* **57**, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Berberich AJ, Hegele RA (2021) A Modern Approach to Dyslipidemia. *Endocr Rev* **43**, 611–653. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab037>
- Bianchi VE (2018) Weight loss is a critical factor to reduce inflammation. *Clin Nutr ESPEN* **28**, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.08.007>
- Bonassi S, Ceppi M, Møller P, Azqueta A, Milić M, Monica N, i sur. (2021) DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Sci Rep* **11**, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95976-7>
- Bouchard C (2021) Genetics of Obesity : What We Have Learned Over Decades of Research. **29**, 802–820. <https://doi.org/10.1002/oby.23116>
- Brant R (2019) Inference for a Mean: Comparing a Mean to a Known Value. <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n1.html>
- Bray GA (2004) Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2583–2589. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0535>
- Brewis A, SturtzSreetharan C, Wutich A (2018) Obesity stigma as a globalizing health challenge. *Global Health* **14**, 20. <https://doi.org/10.1186/s12992-018-0337-x>
- Brown JD, Buscemi J, Milsom V, Malcolm R, O’Neil PM (2016) Effects on cardiovascular risk factors of weight losses limited to 5–10 %. *Transl Behav Med* **6**, 339–346. <https://doi.org/10.1007/s13142-015-0353-9>

Bukhari SA, Rajoka MI, Nagra SA, Rehman ZU (2010) Plasma homocysteine and DNA damage profiles in normal and obese subjects in the Pakistani population. *Mol Biol Rep* **37**, 289–295. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9686-0>

Canning KL, Brown RE, Wharton S, Sharma AM, Kuk JL (2015) Edmonton Obesity Staging System Prevalence and Association with Weight Loss in a Publicly Funded Referral-Based Obesity Clinic. *J Obes* **2015**, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/619734>

Cavicchia PP, Steck SE, Hurley TG, Hussey JR, Ma Y, Ockene IS, i sur. (2009) A New Dietary Inflammatory Index Predicts Interval Changes in Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein1–3. *J Nutr* **139**, 2365–2372. <https://doi.org/10.3945/jn.109.114025>

Cordelli E, Bignami M, Pacchierotti F (2021) Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* **10**, 68–78. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>

Corley J, Shivappa N, Hébert JR, Starr JM, Deary IJ (2019) Associations between Dietary Inflammatory Index Scores and Inflammatory Biomarkers among Older Adults in the Lothian Birth Cohort 1936 Study. *J Nutr Heal Aging* **23**, 628–636. <https://doi.org/10.1007/s12603-019-1221-y>

Del Bo' C, Martini D, Bernardi S, Gigliotti L, Marino M, Gargari G, i sur. (2021) Association between Food Intake, Clinical and Metabolic Markers and DNA Damage in Older Subjects. *Antioxidants* **10**, 730. <https://doi.org/10.3390/antiox10050730>

Donmez-Altuntas H, Sahin F, Bayram F, Bitgen N, Mert M, Guclu K, i sur. (2014) Evaluation of chromosomal damage, cytostasis, cytotoxicity, oxidative DNA damage and their association with body-mass index in obese subjects. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* **771**, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.06.006>

DTU (2022) Frida Food Data; Version 1-National Food Institute, Technical University of Denmark. <http://frida.fooddata.dk>. <https://frida.fooddata.dk/>. Pristupljeno 2. srpanj 2022.

Durrer Schutz D, Busetto L, Dicker D, Farpour-Lambert N, Pryke R, Toplak H, i sur. (2019) European Practical and Patient-Centred Guidelines for Adult Obesity Management in Primary Care. *Obes Facts* **12**, 40–66. <https://doi.org/10.1159/000496183>

Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y (2017) Obesity & inflammation: The linking mechanism & the complications. *Arch Med Sci* **13**, 851–863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>

Eurostat (2022) Body mass index (BMI) by sex, age and educational attainment level. https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/sdg_02_10/default/table?lang=en. Pristupljeno 3. rujna 2022.

Faria SL, Faria OP, Cardeal MDA, Ito MK (2015) Effects of a very low calorie diet in the preoperative stage of bariatric surgery: A randomized trial. *Surg Obes Relat Dis* **11**, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2014.06.007>

Fenech M (2020a) The Role of Nutrition in DNA Replication, DNA Damage Prevention and DNA Repair. In: Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics. Elsevier, p 27–32.

Fenech M (2020b) Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes (Basel)* **11**, 1203. <https://doi.org/10.3390/genes11101203>

Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* **2**, 1084–1104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>

Fenech M (2001) Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* **480–481**, 51–54. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00168-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00168-3)

Franz MJ, VanWormer JJ, Crain AL, Boucher JL, Histon T, Caplan W, i sur. (2007) Weight-Loss Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Weight-Loss Clinical Trials with a Minimum 1-Year Follow-Up. *J Am Diet Assoc* **107**, 1755–1767. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2007.07.017>

Franzke B, Schwingshackl L, Wagner K-H (2020) Chromosomal damage measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay in diabetes and obesity - A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Mutat Res* **786**, 108343. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108343>

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *CC* 1972;18:499–502. Friedewald WT

Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, i sur. (2016) American association of clinical endocrinologists and American college of endocrinology comprehensive clinical practice guidelines for medical care of patients with obesity. *Endocr Pract* **22**, 1–203. <https://doi.org/10.4158/EP161365.GL>

Giannopoulou I, Fernhall B, Carhart R, Weinstock RS, Baynard T, Figueroa A, i sur. (2005) Effects of diet and/or exercise on the adipocytokine and inflammatory cytokine levels of postmenopausal women with type 2 diabetes. *Metabolism* **54**, 866–875. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.01.033>

Gulin D, Budinčević H (2018) Debljina kao ishodište kardiovaskularnog događaja. *Medicus* **27**, 39–45

HALMED (2022) Dodatak i sažetak opisa svojstava lijeka mysimba. <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Mysimba/11354/> Pristupljeno 14. ožujak 2023.

HALMED (2022) Dodatak i sažetak opisa svojstava lijeka orlistat. <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Xenical/10083/> Pristupljeno 14. ožujak 2023.

HALMED (2022) Prilog I. Sažetak Opisa Svojstava Lijeku. <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Wegovy/16450/> Pristupljeno 14. ožujak 2023.

HALMED (2022) Dodatak i sažetak opisa svojstava lijeka 1. <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Saxenda/11356/> Pristupljeno 14. ožujak 2023.

Hayashi M (2016) The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. *Genes Environ* **38**, 18. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>

Hébert JR, Shivappa N, Wirth MD, Hussey JR, Hurley TG (2019) Perspective: The Dietary Inflammatory Index (DII) - Lessons Learned, Improvements Made, and Future Directions. *Adv Nutr* **10**, 185–195. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy071>

Heilbronn LK, Jonge L De, Frisard MI, Delany JP, Enette D, Meyer L, i sur. (2006) Effect of 6 month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation and oxidative stress in overweight subjects. *JAMA* **295**, 1539–1548. <https://doi.org/10.1001/jama.295.13.1539.Effect>

Hermisdorff HHM, Zulet MÁ, Abete I, Martínez JA (2009) Discriminated benefits of a Mediterranean dietary pattern within a hypocaloric diet program on plasma RBP4 concentrations and other inflammatory markers in obese subjects. *Endocrine* **36**, 445–451. <https://doi.org/10.1007/s12020-009-9248-1>

Hofer T, Karlsson HL, Möller L (2006) DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: A gender difference and the role of life style factors. *Free Radic Res* **40**, 707–714. <https://doi.org/10.1080/10715760500525807>

Horáková D, Štěpánek L, Janout V, Janoutová J, Pastucha D, Kollárová H, i sur. (2019) Optimal Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) Cut-Offs: A Cross-Sectional Study in the Czech Population. *Medicina (B Aires)* **55**, 1–8. <https://doi.org/10.3390/medicina55050158>

HZJZ (2012) Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema. HZJZ-Hrvatski zavod za javno zdravstvo, http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44081/9789241547666_hrv.pdf?sequence=1 Pristupljeno 14. rujna 2022.

Ibero-Baraibar I, Azqueta A, De Cerain AL, Martinez JA, Zulet MA (2015) Assessment of DNA damage using comet assay in middle-aged overweight/obese subjects after following a hypocaloric diet supplemented with cocoa extract. *Mutagenesis* **30**, 139–146. <https://doi.org/10.1093/mutage/geu056>

IDF (2006) Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. IDF-International diabetes federation <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html> Pristupljeno 22. veljače 2023.

InBody (2022) 270 Result Sheet Interpretation. <https://inbodyusa.com/general/270-result-sheet-interpretation/#result-sheet> Pristupljeno 28. sječanj 2023.

Inoue N, Yahagi N, Yamamoto T, Ishikawa M, Watanabe K, Matsuzaka T, i sur. (2008) Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance. *J Biol Chem* **283**, 21220–21229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801824200>

Jairam V, Uchida K, Narayanaswami V (2012) Pathophysiology of Lipoprotein Oxidation. Lipoproteins - Role Heal Dis. <https://doi.org/10.5772/50622>

Jelčić J, Baretić M, Koršić M (2010) 4. Smjernice o dijagnostici i liječenju debljine. *Liječnički Vjesn* **132**, 269–271

Kanellakis S, Sidiropoulou S, Apostolidou E, Skoufas E, Bountouvi E, Prelorentzou T, i sur. (2021) Association of dietary intake underreporting with body image perception. *Clin Nutr Open Sci* **40**, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.nutos.2021.09.002>

Kaźmierczak-Barańska J, Boguszevska K, Karwowski BT (2020) Nutrition Can Help DNA Repair in the Case of Aging. *Nutrients* **12**, 1–20. <https://doi.org/10.3390/nu12113364>

Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL (1972) Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis* **25**, 329–343. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(72\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0021-9681(72)90027-6)

Khoo J, Dhamodaran S, Chen DD, Yap SY, Chen RYT, Tian RHH (2015) Exercise-Induced weight loss is more effective than dieting for improving adipokine Ile, Insulin resistance, And inflammation in obese men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **25**, 566–575. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2015-0025>

Kim J, Kwon HS (2022) Not Control but Conquest: Strategies for the Remission of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J* **46**, 65–180. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0377>

Kodsi R, Chimoriya R, Medveczky D, Grudzinskas K, Atlantis E, Tahrani AA, i sur. (2022) Clinical Use of the Edmonton Obesity Staging System for the Assessment of Weight Management Outcomes in People with Class 3 Obesity. *Nutrients* **14**. <https://doi.org/10.3390/nu14050967>

Koliaki C, Spinos T, Spinou M, Brinia M-E, Mitsopoulou D, Katsilambros N (2018) Defining the Optimal Dietary Approach for Safe, Effective and Sustainable Weight Loss in Overweight and Obese Adults. *Healthcare* **6**, 73. <https://doi.org/10.3390/healthcare6030073>

Kopjar N, Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Želježić D, Gajski G, i sur. (2010a) Normalne i granične vrijednosti mikronukleus-testa na limfocitima periferne krvi u ispitanika opće populacije Republike Hrvatske. *Arh Hig Rada Toksikol* **61**, 219–234. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-2027>

Kopjar N, Želježić D, Kašuba V, Rozgaj R (2010b) Antineoplastični Lijekovi Kao Čimbenik Rizika u Radnom Okolišu: Mehanizmi Djelovanja na Razini Stanice i Pregled Metoda za Otkrivanje Njihovih Genotoksičnih Učinaka. *Arh Hig Rada Toksikol* **61**, 121–146. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-2025>

Kord Varkaneh H, Fatahi S, Tajik S, Rahmani J, Zarezadeh M, Shab-Bidar S (2018) Dietary inflammatory index in relation to obesity and body mass index: a meta-analysis. *Nutr Food Sci* **48**, 702–721. <https://doi.org/10.1108/NFS-09-2017-0203>

Ladeira C, Carolino E, Gomes MC, Brito M (2017) Role of Macronutrients and Micronutrients in DNA Damage: Results From a Food Frequency Questionnaire. *Nutr Metab Insights* **10**, 117863881668466. <https://doi.org/10.1177/1178638816684666>

Ladeira C, Gomes MC, Brito M (2014) 3. Human nutrition, DNA damage and cancer: a review. In: *Mutagenesis: exploring novel genes and pathways*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, p 73–104.

Ladeira C, Smajdova L (2017) The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genet* **04**, 166–191. <https://doi.org/10.3934/genet.2017.3.166>

Langie SAS, Azqueta A, Collins AR (2015) The comet assay: past, present, and future. *Front Genet* **6**, 1–3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00266>

Lee SC, Chan JCN (2015) Evidence for DNA damage as a biological link between diabetes and cancer. *Chin Med J (Engl)* **128**, 1543–1548. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.157693>

Lenth R (2023). *_emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means_*. R package version 1.8.4-1 <<https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>>

Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* **6**, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>

Liang S, Nasir RF, Bell-Anderson KS, Toniutti CA, O’Leary FM, Skilton MR (2022) Biomarkers of dietary patterns: A systematic review of randomized controlled trials. *Nutr Rev* **80**, 1856–1895. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac009>

Lima JEBF, Xavier DJ, Sakamoto-Hojo ET (2019) Oxidative Stress, DNA Damage and Repair Pathways in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. In: Type 2 Diabetes [Working Title]. IntechOpen

Lin X, Li H (2021) Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2**, 1–6. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

Luperini BCO, Almeida DC, Porto MP, Marcondes JPC, Prado RP, Rasera I, i sur. (2015) Gene polymorphisms and increased DNA damage in morbidly obese women. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* **776**, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.004>

Madsen EL, Rissanen A, Bruun JM, Skogstrand K, Tonstad S, Hougaard DM, i sur. (2008) Weight loss larger than 10% is needed for general improvement of levels of circulating adiponectin and markers of inflammation in obese subjects: A 3-year weight loss study. *Eur J Endocrinol* **158**, 179–187. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0721>

Mancini M, Longo K, Esposito I, Pauciullo P (2016) Drastic Calorie Restriction for the Treatment of Massive Obesity. *J Obes Eat Disord* **2**, 13–15. <https://doi.org/10.21767/2471-8203.100014>

Manna P, Jain SK (2015) Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord* **13**, 423–444. <https://doi.org/10.1089/met.2015.0095>

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>

Mendez MA, Wynter S, Wilks R, Forrester T (2004) Under- and overreporting of energy is related to obesity, lifestyle factors and food group intakes in Jamaican adults. *Public Health Nutr* **7**, 9–19. <https://doi.org/10.1079/phn2003508>

Merino J, Megias-Rangil I, Ferré R, Plana N, Girona J, Rabasa A, i sur. (2013) Body weight loss by very-low-calorie diet program improves small artery reactive hyperemia in severely obese patients. *Obes Surg* **23**, 17–23. <https://doi.org/10.1007/s11695-012-0729-6>

Merra G, Gratteri S, De Lorenzo A, Barrucco S, Perrone MA, Avolio E, i sur. (2017) Effects of very-low-calorie diet on body composition, metabolic state, and genes expression: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **21**, 329–345

Milić M, Ožvald I, Vinković Vrček I, Vučić Lovrenčić M, Oreščanin V, Bonassi S, i sur. (2019) Alkaline comet assay results on fresh and one-year frozen whole blood in small volume without cryo-protection in a group of people with different health status. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* **843**, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.03.009>

Møller P (2018) The comet assay: Ready for 30 more years. *Mutagenesis* **33**, 1–7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>

Møller P, Azqueta A, Boutet-Robinet E, Koppen G, Bonassi S, Milić M, i sur. (2020) Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat Protoc* **15**, 3817–3826. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>

Mraz M, Lacinova Z, Drapalova J, Haluzikova D, Horinek A, Matoulek M, i sur. (2011) The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 606–613. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1858>

Mukherjee K, Storici F (2012) A Mechanism of Gene Amplification Driven by Small DNA Fragments. *PLoS Genet* **8**, e1003119. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003119>

Mulligan AA, Luben RN, Bhaniani A, Parry-Smith DJ, O'Connor L, Khawaja AP, i sur. (2014) A new tool for converting food frequency questionnaire data into nutrient and food group values: FETA research methods and availability. *BMJ Open* **4**. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004503>

Muramoto A, Matsushita M, Kato A, Yamamoto N, Koike G, Nakamura M, i sur. (2014) Three percent weight reduction is the minimum requirement to improve health hazards in obese and

overweight people in Japan. *Obes Res Clin Pract* **8**, e466–e475. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.10.003>

Musić Milanović S, Bukal D (2018) Epidemiologija debljine – javnozdravstveni problem. *Medicus* **27**, 7–13

Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, i sur. (2010) Phenol-Explorer. <http://phenol-explorer.eu/>. Pristupljeno 1 rujana 2022.

NICE (2020) Guidelines Nice: Obesity : identification , assessment and management. NICE-The National Institute for Health and Care Excellence, <https://www.nice.org.uk/guidance/cg189/chapter/Recommendations#generic-principles-of-care> Pristupljeno 10. listopada 2022.

NIH (2022) Obesity and Cancer. NIH-National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/obesity/obesity-fact-sheet> Pristupljeno 11. studenog 2022.

Nikolac N, Smolčić VŠ, Šimundić A, Čelap I (2014) Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu : Nacionalne preporuke za uzorkovanje venske krvi

Nilsson R, Liu NA (2020) Nuclear DNA damages generated by reactive oxygen molecules (ROS) under oxidative stress and their relevance to human cancers, including ionizing radiation-induced neoplasia part I: Physical, chemical and molecular biology aspects. *Radiat Med Prot* **1**, 140–152. <https://doi.org/10.1016/j.radmp.2020.09.002>

Norde MM, Collese TS, Giovannucci E, Rogero MM (2021) A posteriori dietary patterns and their association with systemic low-grade inflammation in adults: A systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* **79**, 331–350. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa010>

Ocde O (2014) Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Test No 487 Vitr Mamm Cell Micronucleus Test. <https://doi.org/10.1787/9789264224438-en>

Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**, 23–29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>

Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 291–298. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)

Pajtak A, Šimegi-Đekić V, Osonjački I, Slunjski T, Musulin J, Novak-Fumić N, i sur. (2020) Postupak za liječenje pretilosti odraslih. Opća bolnica Varaždin, Varaždin.

Panuganti KK, Nguyen M KRO [Updated 2020 D 8]. IS [Internet]. TI (FL): SP 2021 J-. A from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459357>. (2018) Obesity - StatPearls - NCBI Bookshelf

Park YMM, Choi MK, Lee SS, Shivappa N, Han K, Steck SE, i sur. (2019) Dietary inflammatory potential and risk of mortality in metabolically healthy and unhealthy phenotypes among overweight and obese adults. *Clin Nutr* **38**, 682–688. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.04.002>

Pazmandi K, Agod Z, Kumar B V., Szabo A, Fekete T, Sogor V, i sur. (2014) Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells. *Free Radic Biol Med* **77**, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.028>

Pfrimer K, Vilela M, Resende CM, Scagliusi FB, Marchini JS, Lima NKC, i sur. (2015) Under-reporting of food intake and body fatness in independent older people: a doubly labelled water study. *Age Ageing* **44**, 103–108. <https://doi.org/10.1093/AGEING/AFU142>

Phillips CL, Grayson BE (2020) The immune remodel: Weight loss-mediated inflammatory changes to obesity. *Exp Biol Med* **245**, 109–121. <https://doi.org/10.1177/1535370219900185>

Powell EE, Jonsson JR, Clouston AD (2010) Metabolic factors and non-alcoholic fatty liver disease as co-factors in other liver diseases. *Dig Dis* **28**, 186–191. <https://doi.org/10.1159/000282084>

R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, <https://www.R.org/>. Pristupljeno 5. rujna 2022.

Ramallal R, Toledo E, Martínez JA, Shivappa N, Hébert JR, Martínez-González MA, i sur. (2017) Inflammatory potential of diet, weight gain, and incidence of overweight/obesity: The SUN cohort. *Obesity* **25**, 997–1005. <https://doi.org/10.1002/oby.21833>

Rogers AM (2020) Current State of Bariatric Surgery: Procedures, Data, and Patient Management. *Tech Vasc Interv Radiol* **23**, 100654. <https://doi.org/10.1016/j.tvir.2020.100654>

Román-Pintos LM, Villegas-Rivera G, Cardona-Muñoz EG, Rodríguez-Carrizalez AD, Moreno-Ulloa A, Rubin N, i sur. (2018) Very Low-Calorie Diets in Type 2 Diabetes Mellitus: Effects on Inflammation, Clinical and Metabolic Parameters. In: *Diabetes and Its Complications*. InTech, p 41–47.

Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Rejon A, M'Hiri N, Garcia-Lobato P, i sur. (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database* **2013**, 1–8. <https://doi.org/10.1093/database/bat070>

Ryan DH, Yockey SR (2017a) Weight Loss and Improvement in Comorbidity: Differences at 5%, 10%, 15%, and Over. *Curr Obes Rep* **6**, 187–194. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0262-y>

Ryan DH, Yockey SR (2017b) Weight Loss and Improvement in Comorbidity: Differences at 5%, 10%, 15%, and Over HHS Public Access. **6**, 187–194. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0262-y>

Santovito A, Gendusa C (2020) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of healthy subjects living in turin (North-Italy): contribution of body mass index, age and sex. *Ann Hum Biol* **47**, 48–54. <https://doi.org/10.1080/03014460.2020.1714728>

Schalkwijk CG, Stehouwer CDA (2020) Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases. *Physiol Rev* **100**, 407–461. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2019>

Schnurrer-Luke-Vrbanić T, Novak S (2000) Utjecaj debljine na lokomotorni sustav. *Medicus* **27**, 55–62

Setayesh T, Nersesyan A, Mišík M, Ferk F, Langie S, Andrade VM, i sur. (2018) Impact of obesity and overweight on DNA stability: Few facts and many hypotheses. *Mutat Res - Rev Mutat Res* **777**, 64–91. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.07.001>

Sharma AM, Kushner RF (2009) A proposed clinical staging system for obesity. *Int J Obes* **33**, 289–295. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.2>

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, i sur. (2012) Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* **36**, 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>

Shivappa N, Steck SE, Hurley TG, Hussey JR, Hébert JR (2014) Designing and developing a literature-derived, population-based dietary inflammatory index. *Public Health Nutr* **17**, 1689–1696. <https://doi.org/10.1017/S1368980013002115>

Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S (2022) Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. *Molecules* **27**. <https://doi.org/10.3390/molecules27030950>

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Sioen S, Cloet K, Vral A, Baeyens A (2020) The cytokinesis-block micronucleus assay on human isolated fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells. *J Pers Med* **10**, 1–12. <https://doi.org/10.3390/jpm10030125>

Škrha J, Kunešová M, Hilgertová J, Weiserová H, Křížová J, Kotrlíková E (2005) Short-term very low calory diet reduces oxidative stress in obese type 2 diabetic patients. *Physiol Res* **54**, 33–39

Soares NP, Santos ACS Dos, Costa EC, Azevedo GD, Damasceno DC, Fayh APT, i sur. (2016) Diet-Induced Weight Loss Reduces DNA Damage and Cardiometabolic Risk Factors in Overweight/Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Ann Nutr Metab* **68**, 220–227. <https://doi.org/10.1159/000444130>

Solá E, Jover A, López-Ruiz A, Jarabo M, Vayá A, Morillas C, i sur. (2009) Parameters of inflammation in morbid obesity: Lack of effect of moderate weight loss. *Obes Surg* **19**, 571–576. <https://doi.org/10.1007/s11695-008-9772-8>

Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M (2020) Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *Int J Mol Sci* **21**, 7–9. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>

Sreelatha G, Muraleedharan A, Chand P, Rajkumar RP, Sathidevi PS (2015) An improved automatic detection of true comets for DNA damage analysis. *Procedia Comput Sci* **46**, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.02.004>

Štimac D, Klobučar Majanović S, Baretić M, Bekavac Bešlin M, Belančić A, Crnčević Orlić Ž, i sur. (2022) Hrvatske smjernice za liječenje odraslih osoba s debljinom. *Medix* **152**, 1–27

Sumithran P, Proietto J (2015) Very-low-calorie diets (VLCDs) for the treatment of obesity. In: *Managing and Preventing Obesity*. Elsevier, p 231–242.

Tančić-Gajić M, Vujović S, Vukčević M, Ivović M, Drezgić M, Marina L V., i sur. (2012) Effects of alternate fasting or very low calorie diet and low calorie diet on metabolic syndrome in severely obese patients. *Hippokratia* **16**, 335–341

Tangvarasittichai S (2015) Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* **6**, 456–480. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>

Tsai AG, Wadden TA (2006) The evolution of very-low-calorie diets: An update and meta-analysis. *Obesity* **14**, 1283–1293. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.146>

Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M (2007) What we need to know when calculating the coefficient of correlation? *Biochem Medica* **17**, 10–15. <https://doi.org/10.11613/bm.2007.002>

Umphonsathien M, Prutanopajai P, Aiam-O-Ran J, Thararoop T, Karin A, Kanjanapha C, i sur. (2019) Immediate and long-term effects of a very-low-calorie diet on diabetes remission and glycemic control in obese Thai patients with type 2 diabetes mellitus. *Food Sci Nutr* **7**, 1113–1122. <https://doi.org/10.1002/fsn3.956>

USDA (2018) Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. USDA-United States Department of Agriculture, <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md->

bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/methods-and-application-of-food-composition-laboratory/mafcl-site-pages/flavonoids/. Pristupljeno 2. srpanj 2022.

Usman M, Volpi E V. (2018) DNA damage in obesity: Initiator, promoter and predictor of cancer. *Mutat Res - Rev Mutat Res* **778**, 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2018.08.002>

Vergoni B, Cornejo PJ, Gilleron J, Djedaini M, Ceppo F, Jacquel A, i sur. (2016) DNA damage and the activation of the p53 pathway mediate alterations in metabolic and secretory functions of adipocytes. *Diabetes* **65**, 3062–3074. <https://doi.org/10.2337/db16-0014>

Voss V, Kroke A, Klipstein-Grobusch K, Boeing H (1997) Obesity as a major determinant of underreporting in a self-administered food frequency questionnaire: Results from the EPIC-Potsdam study. *Eur J Nutr* **36**, 229–236

Wagner KH, Schwingshackl L, Draxler A, Franzke B (2021) Impact of dietary and lifestyle interventions in elderly or people diagnosed with diabetes, metabolic disorders, cardiovascular disease, cancer and micronutrient deficiency on micronuclei frequency – A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res - Rev Mutat Res* **787**, 108367. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108367>

West AP, Shadel GS, Ghosh S (2011) Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol* **11**, 389–402. <https://doi.org/10.1038/nri2975>

Wharton S, Lau DCW, Vallis M, Sharma AM, Biertho L, Campbell-Scherer D, i sur. (2020) Obesity in adults: A clinical practice guideline. *Cmaj* **192**, E875–E891. <https://doi.org/10.1503/cmaj.191707>

WHO (1997) Obesity Preventing and managing the global epidemic. WHO-World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63854> Pristupljeno 18. studenog 2022.

WHO (2016) Obesity and overweight. WHO-World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Pristupljeno 22 listopada 2023.

WHO (1981) Energy and protein requirements : report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO-World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39527>. Pristupljeno 2 svibnja 2023.

Willett W (2013) *Nutritional Epidemiology*, 3rd izd. Oxford University Press, New York.

Włodarczyk M, Jabłonowska-Lietz B, Olejarz W, Nowicka G (2018) Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. *Nutrients* **10**, 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu10050578>

Włodarczyk M, Nowicka G (2019) Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *Int J Mol Sci* **20**, 1146. <https://doi.org/10.3390/ijms20051146>

Wu J, Jin Z, Zheng H, Yan LJ (2016) Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* **9**, 145–153. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S106087>

Xydakis AM, Case CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, O'Brian Smith E, i sur. (2004) Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: The impact of rapid weight lose through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2697–2703. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031826>

Yuan S, Song C, Zhang R, He J, Dou K (2022) Dietary Inflammation Index and Its Association with Long-Term All-Cause and Cardiovascular Mortality in the General US Population by Baseline Glycemic Status. *Nutrients* **14**. <https://doi.org/10.3390/nu14132556>

Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, i sur. (2015) European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes Facts* **8**, 402–424. <https://doi.org/10.1159/000442721>

Zaguia N, Laplagne E, Colicchio B, Cariou O, Al Jawhari M, Heidingsfelder L, i sur. (2020) A new tool for genotoxic risk assessment: Reevaluation of the cytokinesis-block micronucleus assay using semi-automated scoring following telomere and centromere staining. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* **850–851**. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503143>

9. Popis kratica

4-HHE	4-hidroksi-2-heksenal
4-HNE	4-hidroksi-2-nonenal
4-ONE	4-okso-2-nonenal
AGE	konačni produkt glikacije
AHA	Američka udruga za srce
ALM	apendikularna nemasna masa
BMI	indeks tjelesne mase
CBMN	metoda blokiranja citokineze upotrebom citohalazina B
DII	upalni indeks prehrane
DMSO	dimetilsulfoksid
EASO	Europsko udruženje za proučavanje pretilosti
ECS	Europska kardiološka društva
EMA	Europska agencije za lijekove
EOSS	Edmontonov sustava klasifikacije pretilosti
FETA	FFQ EPIC Tool for Analysis
FFQ	upitnik o učestalosti unosa hrane i pića
FPG	formamidopirimidin DNA-glikozilaza
GERB	gastroezofagealna refluksna bolest
GLP-1	glukagonu sličan peptid-1
GLUT4	transporter glukoze 4
LCD	dijeta niskog sadržaja energije
HC	Ministarstvo zdravstva Kanade
HOB_r	hipobromna kiselina
HOCl	hipoklorasta kiselina
HOMA-IR	homeostatski model procjene inzulinske rezistencije
hsCRP	visokoosjetljivi C-reaktivni protein
IDF	Internacionalna dijabetička federacija
IKK β	inhibitor kappa B kinaze β
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IRF3	interferon regulatorni faktor 3
IRF7	interferon regulatorni faktor 7

ITM	indeks tjelesne mase
JNK	JUN N-terminal kinaze
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom
MCP-1	monocitni kemotaktični protein-1
MN	mikronukleus
MUFA	mononezasićene masne kiseline
NDI	proliferacijski indeks
NO	dušikov oksid
N₂O	didušikov oksid
N₂O₃	didušikov trioksid
NAFLD	nealkoholna bolest masne jetre
NBUD	nuklearni pupovi
NF-κB	nuklearni faktor kappa B
NHLBI	Nacionalni institut za srce, pluća i krv
NMP	agaroz normalnog tališta
NO	dušikov oksid
NPB	nukleoplazmatski mostovi
NSS	niža stručna sprema
O₂⁻	Superoksid anion
OECD	Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj
ONO₂⁻	Peroksinitrit anion
ONOOCO₂⁻	Nitrozoperoksikarbonat anion
PARP-1	poli (ADPribozil) polimeraze-1
PKC	protein kinaza C
PUFA	višestruko nezasićene masne kiseline
RNS	reaktivne dušikove vrste
ROS	reaktivne kisikove vrste
SMM	skeletna mišićna masa
SSS	srednja stručna sprema
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TNF-α	faktor tumorske nekroze α
VLCD	dijeta izrazito niskog sadržaja energije
VSS	visoka stručna sprema

WHO Svjetska zdravstvena organizacija, SZO

Prilozi

- **Prilog 1 – Upitnik o učestalosti unosa hrane i pića**
- **Prilog 2 – Upitnik o životnim navikama**
- **Prilog 3 – Odobrenje Etičkog povjerenstva Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa**
- **Prilog 4 – Odobrenje Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada**
- **Prilog 5 – Odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu**

Prilog 1 – Upitnik o učestalosti unosa hrane i pića

Prehrambene namirnice i količine	Prosječan unos namirnice unutar godine dana								
	Nikad ili < od 1 mjesečno	1-3 puta mjesečno	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 dnevno	2-3 puta dnevno	4-5 puta dnevno	6 ili > puta dnevno
Meso i ribe (srednje velika porcija)									
Govedina: pečena, odrezak, mljevena, (120 g) gulaš (330 g)									
Goveđi hamburger									
Svinjetina: pečena, kotlet, (120 g) gulaš (330 g)									
Janjetina: pečena, kotlet (120 g), gulaš (330 g)									
Piletina i druga perad (130 g)									
Slanina (40 g)									
Šunka (40 g)									
Konzervirano meso: usoljena govedina, mesni doručak (40 g)									
Kobasice (45 g)									
Mesne pite, bureci od mesa, kobasica u tijestu (160 g)									
Jetrica, jetrena pašteta, jetrena kobasica (40 g)									
Pržena panirana riba (sa brašnom)									
Riblji štapići, panirana riba (brašno, jaja, krušne mrvice)									
Bijela riba: orada, zubatac, brancin, bakalar									
Plava riba: losos, tuna, srdele, inčuni									
Plodovi mora: dağnje, škampi, rakovi									
Ikra									
Kruh i pekarski proizvodi (veličina porcije -1 šnita ili 1 keks)									
Bijeli kruh i pecivo									
Crni kruh i pecivo									
Integralni kruh i pecivo									
Krekeri (npr. Vic), pogačice od sira									
Suhi krekeri									

4

Prehrambene namirnice i količine	Prosječan unos namirnice unutar godine dana								
	Nikad ili < od 1 mjesečno	1-3 puta mjesečno	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 dnevno	2-3 puta dnevno	4-5 puta dnevno	6 ili > puta dnevno
Žitarice (zdjela)									
Zobena kaša, palenta									
Cornflakes, muesli									
Krumpir, riža i tjestenina (srednje velika porcija)									
Kuhani krumpir, pire krumir, pečeni neoguljeni krumpir (180 g)									
Pommes frites (100 g)									
Pečeni krumpir u pećnici (180 g)									
Krumpir salata (120 g)									
Bijela riža (150 g)									
Smeđa riža (150 g)									
Tjestenina (bijela ili zelena) (230 g)									
Integralna tjestenina (230 g)									
Lazanje, musaka (400 g)									
Pizza (240 g)									
Mliječni proizvodi i masti									
Kiselo vrhnje (žlica)									
"Light" jogurt (125 g)									
Punomasni/grčki jogurt (125 g)									
Mliječni deserti (125 g)									
Sir, npr tilzit, gouda (40 g)									
Svježi sir (40 g)									
Jaja: kuhana, pečena.. (jedno)									
Quiche (120 g)									
Preljev za salatu sa smanjenim udjelom masti (15 g)									
Preljev za salatu na bazi majoneze (30 g)									
Francuski preljev za salatu (15 g)									
Ostali preljevi za salatu (15 g)									

5

Prehrambene namirnice i količine	Prosječan unos namirnice unutar godine dana									
	Nikad ili < od 1 mjesečno	1-3 puta mjesečno	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 dnevno	2-3 puta dnevno	4-5 puta dnevno	6 ili > puta dnevno	
Namazi										
Maslac (15 g)										
Margarin (15 g)										
Margarin sa polinezasićenim masnim kiselinama, npr Omegol (15 g)										
Margarin na bazi maslinovog ulja i mliječni namazi (15 g)										
Namazi sa manje od 60 % masti (15 g)										
Namazi sa manje od 30 % masti (15 g)										
Slastice i grickalice (veličina porcije -1 šnita ili 1 keks)										
Slatki keksi, čokoladni npr. digestive (jedan)										
Slatki keksi, jednostvani (petit beurre)										
Torta npr voćna, biskvit (domaća)										
Torta npr voćna, biskvit (kupovna)										
Slatka peciva, palačinke, krafne (domaća)										
Slatka peciva, palačinke, krafne, croasani (kupovna)										
Voćni kolači, pite, tarte (domaći)										
Voćni kolači, pite, tarte (kupovni)										
Puding, od mlijeka, riže (200 g)										
Sladoled (60 g)										
Cokolada (50 g)										
Čokoladice poput Marsa, Twixa...										
Bomboni (8 g)										
Dodani šećer npr u kavu, čaj... (čajna žličica)										
Čips, smoki (40 g)										
Orašasti plodovi (20 g)										

6

Prehrambene namirnice i količine	Prosječan unos namirnice unutar godine dana									
	Nikad ili < od 1 mjesečno	1-3 puta mjesečno	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 dnevno	2-3 puta dnevno	4-5 puta dnevno	6 ili > puta dnevno	
Juhe, umaci i namazi										
Juha od povrća (220 g)										
Bistra juha od mesa (220 g)										
Bešamel umak, umak od sira, vrhnja, umak od pečanja (60 g)										
Ketchup (30 g)										
Ajvar, pindur (15 g)										
Džem, marmelada, med (15 g)										
Maslac od kikirikija (15 g)										
Pića										
Čaj (šalica)										
Kava (šalica)										
Kava bez kofeina (šalica)										
Kakao, vruća čokolada (šalica)										
Vino (125 ml)										
Pivo, jabukovača (250 ml)										
Slatka vina i slatka alkoholna pića (čaša)										
Žestoka alkoholna pića (čaša)										
Bezalkoholna pića niske kalorijske vrijednosti (čaša)										
Gazirana bezalkoholna pića (čaša)										
100 % sok od naranče (čaša)										
100 % sok od jabuke (čaša)										
Sok od sirupa za razrjeđivanje s vodom (čaša)										
Voće										
Jabuke (1 voćka)										
Kruške (1 voćka)										
Naranče, mandarine (1 voćka)										
Grejp (1 voćka)										

7

Prehrambene namirnice i količine Prosječan unos namirnice unutar godine dana

	Nikad ili < od 1 mjesečno	1-3 puta mjesečno	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 dnevno	2-3 puta dnevno	4-5 puta dnevno	6 ili > puta dnevno
Voće (nastavak sa predhodne stranice)									
Banana (1 voćka)									
Grožđe (100 g)									
Dinja (1 šnjita)									
Breskva, šljiva, marelica (1 voćka)									
Jagoda, malina, kivi (80 g)									
Kompoti (100 g)									
Sušeno voće, grožđice, suha šljiva (30 g)									
Povrće (svježe, smrznuto, konzervirano)									
Mrkva (60 g)									
Špinat (90 g)									
Brokula, kelj (90 g)									
Kelj pupčar (90 g)									
Kupus (90 g)									
Grašak (65 g)									
Mahunе, bob (90 g)									
Tikvica, bundeva (224g)									
Cvjetača (90 g)									
Pastrnjak, repa, koraba (70 g)									
Poriluk (160 g)									
Luk (90 g)									
Cešnjak (10 g)									
Gljive (4g)									
Paprika (160 g)									
Klice (60 g)									
Zelena salata, krastavac, celar (30 g)									
Potočarka (20 g)									
Rajčica (85 g)									
Kukuruz šećerac (60 g)									

8

Prehrambene namirnice i količine Prosječan unos namirnice unutar godine dana

	Nikad ili < od 1 mjesečno	1-3 puta mjesečno	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 dnevno	2-3 puta dnevno	4-5 puta dnevno	6 ili > puta dnevno
Povrće (nastavak sa predhodne stranice)									
Cikla (35 g)									
Salata od kupusa (45 g)									
Avokado (145 g)									
Zapečeni grah (135 g)									
Sušena leća, grah, grašak (30 g)									
Tofu, soja, proteini povrća, veganski burger (60 g)									

Postoji li hrana koju ste jeli unutar godine dana a da nije obuhvaćena ovim upitnikom? Ako da, molimo naznačite u listi u nastavku

Vrsta hrane	Veličina serviranja	Broj konzumiranja unutar tjedan dana

Koju vrstu mlijeka najčešće koristite?

Odaberite samo jedan odgovor

Punomasno mlijeko (3,5 % -4,0 % m.m.)	Poluobrano mlijeko (1,5 %-2,8 % m.m.)	
Obrano mlijeko (do 0,5 % m.m.)	Standardizirano ekstra punomasno mlijeko (4,0 %-9,0 % m.m)	
Mlijeko u prahu	Mlijeko od soje	
Ostala mlijeka	Niti jedno	

9

Koliko često jedete prženi hranu vani?

Svakodnevno		4-6 puta tjedno	
1-3 puta tjedno		Nikad	
Manje od jednom tjedno			

Što radite se vidljivom masnoćom na mesu?

Većinu pojedem		Pojedem što je manje moguće	
Pojedem manji dio		Ne jedem uopće to meso	

Koliko puta tjedno jedete pečeno meso?

Pečeno meso najčešće termički obradim do stupnja:

Izrazito pečenog mesa (tamno smeđe boje)	
Srednje pečenog mesa	
Lagano termički obrađenog (skoro sirovog)	
Ne jedem meso	

Koliko često dodajete sol u hranu za vrijeme kuhanja?

Uvijek		Rijetko	
Često		Nikad	
		Ponekad	

Koliko često dodajete sol u hranu nakon kuhanja (za vrijeme obroka)?

Uvijek		Rijetko	
Često		Nikad	
		Ponekad	

Da li redovito koristite zamjenu za sol (npr. Supisol)?

Ako da, koju?

11

Za vrijeme obroka, koliko ste prosječno unutar godine dana konzumirali slijedeću hranu?

	Broj obroka tjedno
Povrće (ne uključuje krumpire)	
Salate	
Voće i proizvodi od voća (ne uključuje voćne sokove)	
Ribu i riblje proizvode	
Mesom, mesna jela i mesne proizvode (uključuje slaninu, šunku i piletinu)	

Hvala Vam na pomoći

12

Prilog 2 – Upitnik o životnim navikama



Institut za
medicinska
istraživanja
i medicinu
rada

Institute
for Medical
Research and
Occupational
Health



UPITNIK

Ispitanik (inicijali) :

Datum i godina rođenja:

Spol: M Ž

	Trenutno zaposlenje	Prethodno zaposlenje
Gdje radite?		
Koliko dugo (u godinama)		
Po zanimanju ste:		
Da li ste na svom radnom mjestu ili u slobodno vrijeme bili izloženi (zaokružiti):	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proizvodnji/upotrebi pesticida, herbicida, fungicida ili insekticida (vrt, poljoprivreda,...) 2. Proizvodnji stakla 3. Proizvodnji poluvodiča, solarnih baterija, uređaja koji koriste mikrovalno zračenje 4. Piljenje, pjeskarenje/brušenje lakiranog ili impregniranog drveta 5. Taljenje metala kao što su bakar ili olovo 6. Uklanjanje opasnog otpada 7. Rad sa životinjama (napisati koji tip)..... 8. Ionizirajućem zračenju 9. Citotoksičnim lijekovima 10. Organskim otapalima 11. Bojama 12. Lakovima za drvo, kemijskim tretmanima drva? 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proizvodnji/upotrebi pesticida, herbicida, fungicida ili insekticida 2. Proizvodnji stakla 3. Proizvodnji poluvodiča, solarnih baterija, uređaja koji koriste mikrovalno zračenje 4. Piljenje, pjeskarenje/brušenje lakiranog ili impregniranog drveta 5. Taljenje metala kao što su bakar ili olovo 6. Uklanjanje opasnog otpada 7. Rad sa životinjama (napisati koji tip)..... 8. Ionizirajućem zračenju 9. Citotoksičnim lijekovima 10. Organskim otapalima 11. Bojama 12. Lakovima za drvo, kemijskim tretmanima drva?
Ako da, koliko često u tjednu, mjesecu, godini?		

Zdravstveno stanje i životne navike

Pretrage u zadnjih godinu dana kao pacijent-izloženost zračenju (rtg zuba, pluća, operacija, CT, mamografija)???	NE DA, ako da, što i koliko puta u godinu dana								
Izloženost zračenju kroz cijeli život? Koliko rtg i kojih (zub ,pluća...), CT, mamografija...									
Kronične bolesti, ako da koje i koliko dugo u godinama	NE DA:								
TUMORSKE BOLESTI ako da koje i koliko dugo u godinama	NE DA:								
TUMORSKE BOLESTI u najbližih srodnika ako da koje i koliko dugo u godinama	NE DA:								
Uzimanje lijekova u zadnjih mjesec dana, kojih?	NE DA:								
Puшите li ? ako da, što i koliko komada mjesečno? Koliko dugo u godinama?	NE DA: 1. Cigarete 2. Duhan 3. Lula 4. Elektronska cigareta Komada mjesečno:..... Koliko dugo u godinama:.....								
Jeste li koristili vitamine, minerale, riblje ulje, vlakna ili druge suplemente unutar godine dana?	DA NE PONEKAD NE ZNAM								
Ako ste na prethodno pitanje odgovorili sa da i ponekad, molimo Vas ispunite tablicu u nastavku.									
Suplement				Prosječna učestalost uzimanja unutar godine dana					
Proizvođač	Ime	Doza	Količina	Nikad ili < 1 mjesечно	1-3 puta mjesечно	1 tjedno	2-4 puta tjedno	5-6 puta tjedno	1 dnevno
Npr. Pliva	Plivit C	500 mg	1				v		



Institut za
medicinska
istraživanja
i medicinu
rada

Institute
for Medical
Research and
Occupational
Health



Fizička aktivnost, sport?(rekreativno, povremeno, regularno, što i koliko puta tjedno ili mjesečno?)	
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Ako želite dobiti rezultate istraživanja o vama, napišite vaš e-mail:

Ivan Ožvald, spec. med. biokem. i lab. medicine Broj telefona: 047/ 819-070 Email: ivan.ozvald@bolnica-dugaresa.hr

U nastavku se nalazi dio upitnika vezan za Vaše prehrambene navike. Molimo Vas da na svako pitanje odgovorite.

Pitanja obuhvaćaju Vaše prehrambene navike unutar godine dana. Veličina hrane u upitniku podrazumijeva veličinu srednjeg serviranja hrane tj. gdje je primjenjivo šnjite ili količinu namirnice izražene pomoću veličine žlice ili zdjelice.

Prilog 3 – Odobrenje Etičkog povjerenstva Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa

SPECIJALNA BOLNICA ZA PRODUŽENO LIJEČENJE DUGA RESA
J.Jeruzalema 7, Duga Resa

ETIČKO POVJERENSTVO

Broj: 08-08-970/19
Duga Resa, 15. travnja 2019.

Na temelju članka 95. Zakona o zdravstvenoj zaštiti („Narodne novine“ br. 100/18.) i članka 30. Statuta Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa, Etičko povjerenstvo Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa na 4. sjednici održanoj dana 15. travnja 2019. godine, donijelo je

O D L U K U

Odobrava se Ivanu Ožvaldu, spec.med.biochem. provođenje istraživanja pod nazivom „Utjecaj trotjedne hipokalorijske dijeta na antropometrijske i biokemijske parametre, status vitamina, minerala, hormona, oksidativni status i DNK oštećenja u pretilih odraslih osoba liječenih u Specijalnoj bolnici za produženo liječenje Duga Resa“.

Istraživanje će se provoditi u Dijabetološkoj i endokrinološkoj ordinaciji, Odjelu produženog liječenja II-Interna medicina i Odjelu medicinsko-biokemijskog laboratorija Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa, a podaci dobiveni istraživanjem koristiti će se za izradu znanstvenih radova i izradu doktorskog rada.

Identitet osoba koje sudjeluju u istraživanju mora biti zaštićen, tj. ne smije se navoditi u znanstvenim radovima i u doktorskome radu.

Obrazloženje

Ivan Ožvald, spec.med.biochem. podnio je 9. travnja 2019. godine zamolbu Etičkom povjerenstvu Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa za provođenje istraživanja pod nazivom „Utjecaj trotjedne hipokalorijske dijeta na antropometrijske i biokemijske parametre, status vitamina, minerala, hormona, oksidativni status i DNK oštećenja u pretilih odraslih osoba liječenih u Specijalnoj bolnici za produženo liječenje Duga Resa“.

Etičko povjerenstvo je temeljem svojih ovlasti iz čl. 95. Zakona o zdravstvenoj zaštiti i čl. 30. Statuta Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa udovoljilo njegovoj zamolbi.

Slijedom navedenog, odlučeno je kao u dispozitivu.

PREDSJEDNIK
ETIČKOG POVJERENSTVA
Damir Samovojska, dr.med.spec.



Prilog 4 – Odobrenje Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada



Institut za
medicinska
istraživanja
i medicinu
rada

ETIČKO
POVJERENSTVO

Ur. br.: 100-21/19-10
Zagreb, 6. lipnja 2019.

Etičko povjerenstvo u sastavu Jelena Macan, Radovan Fuchs, Maja Peraica i Jure Zovko na sjednici održanoj 6. lipnja 2019. godine proučilo je dokumentaciju o planiranom dijelu istraživanja koje će se provoditi na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu pod naslovom:

„Utjecaj trotjedne hipokalorijske dijeta na antropometrijske i biokemijske parametre, status vitamina, minerala, hormona, oksidativni status i DNK oštećenja u pretilih odraslih osoba liječenih u Specijalnoj bolnici za produženo liječenje Duga Resa“

voditelj: Ivan Ožvald, spec.med. biokem. i lab. medicine
voditelj dijela istraživanja na IMI-u: dr.sc.Mirta Milić, viši znanstveni suradnik

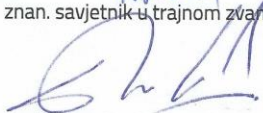
i ocijenilo da će prikupljanje podataka anketnim upitnikom, antropometrijska mjerenja i uzimanje venozne krvi ispitanika biti izvedeni:

1. u skladu s moralnim i znanstvenim načelima koja nalažu opravdanost uzimanja biološkog uzorka;
2. da će zahvate provesti odgovarajuće kvalificirano osoblje;
3. tako da neće proizvesti rizik za zdravlje ili život ispitanika;
4. uz svjesni pristanak ispitanika;
5. tako da će podaci dobiveni uzimanjem uzoraka biti rabljeni isključivo u znanstvene svrhe i neće biti dostupni javnosti na način koji bi oštetio pravo na privatnost i anonimnost ispitanika;
6. da će biološki materijal biti neškodljivo uklonjen u skladu s Uredbom o kategorijama, vrstama i klasifikaciji otpada s katalogom otpada i listom opasnog otpada (NN 50/05 i 39/09).


te da su stoga u potpunom suglasju s preporukama Helsinške deklaracije o ljudskim pravima, Zakonom o potvrđivanju Konvencije o zaštiti ljudskih prava i dostojanstva ljudskog bića u pogledu primjene biologije i medicine (NN Međunarodni ugovor 13/2003), dijela koji se odnosi na istraživanja na ljudima kao i na zaštitu privatnosti i anonimnosti te s Uredbom (EU) 2016/679 Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti pojedinaca u vezi s obradom osobnih podataka i o slobodnom kretanju takvih podataka (Službeni list Europske unije, L 119/1 od 4. 5. 2016.).


Etičko povjerenstvo:


prim. dr. sc. Jelena Macan, dr. med.
znan. savjetnik u trajnom zvanju


prof. dr. sc. Radovan Fuchs, dr. vet. med.
znan. savjetnik u trajnom zvanju


prof. dr. sc. Jure Zovko, prof. filoz


dr. sc. Maja Peraica, dr. med.
znan. savjetnik u trajnom zvanju


dr. sc. Martina Piasek, dr. med.
znan. savjetnik u trajnom zvanju

T +385 1 4682 500
A Ksaverska cesta 2, 10 000 Zagreb
W www.imi.hr

Prilog 5 – Odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu



Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

ETIČKO POVJERENSTVO

A Šalata 3
10000 Zagreb

T +385 1 45 66 777
F +385 1 49 20 053

E mf@mef.hr
W www.mef.unizg.hr

Ur. Broj: 380-59-10106-20-111/174
Klasa: 641-01/20-02/01

Zagreb, 14.12.2020.

Ivan Ožvald, mag.med.biochem.
Heinzelova 47a
10 000 Zagreb

Mišljenje Etičkog povjerenstva

Etičko povjerenstvo MEDICINSKOG FAKULTETA u Zagrebu razmotrilo je načela etičnosti istraživanja prijavljenog u sklopu izrade disertacije **Ivana Ožvalda, mag.med.biochem.** pod naslovom:

„Utjecaj kontrolirane restriktivne dijeta na oštećenja DNA, antropometrijske i biokemijske parametre“

i zaključilo da je prikazano istraživanje etički prihvatljivo.

Prof. dr. sc. Zdravka Poljaković
Predsjednica Etičkog povjerenstva



Dostavljeno: 1. Podnositelju zahtjeva
2. Arhiva Povjerenstva

**Životopis i popis
objavljenih radova**

Ivan Ožvald rođen je u Karlovcu gdje je završio osnovnu školu i Gimnaziju Karlovac. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, smjer medicinska biokemija upisao je 2001. godine. Tijekom studiranja dobio je CEPUS stipendiju u sklopu koje je boravio 3 mjeseca u Varšavi. Diplomirao je 2007. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Nakon pripravničkog staža, 2008. godine zaposlio se u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine položio je 2014. godine. Od 2015. do 2022. bio je voditelj Odjela medicinsko-biokemijskog laboratorija Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa, te član Stručnog vijeća i Povjerenstva za kvalitetu Specijalne bolnice za produženo liječenje Duga Resa. Od 2022. godine do danas radi u Medicinsko-biokemijskom laboratoriju Neuropsihijatrijske bolnice dr. Ivan Barbot Popovača. Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB), Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) i Hrvatskog genetičkog društva. Od 2017. – 2018. bio je predsjednik Povjerenstva za ekonomska pitanja Hrvatske komore medicinskih biokemičara.

Aktivno je sudjelovao na više domaćih i međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova. Bio je predavač na tečaju trajne edukacije HKMB i Hrvatskom kongresu medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem. Autor je i koautor 7 znanstvenih članka objavljenih u Web of Science Core Collection, 1 znanstvenog članka u ostalim časopisima, 20 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenim u časopisima s međunarodnom recenzijom, 7 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenih u knjigama sažetaka te poglavlja u stručnoj knjizi.

Znanstveni rad objavljen u časopisima koji su zastupljeni *Web of Science Core Collection (WoSCC)*

1. Milić, M., Ožvald, I., Matković, M., Radašević, H., Nikolić, M., Božičević, D., Duh, L., Matovinović, M., Bituh, M. Combined Approach: FFQ, DII, Anthropometric, Biochemical and DNA Damage Parameters in Obese with BMI $\geq 35\text{kgm}^{-2}$.// *Nutrients*. 15, 1-38 (2023)
2. Ožvald, I., Božičević, D., Duh, L., Vinković Vrček, I., Domijan, A-M., Milić, M. Changes in anthropometric, biochemical, oxidative, and DNA damage parameters after 3-weeks-567-kcal-hospital-controlled-VLCD in severely obese patients with BMI $\geq 35\text{ kg m}^{-2}$. *Clinical Nutrition* 9 (2022)
3. Ožvald, I., Božičević, D., Duh, L., Vinković Vrček, I., Pavičić, I., Domijan, A-M., Milić, M. Effects of a 3-Week Hospital-Controlled Very-Low-Calorie Diet in Severely Obese Patients. *Nutrients* 13 (2021)
4. Milić M., Ožvald I., Vinković Vrček I., Vučić Lovrenčić M., Orescanin V., Bonassi S., Rojas E. Alkaline comet assay results on fresh and one-year frozen whole blood in small volume without cryo-protection in a group of people with different health status. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 843, 3-10 (2019)
5. Prkačin, I., Ožvald I., Cavrić, G., Balenović, D., Bulum, T., Flegar-Meštrić, Z. Importance of urinary NGAL, serum creatinine standardization and estimated glomerular filtration rate in resistant hypertension. *Coll.Atropol*. 37, 821-5 (2013)
6. Radišić Biljak, V., Ožvald, I., Radeljak, A., Majdenić, K., Lasić, B., Šiftar, Z., Vučić Lovrenčić, M., Flegar-Meštrić, Z. Validation of a laboratory and hospital information system in a medical laboratory accredited according to ISO 15189. *Biochemia Medica* 22, 86-91 (2012)
7. Flegar-Meštrić, Z., Nazor, A., Perkov, S., Šurina, B., Kardum-Paro, M.M., Šiftar, Z., Sikirica, M., Sokolić, I., Ožvald, I., Vidas, Ž. Accreditation of medical laboratories in Croatia – experiences of the Institute of clinical chemistry, University Hospital Merkur, Zagreb. *Coll Antropol* 34, 181-6 (2010)

Znanstveni rad recenziran, objavljen u domaćem časopisu s naznačenom kategorizacijom

1. Flegar-Meštrić, Z., Nazor, A., Perkov, S., Šurina, B., Šiftar, Z., Ožvald, I., Vidas, Ž. Značenje akreditacije kliničkih laboratorija u transplantacijskoj medicini. Acta Medica Croatica 2011;65(Suppl.1):23-9.

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom

1. Ožvald, I., Bituh, Martina; Radašević, Hrvoje; Nikolić, Maja; Matković, Martina; Božičević, Dragan; Duh, Lidija; Vinković Vrček, Ivana; Domijan, Ana-Marija; Milić, Mirta, 1500-kcal-nutritionally balanced reduction vs. 567-kcal-hospitally controlled diet differences on anthropometric, biochemical, oxidative, primary and permanent DNA damage parameters in severely obese patients with BMI \geq 35kgm⁻² after 3 weeks of diet—preliminary results. // Joint EEMGS meeting & Internatiional Comet Assay workshop Maastricht, Nizozemska, 2022. str. 84-84 (poster, podatak o recenziji nije dostupan, sažetak, znanstveni)
2. Ožvald, I., Božičević, D., Vinković Vrček, I., Pavičić, I., Domijan, AM., Milić, M., Micronucleus cytome assay results in obese patients with body mass index (BMI) \geq 35 on a 500-kcal-3-week dietcontrolled in hospital. // Abstracts of the 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation CROTOX Zagreb, 2021. str. 27-27. (usmeno priopćenje, međunarodna recenzija)
3. Ožvald I., Božičević D., Vinković Vrček I., Pavičić I., Domijan AM., Milić M. Differences between biochemical and DNA damage parameters (comet assay and micronucleus assay) before and after three weeks of interventional hypocaloric diet in obese patients monitored in the Special Hospital for extended treatment of Duga Resa, Croatia – preliminary results. 10th International congress of the Turkish society of toxicology. 16-19.10.2019. Antalya P150; P41
4. Ožvald I., Božičević D., Vinković Vrček I., Pavičić I., Domijan AM., Milić M. The influence of a three-week hypocaloric diet on DNA damage parameters messured by alkinе comet assay and cytochalasin B-blocked micronucleus assay in obese patients from Special Hospital for extended Treatment of Duga Resa- preliminary results. 1 st Congress of

- Genetics in Bosnia and Herzegovina with International Participation, Sarajevo 2-4.10.2019 P:31; O12
5. Perkov, S., Flegar-Meštrić, Z., Ožvald, I., Kocman, B., Čolić Cvrlje, V., Čakalo, Lj. The impact of different methods of creatinine measurements on MELD scoring system (abstract). 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS «Laboratory Medicine at the Clinical Interface» i 7th Congress of the Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory Medicine (CSMBLM), Dubrovnik, 10-13.10.2012.; P12-02; A134
 6. Ožvald, I., Mrzljak, A., Radišić Biljak, V., Perkov, S., Flegar-Meštrić, Z. Influence of immunosuppressive regimen change on renal function in liver transplant recipients (abstract). 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS «Laboratory Medicine at the Clinical Interface» i 7th Congress of the Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory Medicine (CSMBLM), Dubrovnik, 10-13.10.2012.; P21-12; A196
 7. Radeljak, A., Podobnik Brlečić, P., Ožvald, I., Gebauer Vuković, B., Podobnik, M., Stojanović, N. Comparison of the «SsdwLab 5.0.9» and «Fetal Medicine Foundation» Down syndrom screening softwares (abstract). 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS «Laboratory Medicine at the Clinical Interface» i 7th Congress of the Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory Medicine (CSMBLM), Dubrovnik, 10-13.10.2012.; P19-04; A181
 8. Mrzljak, A., Galešić-Ljubanović, D., Ožvald, I., Čolić-Cvrlje, V., Filipec-Kanižaj, T., Kocman, B., Knotek, M. Chronic kidney disease after liver transplantation (abstract). The 2011 Joint International Congress of ILTS, ELITA, and LICAGE, Valencia, Spain, 22.25.6.2011. Liver Transplantation 2011;Vol.14, No6, Supplement 1:S163. Abstract# P-110
 9. Flegar-Meštrić, Z., Ožvald, I., Šimonović, B., Knotek, M., Vidas, Ž., Sabljarić-Matovinović, M. Value of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury after kidney transplantation: A pilot study (abstract). IFCC–WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011, Berlin 15-19 May 2011. Clin Chem Lab Med 2011;49, Special supplement; 0712
 10. Flegar-Meštrić, Z., Šurina, B., Perkov, S., Ožvald, I., Šimonović, B. Measurement uncertainty for routine measurement procedures in clinical chemistry laboratory accredited according to ISO 15189 (oralna prezentacija). IFCC–WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011, Berlin 15-19 May 2011. Clin Chem Lab Med 2011;49, Special supplement; 1198
 11. Šurina, B., Čolić-Cvrlje, V., Mrzljak, A., Kocman, B., Šiftar, Z., Perkov, S., Vidas, Ž., Ožvald, I., Flegar-Meštrić Z. Therapeutic drug monitoring in transplant patients (abstract).

- First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P09-2, p. 84
12. Šimonović, B., Ožvald, I., Šurina, B., Šiftar, Z., Flegar-Meštrić Z. Performance characteristics and clinical usefulness of troponin I assays (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P18-8, p. 167.
 13. Flegar-Meštrić, Z., Nazor, A., Perkov, S., Šurina, B., Kardum Paro, M.M., Šiftar, Z., Sikirica, M., Sokolić, I., Ožvald, I., Šimonović, B., Vidas, Ž. The role of laboratory diagnostics in liver transplantation (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P09-1, p. 83.
 14. Ožvald I., Šurina, B. Praćenje imunosupresivne terapije transplantiranih bolesnika. 6. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem. 30.9.-4.10.2009. Supetar, Brač. *Biochemia Medica* 2009;19, supplement 1:S60. (pozvano predavanje)
 15. Flegar-Meštrić, Z., Perkov, S., Kardum Paro, M.M., Ožvald, I., Šimonović, B., Sikirica, M. Harmonizacija referentnih intervala za koncentraciju kreatinina u serumu. 6. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem. 30.9.-4.10.2009. Supetar, Brač. *Biochemia Medica* 2009;19, supplement 1:S177.
 16. Ožvald, I., Šurina, B., Flegar-Meštrić, Z., Vidas, Ž. Prednost određivanja takrolimusa na Abbott Architect analizatoru (sažetak). 6. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem. 30.9.-4.10.2009. Supetar, Brač. *Biochemia Medica* 2009;19, supplement 1:S154 (usmeno priopćenje)
 17. Flegar-Meštrić Z., Perkov, S., Kardum Paro, M.M., Sikirica, M., Ožvald, I., Šimonović, B., Šurina, B. Applicability of the recommended reference intervals for serum creatinine concentrations (abstract). *Euromedlab Innsbruck 2009; 18th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-C025. Clin Chem Lab Med* 2009;47, Special Suppl., S376.
 18. Flegar-Meštrić, Z., Kardum Paro, M.M., Šiftar, Z., Perkov, S., Sikirica, M., Ožvald, I., Sokolić, I., Nazor, A., Šurina, B., Vidas Ž. The impact of an electronic information system on clinical laboratory efficiency and prevention of identification errors (abstract). *Euromedlab Innsbruck 2009; 18th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-C034. Clin Chem Lab Med* 2009;47, Special Suppl., S257.
 19. Ožvald, I., Šurina, B., Perkov, S., Šimonović, B., Čolić-Cvrlje, V., Naumovski-Mihalić, S., Kocman, B., Vidas, Ž., Flegar-Meštrić, Z. Effect of primary immunotherapy on post

transplantation outcome in HCV-infected liver transplant recipients (abstract). Euromedlab Innsbruck 2009; 18th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-A140. Clin Chem Lab Med 2009;47, Special Suppl., S292.

20. Perkov, S., Ožvald, I., Flegar-Meštrić Z. Assuring quality of examination procedures in medical-biochemical laboratory according the ISO 15189:2003 (abstract). 3rd Slovenian Congress of Clinical Chemistry, Ljubljana, Slovenia, Nov.13-15, 2008. Clin Chem Lab Med 2008; 46(10): A248

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u knjigama sažetaka

1. Milić, M., Ožvald, I., Bituh, M., Radašević, H., Nikolić, M., Božičević, D., Duh, L., Matovinović, M., (2022) Influence of the 3-weeks-1500-kcal-well-balanced-Diet on DNA Damage (in)Stability, Anthropometric and Biochemical Parameters in Normotensive and Hypertensive Obese Group with BMI ≥ 35 kg/m⁻² a Pilot Study. Book of abstracts Stevo Julius Zagreb conference on prehypertension, hypertension and cardiovascular protection, Zagreb, 2022. str. 79-79. Stevo Julius Zagreb conference on prehypertension, hypertension and cardiovascular protection, 3.-6.11.2022. Zagreb
2. Ožvald, I., Bituh, M., Radašević, H., Nikolić, M., Matovinović, M., Božičević, D., Duh, L., Vinković Vrček, I., Domijan, A.-M., Milić M. (2022) Utjecaj trotjedne redukcijske dijeta na antropometrijske i biokemijske parametre te oštećenja DNA u pretilih osoba – preliminarni rezultati. Knjiga sažetaka Dani doktorata biotehničkog područja 2022 (Kos, B., Ivanković, A., Beljo Lučić, R., Novak, J., Rumbak, I., Balbino, S., ur.). Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska, (2022), str. 120-121, ISBN: 978-953-6893-18-8, Dani doktorata biotehničkog područja 2022, Zagreb, Hrvatska 28.-29.9.2022. Agronomski fakultet, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilišta u Zagrebu
3. Sabljak, S., Šarlija, E., El Barq, R., Karadžić, A., Ožvald, I. Značaj praćenja prijeanalitičkih indikatora u analitici lijekova (sažetak). 1. kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika s međunarodnim sudjelovanjem. Baška, 18.-21.4.2012. Knjiga sažetaka, p. 30
4. Sabljak, S., Šarlija, E., El Barq, R., Karadžić, A., Ožvald, I. Značaj praćenja prijeanalitičkih indikatora u analitici lijekova (sažetak). 1. kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika s međunarodnim sudjelovanjem. Baška, 18.-21.4.2012. Knjiga sažetaka, p. 30

5. Radišić Biljak, V., Ožvald, I., Budiša, D., Lasić, B., Flegar-Meštrić, Z., Vučić Lovrenčić, M. Validation of information applications – Improvement in the quality of services of a medical biochemistry laboratory and a response to the demands of an accreditation standard. 1st Congress of Croatian Society for Quality Improvement in Healthcare. Opatija 9.-11.6.2011. P-12E
6. Flegar-Meštrić Z., Nazor, A., Perkov, S., Šurina, B., Kardum Paro, M.M., Šiftar, Z., Sikirica, M., Sokolić, I., Ožvald, I., Vidas Ž. The purpose of clinical laboratory accreditation in transplantation medicine (pozvano predavanje), 19. međunarodni simpozij Hrvatskoga društva medicinskih biokemičara i Slovenskog združenja za klinično kemiju, 14.5.2010., Zagreb, p. 3-5.
7. Šurina, B., Ožvald, I., Čolić-Cvrlje, V., Mrzljak, A., Kocman, B., Šiftar, Z., Perkov, S., Vidas, Ž., Flegar-Meštrić, Z. Immunosuppressive therapy in transplant patients – benefits and challenges (pozvano predavanje), 19. međunarodni simpozij Hrvatskoga društva medicinskih biokemičara i Slovenskog združenja za klinično kemiju, 14.5.2010., Zagreb, p. 11-12.
8. Flegar-Meštrić, Z., Nazor, A., Perkov, S., Šurina, B., Kardum Paro, M.M., Šiftar, Z., Sikirica, M., Sokolić, I., Ožvald, I., Vidas Ž. Accreditation of medical laboratories in Croatia – experiences of The Institute of Clinical Chemistry Clinical Hospital Merkur (pozvano predavanje), Zagreb. 4. hrvatski kongres kliničke citologije; 11-14.10.2009. Split. Knjiga sažetaka, p. 153.

Poglavlje u stručnoj knjizi (recenziranoj)

1. Ivan Ožvald: Automatizirana kvalitativna analiza mokraće. U priručniku za trajno usavršavanje Z.Flegar-Meštrić: Kvalitativna analiza mokraće. Tečaj trajnog usavršavanja medicinskih biokemičara, Zagreb, Medicinska naklada i HKMB, 2013. p. 71-86. ISBN 978-953-7468-27-9