

# Aktivnost antioksidativnih enzima kod mladih zdravih ispitanika i kod kardiovaskularnih bolesnika koji konzumiraju obogaćena kokošja jaja

---

Duvnjak, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:138453>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marija Duvnjak**

**AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH  
ENZIMA KOD MLADIH ZDRAVIH  
ISPITANIKA I KOD  
KARDIOVASKULARNIH BOLESNIKA  
KOJI KONZUMIRAJU OBOGAĆENA  
KOKOŠJA JAJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Marija Duvnjak**

**AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH**  
**ENZIMA KOD MLADIH ZDRAVIH**  
**ISPITANIKA I KOD**  
**KARDIOVASKULARNIH BOLESNIKA**  
**KOJI KONZUMIRAJU OBOGAĆENA**  
**KOKOŠJA JAJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, na Katedri za fiziologiju i imunologiju, u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.

Mentor rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr.med.

Rad ima 43 lista, 11 slika i 1 tablicu.

*Zahvale*

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr.med. na velikoj stručnoj pomoći tijekom istraživanja i izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem Nataši Kozini i Petru Šušnjari na strpljenju i pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela diplomskog rada.*

*Isto tako ovim putem zahvaljujem profesorima i predavačima na nesebičnom dijeljenju iskustva i znanja kako bi što lakše usvojili potrebno gradivo.*

*Hvala svim mojim kolegama koji su pridonijeli stvaranju ovog diplomskog rada i onima koji su moje studentske dane pretvorili u neizbrisive uspomene.*

## SADRŽAJ RADA

1. UVOD.....	1
1.1. Oksidativni stres i nastanak slobodnih radikala.....	1
1.2. Antioksidativni mehanizmi.....	2
1.3. Enzimski antioksidansi.....	3
1.3.1. Katalaza.....	3
1.3.2. Superoksid-dismutaza.....	3
1.3.3. Glutation-peroksidaza.....	4
1.4. Neenzimski antioksidansi.....	5
1.4.1. Minerali.....	5
1.4.2. Vitamini.....	5
1.5. n-3 polinezasićene masne kiseline.....	6
1.5.1. Uloga n-3 polinezasićenih masnih kiselina.....	7
2. HIPOTEZA.....	8
3. CILJ.....	9
4. ISPITANICI I METODE.....	10
4.1. Ustroj studije.....	10
4.2. Ispitanici.....	10
4.2.1. Kardiovaskularni bolesnici.....	11
4.2.2. Zdravi ispitanici.....	12
4.3. Metode.....	12

4.3.1. Uzorkovanje venske krvi .....	12
4.3.2. Spektrofotometrijske metode .....	13
4.3.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) .....	14
4.3.4. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GPx) .....	14
4.3.5. Određivanje aktivnosti superoksid-dismuzate (SOD) .....	15
4.4. Statističke metode .....	15
5. REZULTATI .....	16
6. RASPRAVA .....	25
7. ZAKLJUČAK .....	28
8. SAŽETAK .....	29
9. SUMMARY .....	30
10. LITERATURA .....	31
11. ŽIVOTOPIS .....	35

## POPIS KRATICA

ALS – amiotrofična lateralna skleroza, engl. *amyotrophic lateral sclerosis*

ALA –  $\alpha$ -linolenska kiselina, engl. *alpha-linolenic acid*

CAT – katalaza, engl. *catalase*

CRP – C-reaktivni protein, engl. *C-reactive protein*

Cu/Zn SOD / SOD1 – bakar/cink superoksid dismutaza / superoksid dismutaza 1, engl. *copper/zinc superoxide dismutase / superoxide dismutase 1*

DHA – dokosaheksaenoična kiselina, engl. *docosahexaenoic acid*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*

EC-SOD / SOD3 – izvanstanična superoksid dismutaza / superoksid dismutaza 3, engl. *extracellular superoxide dismutase / superoxide dismutase 3*

EPA – eikosapentaenska kiselina, engl. *eicosapentaenoic acid*

GPx – glutation peroksidaza, engl. *glutathione peroxidase*

GPx1 – glutation peroksidaza 1, engl. *glutathione peroxidase 1*

GSH – glutation, engl. *glutathione*

GSSG – glutation disulfid, engl. *glutathione disulfide*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodikov peroksid, engl. *hydrogen peroxide*

IL-6 – interleukin 6, engl. *interleukin 6*

KVB – kardiovaskularne bolesi, engl. *cardiovascular diseases*

Mn SOD / SOD2 – mangan superoksid dismutaza / superoksid dismutaza 2, engl. *manganese superoxide dismutase / superoxide dismutase 2*

NO – dušikov monoksid, engl. *nitric oxide*



$O_2^-$  – superoksidni anion, engl. *superoxide anion*

$O_2$  – kisik, engl. *oxygen*

ONOO<sup>-</sup> – anion peroksinitrita, engl. *peroxynitrite anion*

PUFA – polinezasićene masne kiseline, engl. *polyunsaturated fatty acids*

ROS – reaktivni kisikovi spojevi, engl. *reactive oxygen species*

SOD – supeoksid dismutaza, engl. *superoxide dismutase*

UV – ultraljubičasto zračenje, engl. *ultraviolet radiation*

## 1. UVOD

### 1.1. Oksidativni stres i nastanak slobodnih radikala

Oksidativni stres označava stanje neravnoteže koje nastaje zbog formiranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*) i nedostatka antioksidanata neophodnih za zaštitu organizma (1). U stanicama se javlja kao posljedica jednog od triju čimbenika:

1. povećano nastajanje ROS-a;
2. smanjena antioksidativna zaštita, odnosno nemogućnost neutralizacije štetnog djelovanja ROS-a i nemogućnost njihovog eliminiranja;
3. nemogućnost popravka stanica oštećenih zbog djelovanja ROS-a (2).

ROS su ioni, atomi i molekule, koje u vanjskoj elektronskoj ljusci imaju barem jedan nesparen elektron, zbog kojega su vrlo nestabilnima i izuzetno reaktivnima (3). Upravo zato posljedica njihovog nakupljanja u stanici može biti jedan od čimbenika koji uzrokuje nastanak akutnih i kroničnih poremećaja (4). Njihovo štetno djelovanje proizlazi iz težnje za postizanjem stabilnosti pa tako stupaju u reakciju sa stabilnim molekulama s kojima su u kontaktu, uzimaju njihov elektron te započinju lančanu reakciju koja uzrokuje strukturne, funkcionalne i biokemijske promjene biomolekula (5). Stvaranje ROS-a kontinuiran je i uobičajen proces izmjene tvari unutar stanice. Manje količine ROS djeluju kao nužni elementi kod stvaranja važnih bioloških molekula, kod stvaranja energije, u nastajanju spolnih stanica, regulaciji rasta te prijenosu signala među stanicama. S druge strane, u prevelikim koncentracijama mogu mijenjati građu membrana stanica i remetiti njihovu funkciju, dovesti do mutacija unutar molekule DNA i utjecati na promjene metabolizam proteina i lipida u organizmu (2). Glavni izvor slobodnih radikala u organizmu je aerobna stanična respiracija, a mogu nastati i oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima, stimulacijom fagocita, mikrosomalnim citokrom P450 metabolizmom ksenobiotika, metabolizmom tkivno specifičnih enzima i arginina. Također, koncentracija ROS-a se povećava prilikom uobičajenih procesa poput vježbanja, izlaganja različitim onečišćenjima, apsorpcijom ultraljubičastog (UV, engl. *ultraviolet*) ili ionizacijskog zračenja, kod različitih infekcija i dr. (2). U svakoj stanici dolazi do kemijske reakcije oksidacije i redukcije molekula tj. izmjene elektrona. Npr. u slučaju kada se stvaraju slobodni radikali zbog proizvodnje energije u mitohondrijima gdje stanice koriste O<sub>2</sub> za proizvodnju ATP-a.

Fina ravnoteža između prisutnosti reaktivnih kisikovih radikala i antioksidansa bitna je za pravilno i normalno funkcioniranje stanice. Bazalna koncentracija ROS-a neophodna je za provođenje staničnih funkcija, dok prekomjerna razina ROS-a uzrokuje stanična oštećenja, što na kraju dovodi do nekroze i apoptotske stanične smrti. Kardiovaskularne bolesti (KVB, engl. *cardiovascular diseases*) su glavni uzrok smrti u svijetu, a oksidativni stres uvelike utječe na njihov nastanak. Povećani ROS dovode do smanjene dostupnosti dušikovog oksida i vazokonstrikcije, uzrokujući arterijsku hipertenziju i oštećenje endotela. ROS također negativno utječu na vezanje kalcija u miokardu te uzrokuje aritmiju, hipertrofiju i apoptozu. Isto tako, pokazalo se da ROS potiču stvaranje aterosklerotskih plakova (1).

Također, još jedna posljedica oksidativnog stresa je i starenje. Ono je u većoj mjeri definirano kao rezultat djelovanja oksidativnog stresa na stanice. Stanični mehanizmi u takvom stanju ne funkcioniraju ispravno zbog posljedica oštećenja te počinju slabjeti zbog vlastite nekroze. Usporavanje procesa starenja stvar je kumulativnog smanjenja brzine oksidativnog oštećenja staničnih mehanizama. Zajedno s genetskim razlozima, smanjenje oksidativnog stresa određuje i način života te prehrana (6, 7).

### 1.2. Antioksidativni mehanizmi

Kao što je ranije spomenuto, antioksidansi su neophodni u održavanju ravnoteže oksidacijsko redukcijskih reakcija unutar organizma. Oni su molekule koje predaju ili primaju elektron slobodnog radikala i tako štite stanicu od oštećenja. Neki od antioksidanata su vitamini A i C, hem vezani proteini i  $\beta$ -karoten, a isto tako tu su i enzimi koji djeluju na uništenju kisikovih radikala poput katalaze (CAT, engl. *catalase*), glutation peroksidaze (GPx, engl. *glutathione peroxidase*) i superoksid dismutaze (SOD, engl. *superoxide dismutase*) (8). Kvalitetan izvor antioksidansa su žitarice, voće i povrće, ali također se nalaze i u namirnicama kao što su mlijeko, meso, riba te morski plodovi. Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale kroz nekoliko različitih procesa:

1. inhibicijom slobodnih radikala;
2. uklanjanjem postojećih slobodnih radikala, gdje sudjeluju SOD, GPx, CAT;
3. popravkom oštećenih biomolekula pomoću reparativnih enzima, gdje se ponajprije misli na popravak DNA molekula (9).

### 1.3. Enzimski antioksidansi

#### 1.3.1. Katalaza

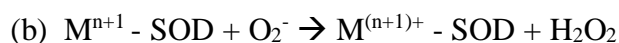
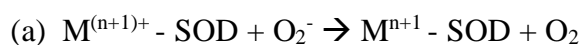
Katalaza je ključni unutarstanični enzim u metabolizmu vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , engl. *hydrogen peroxide*) i reaktivnih dušikovih spojeva, a njezina ekspresija i lokalizacija znatno je promijenjena u oštećenim i tumorskim stanicama (10). Ona je građena od četiri podjedinice koje unutar aktivnog mjesta sadrže hem prostetičku skupinu. Ovakvo aktivno mjesto osigurava regeneraciju brojnih molekula unutar organizma, a primarna uloga mu je razgradnja  $\text{H}_2\text{O}_2$  kroz dva oblika reakcije:

1. katalazni oblik reakcije  $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ;
2. peroksidazni oblik reakcije  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RH}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{R}$ .

Aktivnost katalaze naglašena je kod povišenih koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  pa dokazuje da je CAT zaslužna za odstranjenje peroksida kod oksidacijskog stresa, dok manje koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  razgrađuje GPx. U jetri i eritrocitima se nalaze najveće koncentracije katalaze, a suprotno tome, najmanje koncentracije nalaze se u srcu, mozgu, skeletnim mišićima i slezeni (10). Postoje tri različite vrste CAT-a, a to su monofunkcionalna katalaza, bifunkcionalna katalaza, katalaza-peroksidaza te katalaza koja u svojoj strukturi sadrži mangan umjesto hem skupine (2).

#### 1.3.2. Superoksid-dismutaza

Otkriće superoksid dismutaze mnogi smatraju događajem koji je najodgovorniji za brzi rast i razvoj područja biologije i medicine slobodnih radikala. Važne dokaze o njihovoj važnosti pružaju sistematski učinci na metabolizam energije uočeni kod mutirane SOD, gdje se javlja amiotrofična lateralna skleroza (ALS, engl. *amyotrophic lateral sclerosis*). SOD katalizira dismutaciju superoksidnog aniona ( $\text{O}_2^-$ , engl. *superoxide anion*) u  $\text{H}_2\text{O}_2$  i kisik ( $\text{O}_2$ , engl. *oxygen*) te je zbog toga jako značajan antioksidans koji sudjeluje u zaštiti svih stanica koje koriste kisik i aerobni metabolizam. Dismutacija superoksida uz pomoć superoksid-dismutaze prikazana je reakcijama (a) i (b) (11).



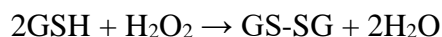
Postoje tri izoforme:

1. bakar-cink SOD (Cu/Zn SOD, engl. *copper/zinc superoxide dismutase*) označen kao SOD1;
2. mangan SOD (Mn SOD, engl. *manganese superoxide dismutase*) označen kao SOD2;
3. izvanstanični SOD (ECSOD, engl. *extracellular superoxide dismutase*) označen kao SOD3.

SOD1 je smještena citosolu i međumembranskom prostoru, a za njegovu aktivnost važni su bakar i cink. SOD2 izoforma enzima nalazi se u mitohondrijima, a SOD3 u izvanstaničnom prostoru. To su bjelančevine, koje se aktiviraju metalnim kofaktorima poput cinka, bakra, mangana, željeza ili nikala te imaju važnu ulogu u inhibiciji stvaranja aniona peroksinitrita (ONOO<sup>-</sup>, engl. *peroxynitrite anion*), koji može biti uzrok mitohondrijske i endotelne disfunkcije, dijabetesa, hipertenzije te starenja (2).

### 1.3.3. Glutation-peroksidaza

Glutation-peroksidaza je antioksidativni enzim, koji štiti stanice od oksidativnog stresa na način da koristi glutation (GSH, engl. *glutathione*) kao supstrat. Građen je kao tetramer, kod kojeg svaka podjedinica ima atom selena kao selenocistein i tako čini aktivno mjesto. Mehanizam djelovanja GPx zaslužan je za neutralizaciju najveće količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unutar stanice. GPx u prisutnosti reduciranog GSH ubrzava reakciju redukcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uključujući i lipidni hidroperoksid:



GSH – reducirani monomerni glutation; GS-SG – glutation disulfid

Mnoga dosadašnja istraživanja pokazuju povezanost abnormalnosti u ekspresiji GPx s kardiovaskularnim bolestima, etiologijom nastanka raka, zatim s pojavom neurodegenerativnih i autoimunih bolesti te dijabetesa. Do sada je poznato sedam podvrsta glutation-peroksidaza, a to su: citosolna GPx (GPx1 ili cGPx), gastrointestinalna GPx (GPx2 ili GI-GPx), izvanstanična, odnosno, plazmatska GPx (GPx3 ili pGPx), fosfolipidna hidroperoksidna GPx (GPx4 ili PHGPx), epididimis sekrecijska GPx (GPx-5), GPx6 i GPx7 (12). Sve ove izoforme nejednoliko su raspoređene unutar organizma, što je vjerojatno posljedica hidroperoksidne

aktivnosti. Naime, hidroperoksidi osim toksične uloge imaju i važnu ulogu u prijenosu unutarstaničnih poruka pa GPx vjerojatno služi u održavanju njihove ravnoteže, kako bi stanice nesmetano obavljale svoju funkciju (2).

## **1.4. Neenzimski antioksidansi**

### **1.4.1. Minerali**

Minerali su kemijski elementi neophodni za život, a postoje kao slobodni ioni ili kao gradivni elementi nekog organskog spoja (hormoni, enzimi). Oni su esencijalni elementi, prijeko potrebni za normalna rad i funkcioniranje svih stanica, koje se putem hrane, vode ili lijekova unosi u organizam. Kod obrane organizma od antioksidativnog stresa, između mnogih mineralima, najčešće se spominju selen, cink i bakar (13). Selen u stanicama ima antioksidativnu ulogu. Sastavni je dio GPx-a i izravno pogoduje razgradnji nastalih peroksida unutar stanice te na taj način inhibira njihov štetan utjecaj. Također, i cink se u manjim koncentracijama nalazi u stanicama, a najčešće je vezan za proteine, zatim u jetri i kostima te je neophodan u nastanku različitih enzimskih sustava. Isto tako, bakar je neophodan element u našem organizmu. Bakar i željezo djeluju na sintezu hemoglobina te sudjeluju kao katalizatori. Bakar pokreće razne enzime, a ponajprije enzime poput citokrom-C-oksidge i katalaze te djeluje kao kofaktor proteina (2).

### **1.4.2. Vitamini**

Vitamini su organski spojevi koji se u organizmu javljaju u vrlo niskim koncentracijama, međutim neophodni su za normalno funkcioniranje organizma. Dije se u dvije skupine:

1. vitamini topivi u mastima, u koje svrstavamo vitamine A, D, E, K;
2. vitamini topivi u vodi, u koje svrstavamo vitamin C i vitamine B kompleksa.

Neizostavni su biološki katalizatori, održavaju fiziološke mehanizme važne za normalan metabolizam svih stanica i tkiva u organizmu. Djeluju na stvaranje koštanog tkiva i kolagena, metabolizmu ugljikohidrata, proteina i masti, procesu zgrušavanja krvi i sl. Najvažniji vitamini i provitamini s antioksidativnim djelovanjem su  $\beta$ -karoten te vitamini C i E.

Vitamin C, nazvan još i askorbinska kiselina, štiti stanice od negativnog djelovanja slobodnih kisikovih radikala pa tako smanjuje incidenciju pojave karcinoma. On u organizmu snižava koncentraciju željeza i bakra koji prenose slobodne radikale te pospješuje normalan rad imunološkog sustava (14). Svrstavamo ga u skupinu vitamina topivih u vodi, a djeluje kao kofaktor u reakcijama biosinteze neurotransmitera kateholamina i kolagena (15). Također, sudjeluje i u borbi od infekcija i zacjeljivanju rana, na način da stimulira proizvodnju leukocita (15). Organizam ga ne može sintetizirati pa je njegove koncentracije neophodno održavati pravilnom i uravnoteženom prehranom. Hrana bogata vitaminom C je bobičasto voće (npr. brusnice, borovnice), zatim karfiol, brokula, agrumi i sl. Preporučena doza vitamina C je oko 90 miligrama dnevno za muškarce te 75 miligrama dnevno za žene (16). Kod nedostatka vitamina C dolazi do razvoja skorbuta, tj. bolesti koju karakteriziraju otežano zarastanje rana, modrice, krvarenje desni i anemija (16). Vitamin C smanjuje pojavu oksidativnog stresa i tako što u stanicama neurona uzrokuje vraćanje oksidiranog vitamina E u reducirani oblik. Namirnice bogate vitaminom E vežu se uz ulja poput maslinovog, suncokretovog, sojinog ili kukuruznog, zatim uz orahe, bademe i pistacije te uz zeleno lisnato povrće poput blitve i kelja. Otapa se u mastima i javlja se u osam kemijskih oblika: alfa-tokoferol, beta-tokoferol, gama-tokoferol, delta-tokoferol i alfa-tokotrienol, beta-tokotrienol, gama-tokotrienol, delta-tokotrienol (17). Suzbija slobodne radikale koji se stvaraju kao posljedica oksidacije masti, suprimira oksidaciju lipoproteina i onemogućuje adheziju trombocita te na taj način sprječava nastanak ateroskleroze i srčanih poremećaja (18).  $\beta$ -karoten organski je biljni pigment, prekursor vitamina A kojega karakterizira intenzivna narančasto-crvena boja. Pogoduje normalnoj funkciji imuniteta, održavanju vida i zdravoj koži. Brojni rezultati istraživanja su potvrdili da hrana obogaćena  $\beta$ -karotenom umanjuje vjerojatnost pojave srčanih bolesti i karcinoma (19). Također, još jedan od važnih biljnih pigmenata je i lutein, koji, za razliku od  $\beta$ -karotena nema provitaminsku aktivnost. Osim pozitivnog učinka na poboljšanje vida, lutein blagotvorno djeluje i na druga stanja pa tako povećava kognitivne funkcije, ublažuje kardiovaskularne bolesti te smanjuje rizik od pojave raka. Dokazana je njegova uloga u zaštiti u napredovanju ateroskleroze te u smanjenju aterosklerotskih lezija (20).

### **1.5. n-3 polinezasićene masne kiseline**

Lipidi su važni sastojci prehrane i služe kao učinkoviti izvori energije, koji se pohranjuju u masnom tkivu. Tijelo ih također treba za staničnu strukturu i funkciju membrane te kao izvor

prekursora za sintezu eikozanoida. Sastavni dijelovi lipida reguliraju funkcije povezane s membranom poput aktivnosti membranski vezanih enzima, receptora, ionskih kanala itd. Sastoje se od različitih stupnjeva zasićenja i duljina lanaca masnih kiselina, kao i različitih konfiguracija. Najznačajnija karakteristika lipida je građa različitih vrsta masnih kiselina, a one se klasificiraju u tri obitelji: zasićene, mononezasićene i polinezasićene masne kiseline (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acids*). Građa masnih kiselina sastoji se od dugih lanaca međusobno povezanih atoma ugljika, koji s jedne strane imaju metilnu, a s druge karboksilnu skupinu. Polinezasićene od zasićenih masnih kiselina razlikuje to što imaju dvije ili više dvostruke veze unutar lanca ugljikovih atoma. n-3 PUFA imaju dvostruku vezu nakon trećeg po redu ugljikovog atoma kada se gleda metilni kraj lanca (21). Svi sisavci mogu sintetizirati zasićene i mononezasićene masne kiseline iz jednostavnih prekursora, poput glukoze ili aminokiselina, koristeći temeljne biokemijske puteve, dok su s druge strane n-3 i n-6 PUFA kiseline esencijalne te se moraju putem prehrane unijeti u organizam. Postoji nekoliko vrsta n-3 PUFA, ali pretežno se javljaju su eikosapentaenska kiselina (EPA, engl. *eicosapentaenoic acid*),  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA, engl. *alpha-linolenic acid*), te dokosaheksaenoična kiselina (DHA, engl. *docosahexaenoic acid*). Značajne količine ALA nalaze se u zelenom povrću i biljnim uljima poput lanenog ulja, ulja repice i sojinog ulja, a ona ima lanac od 18 atoma ugljima. Eikozapentaenska kiselina i dokosaheksaenska kiselina se sintetiziraju desaturacijom i produljenjem lanca ALA, a također se nalaze u visokim koncentracijama u ribi i ribljim uljima (22). U svom lancu imaju 20 i 22 atoma ugljika pa se svrstavaju u grupu dugolančanih kiselina.

### 1.5.1. Uloga n-3 polinezasićenih masnih kiselina

Brojni su doprinosi n-3 PUFA u organizmu. Naime, njihov deficit u čovjeku tijelu uzrokuje poremećaj rasta i kožne promjene (23). One sudjeluju u modifikacijama fosfolipida u staničnim membranama i pomažu u stvaranju eikozanoida, sprečavaju upalne reakcije, također jačaju imunitet, a pomažu i kod autoimunih bolesti (22). Epidemiološka istraživanja pokazala su vezu između konzumacije n-3 PUFA i smanjenog rizika od KVB (24). Dokazalo se da n-3 PUFA reduciraju količinu ROS-a i stimuliraju endotelnu sintezu NO koji oni razgrađuju i na taj način održavaju antiaterogenu i vazoprotektivnu ulogu endotela (25, 26). Isto tako, smanjuju koncentracije IL-6 (interleukin, engl. *interleukin 6*) i C reaktivnog proteina (CRP, engl. *C-reactive protein*), umanjujući staničnu te sustavnu upalnu reakciju krvnih žila, aterosklerozu i povišen krvni tlak.



## **2. HIPOTEZA**

Konsumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom ima pozitivan utjecaj na aktivnost antioksidativnih enzima što pridonosi smanjenju oksidativnog stresa.

### **3. CILJ**

Cilj istraživanja je ispitati aktivnost antioksidativnih enzima u uzorcima seruma kod mladih zdravih ispitanika i kardiovaskularnih, bolesnika koji su konzumirali obična ili obogaćena kokošja jaja.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao intervencijska randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana na humanom modelu. Praktični dio istraživanja proveden je na Medicinskom fakultetu u Osijeku, na Katedri za fiziologiju i imunologiju, u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju. Istraživanje je financirano iz sredstava Hrvatskog nacionalnog znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek EU strukturni i investicijski fond # KK.01.1.1.01.0010. Protokol i postupak istraživanja zadovoljava standard najnovijeg izdanja Helsinške deklaracije, a istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku (klasa: 602-04/19-09/7, broj: 383-60-01-19-13).

### 4.2. Ispitanici

U ovom istraživanju sudjelovalo je dvadeset i troje mladih zdravih ispitanika te četrdeset kardiovaskularnih bolesnika oba spola. Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine:

1. kontrolna skupina, u kojoj su ispitanici konzumirali uobičajena kokošja jaja;
2. eksperimentalna „quattro“ skupina, u kojoj su ispitanici konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom.

Tijekom trojednog protokola obje skupine ispitanika su konzumirale tri kokošja jaja na dan. Obična jaja i jaja obogaćena omega-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom su se proizvodila na farmi Marijančanka d.o.o. Marijanci. Jaja obje skupine su bila iste veličine (L komercijalna veličina) kako ispitanici ne bi mogli uočiti razliku. U Tablici 1 prikazana je količina n-3 PUFA, selena, luteina te vitamina E u obje skupine jaja gdje su dobivene vrijednosti prikazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija (27). Ispitanici su dobili dnevnik prehrane u kojem su vodili evidenciju konzumirane hrane tijekom dana. Prvog i posljednjeg dana protokola obavljeno je uzorkovanje venske krvi kako bi se dobio serum, plazma i puna krv.

**Tablica 1. Sastojci uobičajenih i quattro obogaćenih jaja.**

	kontrola	quattro
	mg/60 g jaje (jestivi dio)	mg/60 g jaje (jestivi dio)
Vitamin E (mg)	0,595	1,098
Lutein (mg)	0,11	0,616
Selen (mg)	0,0183	0,0191
Masne kiseline		
ΣSFA	1566 (346)	1442 (185)
ΣMUFA	1976 (189)	2419 (139)
Σn-6 PUFA	1263 (148)	747 (46)
LA	1165 (140)	702 (43)
AA	89 (9)	44 (4)
Σn-3 PUFA	146 (20)	342 (25)
ALA	71 (11)	189 (16)
EPA	n.d.	19 (2)
DHA	75 (11)	135 (1)
Σn-6 / Σn-3 PUFA	8,71	2,18

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

ΣSFA - zasićene masne kiseline; ΣMUFA - mononezasićene masne kiseline; Σn-6 PUFA - polinezasićene masne kiseline; LA - linolna kiselina; AA - arahidonska kiselina; Σn-3 PUFA - polinezasićene masne kiseline; ALA - alfa-linolenska kiselina; EPA - eikosapentaenoična kiselina; DHA - dokosaheksaenoična kiselina; n.d. - nije detektabilno.

#### 4.2.1. Kardiovaskularni bolesnici

Uključni kriteriji za kardiovaskularne bolesnike bili su: akutni koronarni sindrom ili kronični koronarni sindrom u povijesti bolesti.

Isključni kriteriji za kardiovaskularne bolesnike bili su: zloćudne bolesti, nasljedne metaboličke bolesti i druge nasljedne sistemske bolesti, autoimune bolesti ili sistemske bolesti s imunopatologijom, nedavna operacija (posljednja 3 mjeseca), nedavna teška trauma (posljednjih 6 mjeseci), bubrežna insuficijencija, aktivno krvarenje, nedavni moždani udar (6 tjedana), neurodegenerativne bolesti i epilepsija, značajna anemija (Hg < 110 (muškarci), < 100 (žene)), stanje nakon reanimacije (3 mjeseca), terapija koja značajno utječe na krvožilnu ili imunološku funkciju (poput monoklonskih antitijela, imunosupresivnih lijekova, sistemskih kortikosteroida), kronično zatajenje dišnog sustava i stanja kronične hipoksemije, sepse i kroničnih aktivnih infekcija sa sistemskim upalnim odgovorom (aktivna tuberkuloza itd.),

neliječena bolest štitnjače, zlouporaba alkohola i droga, zatajenje jetre (uznapredovala bolest jetre s oštećenom sintetskom i metaboličkom funkcijom). Također, dodatni isključni kriterij bio je konzumacija n-3 PUFA obogaćene funkcionalne hrane i n-3 PUFA u obliku kapsula prije nego što se ispitanik uključio u ovo istraživanje.

Svi sudionici koristili su statine i druge standardne terapije lijekovima za koronarnu bolest srca poput ACE inhibitora, beta blokatora ili antitrombocitnih lijekova.

### 4.2.2. Zdravi ispitanici

U istraživanju je bilo uključeno dvadeset i troje zdravih mladih ispitanika oba spola, starosti 19-28 godina. Isključni kriteriji za zdrave mlade ispitanike bili su povijest bolovanja od koronarne arterijske bolesti srca, hipertenzije, dijabetesa, bolesti bubrega, hiperlipidemije i bolesti perifernih krvnih žila.

## 4.3. Metode

### 4.3.1. Uzorkovanje venske krvi

Uzimanje krvi obavljeno je pod aseptičnim mjerama predostrožnosti na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Osijeku, prvog i posljednjeg dana trojednoga protokola. Uzorkovala se venska krv iz središnje kubitalne vene, a za potrebe istraživanja uzorkovali smo serum u crvene vakutajnere bez antikoagulansa. Svi uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3600 g kako bi se odvojio serum, koji smo izdvojili u naznačene epice te pohranili na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do provođenja pokusa.



**Slika 1. Uzorak seruma pohranjen na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (izvor: original autorice rada).**

### 4.3.2. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode instrumentalne su metode, koje daju uvid u molekulsku strukturu tvari te se koriste za kvantitativno određivanje organskih komponenta i prijelaznih metala u otopini (28). Temelje se na analizama emisije i apsorpcije elektromagnetskog zračenja na atomima i spojevima u analiziranim uzorcima. Elektromagnetsko zračenje dvojne je prirode, što znači da se takve karakteristike tumače preko valne i čestične prirode.

U osnovi, spektrofotometar je građen od: izvora zračenja, monokromatora i detektora. Glavna uloga mu je usporedba intenziteta upadnog i propuštenog svjetla koje prolazi kroz uzorak. UV-Vis spektrofotometar koristi ultraljubičasti i vidljivi dio spektra, zračenja valnih duljina od 100 do 800 nm. Kod takvih analiza ispitivane tvari apsorbiraju svjetlost u vidljivom i UV dijelu spektra. Smanjenje intenziteta ovisi o veličini sloja, koncentraciji različitih tvari u uzorku, svjetlosnom putu kroz kivetu te o molarnom apsorpcijskom koeficijentu. Odnos intenziteta upadnog i propuštenog zračenja određuje se preko Beer-Lambertovog zakona:

$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon b c$$

A- apsorbanca na određenoj valnoj duljini svjetlosti

$\epsilon$ - molarni apsorpcijski koeficijent, mjerna jedinica  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b- duljina puta svjetlosti kroz uzorak, mjerna jedinica cm

c- koncentracija tvari u otopini, mjerna jedinica  $\text{mol L}^{-1}$  (28)

Aktivnost antioksidativnih enzima u serumu mjerila se pomoću standardiziranih protokola spektrofotometrijskim metodama, pomoću Lambda 25UV-Vis spektrofotometra, UV WinLab 6.0 software (PerkinElmer For the Better, Waltham, MA, USA).



**Slika 2. Spektrofotometar** (izvor: original autorice rada).

#### 4.3.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT određivala se spektrofotometrijskim metodama gdje se  $\text{H}_2\text{O}_2$  koristio kao supstrat. Primjenjivala se metoda po Aebiju u kojoj se aktivnost katalaze određuje kao količina potrošenog  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reakcijska smjesa je sadržavala 0,036 % otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 50 mM natrijfosfatnog pufera (pH = 7,0). Uslijed razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  pratio se pad apsorbancije tijekom 2 minute svakih 10 sekundi pri valnoj duljini od 240 nm u UV-kiveti. Jedna jedinica aktivnosti bila je definirana kao količina razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{mol}$ ) po minuti po miligramu proteina. Aktivnost CAT izražavala se u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina ( $\text{U} \times \text{mg}^{-1}$  proteina).

#### 4.3.4. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPx)

Aktivnosti GPx mjerila se metodom koju je definirao Wendel gdje se  $\text{H}_2\text{O}_2$  koristio kao supstrat. Aktivnost GPx određivala se mjereći stopu oksidacije NADPH u  $\text{NADP}^+$  pri 340 nm koju prati smanjenje apsorbancije. Reakcijska smjesa sastojala se od 0,0007 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 mM GSH, 3,2 jedinice GR-a, 0,12 mM NADPH i pufera (1 mM  $\text{NaN}_3$ , 0,4 mM EDTA, 50 mM natrij-fosfatni pufer (pH = 7)). Enzimska aktivnost mjerila se spektrofotometrijski pri 340 nm, svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Jedna jedinica GPx-a katalizirala je oksidaciju 1  $\mu\text{mol}$ -a GSH u GSSG u jednoj minuti pomoću  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri pH 7,0 i 25 °C. Aktivnost GPx izražavala se u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina ( $\text{U} \times \text{mg}^{-1}$  proteina).

#### **4.3.5. Određivanje aktivnosti superoksid-dismuzate (SOD)**

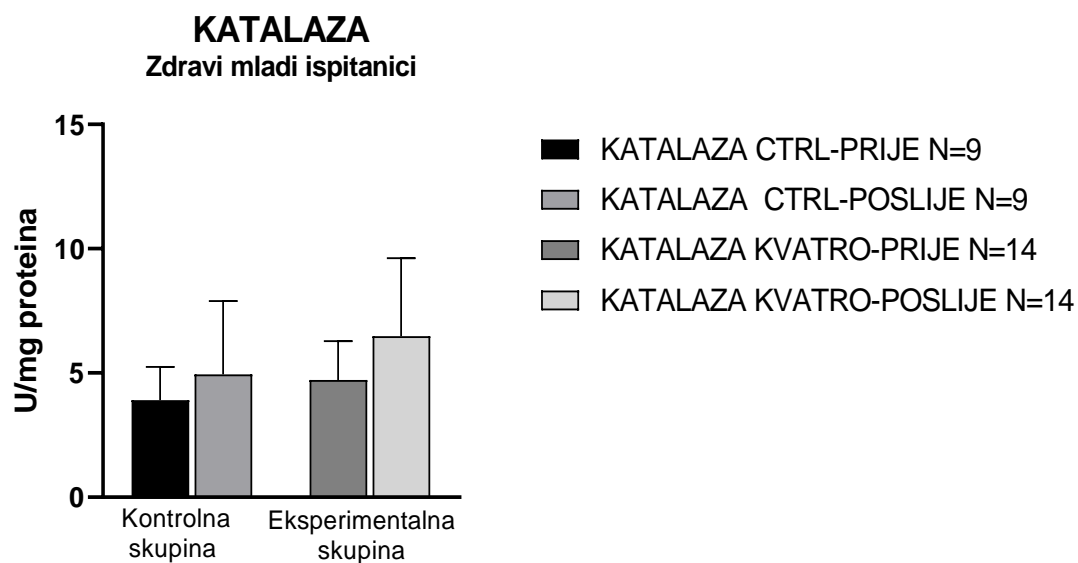
Aktivnost SOD određivala se metodom koju su definirali Flohe i Otiing. Mjerila se aktivnost kao stupanj inhibicije redukcije citokroma C superoksidnim radikalom, a stopa redukcije pratila se pri 550 nm. Jedna jedinica SOD-a inhibirala je stopu redukcije citokroma C za 50 % u povezanom sustavu pomoću ksantin-oksidaze (XOD) i ksantina. Aktivnost SOD izražavala se kao  $U \times \text{mg}^{-1}$  proteina.

#### **4.4. Statističke metode**

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli bila je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između tri nezavisne skupine bile su testirane jednosmjernom analizom varijanci (One-way ANOVA), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal Wallis testom. Razlike između skupina dodatno su testirane Holm Sidak ili Tukey post hoc testom. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardne devijacije, a razina značajnosti bila je postavljena na  $P < 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program Stigma stat 11.0 (Systat Software, Inc. Chicago, IL, SAD).

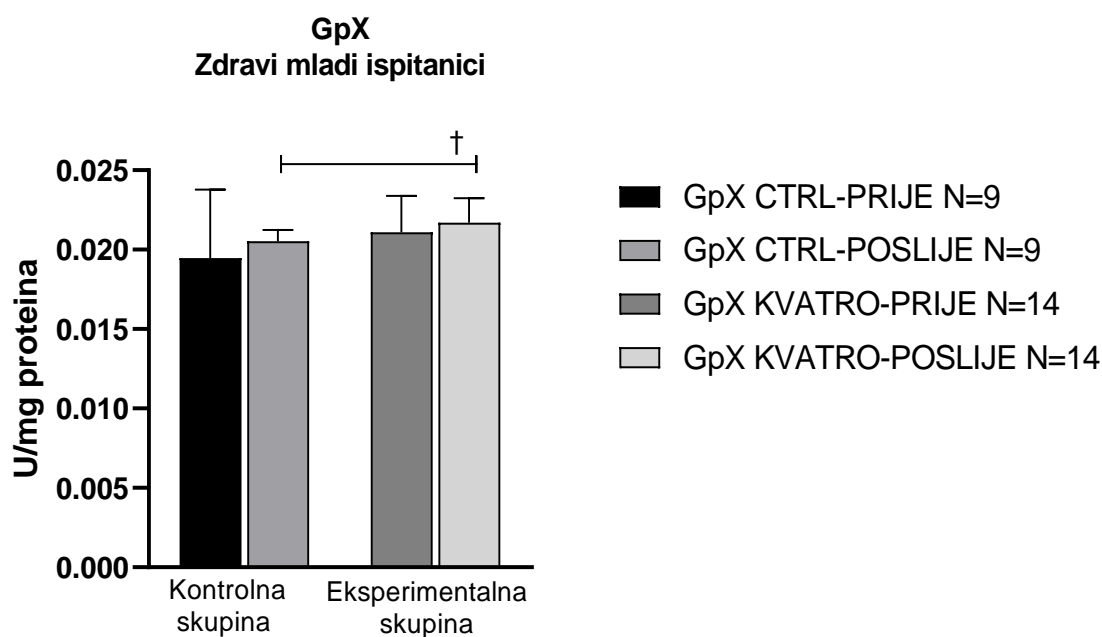


## 5. REZULTATI



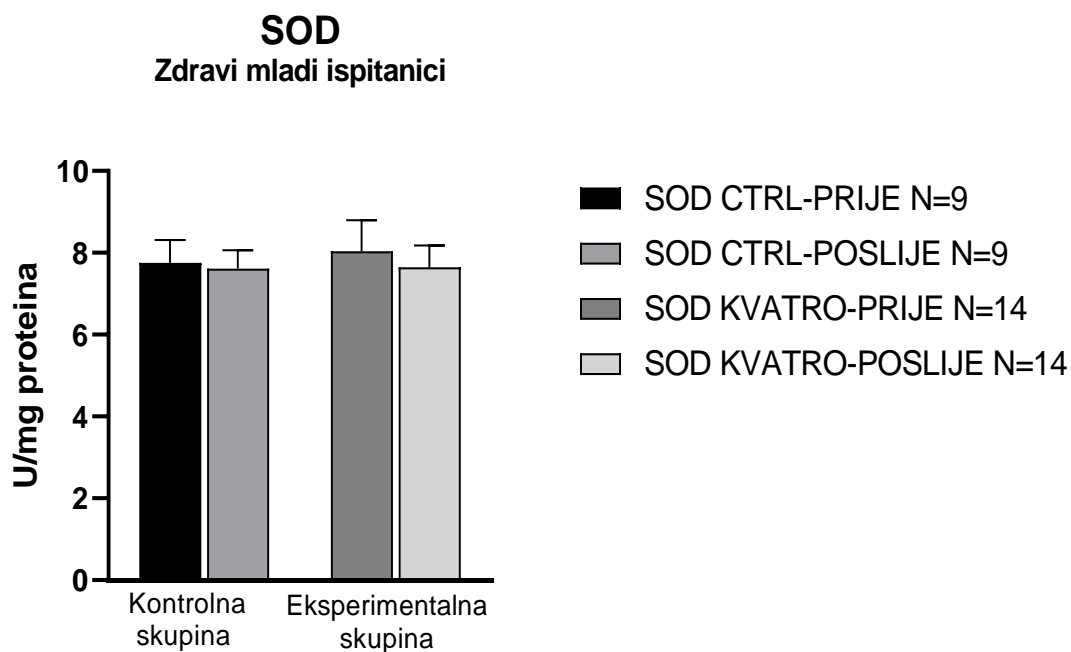
**Slika 3. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima katalaze u uzorcima seruma mladih zdravih ispitanika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

Skupina mladih zdravih ispitanika, koji su konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom ima veću tendenciju povećanja koncentracije katalaze gdje je aritmetička sredina 6,477 (SD = 3,139) u odnosu na skupinu mladih zdravih ispitanika, koji su konzumirali uobičajena kokošja jaja gdje je aritmetička sredina 4,946 (SD = 2,949), ali ta razlika i dalje nije statistički značajna  $P = 0,06$ ; analiza varijance (ANOVA).



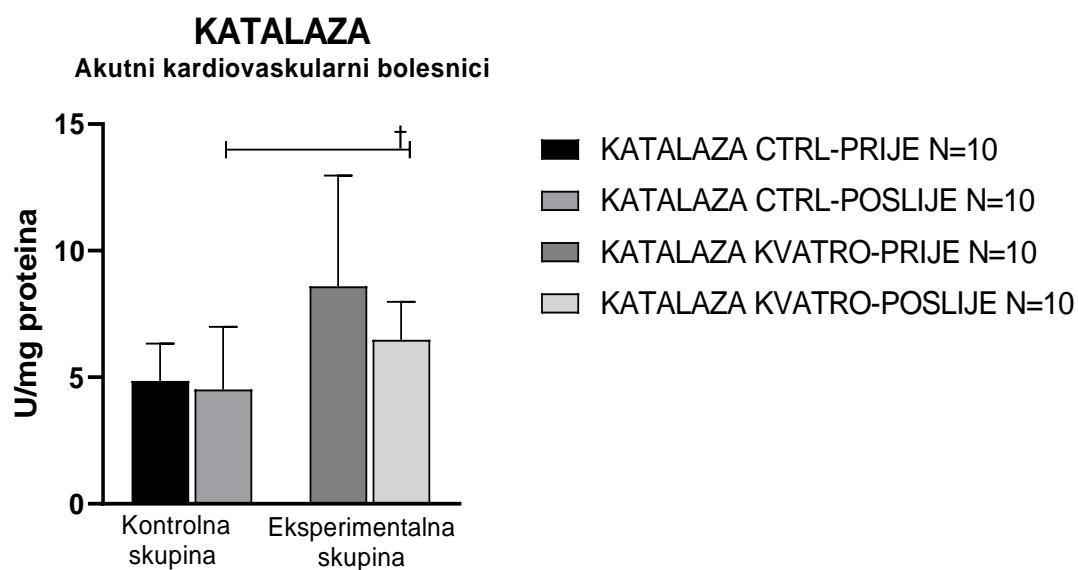
**Slika 4. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima GpX u uzorcima seruma mladih zdravih ispitanika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). † statistički značajna razlika između skupina,  $P < 0,05$ .

Skupina mladih zdravih ispitanika, koji su konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom ima značajno povećanu koncentraciju GPx enzima gdje je aritmetička sredina 0,022 (SD = 0,002) u odnosu na skupinu mladih zdravih ispitanika, koji su konzumirali uobičajena kokošja jaja gdje je aritmetička sredina 0,020 (SD = 0,0006),  $P = 0,04$ ; analiza varijance (ANOVA).



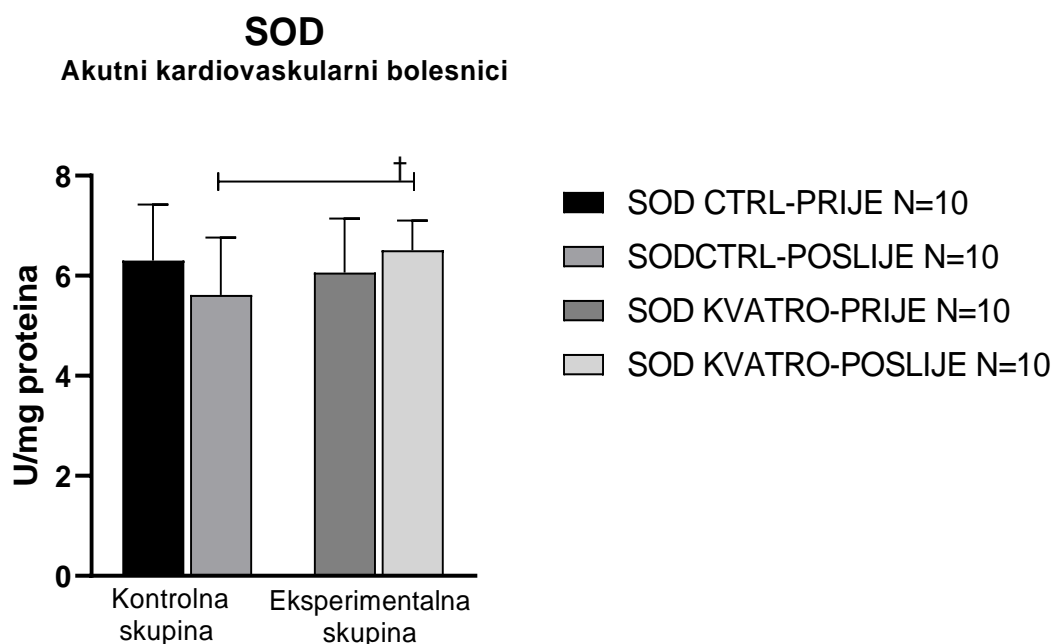
**Slika 5. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima SOD u uzorcima seruma mladih zdravih ispitanika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

Obje skupine mladih zdravih ispitanika neočekivano su pokazale da konzumacija uobičajenih i obogaćenih jaja ima tendenciju smanjenja koncentracije SOD u serumu, ali ne do razine statističke značajnosti u odnosu na početne vrijednosti koncentracija enzima:  $P = 0,45$  za kontrolnu skupinu,  $P = 0,07$  za eksperimentalnu skupinu; analiza varijance (ANOVA).



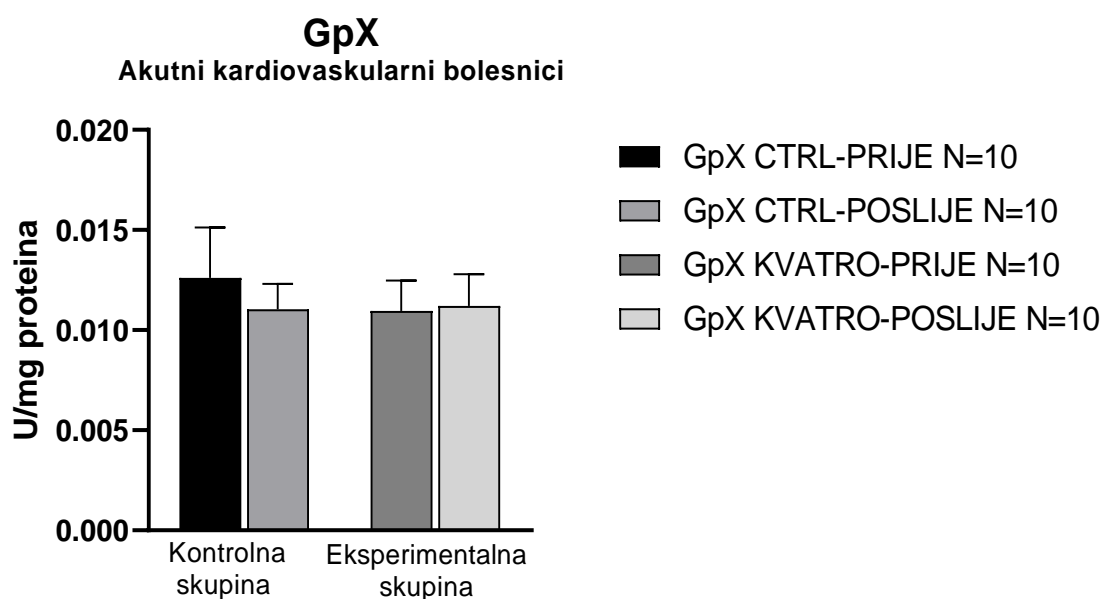
**Slika 6. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima katalaze u uzorcima seruma akutnih kardiovaskularnih bolesnika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). † statistički značajna razlika između skupina,  $P < 0,05$ .

Obje skupine akutnih kardiovaskularnih bolesnika su pokazale da konzumacija uobičajenih i obogaćenih jaja ima tendenciju smanjenja koncentracije katalaze u serumu, ali ne do razine statističke značajnosti u odnosu na početne vrijednosti koncentracija enzima unutar grupe:  $P = 0,23$  za kontrolnu skupinu,  $P = 0,18$  za eksperimentalnu skupinu; analiza varijance (ANOVA), ali dobiveni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku koncentracija između grupa nakon konzumacije jaja:  $P = 0,007$ ; analiza varijance (ANOVA).



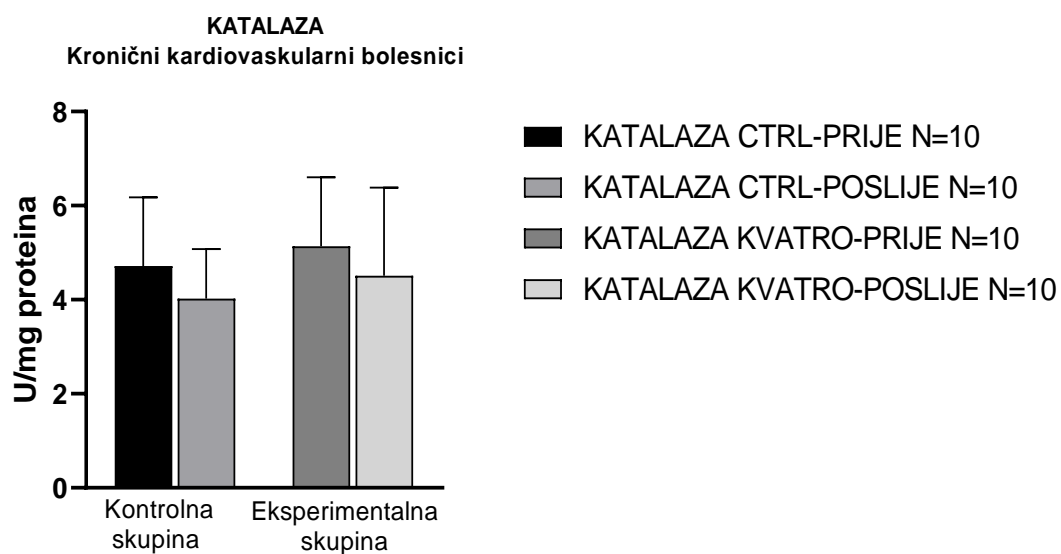
**Slika 7. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima SOD u uzorcima seruma akutnih kardiovaskularnih bolesnika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). † statistički značajna razlika između skupina,  $P < 0,05$ .

Skupina akutnih kardiovaskularnih bolesnika koji su konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom ima značajno veću koncentraciju SOD enzima gdje je aritmetička sredina 6,511 (SD = 0,591) u odnosu na skupinu mladih zdravih ispitanika koji su konzumirali uobičajena kokošja jaja gdje je aritmetička sredina 5,617 (SD = 1,144),  $P = 0,04$ ; analiza varijance (ANOVA). Također, eksperimentalna skupina pokazuje tendenciju povećanja koncentracije SOD enzima, dok s druge strane kontrolna skupina pokazuje pad koncentracije SOD enzima u serumu akutnih kardiovaskularnih bolesnika.



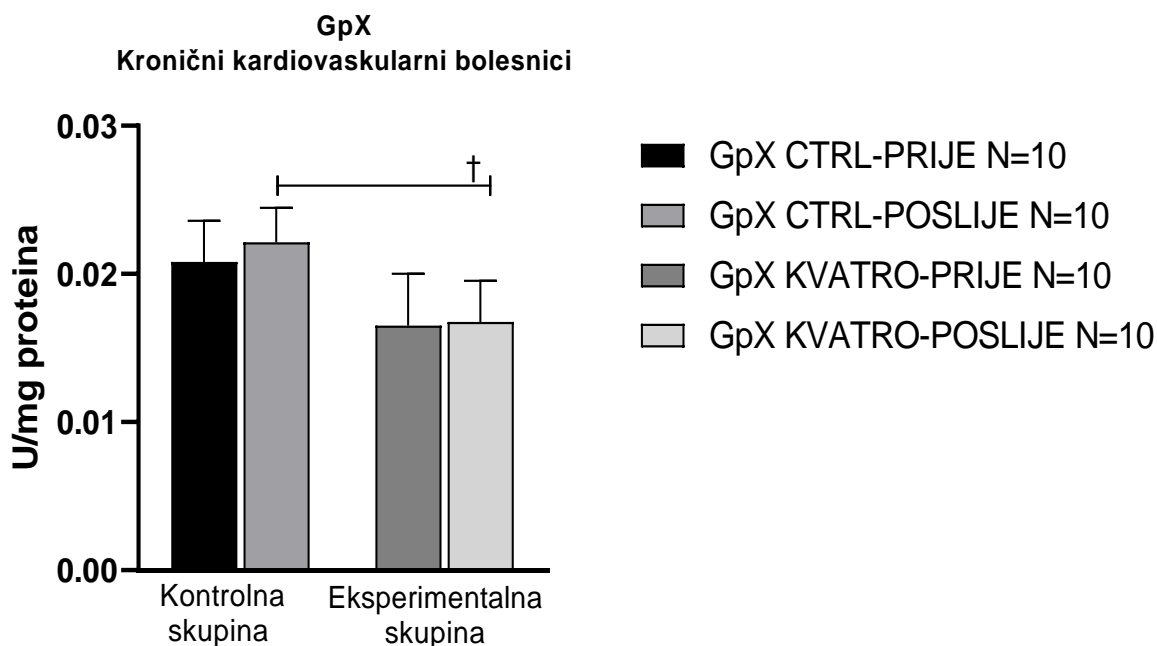
**Slika 8. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima GpX u uzorcima seruma akutnih kardiovaskularnih bolesnika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

Skupina akutnih kardiovaskularnih bolesnika koji su konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom pokazuje blago povećanja koncentracije GpX enzima u serumu, ali dobivena razlika nije statistički značajna:  $P = 0,57$ ; analiza varijance (ANOVA). S druge strane kontrolna skupina pokazuje suprotne rezultate, gdje dolazi do smanjena koncentracije GpX enzima u serumu bolesnika, ali ni ta razlika nije statistički značajna:  $P = 0,08$ ; analiza varijance (ANOVA).



**Slika 9. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima katalaze u uzorcima seruma kroničnih kardiovaskularnih bolesnika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

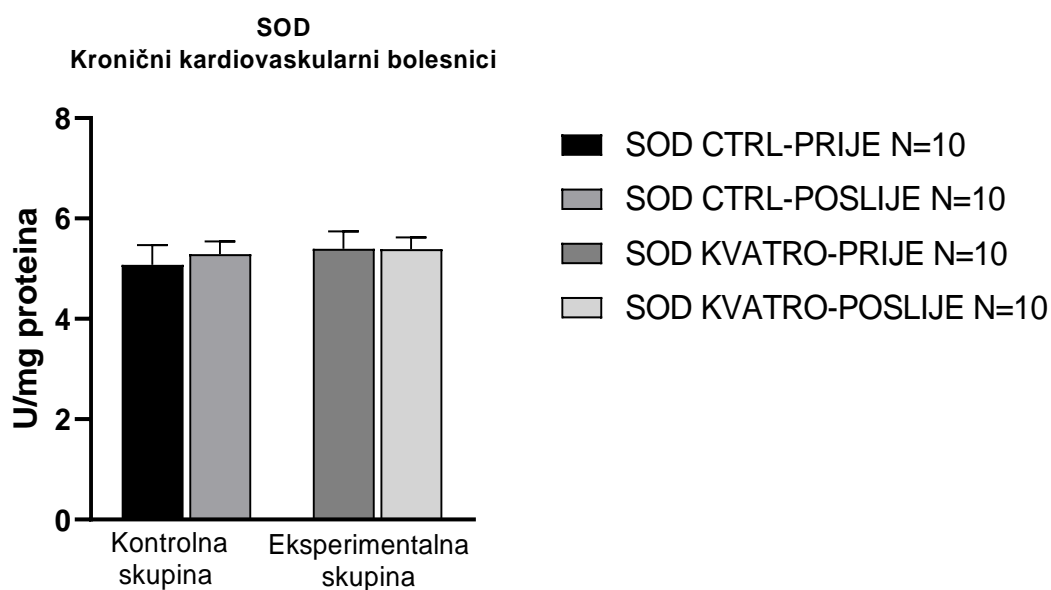
Obje su skupine kroničnih kardiovaskularnih bolesnika pokazale da konzumacija uobičajenih i obogaćenih jaja ima tendenciju smanjenja koncentracije katalaze u serumu, ali ne do razine statističke značajnosti u odnosu na početne vrijednosti koncentracija enzima:  $P = 0,19$  za kontrolnu skupinu,  $P = 0,13$  za eksperimentalnu skupinu; analiza varijance (ANOVA).



**Slika 10. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima GpX u uzorcima seruma kroničnih kardiovaskularnih bolesnika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). † statistički značajna razlika između skupina,  $P < 0,05$ .

Obje su skupine kroničnih kardiovaskularnih bolesnika pokazale da konzumacija uobičajenih i obogaćenih jaja ima tendenciju blagog povećanja koncentracije GpX enzima u serumu, ali ne do razine statističke značajnosti u odnosu na početne vrijednosti koncentracija enzima unutar grupe:  $P = 0,06$  za kontrolnu skupinu,  $P = 0,13$  za eksperimentalnu skupinu; analiza varijance (ANOVA), a dobiveni rezultati pokazuju statistički značajnu razliku koncentracija između grupa nakon konzumacije jaja u korist kontrolne skupine:  $P = 0,001$ ; analiza varijance (ANOVA).





**Slika 11. Koncentracija (U/mg) antioksidativnog enzima SOD u uzorcima seruma kroničnih kardiovaskularnih bolesnika.** Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

Skupina kroničnih kardiovaskularnih bolesnika, koji su konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom pokazuje blago smanjenje koncentracije SOD enzima u serumu, ali dobivena razlika nije statistički značajna:  $P = 0,94$ ; analiza varijance (ANOVA). S druge strane, kontrolna skupina pokazuje suprotne rezultate, gdje dolazi do povećanja koncentracije SOD enzima u serumu bolesnika, ali ni ta razlika nije statistički značajna:  $P = 0,22$ ; analiza varijance (ANOVA).

## 6. RASPRAVA

Kokošja su jaja važan izvor brojnih mikroelemenata, masti i bjelančevina te imaju bitnu ulogu u ljudskoj prehrani. Potrošnja, ali i sama proizvodnja jaja u zadnjih je nekoliko desetljeća znatno porasla. Zbog sadržaja kolesterola, konzumacija jaja je duže vrijeme bila uspoređivana sa štetnim utjecajem na ljudski organizam i ljudsko zdravlje u cjelini. Međutim, brojna istraživanja su pokazala da, za razliku od kolesterola iz jaja, drugi čimbenici poput hormonskog statusa, genetske predispozicije i načina prehrane imaju znatno veći utjecaj na razinu kolesterola u serumu (29). Upravo su zato Hu i suradnici, Qureshi i suradnici te Zazpe i suradnici provodili svoja istraživanja na temelju kojih su donijeli zajednički zaključak da konzumacija kokošnjih jaja ne povećava vjerojatnost pojave različitih kardiovaskularnih bolesti poput moždanog udara, bolesti srca ili krvnih žila kod zdravih ljudi (30, 31, 32). Danas namirnice, osim osnovne uloge zadovoljenja opskrbe organizma s neophodnim hranjivim tvarima, imaju ulogu u pomoći kod prevencije raznih kliničkih stanja povezanih s prehranom na način da smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, jačaju imunološki sustav, sudjeluju u očuvanju vida i slično. Upravo zato, opisane su specijalne metode u proizvodnji obogaćenih jaja u kojima je moguće povećati količine nekih funkcionalnih sastojaka poput selena, n-3 PUFA, luteina te vitamina A i E (29). Veliku pozornost su privukla istraživanja koja su dokazala kako povećani unos n-3 PUFA ima utjecaj na smanjenje pojave oksidativnog stresa, a samim time i na pojavu te nastanak kardiovaskularnih bolesti (19). Djeluju povoljno, jer uzrokuju redukciju kisikovih radikala i stimuliraju sintezu endotelnog protuupalnog spoja, ugljikova monoksida, kojeg ROS razgrađuje (33). Isto tako, uzrokuju pad koncentracije IL-6 i CRP-a i na taj način smanjuju upalnu reakciju krvnih žila, smanjuju vjerojatnost nastanka zadebljanja krvnih žila te nakupljanja triglicerida u stijenkama tako što inhibiraju rad jetrenih enzima koji djeluju na njihovu sintezu (34). Osim n-3 PUFA, pojavu kardiovaskularnih bolesti te oksidativnog stresa sprječavaju i antioksidativni enzimi.

Surai i suradnici su u istraživanju konzumacije obogaćenih jaja kod zdravih ljudi dokazali da su ispitanici koji su tijekom 8 tjedana koristili jedno obogaćeno jaje dnevno u odnosu na ispitanike koji su konzumirali uobičajena jaja, imali u krvnoj plazmi više koncentracije luteina, vitamina E ( $P = 0,0012$ ) i n-3 PUFA ( $P < 0,001$ ) (35). Također, autori navode da su obogaćena jaja u odnosu na uobičajena imala 6 puta veći sadržaj DHA, 8 puta veći sadržaj selena, 16 puta veći sadržaj karotenoida i 26 puta veći sadržaj vitamina E (35). Isto su tako Surai i Sparks došli

do pozitivnih rezultata. Navode da konzumacija dva jaja obogaćena selenom omogućava konzumaciju 55 do 65  $\mu\text{g}$  selena, što odgovara preporučenoj dnevnoj dozi. Također, dokazali su da prednosti obogaćivanja jaja karotenoidima, vitaminom E, selenom i dokosaheksaenoičnom kiselinom omogućuje veću stabilnost polinezasićenih masnih kiselina tijekom kuhanja i skladištenja jaja, višu koncentraciju hranjivih sastojaka kao što su vitamin E i karotenoidi te poboljšani antioksidativni i n-3 status ljudi koji konzumiraju ova jaja (36). U istraživanju koncentracije luteina i zeaksantonina te konzumiranja jednog obogaćenoj jajeta tijekom pet tjedana, Goodrow i suradnici su zaključili da u serumu ispitanika dolazi do povećanja koncentracije luteina za 26% i zeaksantonina za 38% s time da se ne povećava koncentracija ukupnog HDL i LDL kolesterola. Navedeno je istraživanje provedeno na zdravim muškarcima, koji su svakodnevno kroz pet tjedana konzumirali jaja dobivena od posebno hranjenih nesilica, čiji je obrok uključivao 6 miligrama luteina. Dobiveni rezultati su dokazali da uz konzumaciju luteinom obogaćenih jaja dolazi do rasta količine luteina u serumu ispitanika (37).

S druge strane, postoje istraživanja koja povezuju konzumaciju obogaćenih jaja i genski izražaj antioksidativnih enzima u organizmu. Upravo takvo istraživanje su proveli Šafar i suradnici, a istraživanje je uključivalo mlade sedentarne ispitanike, oba spola. Međutim, genski izražaj CAT, SOD, MPO i GPx nakon konzumacije obogaćenih jaja nije pokazao razlike do razine statističke značajnosti (21).

Slično tome, rezultati ovog istraživanja pokazali su blage promjene koncentracije antioksidativnih enzima CAT, GPx i SOD u serumu ispitanika, ali ne do razine statističke značajnosti unutar grupe. Jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom uzrokuju blagi porast koncentracije GPx kod mladih zdravih ispitanika i kardiovaskularnih bolesnika iako dobiveni rezultati nisu statistički značajni unutar grupa. Skupina mladih zdravih ispitanika, koja je konzumirala obogaćena jaja, pokazala je lagani porast koncentracije CAT enzima nakon provedbe istraživanja, dok su obje skupine kardiovaskularnih bolesnika, koje su konzumirale obogaćena jaja, imale blago snižene vrijednosti CAT enzima. Ovakvi rezultati mogu biti posljedica neizlaganja stresoru kod mladih zdravih ispitanika, jer postoji vjerojatnost da se stanice moraju izložiti stresoru koji bi uzrokovao intenzivnije djelovanje n-3 PUFA, luteina, vitamina E i selena na organizam. S druge strane, ovakvi rezultati kod kardiovaskularnih bolesnika vjerojatno su posljedica trajno prisutnih činitelja koji uzrokuju oštećenje endotela

krvnih žila i na taj način povećavaju oksidativni stres u organizmu. Usporedbom rezultata unutar kontrolne i unutar eksperimentalne skupine nakon provedbe istraživanja, nisu uočene značajne promjene koncentracije SOD enzima kod mladih zdravih ispitanika i kardiovaskularnih bolesnika unutar grupa. Te su upravo takvi rezultati pokazali da koncentracija SOD nije reprezentativan primjer da povećane koncentracije antioksidativnih enzima, znače i smanjene vrijednosti slobodnih radikala, jer se tijekom upale stvaraju veće količine  $O_2^-$  pa je samim time i u takvim tkivima potrebno više SOD. Upravo se zato može zaključiti da porast, kao i pad aktivnosti SOD enzima može upozoriti na određene promjene i patološke procese.

Rezultati ovog istraživanja ne pokazuju statistički značajne razlike unutar pripadajućih grupa ispitanika, ali usporedbom rezultata kontrolnih i eksperimentalnih grupa nakon provedbe istraživanja ipak su dobivene statistički značajne razlike. Mladi zdravi ispitanici imaju značajno veću koncentraciju GPx enzima nakon konzumacije obogaćenih jaja u usporedbi s kontrolnom grupom mladih zdravih ispitanika. S obzirom da GPx razgrađuje  $H_2O_2$  na  $H_2O$  i  $O_2$ , njezina povećana aktivnost može uzrokovati sniženu koncentraciju  $H_2O_2$ . Na temelju toga možemo povezati rezultate aktivnosti katalaze koji nisu pokazali statistički značajne razlike između skupine mladih zdravih ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja i kontrolne skupine.  $H_2O_2$  može uzrokovati postepenu inhibiciju SOD enzima. Razgradnjom  $H_2O_2$ , GPx je spriječio veću inhibiciju SOD enzima, što je vjerojatno uzrokovalo blago snižene koncentracije SOD enzima kod mladih zdravih ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja. Akutni kardiovaskularni bolesnici imaju značajno veću aktivnost katalaze i SOD nakon konzumacije obogaćenih jaja u usporedbi s kontrolnom grupom akutnih kardiovaskularnih bolesnika, što ukazuje na pozitivno djelovanje n-3 PUFA, luteina, vitamina E i selena na zaštitu organizma od slobodnih radikala i sniženje oksidativnog stresa. Kronični kardiovaskularni bolesnici imaju značajno nižu aktivnost GPx enzima nakon konzumacije obogaćenih jaja u usporedbi s kontrolnom grupom kroničnih kardiovaskularnih bolesnika, što je moguća posljedica pada koncentracije selena o kojem aktivnost GPx enzima najviše ovisi. Naime, prilikom konzumacije anorganskog i organskog selena, prvotne koncentracije selena naglo rastu i neko vrijeme ostaju povišene. Tijekom dulje konzumacije dolazi do uravnoteženja koncentracije zbog koje vrijednosti selena padaju i snižavaju se do primarne razine.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- 1) Jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom uzrokuju blagi porast koncentracije CAT kod mladih zdravih ispitanika, iako dobiveni rezultati nisu statistički značajni unutar grupe;
- 2) Jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom, kao i uobičajena jaja uzrokuju neznatan pad koncentracije CAT kod kardiovaskularnih bolesnika, iako dobiveni rezultati nisu statistički značajni unutar grupe;
- 3) Jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom uzrokuju blagi porast koncentracije GPx kod mladih zdravih ispitanika i kardiovaskularnih bolesnika, iako dobiveni rezultati nisu statistički značajni unutar grupa;
- 4) Jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom ne uzrokuju značajnu promjenu koncentracije SOD kod mladih zdravih ispitanika i kardiovaskularnih bolesnika unutar grupa;
- 5) Rezultati upućuju da konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom ima pozitivan utjecaj na aktivnost antioksidativnih enzima i pridonosi smanjenju oksidativnog stresa.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati aktivnost antioksidativnih enzima u uzorcima seruma kod mladih zdravih ispitanika i kardiovaskularnih bolesnika, koji su konzumirali obična ili obogaćena kokošja jaja.

**Nacrt studije:** Pokusno (eksperimentalno) istraživanje

**Materijali i metode:** Istraživanje je provedeno na zdravim ispitanicima i kardiovaskularnim bolesnicima, koji su konzumirali obogaćena ili uobičajena kokošja jaja. Ispitanici su bili podijeljene u 2 skupine: (1) kontrolna skupina, u kojoj su ispitanici konzumirali uobičajena kokošja jaja; (2) eksperimentalna „quattro“ skupina, u kojoj su ispitanici konzumirali jaja obogaćena n-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Aktivnost antioksidativnih enzima u serumu mjerila se pomoću standardiziranih protokola spektrofotometrijskim metodama, pomoću Lambda 25UV-Vis spektrofotometra

**Rezultati:** Aktivnost antioksidativnih enzima CAT, GPx i SOD nije se značajno promijenila unutar ispitivanih skupina ( $P > 0,05$ )

**Zaključak:** Aktivnost antioksidativnih enzima enzima CAT, GPx i SOD nije statistički značajno ovisna o udjelu n-3 PUFA, luteina, vitamina E i selen u hrani

**Ključne riječi:** antioksidativni, enzimi; obogaćena, kokošja, jaja; spektrofotometrija

## 9. SUMMARY

**Title:** Antioxidative enzymes' activity in young healthy persons and cardiovascular patients on a enriched hen eggs diet

**Objectives:** The activity of antioxidative enzymes in serum samples in young healthy persons and cardiovascular patients on a enriched hen eggs diet

**Study draft:** Experimental research

**Materials and methods:** Healthy persons and cardiovascular patients were divided into 2 groups: (1) control group (consumed common chicken eggs); (2) experimental "quattro" group (consumed eggs enriched with n-3 fatty acids, lutein, vitamin E and selenium). Antioxidant enzymes activity were analysed using standardized protocols by spectrophotometric methods, using a Lambda 25UV - Vis spectrophotometer

**Results:** The activity of the antioxidant enzymes CAT, GPx and SOD was not significantly altered within the study groups ( $P > 0,05$ )

**Conclusion:** The activity of antioxidant enzymes CAT, GPx and SOD is not statistically significantly dependent on the content of n-3 PUFA, lutein, vitamin E and selenium in food

**Key words:** antioxidative, enzymes; enriched, hen, eggs; spectrophotometry

**10. LITERATURA**

1. Senoner T, Dichtl W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?. *Nutrients*. 2019;11.9:2090.
2. Crnoja A. Oksidativni stres i antioksidacijska aktivnost kod mliječnih krava. Završni rad. Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek. 2016.
3. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993;49(3):481-93.
4. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(3):368-70.
5. Rimbach, G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, i sur. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr*. 1999;52(3):203-22.
6. Wei JH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Experimental biology and medicine*. 2002;227.9:671-682.
7. Mohammad M, Solanki P, Singh P. Oxidative Stress, Antioxidants, Hormesis and Calorie Restriction: The Current Perspective in the Biology of Aging. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2021;104413.
8. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radical Research*. 2007;41:1364-1375.
9. Mayne TS. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research; *The Journal of Nutrition*. 2003;933-940.
10. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological chemistry*. 2017;398.10:1095-1108.



11. Damiano S, Sozio C, La Rosa G, Guida B, Faraonio R, Santillo M i sur. Metabolism Regulation and Redox State: Insight into the Role of Superoxide Dismutase 1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21.18:6606.
12. Jurkovič S, Osredkar J, Marc J. Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. *Biochemia Medica*. 2008;18.2:162-174.
13. Buhač I. Vitamini i minerali u dječjoj dobi. Dijete, vrtić, obitelj: Časopis za odgoj i naobrazbu predškolske djece namijenjen stručnjacima i roditeljima. 2008;14.54:27-28.
14. Tavakoli M, Bouyeh M, Seidavi A. Učinci dodatka vitamina C prehrani na profil masnih kiselina u mesu prsa brojlera. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*. 2020;22.4:268-273.
15. Berger MM, Oudemans-van Staaten HM. Vitamin C supplementation in the critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(2):193-201.
16. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
17. Ayyildiz HF, Topkafa M, Kara H, Sherazi STH. Evaluation of fatty acid composition, tocopherol profile, and oxidative stability of some fully refined edible oils. *International Journal of Food Properties*. 2015;18.9: 2064-2076.
18. Ali MM, Noaman E, Kamal S, Soliman S, Ismail D. Role of germanium L-cysteine  $\alpha$ -tocopherol complex as stimulator of some antioxidant defense system in gamma-irradiated rats. *Acta Pharmaceutica*. 2007;57.1:1-12.
19. Touvier M, Kesse E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC. Dual association of  $\beta$ carotene with risk of tobacco-related cancers in a cohort of French women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(18):1338-1344.
20. Leermakers ET, Darweesh SK, Baena CP, Moreira EM, Melo van Lent D, Tielemans MJ, et al. The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis, 2. *The American journal of clinical nutrition*. 2016;103(2):481-94.

21. Šafar I. Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (pufa) na izražaj gena antioksidativnih enzima u mononuklearnim stanicama krvi kod mladih zdravih ispitanika. Završni rad. Medicinski fakultet Osijek. 2020.
22. Nair SSD, Leitch, JW, Falconer J, Garg ML. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *The Journal of nutrition*. 1997;127.3:383-393.
23. Lužaić T, Romanić R, Kravić S, Radić B. Formulation of sunflower and flaxseed oil blends rich in omega 3 fatty acids. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 2018;7.1:18-21.
24. Bang HO, Dyerberg J, Hjörne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Medica Scandinavica*. 1976;200.1-6:69-73.
25. Cappellari GG, Losurdo P, Mazzucco S, Panizon E, Jevnicar M, Macaluso L, i sur. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem*. 2013;24:371–379.
26. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018; 83-86.
27. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z, i sur. AntiInflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals. *Clinical Trial. Int J Mol Sci*. 2020;21(11):4149.
28. Topolnik S. Optimiranje uvjeta fotokatalitičke razgradnje azo bojila uz poli(3,4-etilendioksifen)/tio<sub>2</sub> fotokatalizator i simulirano sunčevo zračenje. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. 2016.
29. Kralik Z, Lovreković M. Utjecaj hranidbe na kvalitetu i obogaćivanje jaja funkcionalnim sastojcima. *Meso*, 2018, 20.1.

30. Hu FB, Stampfer MJ, Rimm EB, Manson JE, Ascherio A, Colditz GA i sur. A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *Jama*. 1999;281.15:1387-1394.
31. Qureshi AI, Fareed M, Suri K, Ahmed S, Nasar A, Divani AA i sur. Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. *Medical Science Monitor*. 2006;13.1:CR1-CR8.
32. Zazpe I, Beunza JJ, Bes-Rastrollo M, Warnberg J, De la Fuente-Arrillaga C, Benito S i sur. Egg consumption and risk of cardiovascular disease in the SUN Project. *European journal of clinical nutrition*. 2011;65.6:676-682.
33. Gortan Cappellari G, Losurdo P, Mazzucco S, Panizon E, Jevnicar M, Macaluso L, Fabris B, Barazzoni R, Biolo G, Carretta R, Zanetti M. Treatment with n-3 27 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem*. 2013;24:371–379.
34. Jaccobsn TA. Role of n-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(6):1981S-90S.
35. Surai PF, MacPherson A, Speake BK, Sparks NHC. Designer egg evaluation in a controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2000;54.4: 298-305.
36. Surai PF, Sparks NHC. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in food science & Technology*. 2001;12.1:7-16.
37. Wilson TA, Goodrow E, Houde S, Vishwanathan R, Scollin P, Handelman G, Nicolosi RJ. Consumption of one egg per day increases serum lutein and zeaxanthin concentrations in older adults without altering serum lipid and lipoprotein cholesterol concentrations. *The Journal of nutrition*. 2007;136.10: 2519-2524.

## **11. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI**

Ime i prezime: Marija Duvnjak

Datum rođenja: 4. listopada 1997. godine

Mjesto rođenja: Osijek, Hrvatska

Adresa: N. Š. Zrinskog 177, Koška

Mobitel: 099 5151 085

E-pošta: marija.duvnjak97@gmail.com

### **OBRAZOVANJE**

2004. – 2012. Osnovna škola Ivane Brlić Mažuranić, Koška

2012. – 2016. I. Gimnazija Osijek (Opća gimnazija)

2016. – trenutno Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet MLD

### **OSTALE AKTIVNOSTI**

Predstavnik studenata u Fakultetskom vijeću Medicinskog fakulteta Osijek 2019. godine

Predsjednica Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Osijek 2019. godine

Član studentske udruge CMLDSA od 2016. godine