

Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA) na izražaj gena antioksidativnih enzima u mononuklearnim stanicama krvi mladih zdravih ispitanika

Šafar, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:152:592787>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

Iva Šafar

**UTJECAJ KONZUMACIJE KOKOŠJIH
JAJA OBOGAĆENIH n-3
POLINEZASIĆENIM MASNIM
KISELINAMA (PUFA) NA IZRAŽAJ
GENA ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
MONONUKLEARNIM STANICAMA KRVI
KOD MLADIH ZDRAVIH ISPITANIKA**

Završni rad

Osijek, 2020.

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

Iva Šafar

**UTJECAJ KONZUMACIJE KOKOŠJIH
JAJA OBOGAĆENIH n-3
POLINEZASIĆENIM MASNIM
KISELINAMA (PUFA) NA IZRAŽAJ
GENA ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U
MONONUKLEARNIM STANICAMA KRVI
KOD MLADIH ZDRAVIH ISPITANIKA**

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet u Osijeku, Katedra za fiziologiju i imunologiju, Laboratorij za molekularnu i kliničku imunologiju

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

Neposredni voditelj: Petar Šušnjara, *univ. bacc. med. lab. diagn.*

Rad ima: 28 listova, 2 tablice i 8 slika

ZAHVALA:

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med., na izdvojenom vremenu i pruženoj prilici za ostvarenje mog završnog rada. Također, zahvaljujem na razumijevanju i strpljenju te savjetima i prenesenom znanju u protekle tri godine mog obrazovanja.

Zahvaljujem na omogućenom radu u laboratoriju te usavršavanju mog znanja na Katedri za fiziologiju i imunologiju. Veliko hvala Petru Šušnjari, univ. bacc. med. lab. diagn., na pomoći pri izvođenju istraživanja i pisanju završnog rada.

Od srca zahvaljujem kolegama i prijateljima koji su bili uz mene i time uljepšali i olakšali moje studiranje.

Najveće hvala mojoj obitelji koja je od samog početka mog obrazovanja pružala podršku i bila uz mene kroz uspone i padove. Hvala im na ukazanom povjerenju i poticaju za daljnje obrazovanje.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Oksidativni stres i slobodni radikali	1
1.2. Antioksidativni mehanizmi	1
1.2.1. Enzimski antioksidansi	3
1.2.2. Neenzimski antioksidansi	4
1.3. Omega-3 polinezasićene masne kiseline	6
1.4. Uloga omega-3 polinezasićenih masnih kiselina na oksidativni stres i krvožilni sustav	7
2. HIPOTEZA	9
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	10
4. MATERIJALI I METODE	11
4.1. Ustroj studije	11
4.2. Ispitanici	11
4.3. Metode	12
4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC)	12
4.3.2. Izolacija humane RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi	13
4.3.3. PCR u stvarnom vremenu	13
4.4. Statistička analiza	15
5. REZULTATI	16
5.1. Promjena genskog izražaja antioksidativnih enzima iz mononuklearnih stanica periferne krvi mladih zdravih ispitanika	16
6. RASPRAVA	19
7. ZAKLJUČAK	21
8. SAŽETAK	22
9. SUMMARY	23
10. LITERATURA	24
11. ŽIVOTOPIS	28

KRATICE

AHRQ - (engl. *Agency for Healthcare Research and Quality*) Agencija za zdravstvena istraživanja i kvalitetu

ALA - (engl. *alpha-linolenic acid*) alfa-linolenska kiselina

ANOVA – (engl. *Analysis of Variance*) analiza varijance

CAT - (engl. *catalase*) katalaza

cDNA - (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) komplementarna deoksiribonukleinska kiselina

CRP - (engl. *C-reactive protein*) C-reaktivni protein

Ct - (engl. *cycle-threshold*) granični ciklus

Cu/Zn SOD / SOD1 - (engl. *copper/zinc superoxide dismutase / superoxide dismutase 1*) bakar/cink superoksid dismutaza / superoksid dismutaza 1

DHA - (engl. *docosahexaenoic acid*) dokosaheksaenoična kiselina

DNA - (engl. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

EC-SOD / SOD3 - (engl. *extracellular superoxide dismutase / superoxide dismutase 3*) izvanstanična superoksid dismutaza / superoksid dismutaza 3

EPA - (engl. *eicosapentaenoic acid*) eikosapentaenska kiselina

FDA - (engl. *Food and Drug Administration*) Administracija hrane i lijekova

GPx - (engl. *glutathione peroxidase*) glutation peroksidaza

GPx1 - (engl. *glutathione peroxidase 1*) glutation peroksidaza 1

GPx1leu - (engl. *glutathione peroxidase 1 leucine*) glutation peroksidaza 1 leucin

GSH - (engl. *glutathione*) glutation

GSSG - (engl. *glutathione disulfide*) glutation disulfid

H₂O₂ - (engl. *hydrogen peroxide*) vodikov peroksid

HDL - (engl. *high density lipoprotein*) lipoprotein visoke gustće

LDL - (engl. *low density lipoprotein*) lipoprotein niske gustoće

MAPK - (engl. *mitogen-activated protein kinase*) protein kinaza aktivirana mitogenom

Mn SOD / SOD2 - (engl. *manganese superoxide dismutase / superoxide dismutase 2*) mangan superoksid dismutaza / superoksid dismutaza 2

MPO - (engl. *myeloperoxidase*) mijeloperoksidaza

NO - (engl. *nitric oxide*) dušikov monoksid

O₂⁻ - (engl. *superoxide anion*) superoksidni anion

ONOO⁻ - (engl. *peroxynitrite anion*) anion peroksinitrita

PBMC - (engl. *peripheral blood mononuclear cell*) mononuklearne stanice periferne krvi

PBS - (engl. *phosphate-buffered saline*) fiziološka otopina puferirana fosfatom

PCR - (engl. *polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimeraze

pKa - (engl. *acid dissociation constant*) konstanta disocijacije kiseline

PUFA - (engl. *polyunsaturated fatty acids*) polinezasićene masne kiseline

qPCR - (engl. *quantitative polymerase chain reaction*) kvantitativna lančana reakcija polimeraze

RCF - (engl. *relative centrifugal force*) relativna centrifugalna sila

ROS - (engl. *reactive oxygen species*) reaktivni kisikovi spojevi

RT-PCR - (engl. *real-time polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

SAPK - (engl. *stress-activated protein kinase*) protein kinaza aktivirana stresom

SOD - (engl. *superoxide dismutase*) supeoksid dismutaza

UV - (engl. *ultraviolet radiation*) ultraljubičasto zračenje

VLDL - (engl. *very low density lipoprotein*) lipoprotein vrlo niske gustoće

SLIKE:

Slika 1. Struktura ALA masne kiseline

Slika 2. Struktura EPA masne kiseline

Slika 3. Struktura DHA masne kiseline

Slika 4. PCR uređaj - BioRad CFX96

Slika 5. Relativni izražaj katalaze u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Slika 6. Relativni izražaj mijeloperoksidaze u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Slika 7. Relativni izražaj superoksid dismutaze 1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Slika 8. Relativni izražaj glutacion peroksidaze 1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi

TABLICE:

Tablica 1. Podjela i primjeri antioksidansa

Tablica 2. Profil masnih jestivih dijelova jaja

1. UVOD

1.1. Oksidativni stres i slobodni radikali

Oksidativni stres predstavlja fiziološki stres u tijelu koji se javlja kada su slobodni radikali nedovoljno ili nepravilno neutralizirani antioksidansima (1). Slobodni su radikali atomi ili molekule koji u svojoj vanjskoj orbitali sadrže nesparene elektrone, a nastaju kada zbog djelovanja štetnih čimbenika na organizam, na primjer ultraljubičastog zračenja (UV; engl. *ultraviolet radiation*), ionizirajućeg zračenja, konzumacije alkohola i cigareta, radijacije i slično, dođe do pucanja kemijskih veza unutar molekula (2). Slobodni radikali nastoje se što prije povezati s okolnim molekulama kako bi preuzeli njihov nespareni elektron i ponovno se stabilizirali. Tako u organizmu nastaje niz lančanih kemijskih reakcija u kojima okolni atomi ili molekule otpuštaju svoje elektrone, stoga govorimo o reakcijama oksidacije (3). Unutarstaničnim procesom mitohondrijske oksidacijske fosforilacije te reakcijama staničnog odgovora na prisutnost stranih tvari u organizmu, poput citokina, bakterija ili ksenobiotika, u organizmu se formiraju reaktivni kisikovi spojevi ili kraće ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*) (4). Radi se o molekulama kisika koje bivaju razdvojene u pojedinačne atome s nesparenim elektronima te tako postaju vrlo reaktivni. Tu ubrajamo vodikov peroksid (H_2O_2 ; engl. *hydrogen peroxide*), superoksidni anion (O_2^- ; engl. *superoxide anion*), ozon, singlet kisik i organske perokside. Pojava veće aktivnosti reaktivnih kisikovih spojeva koju nije moguće uravnotežiti djelovanjem antioksidansa može dovesti do oštećenja važnih strukturnih molekula i tkiva u organizmu kao što su deoksiribonukleinska kiselina (DNA; engl. *deoxyribonucleic acid*), proteini i masno tkivo te tako prouzročiti oboljenja poput dijabetesa, ateroskleroze, raznih upalnih procesa, hipertenzije, srčanih bolesti, nekih neurodegenerativnih bolesti (npr. Parkinsonova i Alzheimerova bolest) ili biti „okidač“ u razvoju tumora organa (3). Također, proces oksidativnog stresa povezujemo sa starenjem. S druge strane, dokazano je da je ROS u umjerenim koncentracijama važan u regulaciji signalizacije nekih staničnih procesa kao što su proliferacija, metabolizam, rast i diferencijacija te apoptoza stanica.

1.2. Antioksidativni mehanizmi

Prethodno je opisano kako su za neutralizaciju slobodnih radikala u organizmu neophodni antioksidansi. Radi se o tvarima poput vitamina A, C, E i brojnih drugih, kojima je primarna uloga zaštita organizma od infekcija, raznih bolesti i štetnih učinaka slobodnih radikala na zdrave

stanice. Nespareni elektroni čine slobodne radikale nestabilnima zbog čega oni nastoje preuzeti elektrone od okolnih molekula. Antioksidansi doniranjem ili prihvaćanjem elektrona nastoje stabilizirati slobodne radikale i tako umanjiti mogućnost oštećenja stanica i nastanka bolesti. Iako se uobičajeno sintetiziraju u našem organizmu, potrebno ih je dodatno unositi prehranom s obzirom na to da se njihova produkcija s godinama smanjuje. Povoljan izvor antioksidansa su voće, povrće i žitarice, no sadrže ih i druge namirnice poput mlijeka, mesa, ribe i morskih plodova. Antioksidansi nastoje ukloniti slobodne radikale na tri načina. Jedan od njih je inhibicija slobodnih radikala u kojoj sudjeluju takozvani preventivni antioksidansi poput albumina, ceruloplazmina, transferina, feritina i ostalih proteina koji vežu metale (5). Neki antioksidansi uklanjaju postojeće slobodne radikale, a to su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza uz manje molekule poput flavonoida, karotenoida, mokraćne kiseline, bilirubina i askorbata (5). Posljednji mehanizam obrane je popravak oštećenih biomolekula pomoću reparativnih enzima, na primjer popravak molekule DNA (5). Obrambeni antioksidativni mehanizmi mogu se definirati kao enzimski i neenzimski. Superoksid dismutaza (SOD; engl. *superoxide dismutase*), glutation peroksidaza (GPx; engl. *glutathione peroxidase*), katalaza (CAT; engl. *catalase*) i mijeloperoksidaza (MPO; engl. *myeloperoxidase*) pripadaju skupini enzimskih antioksidansa. Njihova je aktivnost praćena u ovom istraživanju. U neenzimske antioksidanse ubrajamo one koji u organizmu nastaju kao produkt metaboličkih reakcija, a to su koenzim Q, glutation i lipoična kiselina, te one koje se u organizam unose prehranom - vitamini A, C, E, β-karoten, flavonoidi, selen i lignan (6).

Tablica 1. Podjela i primjeri antioksidansa

ANTIOKSIDANSI		
ENZIMSKI	NEENZIMSKI	
	<i>neesencijalni</i>	<i>esencijalni</i>
SOD	koenzim Q	vitamini
GPx	glutation	β-karoten
CAT	lipoična kiselina	flavonoidi
MPO		selen
		lignan

1.2.1. Enzimski antioksidansi

U borbi protiv oksidativnog stresa središnju ulogu ima superoksid dismutaza (SOD). Pripada skupini enzima koji kataliziraju reakciju dismutacije superoksidnog aniona (O_2^-) na molekularni kisik (O_2) i vodikov peroksid (H_2O_2) te tako štite stanice od oštećenja (7). U organizmu sisavaca postoje tri izoforme SOD-a: bakar-cink SOD (Cu/Zn SOD; engl. *copper/zinc superoxide dismutase*) ili SOD1 (engl. *superoxide dismutase 1*) koji se nalazi u citosolu i manjim dijelom u međumembranskom prostoru, mangan SOD (Mn SOD; engl. *manganese superoxide dismutase*) ili SOD2 (engl. *superoxide dismutase 2*) koji se nalazi u mitohondriju te izvanstanični SOD (EC-SOD; *extracellular superoxide dismutase*) ili SOD3 (engl. *superoxide dismutase 3*) (7, 8). Riječ je o bjelančevinama koje se aktiviraju pomoću metalnih kofaktora, bakra, cinka, mangana, nikla ili željeza. SOD imaju važnu ulogu u inhibiciji stvaranja štetnog aniona peroksinitrita ($ONOO^-$; engl. *peroxynitrite anion*) (8). Naime, važan protuupalni spoj - dušikov monoksid (NO; engl. *nitric oxide*) može biti deaktiviran u reakciji s O_2^- pri čemu nastaje $ONOO^-$ koji može biti uzrok endotelne i mitohondrijske disfunkcije, hipertenzije, dijabetesa i starenja (8). Katalizirajući reakciju dismutacije O_2^- na O_2 i H_2O_2 , SOD preveniraju stvaranje $ONOO^-$. SOD1 je glavni unutarstanični enzim, a od SOD2 ga razlikujemo po tome što je osjetljiv na cijanid (8). Za enzimsku aktivnost SOD1 ili Cu/Zn SOD važni su bakar i cink. Cink doprinosi pravilnom savijanju i stabilnosti proteina, dok bakar izravno sudjeluje u katalitičkim reakcijama uklanjanja O_2^- (8). Gen SOD1 nalazi se na dugom kraku 21. kromosoma, u području 21q22, te pacijenti s Downovim sindromom (trisomija 21) imaju jednu dodatnu kopiju tog gena (9). S obzirom na to, aktivnost SOD1 upola je veća kod pacijenata s trisomijom u odnosu na normalnu diploidnu populaciju. Posljedica toga je povećana koncentracija H_2O_2 koja može postati toksična. Također, istraživanja su pokazala da je preko 100 mutacija gena SOD1 povezano s nastankom neurodegenerativne bolesti - amiotrofične lateralne skleroze (ALS) (8). Sljedeća skupina enzima su glutation peroksidaze (GPx). Njihova primarna uloga je redukcija vodikovog peroksida i monomernog glutationa (GSH; engl. *glutathione*) do molekule vode i glutation disulfida (GSSG; engl. *glutathione disulfide*) u reakciji: $GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$ te redukcija lipidnih hidroperoksida (10). Nalaze se u citoplazmi stanica ili mitohondriju. U mitohondriju se odvija redukcija H_2O_2 koji nastaje u reakciji dismutacije superoksida djelovanjem SOD2. Glutation peroksidaza 1 (GPx1; engl. *glutathione peroxidase 1*), proteinska je molekula koja sadrži aminokiselinu – selenocistein, a ona se od aminokiseline cistein razlikuje po tome što umjesto sumpora sadrži selen (11). Konstanta disocijacije kiseline (pKa; engl. *acid dissociation constant*) selenocisteina niža je u odnosu na pKa cisteina što znači da će selenocistein lakše disociirati u

oksidoredukcijskim reakcijama te ga to čini učinkovitijim antioksidansom (11). Gen GPx1 je polimorfan u području kodona 198 koji se odnosi na C-terminalni kraj enzima. Može rezultirati ekspresijom aminokiseline prolina ili leucina. Istraživanja su pokazala da je alelna varijanta GPx1leu (engl. *glutathione peroxidase 1 leucine*) povezana s nastankom karcinoma pluća, dojke, mokraćnog mjehura, jetre i limfoma (11). GPx1leu protein češće je smješten u citoplazmi, a ne u mitohondriju te manjim afinitetom veže selen. S obzirom na te karakteristike, njegova funkcija u oksidoredukcijskim reakcijama je smanjena. Sljedeći enzim u borbi protiv vodikovog peroksida je katalaza (CAT), jedan od najučinkovitijih enzima u stanicama. Pojedina molekula katalaze može razgraditi do milijun molekula H₂O₂ u sekundi (12). Postoje tri različite vrste ovog enzima temeljenih na razlikama u njihovoj strukturi i mjestu djelovanja. Najrasprostranjeniji je monofunkcionalni enzim koji sadrži hem. Prisutan je u svim aerobnim organizmima. Bifunkcionalna katalaza, katalaza-peroksidaza, također sadrži hem, a strukturno je nalik biljnoj peroksidazi. Posljednja vrsta katalaze ne sadrži hem, već mangan u svojoj strukturi (13). Katalaze su unutarstanični enzimi aktivni u eritrocitima, hepatocitima i nešto manje u bubregu. Monofunkcionalna katalaza koja štiti naše eritrocite sastoji se od četiri identične podjedinice koje u svom aktivnom centru sadrže hem skupinu. U središtu hem skupine nalazi se ion željeza koji ubrzava reakciju razgradnje H₂O₂ na O₂ i 2H₂O. Mijeloperoksidaza (MPO) je metaloprotein uskladišten u azurofilnim granulama polimorfonuklearnih neutrofila i makrofaga koji se otpušta u izvanstaničnu tekućinu u stanjima upale (14). Enzim je koji katalizira pretvorbu klorida (Cl⁻) i vodikovog peroksida (H₂O₂) u hipoklorastu kiselinu (HOCl) koja ima baktericidno djelovanje (14). Sudjeluje i u oksidaciji lipida sadržanih u LDL kolesterolu. Aktivnost MPO može se mjeriti u krvi i tkivima spektrofotometrijskim metodama ili u neutrofilima kao indeks degranulacije s Coulterovim brojačem i protočnom citometrijom. Prethodna istraživanja pokazala su da porast aktivnosti MPO u korelaciji s povećanim koncentracijama C-reaktivnog proteina (CRP; engl. *C-reactive protein*) i bijelih krvnih stanica upućuje na kronično srčano oboljenje (14). Aktivnost može biti povećana i kod naizgled zdravih pacijenata koji će tek razviti bolest, ali primarno upućuje na to da se u organizmu odvija upalni proces (14).

1.2.2. Neenzimski antioksidansi

Važnu ulogu u obrani organizma od štetnog djelovanja oksidativnog stresa imaju i neenzimski antioksidansi. Riječ je o esencijalnim elementima koji se u organizam dodatno unose prehranom. Najvažniji neenzimski antioksidans je glutation, tripeptid koji se sastoji od cisteina, glicina i glutaminske kiseline. Postoji u dva oblika u stanicama – reducirani oblik (GSH) i oksidirani oblik

(GSSG) koji se sastoji od dva reducirana glutaciona povezana između atoma sumpora. Zdrave su stanice one koje imaju omjer GSH/GSSG > 100 (14). Nakupljanje GSSG-a štetno je za stanice i tada glutacion aktivira SAPK/MAPK (engl. *stress-activated protein kinase/mitogen-activated protein kinase*) signalne puteve apoptoze (14). Osim što štiti stanice od potencijalnog oštećenja kisikovim i dušikovim slobodnim radikalima, glutacion nastoji spriječiti nastanak oksidativnog stresa tako što transportira živu i druge štetne tvari te potiče njihovo izlučivanje iz organizma. Vitamin C, poznat pod nazivom askorbinska kiselina, također štiti stanice od štetnog djelovanja slobodnih radikala i smanjuje rizik od pojave karcinoma. Nastoji sniziti koncentraciju bakra i željeza koji služe za prijenos slobodnih radikala i pogoduje normalnoj funkciji imunološkog sustava (16). Topljiv je u vodi te ima ulogu kofaktora u reakciji biosinteze kolagena i neurotransmitera kateholamina (17). Stimulirajući proizvodnju i funkciju leukocita, sudjeluje u obrani organizma od infekcija te pomaže u cijeljenju rana (17). Budući da se ne sintetizira u našem organizmu, potrebno ga je unositi prehranom (agrumi, kupus, rajčica, špinat, krumpir...) ili u obliku kapsule. Preporučena dnevna količina vitamina C za odrasle muškarce je 90 miligrama, a za žene oko 75 miligrama (18). U nedostatku ovog vitamina razvija se bolest zvana skorbut. Simptomi bolesti su krvarenje desni, modrice, otežano zarastanje rana i anemija (18). Kako bi uklanjanje slobodnih radikala bilo što učinkovitije, vitamin C često je u suradnji s vitaminom E kojeg u staničnoj membrani neurona vraća iz oksidiranog u reducirani oblik i time indirektno smanjuje pojavu oksidativnog stresa (17). Prirodni izvor vitamina E su orašasti plodovi, biljna ulja (npr. suncokretovo, sojino, maslinovo ulje), sjemenke (npr. suncokreta, bundeve), zeleno lisnato povrće, žumanjak jajeta. Topljiv je u mastima, a u prirodi je prisutan u osam kemijskih oblika – alfa-, beta-, gama-, delta-tokoferol i alfa-, beta-, gama-, delta-tokotrienol (19). Za čovjeka je najznačajniji alfa-tokoferol. Uspješan je u suzbijanju nastanka slobodnih radikala koji nastaju oksidacijom masti. Na primjer, inhibira oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL; engl. *low density lipoprotein*) i smanjuje adhezivnost trombocita te na taj način prevenira nastanak aterosklerotičnog plaka i razvoj srčane bolesti. Blokiranjem stvaranja kancerogenih spojeva iz nitrita u hrani smanjuje rizik od pojave karcinoma (19). Beta karoten je biljni pigment karakteristične narančasto-crvene boje. Prekursor je vitamina A koji pridonosi normalnoj funkciji imunološkog sustava, održavanju vida i zdrave kože. Istraživanja su pokazala da prehrana bogata beta karotenom smanjuje rizik od pojave karcinoma i srčanih bolesti te usporava pad kognitivnih sposobnosti kod muškaraca (20).

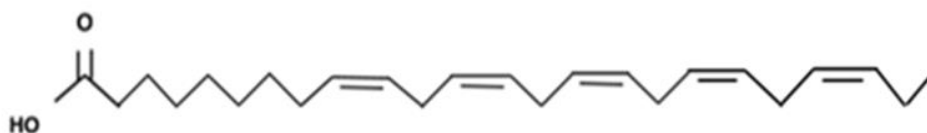
1.3. Omega-3 polinezasićene masne kiseline

Strukturu masnih kiselina čine dugi lanci međudobno povezanih ugljikovih atoma koji na jednom kraju sadrže karboksilnu, a na drugom metilnu skupinu. Polinezasićene masne kiseline (PUFA; engl. *polyunsaturated fatty acids*) od zasićenih se razlikuju po tome što sadrže dvije ili više dvostruke veze između atoma ugljika. Omega-3 (n-3) masne kiseline sadrže dvostruku vezu nakon trećeg po redu ugljikovog atoma kada gledamo metilni kraj lanca. Prisutni su u orašastim plodovima, sjemenkama lana, ribi i algama (21). Izvorno ih sintetiziraju mikroalge, a riba ih u svom tkivu nakuplja tek nakon konzumacije fitoplanktona čija su prehrana mikroalge (21). Postoje različite vrste n-3 masnih kiselina, ali najčešće se spominju alfa-linolenska kiselina (ALA; engl. *alpha-linolenic acid*), eikosapentaenska kiselina (EPA; engl. *eicosapentaenoic acid*) i dokosaheksaenoična kiselina (DHA; engl. *docosahexaenoic acid*). EPA i DHA su dugolančane kiseline, s 20 i 22 ugljikova atoma u lancu (Slika 1. Struktura DHA masne kiseline; Slika 2. Struktura EPA masne kiseline). ALA ima nešto kraći lanac od 18 ugljikovih atoma (Slika 3. Struktura APA kiseline). U organizmu se dvostruke veze mogu formirati tek nakon devetog ugljikovog atoma s metilne strane lanca (22). Iz tog se razloga ALA u organizam unosi prehranom (23). Moguća je konverzija ALA u EPA i zatim u DHA, no odvija se tek u malom postotku u jetri pa je i njih potrebno unositi prehranom (21). Nakon unošenja prehranom, slijedi njihova hidroliza u tankom crijevu (22). U tome im pomažu žučne soli koje zbog svog hidrofobnog i hidrofilnog dijela imaju mogućnost stvaranja micela. Kapljice masti bivaju uklopljene u micela, što pomaže u njihovoj razgradnji na monogliceride i slobodne masne kiseline. Novonastali produkti ulaze u enterocite pasivnom difuzijom. Zatim se masne kiseline ugrađuju u hilomikrone koji putem limfe ulaze u cirkulaciju i prema potrebi se prenose po tijelu do određenih organa za skladištenje ili naknadnu oksidaciju (22, 24, 25). Važno je spomenuti strukturnu ulogu omega-3 masnih kiselina u tvorbi staničnih membrana (25). Primjerice, DHA se u visokim koncentracijama nalazi kao komponenta staničnih membrana u mozgu, mrežnici i spermiji (25, 26). Omega-6 i omega-3 formiraju signalizacijske molekule. Riječ je o eikosanoidima, posrednicima upalnih reakcija (22). Status omega-3 u organizmu može se procijeniti mjerenjem pojedinih omega-3 masnih kiselina u plazmi i serumskim fosfolipidima u odnosu na ukupnu količinu fosfolipidnih masnih kiselina (27 - 29). Njihovo stanje u plazmi i serumu varira u odnosu na posljednji obrok pojedinca, no postoji i način provjere koji odražava dugoročne unose (21). Harris i von Shaky predložili su „Omega-3 indeks“ koji prikazuje ukupan broj EPA i DHA u membranama eritrocita u odnosu na ukupan broj eritrocitnih masnih kiselina (30). U zemljama u kojima se često konzumiraju riba ili orašasti plodovi postotak EPA i DHA iznosi 6 – 10 % ukupnih eritrocitnih masnih kiselina, dok je u zapadnoeuropskim zemljama taj

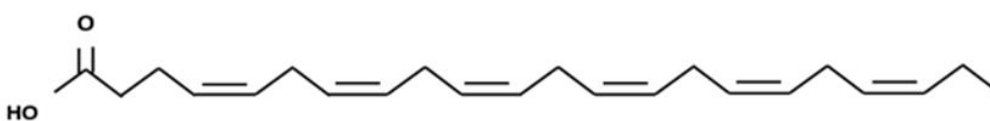
postotak dvostruko manji. Prema podacima NHANESA-a iz 2011./2012. godine, većina djece i odraslih u SAD-u konzumira preporučene količine omega-3 u obliku ALA (31). Prosječan dnevni unos ALA za žene je 1,59 g, a za muškarce 2,06 g. DHA i EPA se prehranom unose u manjim količinama, oko 40 mg kod djece i oko 90 mg kod odraslih (31). Manjak omega-3 i omega-6 masnih kiselina odražava se na kožu, postaje suha i luskasta (25). Istraživanja su pokazala da prehrana bogata omega-3 masnim kiselinama smanjuje rizik od pojave kardiovaskularnih bolesti i zatajenja srca jer omega-3 djeluju na slabljenje trombocitne agregacije, snižavanje krvnog tlaka i smanjenje koncentracije triglicerida u krvi (32). S obzirom na to da se DHA većim dijelom nalazi u mozgu i mrežnici (25), važna je za fetalni rast i razvoj. Pretpostavlja se da zbog mogućnosti inhibicije faktora rasta i antiupalnih svojstva omega-3 imaju ulogu u borbi protiv raka (33).



Slika 1. Struktura ALA masne kiseline (Izvor: vlastita izrada autorice)



Slika 2. Struktura EPA masne kiseline (Izvor: vlastita izrada autorice)



Slika 3. Struktura DHA masne kiseline (Izvor: vlastita izrada autorice)

1.4. Uloga omega-3 polinezasićenih masnih kiselina na oksidativni stres i krvožilni sustav

Kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok smrti u svijetu. Pretežno nastaju kao posljedica razvoja ateroskleroze - kronične, progresivne bolesti stijenke krvnih žila za koju je karakteristična pojava plakova (nakupina lipida, upalnih stanica, stanica glatkih mišića i vezivnog tkiva u stijenkama krvnih žila), a najčešće zahvaća aortu te arterije srca i mozga (34, 35). Proces započinje

oštećenjem endotela krvnih žila koji je zaslužan za rast i održavanje njihovog tonusa te sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka i hemostaze (35). Do oštećenja može doći utjecajem kemijskih (hiperkolesterolemija, štetni produkti cigareta), mehaničkih (hipertenzija) i bioloških (bakterijske i virusne infekcije) čimbenika koji potiču stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, a time i oksidativnog stresa (35). Iz tog je razloga narušena normalna funkcija endotelnog sustava kao selektivne pregrade između krvi i stijenke krvnih žila te je povećana propusnost za makromolekule (35). 70-ih godina 20. stoljeća započela su brojna istraživanja koja su pokazala povezanost povećanog unosa omega-3 masnih kiselina prehranom (učestala konzumacija ribe, npr. u Japanu) i smanjenja pojave kardiovaskularnih bolesti (21). Smatra se da omega-3 masne kiseline reduciraju količinu reaktivnih kisikovih spojeva i stimuliraju endotelnu sintezu NO koji oni razgrađuju (36) te tako održavaju vazoprotektivnu i antiaterogenu ulogu endotela (35). Također, snižavaju razine adhezijskih molekula, interleukina (IL-6) i/ili CRP-a, umanjujući time staničnu i sustavnu upalnu reakciju krvnih žila. S obzirom na to da kod endotelnog oštećenja dolazi do povećane propusnosti za makromolekule, a posljedično i do povećane razine triglicerida u krvi te lipoproteina visoke gustoće (HDL; engl. *high density lipoprotein*) i lipoproteina niske gustoće (35), omega-3 masne kiseline ublažavaju ovaj problem reducirajući koncentraciju triglicerida inhibiranjem dvaju bitnih jetrenih enzima koji sudjeluju u njihovoj sintezi (37). Nadalje, omega-3 povećavaju klirens lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL; *very low density lipoprotein*) u perifernoj cirkulaciji te tako sprječavaju njegovo zadržavanje u subendotelnom prostoru (35, 37). Već je istraživanjem iz 1993. godine dokazano da omega-3 masne kiseline iz ribljeg ulja u manjoj mjeri snižavaju sistolički i dijastolički tlak (38). Unatoč tome, znanstvenici Agencije za zdravstveno istraživanje i kvalitetu (AHRQ; engl. *Agency for Healthcare Research and Quality*) utvrdili su da prekomjeren unos omega-3 nema utjecaj na promjenu sistoličkog i dijastoličkog tlaka te iz tog razloga ne smanjuje rizik za pojavu hemoragičnog moždanog udara, fibrilacije atrijske ili srčanog udara (39). Kako bi omogućili što učinkovitije djelovanje omega-3 masnih kiselina, stručnjaci američke Administracije za hranu i lijekove (FDA; engl. *Food and Drug Administration*) procjenjuju da ukupan dnevni unos EPA i DHA ne bi smio prelaziti 2 grama (40).

2. HIPOTEZA

Pretpostavlja se kako su brojni povoljni učinci n-3 PUFA-e vezani uz oksidativni stres i posljedičnu modulaciju gena antioksidativnih enzima kod mladih zdravih ispitanika koji su konzumirali kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog istraživanja utvrditi promjenu / razliku genskog izražaja antioksidativnih enzima – SOD, GPx1, CAT i MPO iz mononuklearnih stanica periferne krvi kod mladih zdravih ispitanika koji su konzumirali obična kokošja jaja i onih koji su konzumirali kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Studija je bila dvostruko slijepa, randomizirana, kontrolirana klinička studija. Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine - kontrolna skupina (konzumiraju uobičajena kokošja jaja) i eksperimentalna skupina (konzumiraju n-3 PUFA obogaćena jaja). Istraživanje je provedeno nasumično tako da ni ispitanici ni istraživač nisu znali kojoj skupini prehrane pripada koji ispitanik. Protokol je trajao tri tjedna tijekom kojih su ispitanici konzumirali 3 kokošja jaja dnevno. Jaja obje skupine (uobičajena jaja i n-3 PUFA obogaćena jaja) bila su proizvedena na peradarskoj farmi Marijančanka d.o.o. Marijanci te su bila iste veličine (M komercijalna veličina) kako se ne bi uočila razlika. Količina n-3 PUFA masnih kiselina u obje skupine jaja prikazana je u Tablici 2 gdje su dobivene vrijednosti prikazane kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD) (41). Kontrolna skupina ispitanika konzumirala je 3 obična kokošja jaja / dnevno. S obzirom na to da težina jaja iznosi 70 - 80 g, količina n-3 PUFA masnih kiselina u običnom jajetu iznosi otprilike 83 mg, a time zaključujemo da su ispitanici kontrolne skupine konzumirali otprilike 249 mg n-3 PUFA / dnevno (41). Eksperimentalna skupina konzumirala je po 3 n-3 PUFA obogaćena jaja / dnevno. S obzirom na to da težina jaja iznosi 70 - 80 g, količina n-3 PUFA masnih kiselina u jajetu koje je prethodno obogaćeno s n-3 PUFA masnim kiselinama iznosi otprilike 351 mg, a time zaključujemo da su ispitanici eksperimentalne skupine konzumirali otprilike 1053 mg n-3 PUFA/dnevno (41). Uzorkovanje venske krvi u svrhu dobivanja seruma, plazme i pune krvi izvodilo se prvog i posljednjeg dana trodnevnog protokola. Studiju su financirali Europski strukturni i investicijski fondovi bespovratnim sredstvima projekta Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Znanstvene jedinice za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane, #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: 602-04/14-08/06, broj: 2158-610714-114).

4.2. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 40 zdravih mladih sedentarnih ispitanika, oba spola, 19 - 28 godina starosti (studenti Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku). Ispitanici koji se posljednjih 12 mjeseci nisu bavili redovitim tjelesnim aktivnostima smatraju se sedentarnima. Isključni faktori za ispitanike bili su: povijest bolovanja od hipertenzije, koronarne arterijske bolesti srca, dijabetesa, hiperlipidemije, bolesti bubrega i perifernih krvnih žila. Svi ispitanici na uvid su

dobili obrazloženje studije, detaljne upute i informirani pristanak na potpis ako odluče biti dio istraživanja.

Tablica 2. Profil masnih kiselina jestivih dijelova jaja

Masne kiseline	Jaja	
	(mg/100 g jaje)	
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina
Σ SFA	2082,6 (83,1)	2162,1 (52,6)
Σ MUFA	2669,6 (84,8)	2917,5 (137,9)
Σ n-6 PUFA	1417,7 (119,3)	1182,6 (111,9)
LA	1274,4 (127)	1106,6 (108,6)
AA	125,4 (6,1)	67,1 (3,6)
Σ n-3 PUFA	138,2 (28,4)	585,2 (77,1)
ALA	59,9 (16,1)	384,2 (64,0)
EPA	N/P	25,2 (3,2)
DHA	78,3 (13,8)	175,8 (25,9)
Σ n-6 PUFA/n-3 PUFA	10,3	2,02
Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). Σ SFA - zasićene masne kiseline, Σ MUFA - monozasićene masne kiseline, Σ n-6 PUFA - n-6 polinezasićene masne kiseline, LA - linolenska kiselina, AA - arahidonska kiselina, Σ n-3 PUFA - n-3 polinezasićene masne kiseline, ALA - alfa-linolenska kiselina, EPA - eikozapentaenska kiselina, DHA - dokozaheksaenska kiselina, Σ n-6 PUFA/ n-3 PUFA - n-6 polinezasićene masne kiseline/ n-3 polinezasićene masne kiseline, N/P – nije pronađeno		

4.3. Metode

4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC)

Krv ispitanika uzorkovali smo iz kubitalne vene koristeći vakutajnere s EDTA antikoagulansom. Nakon uzorkovanja venske krvi uslijedila je izolacija mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC; engl. *peripheral blood mononuclear cells*) pomoću gradijenta gustoće. U Falcon epruvetu od 50 mL otpipetirali smo 15 mL Ficoll-Paque otopine, a potom u istu epruvetu naslojavali uzorak krvi koji smo prethodno razrijedili fiziološkom otopinom koja je puferirana fosfatom (PBS; engl. *phosphate-buffered saline*) u omjeru 1:1 dobro pazeći da se otopine ne pomiješaju. Zatim smo navedeni uzorak centrifugirali na +4 °C 25 minuta, na 800 RCF (engl. *relative centrifugal force*). Nakon centrifugiranja je, između dva sloja otopine, nastao „bijeli oblačić“. U njemu su se nalazile mononuklearne stanice koje smo prebacili u novu Falcon epruvetu od 15 mL tako da smo prvo odlili gornji sloj plazme, a zatim vrhom tipse pažljivo sakupili PBMC-eve. U navedenu epruvetu s PBMC-evima dodali smo PBS do vrha i

centrifugirali 10 minuta, na 800 RCF. Odbacili smo supernatant, a ostatak resuspendirali pomoću 3 mL PBS-a. Ponovno smo dodali PBS do vrha i centrifugirali 10 minuta, na 800 RCF. U posljednjem koraku odbacili smo supernatant i dodali PBS do 5 mL. PBMC-evi su nakon izolacije bili pohranjeni na -80 °C do početka izvođenja pokusa.

4.3.2. Izolacija humane RNA iz mononuklearnih stanica periferne krvi

Izolaciju humane RNA iz mononuklearnih stanica izvodili smo iz prethodno smrznutih uzoraka tako što smo ih prethodno otopili na sobnoj temperaturi, resuspendirali ih i prebacili u PVC mikrotube za lančanu reakciju polimeraze (PCR; engl. *polymerase chain reaction*) te im dodali kompletirani RPMI medij. Uslijedilo je centrifugiranje, nakon čega smo uzorke dva puta ispirali otopinom PBS-a. Za samu izolaciju koristili smo TRIzol otopinu koju smo dobro vorteksirali, zatim dodali kloroform te ponovno vorteksirali uzorak dok nismo dobili žarko ružičasto obojenje. Nakon dobivenog ružičastog obojenja uzorak smo stavili centrifugirati na 12000 RCF, 15 minuta. Dobili smo tri frakcije u tubici: RNA, proteini i DNA. Odvojili smo supernatant u kojem se nalazila RNA, a potom dodali izopropanol kako bismo precipitirali RNA. Nakon centrifugiranja istog, dodali smo 75 % etanol i ponovo centrifugirali na 7500 RCF, 5 minuta. Ovaj smo postupak ponovili još jednom kako bismo pročistili dobivenu RNA. Nakon pročišćavanja uzorka dodali smo 40 µL NFW otopine, očitali koncentraciju pomoću spektrofotometra te spremili na -20 °C do izvođenja PCR-a.

4.3.3. PCR u stvarnom vremenu

Prethodno je navedeno kako je za analizu genskog izražaja antioksidativnih enzima u ovom istraživanju korišten je PCR u stvarnom vremenu (RT-PCR; engl. *real time polymerase chain reaction*). Analiza je provedena pomoću uređaja *BioRad CFX96* (Slika 4. PCR uređaj - BioRad CFX96). PCR je metoda koju je 90-ih godina prošlog stoljeća uveo Karry Mullis, a izazvala je veliku revoluciju na području molekularne biologije, genetike i sudske medicine (42). Za analizu je potrebna vrlo mala količina DNA, tek jedna dobro očuvana molekula iz koje se već nakon nekoliko sati, amplifikacijom, dobije veliki broj istovjetnih kopija (42). Pomoću RT-PCR-a moguće je kvantificirati gensku ekspresiju na način da se prati jačina fluorescencije koja je proporcionalna količini nukleinske kiseline. Zbog visoke osjetljivosti molekule RNA i njezine moguće razgradnje, potrebna je sinteza stabilnije molekule, komplementarne DNA (cDNA; engl. *complementary DNA*). Prepisivanje RNA u DNA omogućuje enzim reverzna transkriptaza.

Nakon sinteze cDNA slijedi RT-PCR reakcija koja se, kao i klasična PCR reakcija, odvija u tri osnovna koraka. Započinje denaturacijom DNA molekule koja se odvija na visokoj temperaturi do 95 °C. Potom slijedi hibridizacija, tj. sljepljivanje DNA početnica i jednolančanih molekula DNA, a za koju je potrebno sniziti temperaturu reakcijske smjese na otprilike 50 - 65 °C. Početnice koje se koriste mogu biti fluorescentno obilježene pa se u tom slučaju porast fluorescencije prati kada početnica hibridizira s jednolančanom molekulom DNA. Drugi je način korištenje fluorescentnog spoja SYBR Green koji se može vezati isključivo na dvolančane molekule DNA što se kod amplifikacije i stvaranja novih molekula DNA primjećuje kao porast fluorescencije. Posljednji je korak produljivanje lanaca što je omogućeno djelovanjem Taq polimeraze u prisutnosti DNA početnica i deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dCTP i dGTP) te se odvija na 72 °C. Postoji još i TaqMan metoda RT-PCR-a kod koje se koriste specifične probe, obilježene na 5' i 3' kraju. Na 5' kraju nalazi se takozvana „reporter“ boja koja emitira fluorescentnu svjetlost kada se ne nalazi u neposrednoj blizini prigušivača boje ili „quencher“a. Prigušivač se nalazi na 3' kraju probe, u neposrednoj blizini „reporter“ boje te stoga ne dolazi do fluorescencije. Probe se vežu u blizini početnica na jednolančanoj DNA, ali se s njima ne preklapaju. DNA polimeraza sintetizira novi lanac, a ujedno i uklanja TaqMan probu zbog čega se „reporter“ boja udaljava od prigušivača te dolazi do porasta fluorescencije, čime se prati količina PCR produkta. RT-PCR metoda je brza i efikasna, a jedini problem predstavljaju skupa oprema i reagensi.



Slika 4. Uređaj lančane reakcije polimeraze - BioRad CFX96 (Izvor: vlastita izrada autorice)

4.4. Statistička analiza

Metoda delta-delta Ct, poznata i kao metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$, jednostavna je formula koja se koristi za izračunavanje relativnog genskog izražaja u uzorcima kod izvođenja lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR; engl. *quantitative polymerase chain reaction*). Prikladan je način za izračunavanje relativne razine genskog izražaja između različitih uzoraka tako što za izračun izravno koristi granične cikluse (Ct; engl. *cycle threshold*) generirane sustavom qPCR (43). Pod pojmom graničan ciklus podrazumijevamo broj ciklusa PCR reakcije u kojem vrijednost fluorescencije svakog uzorka doseže prag fluorescencije. Prag fluorescencije je najniža vrijednost fluorescentnog signala koja značajno nadmašuje pozadinsku fluorescenciju, nastalu u ranijim PCR ciklusima (43). Iz tog se razloga ova metoda primjenjuje za analizu podataka kod kojih je potrebno prvo ukloniti pozadinsku fluorescenciju, kao što je to slučaj u ovom istraživanju (43). Prvo je potrebno normalizirati Ct vrijednosti ciljnog gena u odnosu na referentni gen i taj postupak primijeniti za svaki nepoznati uzorak i uzorak kalibratora prema formulama:

$$\Delta Ct (\text{uzorak}) = Ct (\text{ciljni gen}) - Ct (\text{referentni gen})$$

$$\Delta Ct (\text{kalibrator}) = Ct (\text{ciljni gen}) - Ct (\text{referentni gen})$$

Zatim se izračunava $\Delta\Delta Ct$ tako da se od ΔCt uzorka oduzme ΔCt kalibratora:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{uzorak}) - \Delta Ct (\text{kalibrator})$$

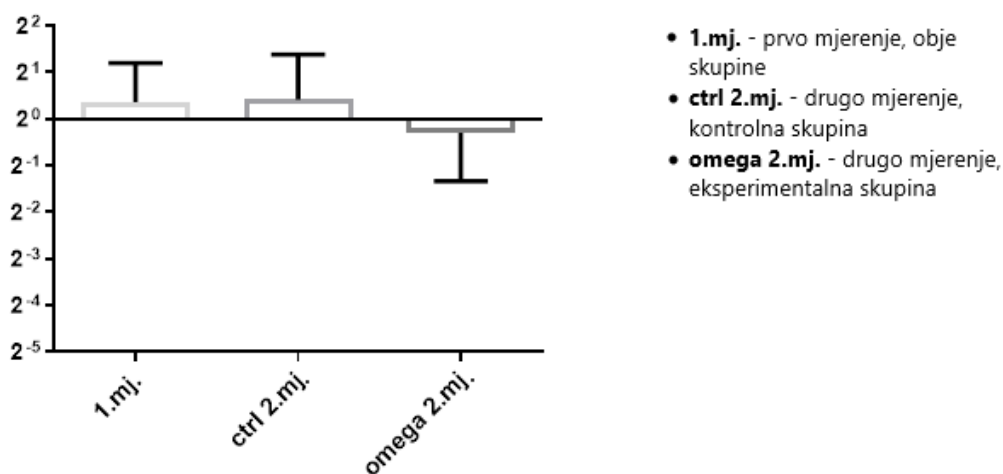
Razina genskog izražaja u uzorku računa se pomoću prethodno dobivenog rezultata ($\Delta\Delta Ct$) prema formuli: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (43).

Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli nezavisnih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA; engl. *Analysis of Variance*) a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele, Kruskal-Wallisovim testom. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Za statističku analizu upotrijebili smo GraphPad Prism v8.0.2.

5. REZULTATI

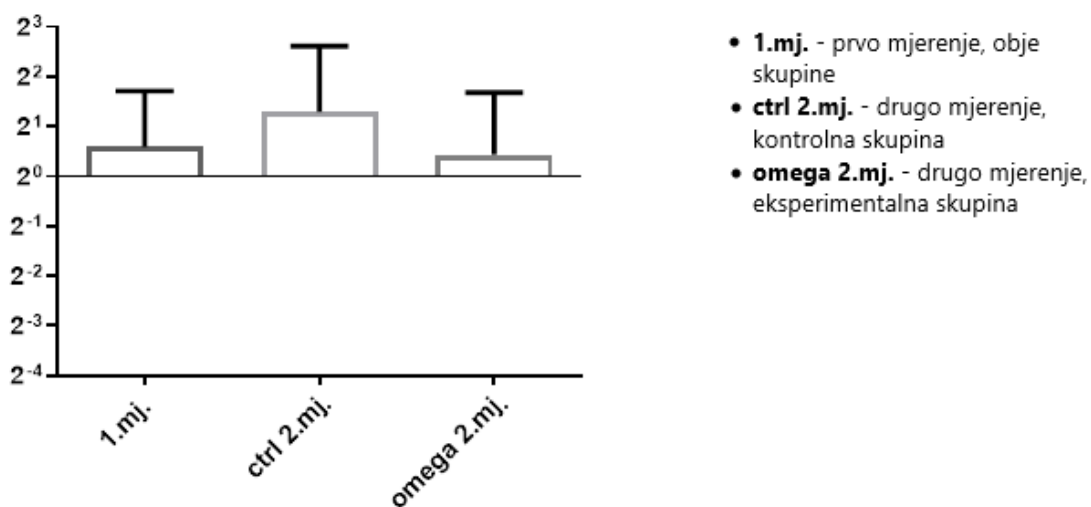
5.1. Promjena genskog izražaja antioksidativnih enzima iz mononuklearnih stanica periferne krvi mladih zdravih ispitanika

Iz mononuklearnih stanica periferne krvi mladih zdravih ispitanika izolirana je ukupna RNA. Izolacija je provedena kod obje skupine ispitanika (kontrolna skupina i skupina koja je konzumirala omega-3 obogaćena jaja) na početku eksperimenta i nakon tri tjedna konzumacije jaja. Nakon izolacije pomoću RT-PCR-a utvrđen je genski izražaj antioksidativnih enzima – katalaze (CAT) (Slika 5.), mijeloperoksidaze (MPO) (Slika 6.), superoksid dismutaze 1 (SOD1) (Slika 7.) i glutation peroksidaze 1 (GPx1) (Slika 8.). S obzirom na to da je prvo mjerenje isto kod obje skupine ispitanika jer je odrađeno prije početka protokola, nema značajnih razlika u rezultatima te je prikazano kao zajedničko mjerenje. Prikazane vrijednosti dobivene su $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodom, a $p < 0,05$ je razina statističke značajnosti.



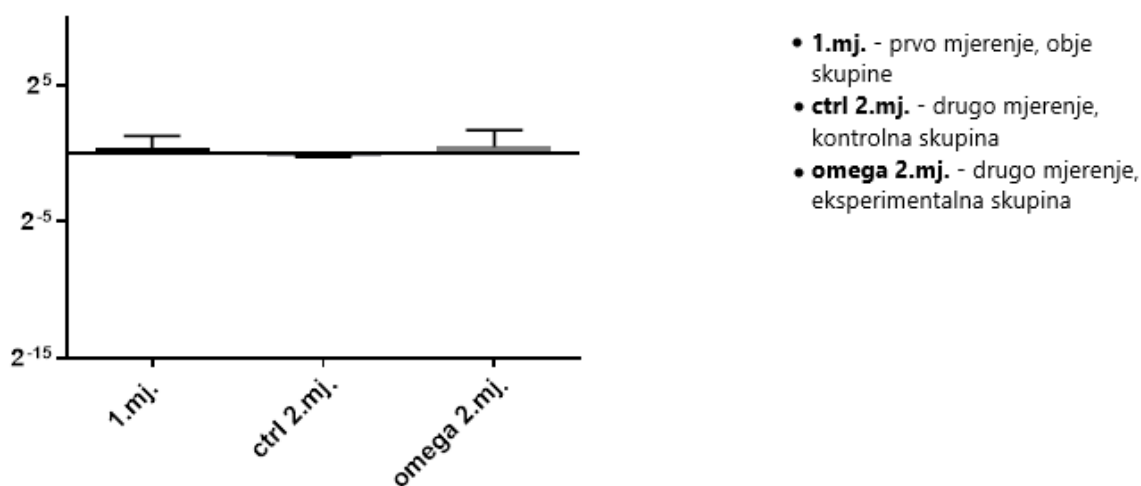
Slika 5. Relativni izražaj katalaze u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Genski izražaj antioksidativnog enzima, katalaze (CAT), nije se značajno razlikovao u omega-3 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (konzumiraju obična kokošja jaja) nakon trojtjednog dijetetskog protokola u kojem su ispitanici omega-3 skupine konzumirali n-3 PUFA obogaćena jaja. Statističkom metodom ANOVA nije utvrđena statistički značajna razlika genskog izražaja enzima CAT između eksperimentalnih skupina ($p = 0,231$).



Slika 6. Relativni izražaj mijeloperoksidaze u mononuklearnim stanicama periferne krvi

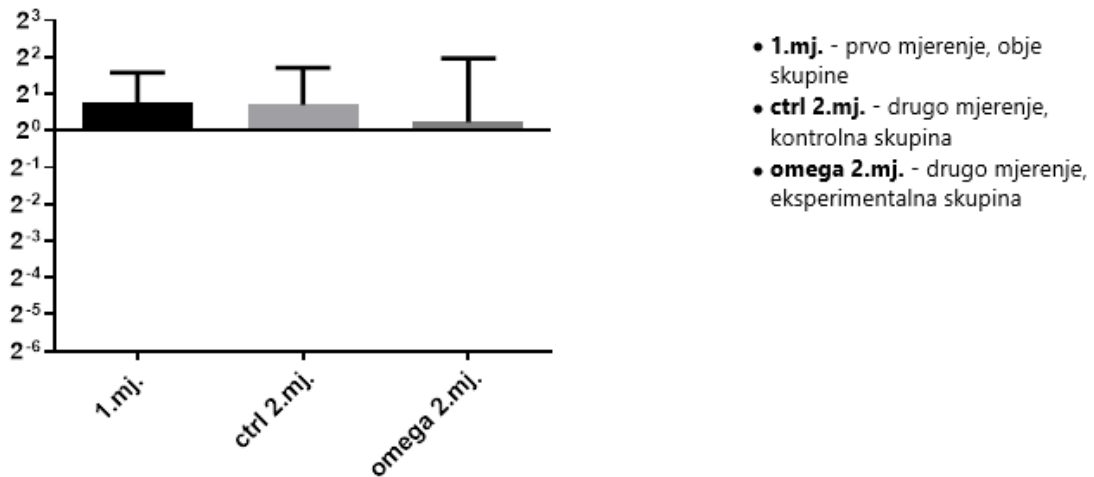
Genski izražaj antioksidativnog enzima, mijeloperoksidaze (MPO), nije se značajno razlikovao u omega-3 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (konzumiraju obična kokošja jaja) nakon trojednog dijetetskog protokola u kojem su ispitanici omega-3 skupine konzumirali n-3 PUFA obogaćena jaja. Statističkom metodom ANOVA nije utvrđena statistički značajna razlika genskog izražaja enzima MPO između eksperimentalnih skupina ($p = 0,951$).



Slika 7. Relativni izražaj superoksid dismutaze 1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Genski izražaj antioksidativnog enzima, superoksid dismutaze 1 (SOD1), nije se značajno razlikovao u omega-3 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (konzumiraju obična kokošja jaja)

nakon trojtjednog dijetetskog protokola u kojem su ispitanici omega-3 skupine konzumirali n-3 PUFA obogaćena jaja. Statističkom metodom ANOVA nije utvrđena statistički značajna razlika genskog izražaja enzima SOD1 između eksperimentalnih skupina ($p = 0,839$).



Slika 8. Relativni izražaj glutathion peroksidaze 1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Genski izražaj antioksidativnog enzima, katalaze (CAT), nije se značajno razlikovao u omega-3 skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (konzumiraju obična kokošja jaja) nakon trojtjednog dijetetskog protokola u kojem su ispitanici omega-3 skupine konzumirali n-3 PUFA obogaćena jaja. Statističkom metodom ANOVA nije utvrđena statistički značajna razlika genskog izražaja enzima CAT između eksperimentalnih skupina ($p = 0,451$).

6. RASPRAVA

Za normalno funkcioniranje organizma neophodan je kisik. S druge strane, njegova visoka reaktivnost predstavlja potencijalnu opasnost, osobito ako je funkcija oksidacijsko-redukcijskih mehanizama prethodno narušena. Istraživanja su pokazala da brojni štetni čimbenici, poput UV zračenja, radijacije, konzumacije duhanskih proizvoda i slično, mogu dovesti do povećanog stvaranja slobodnih radikala od kojih su najzastupljeniji reaktivni kisikovi spojevi, ROS (2). Njihova povećana aktivnost može dovesti do oksidativnog stresa, oštećenja molekula i tkiva u organizmu, a posljedično i do razvoja bolesti poput dijabetesa, ateroskleroze, raznih upalnih procesa, srčanih bolesti, nekih neurodegenerativnih bolesti ili pridonijeti razvoju tumora organa (3). Kao odgovor na pojavu oksidativnog stresa aktiviraju se brojni antioksidativni mehanizmi. Njihova je uloga sprječavanje štetnog djelovanja slobodnih radikala na zdrave stanice tako da doniraju ili prihvaćaju elektrone i time stabiliziraju slobodne radikale. Postoje 3 mehanizma redukcije slobodnih radikala. Jedan od njih je inhibiranje nastanka slobodnih radikala pomoću preventivnih antioksidansa ili „hvatača radikala“, zatim mehanizam uklanjanja postojećih slobodnih radikala te popravak oštećenih molekula reparativnim enzimima (5). U preventivne antioksidanse ubrajamo koenzim Q, glutation i lipoičnu kiselinu koji u organizmu nastaju kao produkt metaboličkih reakcija, zatim vitamine, β -karoten, flavonoide, selen i lignan koji se u organizam unose prehranom (6). Oni pripadaju skupini neenzimskih antioksidansa. Neki od enzimskih antioksidansa su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza 1, katalaza i mijeloperoksidaza čija je promjena genskog izražaja promatrana u ovom istraživanju. Postoje pretpostavke o brojnim povoljnim učincima omega-3 polinezasićenih masnih kiselina na organizam. Primjerice, uz omega-6 masne kiseline formiraju posrednike upalnih reakcija, eikosanoide (22). Imaju strukturnu ulogu, dio su staničnih membrana u mozgu i mrežnici pa se pretpostavlja da su važne za fetalan rast i razvoj (25, 26). Najveću pažnju privukla su istraživanja provedena 70-ih godina 20. stoljeća koja su pokazala da povećani unos omega-3 masnih kiselina smanjuje pojavu oksidativnog stresa, a samim time pojavu i razvoj kardiovaskularnih bolesti (21). Povoljno djeluju na kardiovaskularni sustav redukcijom ROS-a i stimulacijom endotelne sinteze protuupalnog spoja, NO, kojeg ROS razgrađuje (36). Također, umanjuju upalnu reakciju krvnih žila tako što snižavaju razinu adhezijskih molekula, IL-6 i CRP-a. Umanjuju rizik od pojave aterosklerotskih plakova i nakupljanja triglicerida u krvi inhibiranjem dvaju jetrenih enzima koji sudjeluju u njihovoj sintezi (37). Osim omega-3 masnih kiselina, u prevenciji nastanka oksidativnog stresa i daljnjeg razvoja bolesti sudjeluju i antioksidativni enzimi. Superoksid dismutaze (SOD) inhibira stvaranje štetnog spoja, peroksnitrita, koji nastaje

deaktivacijom dušikovog monoksida u reakciji s O_2^- (8). Kako bi spriječili nastanak štetnog spoja, SOD enzimi kataliziraju reakciju dismutacije O_2^- na O_2 i H_2O_2 (8). Nakupljanje vodikovog peroksida u navedenoj reakciji dismutacije sprječava skupina enzima – glutation peroksidaze (GPx). S obzirom na to da štetno djelovanje peroksinitrita može dovesti do endotelne i mitohondrijske disfunkcije, pa tako i do kardiovaskularnih bolesti, SOD ima važnu ulogu u njihovoj prevenciji. Još jedan enzim koji sudjeluje u sprječavanju nakupljanja vodikovog peroksida je katalaza (CAT). Kao jedan od najučinkovitijih enzima u stanici može razgraditi do milijun molekula H_2O_2 u sekundi (12). Aktivnost katalaze očituje se u eritrocitima, hepatocitima te nešto manje u bubregu. Mijeloperoksidaza (MPO) je enzim koji se iz polimorfonuklearnih neutrofila i makrofaga otpušta u krvotok u stanjima upale (14). Osim što je pokazatelj upale u organizmu, reducira nakupljanje H_2O_2 katalizirajući pretvorbu Cl^- i H_2O_2 u hipoklorastu kiselinu (HOCl) koja djeluje baktericidno (14). Prethodno opisani mehanizmi korisni su u borbi protiv oksidativnog stresa, oštećenja stanica i tkiva te razvoja bolesti. Na sličnom principu djeluju i omega-3 masne kiseline zbog čega se u pitanje dovodi postojanje korelacije između povećanog unosa omega-3 masnih kiselina prehranom i promjene genskog izražaja antioksidativnih enzima. U ovom su istraživanju primijećene promjene genskog izražaja antioksidativnih enzima. Skupina ispitanika koja je konzumirala n-3 PUFA obogaćena jaja imala je blagi porast genske ekspresije svih četiriju testiranih antioksidativnih enzima nakon provedbe istraživanja. S druge strane, usporedbom rezultata kontrolne skupine i skupine koja je konzumirala n-3 PUFA obogaćena jaja nakon provedbe istraživanja, uočen je blago povećan genski izražaj antioksidativnih enzima MPO i SOD1 u kontrolnoj skupini ispitanika. Ipak, detaljnijom usporedbom rezultata nisu utvrđene značajne razlike genskog izražaja antioksidativnih enzima kod mladih zdravih ispitanika. S obzirom na to da se radi o nestimuliranim stanicama, postoji vjerojatnost da se povoljan učinak omega-3 masnih kiselina nije mogao pravilno očitovati, točnije, da je stanice potrebno prethodno izložiti stresoru koji bi izazvao oksidativni odgovor u organizmu i potaknuo djelovanje omega-3 masnih kiselina.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata dobiveni su sljedeći zaključci:

- Genski izražaj antioksidativnih enzima – CAT, SOD1, GPx1 i MPO oscilira neovisno o konzumaciji n-3 PUFA obogaćenih jaja te ne postoji statistički značajna razlika genskog izražaja ovih enzima između ispitivanih skupina nakon konzumacije običnih kokošnjih jaja i n-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja
- Nije utvrđeno da konzumacija n-3 PUFA obogaćenih jaja ima utjecaj na promjenu genskog izražaja antioksidativnih enzima kod mladih zdravih ispitanika koji nisu izloženi stresoru.

8. SAŽETAK

Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA) na izražaj gena antioksidativnih enzima u mononuklearnim stanicama krvi mladih zdravih ispitanika

UVOD: Oksidativni stres u podlozi je mehanizama poremećene vaskularne reaktivnosti koja je povezana s razvojem kardiovaskularnih bolesti. U prijašnjim istraživanjima (Appl Physiol Nutr Metab. 2018) prikazano je da postoji promjena razine oksidativnog stresa nakon konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja kod mladih zdravih ispitanika.

CILJ ISTRAŽIVANJA: Utvrditi izražaj gena za SOD1 - superoksid dismutazu, GPX1 - glutation peroksidazu, CAT - katalazu i MPO - mijeloperoksidazu u izoliranim mononuklearnim stanicama periferne (PBMC) krvi kod mladih zdravih ispitanika koji su konzumirali n-3 PUFA obogaćena jaja ili obična, kontrolna jaja prije i nakon dijetetskog protokola.

NACRT STUDIJE: dvostruko slijepa, randomizirana

MATERIJALI I METODE: Mononuklearne stanice periferne krvi izolirane su pomoću gradijenta gustoće. Iz njih je izolirana RNA pomoću TRIzol otopine te je određen genski izražaj antioksidativnih enzima pomoću PCR-a u realnom vremenu na uređaju Bio Rad CFX96. U istraživanju su sudjelovali mladi sedentarni ispitanici, oba spola. Za grupne usporedbe korišten je t-test, dok su se usporedbe unutar skupine provodile korištenjem uparenog t-testa ili Wilcoxon testa, statistička značajnost postavljena je kao $p < 0,05$.

REZULTATI: Preliminarni rezultati genskog izražaja antioksidativnih enzima SOD1, CAT, GPx1 te MPO prije i poslije konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja ne pokazuju značajne statističke razlike.

ZAKLJUČAK: Nije moguće pravilno očitovati povoljan učinak omega-3 masnih kiselina na genski izražaj antioksidativnih enzima jer stanice prethodno nisu bile izložene stresoru.

Ključne riječi: antioksidativni enzimi, izražaj gena, n-3 PUFA, vaskularna reaktivnost

9. SUMMARY

The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) chicken eggs consumption on antioxidative enzymes gene expression in mononuclear blood cells in young healthy individuals

INTRODUCTION: Oxidative stress underlies the mechanisms of impaired vascular reactivity associated with the development of the cardiovascular disease. Previous research (Appl Physiol Nutr Metab. 2018) has shown that there is a change in oxidative stress levels after consumption of n-3 PUFA enriched eggs in young healthy subjects.

OBJECTIVES: The aim of this study was to determine the expression of genes for SOD1 - superoxide dismutase, GPX1 - glutathione peroxidase, CAT - catalase, and MPO - myeloperoxidase in isolated peripheral (PBMC) blood mononuclear cells in young healthy subjects who were controlled or consumed by PFA. eggs before and after the dietary protocol.

STUDY DESIGN: Double-blind, randomized

MATERIALS AND METHODS: Peripheral blood mononuclear cells were isolated using a density gradient. RNA was isolated from them using a TRIzol solution and the genetic expression of antioxidant enzymes was determined by real-time PCR on a Bio Rad CFX96 device. Young sedentary respondents, both sexes, participated in the study. For group comparisons, a t-test was used, while intra-group comparisons were performed using paired t-test or Wilcoxon test, statistical significance was set as $p < 0.05$.

RESULTS: Preliminary results of gene expression of antioxidant enzymes SOD1, CAT, GPx1, and MPO before and after consumption of n-3 PUFA enriched eggs do not show significant statistical differences.

CONCLUSION: It is not possible to correctly demonstrate the beneficial effect of omega-3 fatty acids on the genetic expression of antioxidant enzymes because the cells have not been previously exposed to the stressor.

Keywords: antioxidant enzymes, gene expression, n-3 PUFA, vascular reactivity

10. LITERATURA

1. Merriam-Webster Medical Dictionary. Medical Definition of oxidative stress. Dostupno na adresi:<https://www.merriam-webster.com/medical/oxidative%20stress>. Datum pristupa: 21.03.2020.
2. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
3. 2005-2020 Healthline Media a Red Ventures Company - Megan Dix, RN, BSN. Everything You Should Know About Oxidative Stress. Dostupno na adresi: <https://www.healthline.com/health/oxidative-stress>. Datum pristupa: 26.03.2020.
4. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2009;8(7):579-591.
5. 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.
6. Kedar N, Prasad Che K. Protiv raka vitaminima i dodacima prehrani. Zagreb: CID-NOVA; 2004.
7. Rimoin D, Pyeritz R, Korf B. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 6. izd. Los Angeles. Academic Press; 2013.
8. Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2009;65(Suppl 1):S3–S9.
9. Peled-Kamar M, Lotem J, Okon E, Scchs L, Groner Y. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome. *EMBO J* 1995;14:4985-93.
10. Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of Chemical Research.* 2010;43(11):1408–19.
11. Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Molecular Cell Biology,* 2002;22:3565-3576.
12. Chelikani P, Fita I and Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004;61:192-208.

13. Kirkman HN and Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984;81(14):4343–4347
14. Biasucci LM, D'Onofrio G, Liuzzo G i sur. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;27(3):611–616.
15. Biswas SK, Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1–2):60–76.
16. Cipola MJ. *The Cerebral Circulation*. 2. izd. San Rafael: US Morgan and Claypool; 2016.
17. 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.
18. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids* external link disclaimer. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
19. Traber MG. Vitamin E. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins R, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins. 2006;396-411.
20. Touvier M, Kesse E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC. Dual association of β -carotene with risk of tobacco-related cancers in a cohort of French women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(18):1338-1344.
21. Harris WS. Omega-3 fatty acids. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, et al., eds. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd ed. London and New York: Informa Healthcare; 2010:577-86.
22. Jones PJH, Rideout T. Lipids, sterols, and their metabolites. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
23. Jones PJH, Papamandjaris AA. Lipids: cellular metabolism. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell; 2012:132-48.
24. Lichtenstein AH, Jones PJH. Lipids: absorption and transport. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell; 2012:118-31.

25. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). Washington, DC: National Academy Press; 2005.
26. SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:87-138.
27. Brasky TM, Till C, White E, Neuhaus ML, Song X, Goodman P, et al. Serum phospholipid fatty acids and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol* 2011;173:1429-39.
28. Brasky TM, Darke AK, Song X, Tangen CM, Goodman PJ, Thompson IM, et al. Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1132-41.
29. Harris WS, Sands SA, Windsor SL, Ali HA, Stevens TL, Magalski A, et al. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation* 2004;110:1645-9.
30. Harris WS, Von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 2004;39:212-20.
31. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. What we eat in America, 2011-2012. 2015.
32. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006;84:5-17
33. Weylandt KH, Serini S, Chen YQ, Su HM, Lim K, Cittadini A, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: the way forward in times of mixed evidence. *Biomed Res Int* 2015;2015:143109.
34. Kralj V, Sekulić K, Šekerija M. Kardiovaskularne bolesti u Hrvatskoj. Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2013.
35. Zrinski Topić R. Metabolizam lipida i ateroskleroze. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2018:83-86.
36. 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

- polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. *J Nutr Biochem*. 2013;24:371–379.
37. 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.
38. Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 1993;88:523-33.
39. Balk EM, Adam GP, Langberg V, Halladay C, Chung M, Lin L, Robertson S, Yip A, Steele D, Smith BT, Lau J, Lichtenstein AH, Trikalinos TA. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: An Updated Systematic Review. Evidence Report/Technology Assessment No. 223. (Prepared by the Brown Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-2012-00012-I.) AHRQ Publication No. 16-E002-EF. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality; August 2016.
40. Rovina K, Siddiquee S, Shaarani SM. Highly sensitive electrochemical determination of sunset yellow in commercial food products based on CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE. *Food control*. 2017;82:66-73.
41. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z, i sur. Anti-Inflammatory 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.
42. Primorac D, Marjanović D, Škaro V, Projić P, Džijan S. Forenzička analiza DNA. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M i sur. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada. 2018;732-753.
43. Livak KJ, Schmittgen TD. *Methods*. Vol. 25. San Diego, CA. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. 2001;402-408.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Iva Šafar

Datum i mjesto rođenja: 06. 09. 1998., Koprivnica

Adresa: Gorička 14, 48000 Koprivnica

Tel/Mob: +385 98 629 969

Mail: ivasafar98@gmail.com

OBRAZOVANJE

2005. – 2013. Osnovna škola „Braća Radić“

2013. – 2017. Gimnazija „Fran Galović“ Koprivnica

2017. – 2020. Preddiplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera

OSOBNNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik: hrvatski jezik

Strani jezici: engleski jezik, njemački jezik (osnove)

Vozačka dozvola: B kategorija

Poznavanje računalnih/informatičkih programa: Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint)