

# Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima na endotelnu funkciju i razinu oksidativnog stresa kod zdravih mladih ispitanika - Randomizirani kontrolirani pokus

---

Šušnjara, Petar

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:152:401653>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Petar Šušnjara

Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima na endotelnu funkciju i razinu oksidativnog stresa kod zdravih mladih ispitanika – Randomizirani kontrolirani pokus

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Petar Šušnjara

Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima na endotelnu funkciju i razinu  
oksidativnog stresa kod zdravih mladih ispitanika – Randomizirani kontrolirani pokus

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

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

Komentor rada: doc. dr. sc. Zrinka Mihaljević, prof.

Rad ima 101 stranica

Ova doktorska disertacija je financirana od strane Europskih strukturnih i investicijskih fondova kroz Znanstveni centar izvrsnosti i personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane, # KK.01.1. 1.01.0010.

Istraživanje je provedeno na Zavodu za fiziologiju i imunologiju (Laboratorij za molekularnu i kliničku imunologiju i Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju) Medicinskog fakulteta u Osijeku, Hrvatska.



Operativni program  
**KONKURENTNOST  
I KOHEZIJA**



**EUROPSKI STRUKTURNI  
I INVESTICIJSKI FONDOVI**



Europska unija  
Zajedno do fondova EU

**KK.01.1.1.01.0010**  
**Znanstveni centar izvrsnosti za  
personaliziranu brigu o zdravlju**

**Izradu doktorske disertacije sufinancirala je Europska  
unija iz Europskog fonda za regionalni razvoj**

Zahvala:

*Izrada ove disertacije ne bi bila moguća bez pružene prilike i ukazanog povjerenja od strane predsjednice Zavoda za fiziologiju i imunologiju te voditeljice projekta u okviru kojeg je studija rađena, prof. dr.sc. Ines Drenjančević, ujedno i mentorice rada. Zbog toga sam joj neizmjereno zahvalan i od srca zahvaljujem na strpljenu, usmjeravanju, perfekcionizmu i pomoći da istraživanje privedemo kraju.*

*Isto tako zahvaljujem i svojoj ko-mentorici doc. dr. sc. Zrinki Mihaljević za svu pomoć i dostupnost u bilo koje doba dana kada mi je god ona trebala.*

*Nadalje, znanje i vještine koje sam stekao u posljednjih nekoliko godina moram pripisati svojim kolegama s Katedre. Bilo da se radi o funkcionalnim metodama ili laboratorijskim metodama, pisanju radova, statistici, znajte da ste obogatili moj život na ovaj ili onaj način i hvala vam zbog toga.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su moj oslonac i koji vjeruju u mene.*

*Posebno zahvaljujem mojim roditeljima, sestrama i bratu na bezuvjetnoj i vjećoj podršci. Bez obzira na odluke koje sam donosio, dobre i loše, uvijek sam znao da stojite iza mene i da ste tu kada god vas trebam.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Funkcionalna hrana.....	1
1.2.1. Polinezasićene masne kiseline.....	2
1.2.2. Vitamin E.....	5
1.2.3. Selen .....	7
1.2.4. Lutein.....	9
1.3. Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija .....	10
1.4. Imunološki odgovor.....	13
1.5. Prehrambene navike .....	14
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>17</b>
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>18</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE .....</b>	<b>19</b>
4.1. Ustroj studije i ispitanici.....	19
4.2. Antropometrijski, hemodinamski i biokemijski parametri.....	21
4.3. Tjelesni sastav i sastav tjelesnih tekućina.....	22
4.4. Mjerenja serumskog profila masnih kiselina.....	22
4.5. Mjerenje koncentracije vitamina E u serumu .....	22
4.6. Mjerenje koncentracije selena u serumu .....	23
4.6. Mjerenje koncentracije luteina u serumu.....	23
4.7. Procjena mikrovaskularne vazodilatacije ovisne o endotelu i endotel - neovisne vazodilatacije .....	23
4.10. Izolacija i krioprezervacija mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC) .....	24
4.11. Proteinska ekspresija enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti	25
4.12. Mjerenje markera za oksidativni stres i antioksidativni kapacitet u serumu .....	26
4.13. Mjerenje genskog izražaja pomoću rt PCR .....	26

4.14. Dnevnik prehrane .....	27
4.15. Statističke metode.....	27
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>29</b>
5.1. Antropometrijski, hemodinamski i biokemijski parametri.....	29
5.2. Sastav tijela i tjelesnih tekućina.....	29
5.3. Profil masnih kiselina, koncentracija vitamina E, selen i luteina u serumu .....	31
5.4. Vazodilatacija ovisna o endotelu i vazodilatacija neovisna o endotelu u mikrocirkulaciji kože podlaktice .....	33
5.5. Multipleksna i Simpleksna kvantifikacija adhezijskih molekula, koncentracija pro- i protuupalnih citokina u serumu .....	34
5.6. Promjene serumskih koncentracija pro- i protuupalnih lipidnih medijatora koji potječu iz n-6 (AA) i n-3 (EPA) masnih kiselina nakon dijetetskog protokola .....	35
5.7. Oksidativni stres i antioksidativni kapacitet nakon protokola prehrane.....	37
5.8. Analiza povezanosti biokemijskih i antropometrijskih mjerenja, serumskih koncentracija lipidnih medijatora te biljega oksidativnog stresa i aktivnosti / izražaja antioksidativnih enzima.....	39
5.9. Proteinski izražaj enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti.....	40
5.10. Prehrambene navike kod zdravih mladih ispitanika.....	44
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>45</b>
6.1. Učinci konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na mikrovaskularnu funkciju.....	45
6.2. Protuupalni učinci funkcionalno obogaćenih jaja.....	50
6.3. Prehrambene navike zdravih mladih ispitanika.....	55
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>61</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>62</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>63</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>65</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>89</b>
<b>12. PRILOZI</b>	



## Popis kratica korištenih u tekstu

AA	Arahidonska kiselina (engl. <i>arachidonic acid</i> )
ACh	Acetilolin (engl. <i>acetylcholine</i> )
ALA	$\alpha$ -linolenska kiselina (engl. <i>alpha-linolenic acid</i> )
AUC	Površina ispod krivulje (engl. <i>area under the curve</i> )
BMI	Indeks tjelesne mase (engl. <i>body massi indeks</i> )
BP	Krvni tlak (engl. <i>blood pressure</i> )
BW	Tjelesna težina (engl. <i>body weight</i> )
CAT	Katalaza (engl. <i>catalasa</i> )
CD105	Endoglin 1 (CD105) glikoprotein stanične površine (engl. <i>endoglin 1 (CD105) cell-surface glycoprotein</i> )
CD62E	E – selektin (CD62E) glikoprotein stanične površine (engl. <i>E -selectin (CD62) cell-surface glycoprotein</i> )
COX	Ciklooksigenaza (engl. <i>cyclooxygenase</i> )
COX-1	Ciklooksigenaza 1 (engl. <i>cyclooxygenase 1</i> )
COX-2	Ciklooksigenaza 2 (engl. <i>cyclooxygenase 2</i> )
CRP	C reaktivni protein
DBP	Dijastolički krvni tlak (engl. <i>diastolic blood pressure</i> )
DHA	Dokozaheksaenska kiselina (engl. <i>docosahexaenoic acid</i> )
DMSO	Dimetilsulfoksid
EDD	Endotel ovisna dilatacija (engl. <i>endothelial dependent dilation</i> )
EDP	Epoksidozapentaenske kiseline (engl. <i>epoxidosapentaenoic acid</i> )
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EET	Epoksieikozatrienskim kiselinama (engl. <i>epoxyeicosatrienoic acids</i> )
ELISA	Enzimski imunosorbentni test (engl. <i>enzyme - linked immunosorbent assay</i> )

eNOS	Endotelna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>endothelial nitric oxide synthase</i> )
EPA	Eikozapentaenska kiselina (engl. <i>eicosapentaenoic acid</i> )
FeCl <sub>3</sub>	Željezo (III) klorid (engl. <i>iron (III) chloride</i> )
FRAP	Sposobnost plazme da reducira željezo (engl. <i>ferric reducing antioxidant power assay</i> )
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )
GC–MS/MS	Plinska kromatografija s tandemskom masenom spektrometrijom (engl. <i>gas chromatography with tandem mass spectrometry</i> )
GPx	Glutation peroksidaza (engl. <i>glutathione peroxidase</i> )
GPx1	Glutation peroksidaza 1 (engl. <i>glutathione peroxidase 1</i> )
GPx4	Glutation peroksidaza 4 (engl. <i>glutathione peroxidase 4</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vodikov peroksid (engl. <i>hydrogen peroxide</i> )
HDL	Lipoproteina visoke gustoće (engl. <i>high-density lipoprotein</i> )
HNO <sub>3</sub>	Dušična kiselina (engl. <i>nitric acid</i> )
HPLC	Tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HR	Broj otkucaja srca (engl. <i>heart rate</i> )
HRP	Peroksidaza hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
HUVEC	Endotelne stanice ljudske pupčane vene (engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
hsCRP	Visoko osjetljivi C reaktivni protein (engl. <i>high sensitive C reactive protein</i> )
ICAM-1	Međustanična adhezijske molekula 1 (engl. <i>intercellular adhesion molecules1</i> )
ICP-MS	Masena spektrometrija induktivno spojene plazme (engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
IL-1	Interleukin 1

IL-10	Interleukin 10
IL-17A	Interleukin 17A
IL-6	Interleukin 6
INF- $\gamma$	Interferon-gama (engl. <i>interferon-gamma</i> )
iNOS	Inducibilna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
LA	Linolna kiselina (engl. <i>linoleic fatty acid</i> )
LDF	Laser doppler flowmetar (engl. <i>laser doppler flowmetar</i> )
LDL	Lipoproteina niske gustoće (engl. <i>low density lipoprotein</i> )
L-NAME	N <sup>G</sup> -metil-L-arginin acetatna sol (engl. <i>N<sup>G</sup>-Methyl-L-arginine acetate salt</i> )
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
LTB <sub>5</sub>	Leukotrien B <sub>5</sub>
MAP	srednji arterijski tlak (engl. <i>mean arterial pressure</i> )
MPO	Mijeloperoksidaze (engl. <i>myeloperoxidase</i> )
mRNA	Glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MUFA	Mononezasićene masne kiseline (engl. <i>monounsaturated fatty acids</i> )
NB	Nezarazne bolesti
n-3 PUFA	n-3 polinezasićene masne kiseline (engl. <i>n - 3 polyunsaturated fatty acids</i> )
n-6 PUFA	n-6 polinezasićene masne kiseline (engl. <i>n - 6 polyunsaturated fatty acids</i> )
nNOS	Neuralna sintaza dušikovog oksida (engl. <i>neural nitric oxide synthase</i> )
NO	Dušikov oksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
PBMC	Mononuklearne stanice periferne krvi (engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Puferirana otopina s fosfatom (engl. <i>buffered solution with phosphate</i> )
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGE <sub>3</sub>	Pprostaglandin E <sub>3</sub>

PGI <sub>3</sub>	Prostaglandin I <sub>3</sub>
PORH	Postokluzivna reaktivna hiperemija (engl. <i>postocclusive reactive hyperemia</i> )
PU	Perfuzijska jedinica (engl. <i>perfusion units</i> )
PUFA	Višestruko nezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
PVDF	Poliviniliden difluorid (engl. <i>polyvinylidene difluoride</i> )
RNA	Ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	Reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
RvE <sub>1</sub>	Rezolvin E <sub>1</sub>
SBP	Sistolički krvni tlak (engl. <i>systolic blood pressure</i> )
Se	Selen
SMTC	S-metil-L-tiocitrulin
SNP	Natrij nitroprusid (engl. <i>sodium nitroprusside</i> )
SOD	Superoksid dismutaza (engl. <i>superoxide dismutase</i> )
SOD2	Superoksid dismutaza 2 (engl. <i>superoxide dismutase 2</i> )
TBARS	Reaktivne tvari s tiobarbiturnom kiselinom (engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> )
TNF- $\alpha$	Tumorski faktor nekroze $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
TR	Tioredoksin reduktaza
TRIM	1-(2-trifluorometilfenil) imidazolom
Trx	Oksidirani tioredoksin (engl. <i>oxidized thioredoxin</i> )
TXA <sub>3</sub>	Tromoboksan A <sub>3</sub> (engl. <i>thromboxane A<sub>3</sub></i> )
TXB <sub>2</sub>	Tromboksan B <sub>2</sub> (engl. <i>thromboxane B<sub>2</sub></i> )
VCAM-1	Molekule adhezije vaskularnih stanica 1 (engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> )
WHR	Omjer struka i bokova (engl. <i>waist-to-hip ratio</i> )
ΣSFA	Zasićene masne kiseline (engl. <i>saturated fatty acids</i> )

## Popis tablica

TABLICE:

<b>Tablica 1</b> Čimbenici koji izazivaju vazokonstrikciju i/ili vazodilataciju u krvnim žilama .....	12
<b>Tablica 2.</b> Profil masnih kiselina i mikronutrijenata jestivog dijela jaja u CTRL skupini i Nutri4 skupini .....	20
<b>Tablica 3.</b> Utjecaj običnih (CTRL skupina) i Nutri4 (Nutri4 skupina) obogaćenih kokošnjih jaja na antropometrijske, hemodinamske i biokemijske parametre .....	30
<b>Tablica 4.</b> Utjecaj jaja na sastav tijela i status tjelesne tekućine na kontrolnu skupinu i Nutri4 skupinu .....	31
<b>Tablica 5.</b> Profil masnih kiselina, koncentracija vitamina E, selen i luteina u serumu.....	31-32
<b>Tablica 6.</b> Utjecaj običnih (CTRL skupina) i obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske koncentracije IL-17A, IL-10, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1, E-selektin i edoglin 1 nakon trojednog dijetetskog protokola .....	35
<b>Tablica 7.</b> Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih jaja (Nutri4 skupina) na serumsku antioksidativnu aktivnost .....	38

## Popis slika

<b>Slika 1.</b> Kemijske strukture n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) - linolne kiseline (LA; C18:2) i alfa-linolenske kiseline (ALA; 18:3) .....	3
<b>Slika 2.</b> Metabolizam dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina .....	4
<b>Slika 3.</b> Kemijska struktura izomernog oblika vitamina E $\alpha$ -tokoferola .....	6
<b>Slika 4.</b> Kemijska strukture luteina .....	9
<b>Slika 5.</b> Slika prikazuje mjerenje mikrovaskularne reaktivnosti pomoću Laser doppler Flowmetra .....	24
<b>Slika 6.</b> Postokluzivna reaktivna hiperemija, ACh potaknuta dilatacija i SNP potaknuta dilatacija .....	33
<b>Slika 7.</b> Postokluzivna reaktivna hiperemija i ACh potaknuta dilatacija sa ili bez primjene indometacina .....	34
<b>Slika 8.</b> Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske koncentracije lipidnih medijatora.....	36
<b>Slika 9.</b> Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćene kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na omjer leukotriena B <sub>4</sub> /B <sub>5</sub> i prostaglandina E <sub>2</sub> /E <sub>3</sub> u serumu nakon dijetetskog protokola .....	36
<b>Slika 10.</b> Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske razine oksidativnog stresa (TBARS) i antioksidativnog kapaciteta (FRAP) nakon trojednog dijetetskog protokola .....	37
<b>Slika 11.</b> Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćene kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske razine MPO nakon trojednog dijetetskog protokola .....	38
<b>Slika 12.</b> Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih jaja (Nutri4 skupina) na relativni genski izražaj proteina uključenih na oksidativni stres i vazoreaktivnost iz PBMC nakon trojednog dijetetskog protokola .....	39
<b>Slika 13.</b> Relativni proteinski izražaj iz PBMC i reprezentativni blotovi .....	41
<b>Slika 14.</b> Neravnoteža između proizvodnje ROS i antioksidativne aktivnosti .....	51

## 1. UVOD

### 1.1. Funkcionalna hrana

Definicije funkcionalne hrane razlikuju se u različitim dijelovima svijeta, no svima im je zajedničko pozivanje na hranu prirodnog podrijetla koja sadrži sastojke koji blagotvorno djeluju na ljudsko zdravlje (1). Funkcionalna hrana je prirodna ili prerađena hrana koja sadrži poznate ili nepoznate biološki aktivne sastojke, koji u određenim, učinkovitim i netoksičnim koncentracijama pružaju klinički dokazane i dokumentirane zdravstvene dobrobiti u očuvanju zdravlja ili smanjenju rizika od razvoja bolesti (2, 3). Znanstveni koncept funkcionalne hrane možemo smatrati funkcionalnom ako se na zadovoljavajući način pokaže da, osim odgovarajućih nutritivnih učinaka, ima povoljan učinak na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu, na način da je važan za poboljšanje zdravstvenog stanja i opće dobrobiti ili smanjenje rizika od nastanka bolesti (3).

S razvojem znanosti i novih tehnologija zdrava prehrana je dobila novu dimenziju. Također, ljudi diljem svijeta postaju sve uvjereniji da hrana koju konzumiraju može modulirati njihove zdravstvene performanse. Prema procjenama WHO-a, svake godine umre 16,7 milijuna ljudi diljem svijeta od kardiovaskularnih bolesti (4). Mnogi dokazi upućuju na to da su loše prehrambene navike jedan od faktora rizika koji doprinosi bržem nastanku kardiovaskularnih bolesti (5). Dvije glavne skupine hranjivih tvari, nezasićene masne kiseline i antioksidansi, koje se konzumiraju kao dodaci mogu biti koristan dodatak kardiovaskularnom zaštitnom obrascu prehrane (6). Općenito se vjeruje da veći unos ukupnih i zasićenih masti doprinosi razvoju koronarne bolesti srca. Trenutne preporuke za smanjenje rizika od razvoja ateroskleroze su ograničenje unosa masti na 25-30% energije, zasićenih masti na manje od 7% energije i kolesterola na manje od 200 mg/dan. U kontekstu primarne i sekundarne prevencije, obrazac prehrane koji uključuje hranu i hranjive tvari za koje se pokazalo da su povezani sa smanjenim rizicima od kardiovaskularnih bolesti može proizvesti smanjenje rizika iste veličine kao ono koje se obično povezuje s terapijom statinima (7). Različite provedene studije potvrdile su blagotvornost funkcionalno obogaćene hrane. Tako je studija Breškić i sur. (8) ispitala učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) na profile lipida i slobodnih masnih kiselina u serumu, biljege upalnog i oksidativnog stresa i mikrovaskularnu reaktivnost u bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću te su došli do

zaključka da postoji snažan potencijal konzumacije n-3 polinezasićenih masnih kiselina (n-3 PUFA) za smanjenje kardiovaskularnog rizika i sprječavanje štetnih ishoda kod postojećih kardiovaskularnih bolesti. Nadalje, konzumacija tri kokošja jaja dnevno obogaćena n-3 PUFA tijekom tri tjedna imala je povoljan učinak na profil slobodnih masnih kiselina u serumu (niži omjer n-6/n-3 PUFA) i blage protuupalne učinke. Osim kod kardiovaskularnih bolesnika, funkcionalno obogaćena hrana pokazala se blagotvornom kod zdravih mladih ispitanika. U istraživanju Kolobarić i sur. utvrđeno je da je mikrovaskularna reaktivnost na podražaje koji su posredovani endotelom pojačana dok se proupalna koncentracija interferon- $\gamma$  značajno smanjila, a protuupalna koncentracija IL-10 značajno je porasla u zdravih ispitanika koja su konzumirali funkcionalno obogaćenu hranu (9). Nadalje, osim kod zdravih pojedinaca i kardiovaskularnih bolesnika, funkcionalno obogaćena hrana pronašla je svoje mjesto i kod sportaša. Studija Kolar i sur. (10) je pokazala da konzumacija funkcionalne obogaćene hrane s n-3 PUFA-om poboljšava mikrovaskularnu funkciju zbog unosa n-3 PUFA se neovisno o promjenama krvnog tlaka i koncentracije lipida u krvi, što ukazuje na potencijalne mehanizama koji posreduju međudjelovanje između n-3 PUFA, tjele vježbe i endotela kod sportaša. U studiji je utvrđeno da n-3 PUFA povoljno modificira periferne mikrovaskularne prilagodbe na akutno iscrpljujuće vježbanje kod sportaša (10). Isto tako postoje i druge studije koje su potvrdile pozitivne efekte funkcionalne hrane kao što je studija Kaczmarek i sur. (11) u kojoj su željeli ispitati konzumaciju brokule na ljudsku gastrointestinalnu mikrobiotu. Tijekom 42 dana jeli su 200 g kuhane brokule te 20 g sirove rokvice dnevno. Usporedbom uzraka prije i poslije dijetalnog protokola utvrđeno je da konzumacija brokule utječe na sastav i funkciju ljudske gastrointestinalne mikrobiote. Nadalje, konzumacijom ribe kao izvora n-3 PUFA koja je važna za normalanu imunološku i krvožilnu funkciju našla je svoje mjesto u prehrani što potvrđuje studija Conway i sur. (12) u kojoj su ispitanici dobivali dvije porcije ribe tjedno (140 g po porciji) tijekom 8 tjedana te su zamijećene značajno veće koncentracije EPA i DHA nakon protokola kao i niži n-6/n-3 omjer.

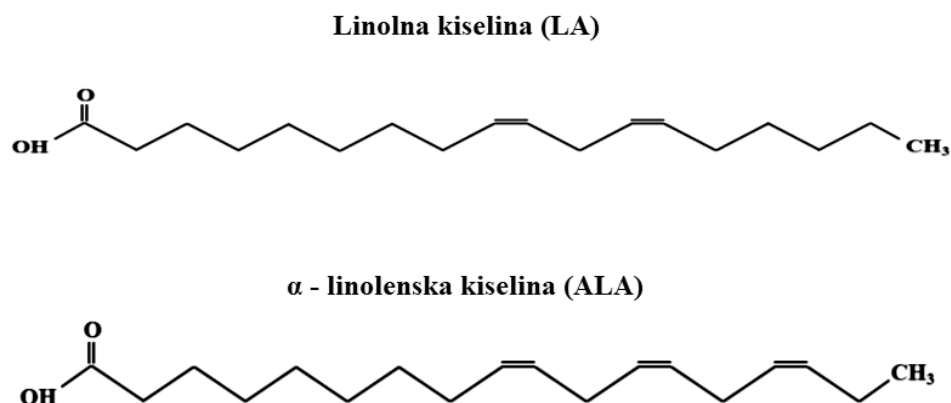
### **1.2. Funkcionalna hrana obogaćena polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminom E, selenom i luteinom**

#### **1.2.1. Polinezasićene masne kiseline**

Višestruko nezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acids, PUFA) dijele se u dvije skupine n-3 i n-6, ovisno o tome gdje se nalazi prva dvostruka veza u ugljikovovodičnom lancu (3). Predstavnicima n-6 skupine su linolna masna kiselina (LA) i arahidonska masna kiselina (AA), dok n-3 skupinu predstavljaju  $\alpha$ -linolenska masna kiselina (ALA), eikozapentaenska

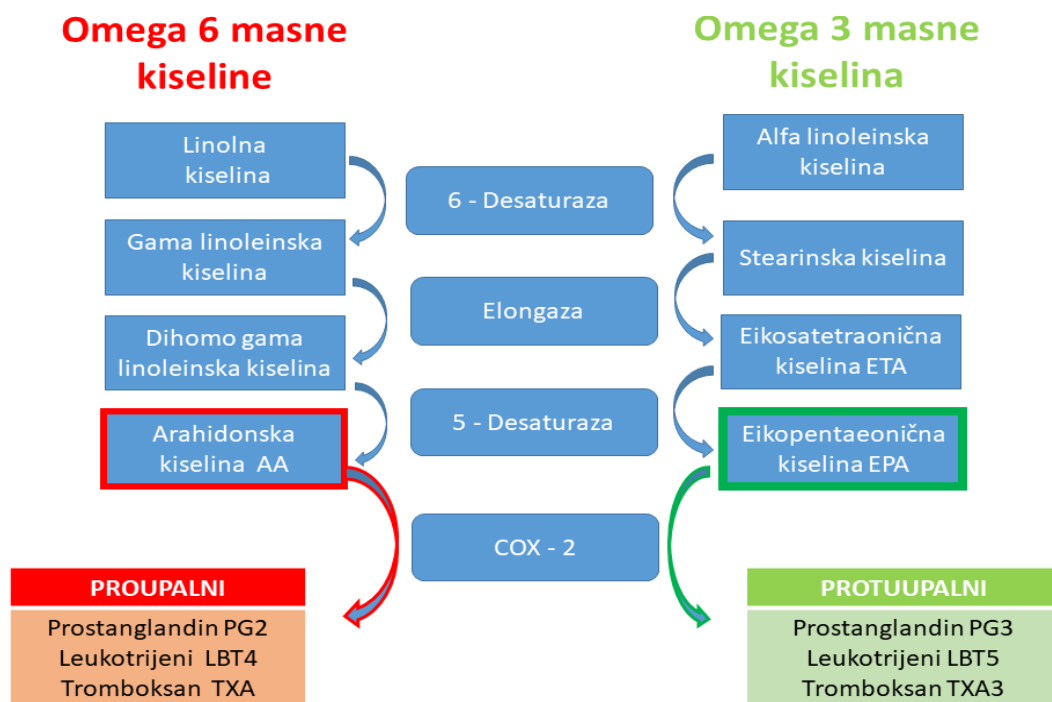


kiselina (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA). n-6 i n-3 masne kiseline (LA i ALA) ne mogu se sintetizirati u organizmu i stoga se nazivaju esencijalnim masnim kiselinama (9,13).



**Slika 1.** Kemijske strukture n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) - linolne kiseline (LA; C18:2) i alfa-linolenske kiseline (ALA; 18:3) (izvor: izradio autor disertacije).

n-3 i n-6 PUFA su sastavni dio stanične membrane. Promjenama u fizikalno-kemijskim svojstvima membrane mogu utjecati na funkciju receptora vezanih za membranu ionskih kanala i enzima, te utjecati na nizvodne signalne putove koji će imati izravan učinak na funkciju vaskularnog endotela i glatkih mišićnih stanica (14). Dobro je dokumentirano da vazokonstriktivni prostaglandini dobiveni iz n-6 PUFA posreduju narušenom odgovoru endotel ovisne vazodilatacije u stanjima kao što su hipertenzija i visok unos soli hranom (15). S druge strane, n-3 PUFA se natječe s n-6 PUFA za putove razgradnje i proizvodnje vazoprotektivnih metabolita (16) npr. natječu se za proizvodnju prostaglandina i drugih medijatora posredovanu ciklooksigenazama (16). U slučaju većeg omjera n-6 PUFA/n-3 PUFA, nastaju prostaglandin serije 2 (PGI<sub>2</sub>), leukotrien serije 4 (LTB<sub>4</sub>) i tromboksan B serije 2 (TXB<sub>2</sub>), koji imaju vazokonstriktivno djelovanje, djeluju kao aktivatori trombocita i pokazuju proupalni potencijal (16). Ako omjer ide do većih koncentracija n-3 PUFA, tada dominira proizvodnja protuupalnih i vazodilatatornih medijatora prostaglandina serije 3 (PGI<sub>3</sub>), leukotriena serije 5 (LTB<sub>5</sub>) i tromoboksana serije 3 (TXA<sub>3</sub>) (17).



**Slika 2.** Metabolizam dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina.

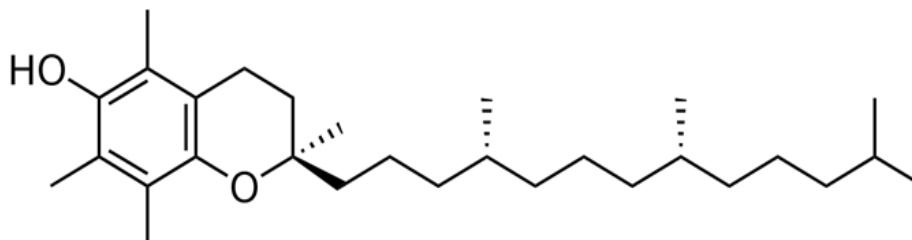
Shematski prikaz sinteze PUFA iz prekursora esencijalnih masnih kiselina, alfa-linolenske kiseline (ALA; n-3 PUFA put) i linolne kiseline (LA; n-6 PUFA put) kroz procese desaturacije i elongacije izvedenih enzima. (izvor: izradio autor disertacije).

Utvrđeno je da n-3 PUFA ima širok raspon fizioloških uloga gdje su te uloge povezane s određenim zdravstvenim ili kliničkim prednostima. Dokazano je da n-3 PUFA povoljno mijenjaju brojne čimbenike rizika za kardiovaskularne bolesti. Tako su Geleijnse i sur. proveli metaregresijsku analizu antihipertenzivnog učinaka ribljeg ulja iz randomiziranih studija. Analizom je ispitana promjena učinka krvnog tlaka prema dobi, spolu, krvnom tlaku i indeksu tjelesne mase u ukupno 90 randomiziranih studija te su došli do zaključka da visoki unos hrane bogate n-3 PUFA-om može sniziti krvni tlak, osobito kod starijih osoba s hipertenzijom (18). Nadalje, kako je AA glavna komponenta fosfolipidne membrane trombocita koja je potreban za sintezu prostaglandina, a odgovorna je za ubrzanje nekih faza procesa koagulacije. Kako je sastav fosfolipida u membrani trombocita po prirodi dinamičan, a budući da se mnoge masne kiseline koje čine fosfolipidni dvosloj ne proizvode u tijelu, njihov se sadržaj primarno regulira unosom hranom (19). Stoga, sadržaj višestruko nezasićenih masnih kiselina u membranama trombocita varira ovisno o prehrani, a sami učinci prehrane bogatom n-3 PUFA-om rezultiraju modulacijom hemostaze trombocita te može utjecati na reaktivnost trombocita i trombozu što su detaljno opisali (19). Isto tako zapažen je blagotvorni učinak n-3 PUFA kod zdravih ispitanika na koncentracije triglicerida u plazmi u randomiziranoj, dvostruko slijepoj,

placebom kontroliranoj studiji Lovegrove i sur. (20) u kojoj je skupina ispitanika koja je konzumirala 4 g ribljeg ulja dnevno obogaćenog s 1,5 g eikozapentaenske kiseline i 1 g dokozaheksaenske kiseline tijekom 12 tjedana imala značajno snižene razine triglicerida u plazmi nakon dijetetskog protokola. Osim kod zdravih pojedinaca, n-3 PUFA ima dokazan povoljan učinak kod kardiovaskularnih bolesnika koji su konzumirali tri n-3 PUFA obogaćena funkcionalna jaja dnevno (1053 g n-3 PUFA/dan) tijekom tri tjedna te su nakon prehranbenog protokola imali značajano snižen LDL kolesterol (8). Dobrobiti dugolančane n-3 PUFA osim na hemostatski i lipidni metabolizam ima i na samu vaskularnu funkciju što je potvrđeno nizom studija. Jedna od njih je studija Goodfellow i sur (21) u kojem su ispitanici s hiperkolesterolemijom bez drugih poznatih uzroka endotelne disfunkcije konzumirali n-3 PUFA u dozi od 4 g/dan tijekom četiri mjeseca, u konačnici, imali poboljšanu dilataciju ovisna o endotelu velikih arterija. Nadalje, studije Znanstvenog centra izvrsnost za personaliziranu brigu o zdravlju u kojem ispituju funkcionalno obogaćenu hranu i između ostaloga i hranu obogaćenu s n-3 PUFA-om utvrdili su korisni učinak na mikrovaskularnu funkciju kod zdravih mladih ispitanika, sportaša te kardiovaskularnih bolesnika na kardiovaskularni sustav (3, 8, 9, 22–24). Slično su istraživanja proveli Khan i sur. (25) koji su pomoću iontoforeze ACh i SNP procijenili vaskularnu funkciju kod 173 zdrava dobrovoljaca koji su 8 tjedana konzumirali ulje tune te su dobili značajno povećan odgovor na ACh ovisnu vasodilataciju na koži podaktice. Pozitivan učinak n-3 PUFA primijećen je i kod trkača rekreativaca u studiji Żebrowska i sur (26) gdje su tri tjedna konzumirali (jedna kapsula: 142 mg EPA, 267 mg DHA, 12 mg vitamina E i 5 µg vitamina D ) šest kapsula dva puta dnevno. Nakon protokola je zamijećen značajno viši indeks n-3 PUFA i niži omjer n-6/n-3 PUFA te smanjenje koncentracije leptina i poboljšanje lipidnog profila kod rekreativnih trkača koji su konzumirali dodatke u obliku kapsula,

### 1.2.2. Vitamin E

Vitamin E je lipofilna molekula, a najviše ga ima u orašastim plodovima i raznim biljnim uljima (27). Obitelj vitamina E sadrži osam izomera: četiri tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol) i četiri tokotrienola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokotrienol). Izomerni oblici ovise o broju i mjestu metilnih skupina na kromanskim prstenovima (28).  $\gamma$ -tokoferol je najzastupljeniji oblik vitamina E u zapadnoj prehrani, dok je  $\alpha$ -tokoferol najzastupljeniji oblik vitamina E u plazmi i biološki je najaktivniji. *In vitro*, vitamin E posjeduje mnoge biološke funkcije, uključujući regulaciju preživljavanja stanica (29), poboljšanje endotelne funkcije (30,31) i regulaciju upalnih procesa (32,33). *In vivo* je najznačajniji zbog svog antioksidativnog učinka, sposobnosti uklanjanja lipidnih radikala i prekida oksidativnih lančanih reakcija (27).

$\alpha$  - tokoferol

**Slika 3.** Kemijska strukture  $\alpha$ -tokoferola izomernog oblika vitamina E (izvor: izradio autor disertacije).

Kao što je već spomenuto, vitamin E ima značajnu ulogu u antioksidativnim procesima, ali je jedan od najučinkovitijih vitamina za koje se zna da moduliraju imunološku funkciju. To je dijelom zbog njegovog zaštitnog učinka protiv oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina u membranama imunoloških stanica, koja je rezultat njihove visoke metaboličke aktivnosti i normalne obrane od patogena što je i dokazano pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti i fluorometrijske detekcije kod ispitanika koji su konzumirali suplemente obogaćene vitaminom E tijekom tri mjeseca (200 IU vitamina E / dan) te su koncentracije vitamina E u bijelim krvnim stanicama bile veće otprilike 30 puta nakon konzumacije vitamina E oralnim putem. Sadržaj tokoferola u plazmi i svim staničnim elementima krvi povećan je oralnim unosom vitamina E (34,35). Imunološke stanice uvelike ovise o sastavu i strukturi stanične membrane jer su njihove membrane primarno mjesto gdje se vanjski signali prevode kroz različite mehanizme prijenosa signala u plazmu i jezgru radi modulacije ključnih regulacijskih gena. Sprečavanjem peroksidacije lipida i s tim povezanim oštećenjem stanične membrane, vitamin E može pomoći u održavanju integriteta membrane, održavati prijenos signala i proizvodnju ključnih proteina i drugih medijatora te izravno utjecati na funkciju imunoloških stanica. Osim toga, vitamin E može izravno modulirati određena svojstva staničnih membrana, uključujući pokretljivost lipidnih splavi što može utjecati na kretanje i aktivaciju površinskih signalnih molekula (27). Osim što je važan za imunološke stanice, vitamin E ima i pozitivan učinak na vaskularni odgovor što je potvrđeno u studiji Heitzera i sur. (36) u kojoj su procijenili učinak vitamina E na vaskularnu funkciju endotela u bolesnika s hiperkolesterolemijom. Protok krvi podlaktice mjeren je pomoću pletizmografa i venske okluzije, a osnovna mjerenja protoka krvi, procjenu vazodilatacije ovisne o endotelu pomoću acetilkolina i endotel neovisne dilatacije pomoću natrij-nitroprusida, mjereni u podlaktici

tijekom intraarterijske infuzije. Studija je pokazala da je vitamin E značajno povećao dilataciju ovisno o endotelu kod pušača s hiperkolesterolemijom te je utvrđen značajan odnos između poboljšanja vazodilatacije izazvane acetilkolinom i promjene u titru autoantitijela protiv oksidiranog LDL-a. Nadalje postoji studija (37) u kojoj je sudjelovalo 39 910 ispitanika s koronarnom bolesti u dobi od 40 do 75 godina s dijabetesom i hiperkolesterolemijom u kojoj su tijekom četiri godine detaljno pratili prehrambene navike pomoću kojih su procjenjivali uobičajeni unos vitamina C, karotena i vitamina E uz ostale hranjive tvari. Došli su do zaključka da je tijekom četiri godine praćenja dokumentirano smo 667 slučajeva koronarne bolesti što povezuju s visokim unosom vitamina E i manjeg rizika od koronarne bolesti srca kod muškaraca (38). Konzumacija multivitaminskih pripravaka s A, C ili E vitaminom kod žena i muškaraca može smanjiti smrtnost od kardiovaskularnih bolesti (38), dok su istraživači sa Sveučilišta Cambridge pokazali da liječenje  $\alpha$ -tokoferolom nakon 1 godine liječenja značajno smanjuje učestalost srčanog udara (39). Slični rezultati su dobiveni kada je analiziran učinak nadomjestka  $\gamma$ -tokoferolom, koji je u obrnutoj povezanosti s pojavom koronarne bolesti srca (40), a kombinirna nadomjesna terapija  $\alpha$ -tokoferolom pokazala se važnom u ublažavanju oksidativnog i dušikovog stresa te upale u bolesnika s metaboličkim sindromom (40).

### 1.2.3. Selen

Selen (Se) je prepoznat kao biološki element u tragovima koji ima važnu ulogu u oksidativnoj obrani organizma zahvaljujući svojoj sposobnosti da se ugradi u antioksidativne enzime kao što je selenocistein (41). Glutation peroksidaza (GPx) i tioredoksin reduktaza (TR) glavni su predstavnici enzima koji sadrže Se kod ljudi (42). Prethodne studije pokazale su da povećana aktivnost GPx ovisne o Se može spriječiti oštećenje proteina i DNA izazvanih reaktivnim kisikovim spojevima (ROS), dok je TR nazvana prema svojoj sposobnosti redukcije oksidiranog tioredoksina (Trx) (43). Nadalje, sve veći broj dokaza ukazuje da su endogeni selenoproteini uključeni u: regulaciju vaskularnog tonusa održavanjem ravnoteže superoksidnog aniona/NO; regulaciju stanične adhezije kontroliranjem izražaja molekule stanične adhezije; regulaciju apoptoze putem inhibicije/aktivacije kinaze-1 koja regulira signal apoptoze; i proizvodnju eikosanoida kontroliranjem aktivnosti ciklooksigenaze 1 i 2 (COX-1, 2) i lipoksigenaze (44).

Suplementacija selenom je većinom imunostimulirajuća, što se mjeri širokim rasponom parametara uključujući proliferaciju T stanica, aktivnost NK stanica, funkcija urođenih imunoloških stanica i brojnih drugih. U ispitivanju na ljudima koji su konzumirali brokulu obogaćenom Se s 200  $\mu$ g Se po porciji tijekom tri dana rezultiralo je povećanom proizvodnjom

interleukina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 i IL-22) iz mononuklearnih stanica periferne krvi i pojačanim imunološkim protuupalnim odgovorom (45). Slična modulacija na upalni odgovor pokazala se kod pacijenata sa sindromom respiratornog distresa koji su primali intravenozno fiziološku otopinu obogaćenu natrijevim selenitom kroz 10 dana u odnosu na kontrolnu skupinu koja je intravenozno primala samo fiziološku otopinu bez dodatka natrijevog selenita (46). Infuzija fiziološke otopine obogaćene natrijevim selenitom obnovila je antioksidativni kapaciteta pluća, što je ublažilo upalni odgovor kroz povećane koncentracije interleukina (IL-1 $\beta$  i IL-6) i značajno poboljšalo respiratornu mehaniku te ublažio upalne reakcije (46). Selen osim svojih protuupalnih svojstava ima važnu ulogu u kardiovaskularnoj homeostazi. Endotelna disfunkcija može se djelomično okarakterizirati kao gubitak normalne vazorelaksacijske reakcije ovisne o endotelu na protok ili na agoniste, kao što je acetilkolin (47). Endotelna disfunkcija je rani marker ateroskleroze i potiče trombozu. Gubitak biorasploživog dušikovog oksida (NO) obilježje je endotelne disfunkcije, ali i promjene sinteze drugih endotelnih vazodilatatora, poput prostaciklina i endotelnog hiperpolarizirajućeg faktora, također mogu pridonijeti smanjenom vaskularnom tonusu (48). NO štiti vaskularnu stijenku od oštećenja sprječavajući aktivaciju trombocita, inhibirajući proliferaciju i migraciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica i sprječavajući proupalne promjene na endotelu. Oksidativni stres može potaknuti endotelnu disfunkciju olakšavanjem gubitka NO, mehanizmima kao što je stvaranje peroksinitrita iz njegove reakcije sa superoksidom. Osim toga, oksidativni stres može smanjiti aktivnost endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS) na druge načine, kao što je smanjenje dostupnosti kofaktora eNOS.

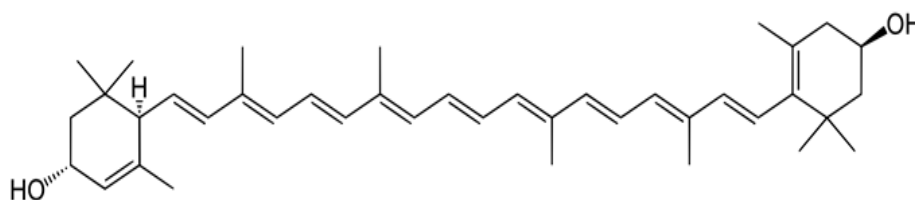
Nadalje selen je bitna komponenta sinteze i funkcije GPx1 enzima te je važan kofaktor za optimalno funkcioniranje antioksidativnih enzima glutation peroksidaze (GPx) koji imaju važnu ulogu kardiovaskularnom zdravlju (49). Utvrđeno je da GPx1 regulira funkciju endotela, jer genetska insuficijencija GPx1 potiče endotelnu disfunkciju, i kod heterozigotnih i kod homozigotnih nokaut miševa (50). Nadalje, kod pacijenata s koronarnom arterijskom bolešću, aktivnost GPx1 crvenih krvnih stanica bila je snažan prediktor budućih kardiovaskularnih (KV) događaja, (51,52). Štoviše, kod bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću kombinacija najniže aktivnosti GPx1 i najvišeg homocisteina u plazmi bila je povezana s najvećim rizikom za buduće kardiovaskularne događaje. Temeljem toga možemo zaključiti da Se ima iznimnu ulogu u imunološkom sustavu, a pomoću svojih protuupalnih medijatora koji smanjuju upalni odgovor doprinosi endotelnoj funkciji, odnosno, endotelnoj disfunkciji koja je usko povezana s nedostatkom GPx1 kod kardiovaskularnih bolesnika.

Sukladno tome, Se i enzimi koji sadrže Se mogu biti izravno uključeni u regulaciju vaskularnih upalnih procesa i aterogeneze (43).

#### 1.2.4. Lutein

Lutein je ksantofilni karotenoid koji se dobiva iz raznih namirnica, poput tamnozelenog lisnatog povrća i žumanjka. Lutein ima antioksidativno djelovanje i uklanja reaktivne kisikove spojeve kao što su singletni kisik i lipidni peroksdnii radikali. Oksidativni stres aktivira upalne medijatore, što dovodi do razvoja metaboličkih i upalnih bolesti (53).

**Lutein**



**Slika 4.** Kemijska strukture luteina (izvor: izradio autor disertacije)

Lutein djeluje kao antioksidans i štiti biljke od foto-induciranih oštećenja slobodnih radikala (54). Ksantofilni karotenoidi moduliraju oksidativni stres i reguliraju unutarstaničnu signalizaciju osjetljivu na redoks (55). Ozawa i sur. (56) sugerirali su da lutein inhibira oksidativni stres. Lutein ima dugačak ugljikov lanac s izmjeničnim jednostrukim i dvostrukim ugljik-ugljik vezama s pričvršćenim metilnim bočnim skupinama. Zbog prisutnosti hidroksilne skupine na oba kraja molekule, lutein ima različite karakteristike u usporedbi s drugim karotenoidima (57). Protuupalni i antioksidativni učinci luteina pripisuju se njegovoj jedinstvenoj strukturi, posebice prisutnosti konjugiranih dvostrukih veza i hidroksilnih skupina (58). Povoljne kardiovaskulane učinke karotenoida ispitala je skupina Cheng i sur. (59) u svojoj analizi baze podataka uključujući Medline, Web of science i Scopus gdje su uključni kriteriji bili interventne studije koja su izvješćivala o učincima proizvoda od rajčice i suplementacije karotenoida na čimbenike kardiovaskularnog rizika među odraslom populacijom starijom od 18 godina. 21 studija je uključena u metaanalizu. Istraživanja koja su dodavali dodavala rajčicu i karotenode u prehranu bile su povezane sa značajnim smanjenjem LDL-kolesterola, IL-6 i smanjenjem sistoličkog tlaka te su došli do zaključka da povećanje

njihovog unosa ima pozitivne učinke na lipide u krvi, krvni tlak i endotelnu funkciju. U opsežnoj studiji Huang i sur. (60) u kojoj je istraživana povezanost koncentracije antioksidativnih mikronutrijenata, kao što su karotenoidi i vitamini, i varijabilnosti srčanog ritma s kardiovaskularnim bolestima pokazalo se da su povećane razine karotenoida i vitamina pozitivno povezane s višim varijabilnost srčanog ritma te da dnevni unos voća i povrća može biti koristan za povećanje statusa karotenoida u krvi i daljnju prevenciju. Nadalje, studija Sikaroudi i sur. (61) proučavala je konzumaciju jaja kao bogatog izvora dijetalnog luteina i zeaksantina na optičku gustoće makularnog pigmenta, smanjeni rizik od nastanka makularne degeneracije i luteina u serumu. U ovom sustavnom pregledu koristila su se randomizirana klinička istraživanja, a kvaliteta prihvatljivosti studija procijenjena je alatom Cochrane Collaboration. Analiza je pokazala da konzumacija jaja ima koristan učinak na optičku gustoću makularnog pigmenta, povećanje luteina u serumu u zdravoj populaciji što je obrnuto proporcionalno s nastankom makularne degeneracije.

### 1.3. Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija

Vaskularni endotel se sastoji od jednostaničnog sloja endotelnih stanica, koji oblaže vaskularni i limfni sustav (62). Površina endotela iznosi 4000 do 7000 m<sup>2</sup> te je prekrivena slojem koji se naziva endotelni glikokaliks (63), koji se sastoji od mozaika glikoproteina i proteoglikana, te glikozaminoglikanskih lanaca. Endotelne stanice iz različitih vaskularnih mjesta i organa pokazale su varijacije u svom izgledu i površinskim sastojcima (64,65). Endotelne stanice su polarizirane stanice: njihova luminalna membrana izravno je izložena sastojcima krvi i cirkulirajućim stanicama, dok je bazolateralna površina odvojena od okolnih tkiva glikoproteinskom bazalnom membranom koju izlučuju i usidre za njihovu staničnu membranu. Uzimajući u obzir heterogenost krvožilnog sustava, žile velikog promjera (arterije, vene, arteriole i venule) provode krv od srca do organa i tkiva i natrag, praktički bez većeg gubitka krvne tekućine ili stanica preko endotelnog sloja u fiziološkim uvjetima. Kapilare su, naprotiv, žile namijenjene izmjeni tekućina i otopljenih tvari između intra- i ekstra-vaskularnih odjeljaka (66). Također se pokazalo da je odgovarajući endotelni glikokaliks krvne žile različit u različitim strukturama organa (67). Ova fenotipska heterogenost omogućuje endotelu niz funkcija prilagođenih različitim organima.

Endotel je izložen različitim mehaničkim i hemodinamičkim silama: radijalnim silama uzrokovanim intravaskularnim tlakom, tangencijalnim silama u stijenci žile uzrokovanim ravnotežom između stanica - staničnih kontakata i vazomocije žile i aksijalne sile smicanja uzrokovane trenjem krvi koja protječe niz stjenku krvne žile. Najznačajnija od ovih promjena



je povećano oslobađanje NO kad se povećava smično naprezanje. To se događa brzom aktivacijom i pojačanim izražajem gena eNOS-a i aktivacijom transkripcije eNOS promotora (68). NO modelira vaskularni tonus te otpuštanje NO iz endotelnih stanica uzrokuju opuštanje vaskularnih glatkih mišićnih stanica i posljedičnu vazodilataciju (69). Endotel također stvara prostaciklin ( $\text{PGI}_2$ ), eikozanoid koji opušta glatke mišićne stanice putem aktivacije adenilat ciklaze s naknadnim stvaranjem cAMP-a (70). cGMP smanjuje unutarstanični protok kalcija izravnom inhibicijom naponskih  $\text{Ca}^{2+}$  kanala aktiviranjem protein kinaza, od kojih je protein kinaza GI (PKG I) od primarne važnosti. PKG I fosforilira proteine u sarkoplazmatskom retikulumu, uključujući kalijeve kanale ovisne o  $\text{Ca}^{2+}$ . Supstrat cGMP kinaze povezan je s receptorom inozitoltrifosfatom ( $\text{IP}_3$ ) i fosfolambanom koji aktivira ATPazu sarkoplazmatskog retikuluma. Fosforilacija ovih sarkoplazmatskih proteina dovodi do sekvestracije  $\text{Ca}^{2+}$  u sarkoplazmatskom retikulumu, što dovodi do pada protoka  $\text{Ca}^{2+}$  i potiče vazodilataciju kroz promijenjenu fosforilaciju lakih miozinskih lanaca (71,72).

S druge strane, faktori koji potječu iz endotela mogu izazvati i vazokonstrikciju. Vazokonstriktori uključuju angiotenzin II (Ang II), tromboksan  $\text{A}_2$ , endotelin-1 (ET-1), prostaglandin  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) i reaktivne kisikove spojeve (ROS) (73,74). Endotelin, vazokonstriktorski peptid izveden iz endotela sastoji od tri strukturno srodna peptida, ET-1, ET-2 i ET-3 (75). U vaskulaturi, proendotelin se oslobađa s bazalne površine endotelne stanice gdje ga membranski vezani enzimi pretvaraju u endotelin. Endotelin nije pohranjen u endotelnim stanicama već se sintetizira *de novo* kao odgovor na različite signale (angiotenzin II, citokini, trombin, itd.) ili fizičke signale (smični stres, hipoksija, itd.) (76–78). Endotelin je snažno vazokonstriktorsko sredstvo s dugotrajnim učincima. Endotelne stanice luče različite signale i medijatore, koji su važni za regulaciju zgrušavanja krvi i funkcije trombocita kako bi spriječili adherenciju i agregaciju trombocita u normalnim fiziološkim uvjetima.  $\text{PGI}_2$  i dušikov oksid NO glavni su antitrombocitni agensi koje konstitutivno izlučuje endotelna stanica (79). Oba medijatora sinergistički povećavaju sadržaj cAMP u trombocitima, čime se sprječava njihova agregacija (80). Sinteza  $\text{PGI}_2$  i NO se povećava kao odgovor na niz agonista (npr. trombin ili bradikinin) ili se izlučuje nakupljanjem trombocita (npr. ADP, serotonin (5-HT) itd.) i služe za ograničavanje stvaranja tromba (81). Kao odgovor na ozljedu tkiva ili hipoksične uvjete, endotelne stanice mogu formirati nove žile procesom koji se naziva angiogeneza (82). Angiogeneza je složeni sekvencijalni proces vazodilatacije, degradacije bazalne membrane, migracije endotelnih stanica, kemotaksije, povećanja vaskularne propusnosti, konačno proliferacije endotelnih stanica i stvaranja krvnih žila. Nekoliko čimbenika rasta i čimbenika

transkripcije kontrolira fino usklađenu ravnotežu angiogeneze. Kapilarni pleksus se remodelira klijanjem, mikrovaskularnim rastom i fuzijom u zreli i funkcionalni vaskularni sloj tijekom angiogeneze (82,83). Angiogeneza također uključuje prodiranje krvnih žila u avaskularne regije tkiva (84).

**Tablica 1.** Čimbenici koji izazivaju vazokonstrikciju i/ili vazodilataciju u krvnim žilama

Vazokonstriktori	Vazodilatatori
<u>Lokalni mehanizmi:</u> pO <sub>2</sub> ↑ Niska temperatura Adrenalin Noradrenalin	<u>Lokalni mehanizmi:</u> pO <sub>2</sub> ↓ NO↑ Povišena temperatura Adenozin K <sup>+</sup> ↑, H <sup>+</sup> ↑, H <sub>2</sub> S↑
<u>Sistemske mehanizmi:</u> Angiotenzin II Vazopresin Serotonin Endotelin A Tromboksan A <sub>2</sub> PG <sub>A2</sub> , PG <sub>f2a</sub> ROS	<u>Sistemske mehanizmi:</u> PGI <sub>2</sub> PGE <sub>3</sub> Endotelin B Bradikinin Kalikrein Histamin Serotonin

NO, kao slobodni radikal, ima sposobnost modificiranja redoks okoline vaskularnih stanica. Koncentracije NO koje proizvodi eNOS daju antioksidativna svojstva vaskularnim stanicama, NO postiže ovaj učinak tako što smanjuje proaterogene oksidacije lipida (85). Primarni mehanizam antioksidativnog djelovanja NO može povećati ekspresiju hemo-oksigenaze, a ovaj enzim smanjuje stvaranje superoksida (O<sup>2-</sup>) i povećava uklanjanje O<sup>2-</sup>. NO stabilizira ekspresiju IκBα. IκBα inhibira aktivaciju NFκB, što je kritičan faktor u aktivaciji i prijanjanju na endotel leukocita koji proizvode reaktivne kisikove vrste (ROS) (86). NO pojačava ekspresiju izvanstanične superoksid dismutaze (ecSOD), a ovaj enzim katalizira redukciju O<sup>2-</sup> u vodikov peroksid (87).

Endotelna disfunkcija, u smislu vaskularnog tonusa, kategorizirana je kao bilo koji fenotip koji naginje prema vazokonstriktorskom profilu (79) i može nastati zbog smanjenja proizvodnje opuštajućih medijatora ili promijenjenog endotelnog odgovora na opuštajuće medijatore. Smanjenjena EDD-a (vazodilatacija ovisna o endotelu) opažena je kod pacijenata koji imaju tradicionalne kardiovaskularne čimbenike rizika kao što je pušenje (88) i prediktor je budućih

kardiovaskularnih bolesti (89). Sveukupna modulacija vaskularnog tonusa ili vazodilatacijski odgovor na ishemijsku stimulaciju surogat je mjera endotelne funkcije.

EDD se obično koristi za određivanje endotelne disfunkcije u modulaciji vaskularnog tonusa. Osim mjerenja EDD odgovora na izravni kemijski podražaj, također se mogu koristiti fiziološki odgovori, odnosno reaktivna hiperemija. Postokluzivna reaktivna hiperemija (PORH) opisuje fenomen u kojem se protok krvi povećava nakon razdoblja arterijske avaskularizacije ili ishemije (90), a djelomično je posljedica EDD-a, ovisno o analiziranom vaskularnom mjestu. Karakteristike protoka krvi, uključujući vršni protok krvi, mjere se prije i nakon hiperemijske okluzije. Mjesta mjerenja mogu uključivati arterije, vene i kapilare korištenjem različitih metoda (91).

### 1.4. Imunološki odgovor

Upala i/ili oksidativni stres induciraju aktivaciju endotela i doprinose njegovom funkcionalnom oštećenju, u konačnici povećavajući rizik od razvoja ranih aterosklerotskih lezija (88, 89). Protuupalni i kardioprotektivni učinci prehrane s dodatkom n-3 PUFA opširno su dokumentirani u nizu studija poput studije na kroničnim bolesnicima kojoj je imala cilj procijeniti učinke istodobne primjene dodataka n-3 PUFA i vitamina E na genski izražaj SIRT1 i PGC1 $\alpha$  te serumske razine antioksidativnih enzima u bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću. Nakon prehranbenog protokola ispitanici koji su konzumirali dodatke prehrani n-3 PUFA (4g / dan) i vitamin E (400 IU / dan) tijekom 2 mjeseca genski izražaj SIRT1 i PGC1 $\alpha$  i ukupni antioksidativni kapacitet značajno im se povećao (94). Nadalje, osim korisnog učinka suplementacije s antioksidansima kod koronarnih bolesnika, suplementacija ima povoljan učinak i u drugim stanjima. Tako su u randomiziranoj studiji na trudnicama (95) istraživači željeli procijeniti učinak dodatka n-3 PUFA i vitamina E na metaboličke profile i ishode trudnoće kod gestacijskog dijabetesa. Pacijentice su nasumično raspoređene i unosile su 1000 mg n-3 PUFA iz lanenog ulja plus 400 IU dodataka vitamina E. Nakon 6 tjedana intervencije, konzumacija n-3 PUFA je rezultirala značajnim porastom ukupnog antioksidativnog kapaciteta i značajnog smanjenja koncentracije malondialdehida u plazmi, a kod novorođenčadi je zabilježena značajno niža učestalost hiperbilirubinemije (95). Isto tako, antioksidativna svojstva funkcionalno obogaćene hrane potvrđena su i na zdravim mladim ljudima u randomiziranim dvostruko slijepim kontroliranim pokusima u kojima su konzumirana funkcionalno obogaćena jaja s n-3 PUFA-om (22). Nakon trojtjednog dijetetskog protokola u kojem su ispitanici konzumirali 1053 mg n-3 PUFA/dan, istraživači su zaključili da funkcionalno obogaćena jaja povoljno djeluju na povećane koncentracije protuupalnih prostanoida i oksilipina. Zabilježili

su i značajne razlike u biljezima aktivacije leukocita (kao što je CD11a /L FA-1) i antioksidativnoj obrani koji su povezani s povećanim unosom n-3PUFA. Konzumacija nutritivno obogaćenih kokošnjih jaja može utjecati na fiziološke procese povezane s oksidativnom ravnotežom. Također je zabilježen i pozitivan učinak proupalnog interferona- $\gamma$  koji se značajno smanjio, a protuupalni interleukin-10 značajno porastao skupini ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja (9, 20, 92). Protuupalna svojstva konzumacije n-3 PUFA potencijalno doprinose poboljšanju vazodilatacije ovisne o endotelu kod zdravih osoba mjerene pomoću Laser doppler flowmetra na koži podlaktice koja su također konzumirali funkcionanu obogaćenu hranu s n-3 PUFA. Pretpostavlja se da n-3 PUFA može poboljšati endotelnu funkciju povećanjem bioraspoloživosti glavnog endotelnog vazodilatatora NO (povećanje proizvodnje NO i/ili smanjenje razine oksidativnog stresa), promjenom izražaja ili aktivnosti drugih vazoaktivni medijatora izvedenih iz endotela, posebno metabolita AA (metaboliti COX: PGI<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>; metaboliti CYP450: epoksieikosatrienske kiseline i 20-hidroksieikosatetraenske kiseline, 20-HETE) (97).

Osim n-3 PUFA, nadoknada spojevima koji posjeduju antioksidativna i protuupalna svojstva, kao što su Se, vitamin E i lutein, u literaturi je pozitivno povezano s potencijalnim poboljšanjima stanja kroničnih pacijenata. Tako su Islam i sur. (98) u sustavnom preglednom članku istraživali potencijal prehrambenih čimbenika na sistemski eritematozni lupus i predložili komplementarne mogućnosti liječenja putem prehrane. Navode kako je uočeno je da niskokalorična i niskoproteinska dijeta s visokim sadržajem vlakana, višestruko nezasićenih masnih kiselina, vitamina, minerala i polifenola sadrži dovoljno potencijalnih makronutrijenata i mikronutrijenata za regulaciju aktivnosti ukupne bolesti putem moduliranje upale i imunoloških funkcija sistemskog eritematoznog lupusa. Kombinacija antioksidanasa poput polifenola i n-3 PUFA može dovesti do trostrukog povećanja aktivnosti glutathion peroksidaze, dvostrukog povećanja antioksidativnog kapaciteta plazme, smanjenja peroksidacije lipida kao i slabljenja uobičajenih biomarkera upale u usporedbi s njihovim pojedinačnim kapacitetima (95).

### 1.5. Prehrambene navike

Stope prekomjerne tjelesne težine i pretilosti dramatično su porasle u posljednjih nekoliko desetljeća i predstavljaju zdravstvenu epidemiju u mnogim područjima svijeta (99). Tjelesna neaktivnost i nezdrave prehrambene navike među glavnim su čimbenicima koji potencijalno imaju negativne učinke na status tjelesne težine u „mladoj“ odrasloj dobi, a posljedično i na buduće zdravlje odraslih (99, 100). Na primjer, većina stanovništva ne konzumira preporučenu

dnevnu količinu voća i povrća, orašastih plodova i sjemenki. S druge strane, konzumacija dodanih šećera, prerađenog mesa i trans masnih kiselina veća je od preporučenog dnevnog unosa (101). Završetkom samog srednjoškolskog razdoblja i prijelaza u akademsko počinje novi niz obrazaca ponašanja povezanih s težinom, poput prekomjerne konzumacije alkohola i niske razine tjelesne aktivnosti (102).

Nezarazne bolesti (NB) kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinom, kronične respiratorne bolesti, dijabetes, pretilost i kognitivna oštećenja među vodećim su uzrocima smrti i invaliditeta u cijelom svijetu, pogađajući stanovništvo u razvijenim zemljama kao i zemljama u razvoju (103). Iako postoje utvrđeni genetski i okolišni čimbenici koji doprinose riziku od NB, promjenjivi čimbenici vezani uz stil života igraju veliku ulogu na individualnoj razini (101, 102). Odabir prehrane uvelike pridonosi riziku od razvoja hipertenzije, hiperkolesterolemije, prekomjerne tjelesne težine / pretilosti i upale, što zauzvrat povećava rizik od bolesti koje su povezane sa značajnim pobolom i smrtnošću, uključujući kardiovaskularne bolesti, dijabetes i rak (106). Doista, značajan porast kroničnih NB ima uzročno - posljedičnu vezu s globalnim prehrambenim obrascima koji postaju sve više zapadnjački (106), karakterizirani visokim razinama masti i prerađenog mesa, zasićenih masti, rafiniranih žitarica, soli i šećera, ali nedostatkom svježeg voća i povrća. Istočna prehrana sadrži cjelovite žitarice, organsku hranu, proteinske obroke s daleko manje soli, šećera, praznih kalorija i škroba od zapadnjačke prehrane. Nedostatak joj je skuplja cijena prehrambenih proizvoda i teže ju je pronaći u usporedbi sa zapadnjačkom prehranom. Međutim, značajno je učinkovitija u prevenciji kronične pretilosti, hipertenzije i raka (105).

Zdravi obrasci prehrane mogu se općenito opisati kao oni koji su bogati hranom koja promiče zdravlje, uključujući hranu biljnog podrijetla, svježe voće i povrće, antioksidanse, orašaste plodove i izvore n-3 PUFA s niskim udjelom zasićenih masti i trans masnih kiselina, proteina životinjskog podrijetla i dodanih/rafiniranih šećera (107).

Mediterranska prehrana temelji se na komponentama tradicionalnih prehrambenih obrazaca euro-mediteranskih zemalja, obuhvaća vrstu hrane koja se konzumira i njihov relativni doprinos dnevnom unosu hranjivih tvari i način života kao što je redovita tjelesna aktivnosti odgovarajući odmor (108). Primarnu osnovu dnevnih obroka u mediteranskoj prehrani čine žitarice poput kruha od cjelovitog zrna, tjestenine, kus-kusa i drugih nerafiniranih žitarica koje su bogate vlaknima te raznovrsno voće i povrće različitih boja i tekstura s visokim udjelom mikronutrijenata, vlakna i fitokemikalija (108–110). Mliječni proizvodi, po mogućnosti

nemasni jogurt, sir ili drugi fermentirani mliječni proizvodi, preporučuju se svakodnevno u umjerenim količinama kao izvor kalcija, koji je potreban za zdravlje kostiju i srca. Maslinovo ulje služi kao primarni izvor dijetalnih lipida i nadopunjuje se maslinama, orašastim plodovima i sjemenkama. Voda (1,5 – 2,0 L/dan ili ~ 8 čaša) preporučuje se kao glavni izvor hidratacije, dok su vino i druga fermentirana alkoholna pića općenito dopuštena u umjerenim količinama, za konzumaciju uz obroke. Riba, bijelo meso i jaja primarni su izvori proteina te mahunarke kao biljni izvor proteina, dok se crveno meso i mesne prerađevine konzumiraju rjeđe i u manjim obrocima (107).

Stoga je cilj ovog doktorata bio utvrditi učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja s četiri hranjiva (n-3 PUFA, vitamin E, selen i lutein) kod zdravih mladih ispitanika.

### 2. HIPOTEZA

Prehrana koja uključuje kokošja jaja obogaćena omega-3 (sinonim: n-3) polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminom E, luteinom i selenom poboljšat će endotelnu funkciju koja će se manifestirati promjenom mikrocirkulacijskoga protoka mjenoga Laser Doppler Flowmetrom (*LDF*) tijekom reaktivne hiperemije kao odgovora na vaskularnu okluziju. Također će smanjiti razinu oksidativnog stresa, proupalnih biljega te biljega endotelne aktivacije, a povećati aktivnost i izažajnost antioksidativnih enzima kod mladih zdravih ispitanika.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

U populaciji zdravih mladih ispitanika:

1. Utvrditi učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitamina E, luteinom i selenom na vaskularnu reaktivnost mikrocirkulacije u odgovoru na reaktivnu hiperemiju u mladih zdravih ispitanika oba spola i utvrditi potencijalne mehanizme vaskularne reaktivnosti.
2. Istražiti utjecaj konzumacije obogaćenih jaja na razinu oksidativnog stresa i ciljanih pro-upalnih te protu-upalnih metabolita n-3 PUFA i n-6 PUFA kod mladih zdravih ispitanika oba spola.

Za svaki od navedenih ciljeva uspoređivat će se vrijednosti ulaznog i završnog mjerenja, odnosno bazalnih vrijednosti i vrijednosti nakon dijetetskog protokola.



### 4. ISPITANICI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije i ispitanici

Protokol i postupci istraživanja usklađeni su sa standardima postavljenim posljednjom revizijom Helsinške deklaracije i odobrilo ih je Etičko povjerenstvo Znanstvenog centra izvrsnosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Cl: 602-04/14-08/ 06; broj: 2158-610714-114) i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Cl: 602-04/20-08/07, Matični broj: 2158-61-07-20147).

Studija je registrirana na Clinical trail pod naslovom: Učinak obogaćenih QUARTET® kokošnjih jaja na kardiovaskularnu funkciju u kardiovaskularnih pacijenata i zdravih osoba. NCT broj: NCT04564690. Ovo je bila randomizirana, prospektivna, placebo kontrolirana intervencijska studija. Protokol studije trajao je 21 dan. Tijekom ta tri tjedna ispitanici su dobili instrukcije da jedu 3 tvrdo kuhana kokošja jaja dnevno (ukupno 63 jaja). Ispitanici su podijeljeni u dvije studijske skupine: kontrolnu skupinu koja je konzumirala obična jaja (CTRL skupina, n = 14) i skupinu koja je konzumirala obogaćena jaja (Nutri4 skupina, n = 20). U odvojenom skupu eksperimenata, 6 ispitanika iz CTRL skupine i 5 ispitanika iz Nutri4 skupine, nasumično odabranih, uzimali su 100 mg indometacina (neselektivni inhibitor ciklooksigenaze (COX) 1 i 2 ) peroralno. Mjerenja Ach potaknute dilatacije i PORH-a ponovljena su nakon 90 minuta u oba studijska posjeta kod grupe ispitanika koji su uzimali 100 mg indometacina. Nutri4 skupina je konzumirala funkcionalno obogaćena jaja (otprilike 3,29 mg/dan vitamina E, 1,85 mg dnevno luteina, 0,06 mg/dan selena i 1026 mg/dan n-3 PUFA-a) 3 jaja dnevno tijekom 3 tjedna, dok je CTRL skupina konzumirala obična kokošja jaja proizvedena na istoj farmi (otprilike 1,79 mg/dan vitamina E, 0,33 mg/dan luteina, 0,05 mg/dan selena i 438 mg/dan n-3 PUFA-a) 3 jaja dnevno tijekom 3 tjedna. Sudionici su regrutirani i uključeni korištenjem anketnog upitnika kako bi zadovoljili kriterije uključanja i isključenja iz studije, a zatim su dobili šifru ZCI-Q-1-br. ili ZCI-Q-2-br., u kojem ZCI-Q- označava naziv projekta koji se proučava ("Znanstveni centar izvrsnosti" u kojem se testiraju kokošja jaja obogaćena s četiri hranjiva tvari: n-3 PUFA, vitamin E, selen i lutein. Broj 1 ili 2 označava skupinu (kontrolnu ili eksperimentalnu- ovisno o jajima koja će se konzumirati), a dodjeljuje ih osoba koja je podijelila jaja. Broj je redni broj ispitanika (1, 2, 3, ...). Sva jaja su bila iste veličine L i proizvedena na farmi peradi Marijančanka d.o.o Marijanci, Hrvatska. Obogaćena kokošja jaja

## 4. ISPITANICI I METODE

proizvedena su prema protokolu istraživačke skupine Fakulteta Agrobiotehničkih znanosti Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, u kojoj je repičino ulje (1,5 %) u krmnim smjesama, kojima se hrane kokoši nesilice, zamijenjeno sa smjesom ribljeg ulja (1,5 %), lanenog ulja (2 %) te mješavinom 0,43 mg/kg selena, 100 mg/kg mješavine vitamina E i luteina. Sadržaj jaja prikazan je u Tablici 2. (111,112).

Svi sudionici studije dobili su upute da jedu tri tvrdo kuhana kokošja jaja (komercijalne veličine L) dnevno tijekom tri tjedna (ukupno 63 jaja). Sudionici su podijeljeni u kontrolnu skupinu (CTRL, N = 14; W/M = 6/8) i Nutri4s skupinu (N = 20; W/M = 9/11). CTRL skupina konzumirala je obična kokošja jaja (sadržaj n-3 PUFA-a: 438 mg/dan, selena: 0,054 mg/dan, luteina: 0,33 mg/dan i vitamina E ~1,79 mg/dan), dok je Nutri4 skupina konzumirala kokošja jaja obogaćena s četiri hranjiva (sadržaj n-3 PUFA-a: 1026 mg/dan, selena: 0,06 mg/dan: luteina: 1,85 mg/dan i vitamina E: 3,29 mg/dan).

**Tablica 2.** Prikazuje sastav masnih kiselina i mikronutrijenata u jajima koja su konzumirali ispitanici.

	Obična jaja	Nutri4 obogaćena jaja
<b>Vitamin E (mg)</b>	0,595	<b>1,098*</b>
<b>Lutein (mg)</b>	0,11	<b>0,616*</b>
<b>Selen (mg)</b>	0,0183	<b>0,02305*</b>
<b>Masne kiseline (mg / 100 g)</b>		
ΣSFA	1566 (346)	1442 (185)
ΣMUFA	1976 (189)	2419 (139)
Σn-6 PUFA	1263 (148)	<b>747 (46)*</b>
LA	1165 (140)	<b>702 ± 43*</b>
AA	89 (9)	<b>44 (4)*</b>
Σn-3 PUFA	146 (20)	<b>342 (25)*</b>
ALA	71 (11)	<b>189 (16)*</b>
EPA	n.d.	<b>19 (2)*</b>
DHA	75 (11)	<b>135 (11)*</b>
Σn-6 / Σn-3 PUFA	8,71	<b>2,18*</b>

Jedno jaje L razreda prosječne težine 68 g, na oko 60 g jestivog dijela. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina (standardna devijacija). n-3 PUFA; ΣSFA—zasićene masne kiseline (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C23:0); ΣMUFA—jednostruko nezasićene masne kiseline (C14:1, C16:1, C18:1n9t, C18:1n9c, C20:1n9, C22:1n9); Σn-6 PUFA—višestruko nezasićene masne kiseline (C18:2n6c, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6, C22:2n6); LA—linolna kiselina (C18:2n6c); AA—arahidonska kiselina (C20:4n6); Σn-3 PUFA—višestruko nezasićene masne kiseline (C18:3n3, C20:3n3, C20:5n3, C22:6n3); ALA—alfa linolenska kiselina (C18:3n3); EPA—eikozapentaenska kiselina (C20:5n3); DHA—dokozaheksaenska kiselina (C22:6n3); \* p < 0,05 kontrola naspram n-3 PUFA.

Nakon regrutiranja, proveden je jednostavan postupak randomizacije izvlačenjem A ili B za svakog ispitanika, koji se odnosio na pripadnost skupini - A (CTRL skupina) ili B (Nutri4 skupina). Rezultat takve randomizacije je razlika u broju ispitanika koja postoji između CTRL i Nutri4 skupine, ali je broj ispitanika u obje skupine zadovoljio veličinu uzorka potrebnu za

## 4. ISPITANICI I METODE

adekvatnu statističku analizu (113). Ispitanici su dobili upute da kuhaju jaja oko 10 minuta prije konzumiranja, svako jutro tijekom trotjednog protokola. Svim ispitanicima je naloženo da uzimaju samo jaja koja su im data za potrebe istraživanja (ukupno 63 jaja) i da ne uzimaju drugu hranu bogatu n-3 PUFA vitaminom E, luteinom i selenom te bilo koju drugu obogaćenu funkcionalnu hranu ili bilo koju drugu suplementaciju tijekom protokola ispitivanja. Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju, Zavoda i Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Dva studijska posjeta i sva dolje opisana mjerenja obavljena su prvog dana i dan neposredno nakon završetka dijetetskog protokola. Sva mjerenja i uzorkovanje venske krvi obavljena su ujutro nakon noćnog posta. Ispitanicima je rečeno da ne obavljaju nikakve naporne aktivnosti tijekom 24 sata prije posjeta i da izbjegavaju unos kofeina ujutro prije dolaska na mjerenja.

U istraživanju su sudjelovale 34 zdrave mlade osobe (N=14 u CTRL skupini i N=20 u Nutri4 skupini) oba spola. Kriteriji prihvatljivosti (uključni kriteriji) ispitanika za studiju uključivali su raspon dobi između 18 i 30 godina, normalan indeks tjelesne mase (BMI; 18,5 - 24,9 kg/m<sup>2</sup>), vrijednosti arterijskog tlaka između 90/60 mmHg i 120/80 mmHg. Isključni kriteriji su bili pušenje, hipertenzija, koronarna arterijska bolest, dijabetes, hiperlipidemija, oštećenje bubrega, cerebrovaskularna i periferna arterijska bolest te uzimanje bilo kakvih lijekova ili tvari koje bi mogle utjecati na endotel. Također, nitko od sudionika nije uzimao obogaćenu funkcionalnu hranu ili n-3 PUFA, lutein, selen i vitamin E u bilo kojem obliku prije ili tijekom provođenja ove studije. Od svakog ispitanika dobiven je pismeni informirani pristanak.

### 4.2. Antropometrijski, hemodinamski i biokemijski parametri

Ispitanicima je izmjerena visina (m) i težina (kg) kako bi se izračunao indeks tjelesne mase (BMI). Opseg struka i bokova, arterijski krvni tlak (BP) i broj otkucaja srca (HR) izmjereni su na početku svakog posjeta nakon 15 minuta odmora u sjedećem položaju pomoću automatiziranog oscilometrijskog sfigmomanometra (OMRON M3, OMRON Healthcare Inc., Osaka, Japan). Konačne vrijednosti BP i HR bile su srednja vrijednost tri ponovljena mjerenja. Uzorci venske krvi uzeti su nakon 15 minuta mirovanja u sjedećem položaju pri svakom posjetu. U uzorcima krvi analizirani su biokemijski i hematološki paramteri: kompletna krvna slika, urea, kreatinin, profil lipida natašte [ukupni kolesterol, kolesterol lipoproteina visoke gustoće (HDL), kolesterol lipoproteina niske gustoće (LDL) i trigliceride], glukozu u krvi natašte i jetrene enzime određene spektrofotometrijskom metodom, hsCRP i transferin

## 4. ISPITANICI I METODE

određeni imunoturbidimetrijom, elektroliti u plazmi određeni potenciometrijskim metodama. Ove analize su rađene na Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek.

### 4.3. Tjelesni sastav i sastav tjelesnih tekućina

Prijenosni analizator impedancije s četiri elektrode (Maltron Bioscan 920-II, Maltron International Ltd.; Rayleigh, Essex, UK) korišten je za određivanje tjelesnog sastava i statusa tjelesnih tekućina. Empirijski izvedene formule (originalni softver proizvođača) korištene su za izračunavanje procijenjenog postotka masti (masne mase %), slobodne masti, postotka unutarstanične vode, postotka izvanstanične vode, ukupnog % vode u sastavu tijela, tjelesne gustoće (kg/L), intersticijske tekućine i tekućine plazme.

### 4.4. Mjerenja serumskog profila masnih kiselina

Profil masnih kiselina u serumu određen je plinskom kromatografijom - tandemskom masenom spektrometrijom (GC-MS/MS), sustavom Thermo Fisher GC Trace 1300 u kombinaciji s TSQ 9000 Triple Quadrupole. Za pripremu standardnih otopina priređena je otopina metil estera masnih kiselina (FAME MIX) kao 30 mg/ml ukupne koncentracije masnih kiselina u metilen kloridu od Supelca (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Prije analize, uzorci su pohranjeni na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i pripremljeni za analizu prema Wang et al. (9). Na 20  $\mu\text{l}$  uzorka seruma u Eppendorf epruveti, dodano je dodatnih 200  $\mu\text{l}$  fiziološke otopine, 1 mL metanola i 2 mL kloroforma i miješano je 10 minuta na rotacijskoj miješalici. Zatim je dodano 500  $\mu\text{l}$  1M NaCl-a i miješano još 2 minute. Nakon miješanja, uzorak je centrifugiran 10 minuta na 3000 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, slojevi su razdvojeni i 1 mL donjeg sloja kloroforma je uzeto u staklenu epruvetu i ispareno do suhog pod strujom dušika. Metilacija masnih kiselina započeta je dodavanjem 1 mL 14% metanolnog borovog fluorida ( $\text{BF}_3$ ) u ispareni uzorak. Uzorak se zatim stavlja na termoblok na  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 45 minuta. Nakon hlađenja doda se 1 ml visoko pročišćene vode i 1 ml heksana i miješa se 2 minute. Nakon odvajanja slojeva, 600  $\mu\text{l}$  gornjeg heksanskog sloja je upareno do suhog. Uzorak je sakupljen sa 600  $\mu\text{l}$  heksana i analiziran. Analiza profila masnih kiselina u serumu provedena je u Bioanalitičkom laboratoriju BIOCentra, BIOCentar – inkubacijski centar za bioznanost, Zagreb, Hrvatska (9).

### 4.5. Mjerenje koncentracije vitamina E u serumu

Koncentracije vitamina E u uzorcima seruma određivane su prema uhdanom protokolu (28). Najprije je dodan apsolutni etanol za denaturaciju serumskih proteina, a ksilen je korišten za odvajanje supernatanta od proteina. Cijela smjesa je centrifugirana na 3000 g tijekom 10 minuta te je zatim odvojen supernatant. U odvojeni supernatant dodan je 2,2-bipiridil i željezo

## 4. ISPITANICI I METODE

(III)-klorid ( $\text{FeCl}_3$ ), što je rezultiralo ružičastom obojenošću. Nakon 2 minute inkubacije, izmjerena je apsorbancija spektrofotometrom (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornija) na 492 nm, a dobivena apsorbancija bila je proporcionalna koncentraciji vitamina E u serumu. Također je napravljena kalibracijska krivulja u pet točaka uz vitamin E kao standard.

### 4.6. Mjerenje koncentracije selena u serumu

Koncentracija selena u serumu mjerena je nakon mikrovalne digestije. Svi uzorci za mjerenje koncentracije Se digestirani su u ultra-čistom  $\text{HNO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (omjer 5:1) na  $180\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 60 minuta u zatvorenom mikrovalnom sustavu CEM Mars 6 (CEM, Matthews, NC, USA). Koncentracije Se u otopinama probavljenih uzoraka seruma određene su spektrometrijom mase induktivno spojene plazme (ICP-MS) (ICP-MS, Agilent 7500a, Agilent Technologies Inc., Kalifornija, SAD). Svaki uzorak seruma na ICP-u analiziran je internom zbirnom kontrolom plazme, a referentni materijal NIST 1567b (pšenično brašno, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, SAD) korišten je za kontrolu analitičke metode. Svi uzorci analizirani su u tri primjerka.

### 4.7. Mjerenje koncentracije luteina u serumu

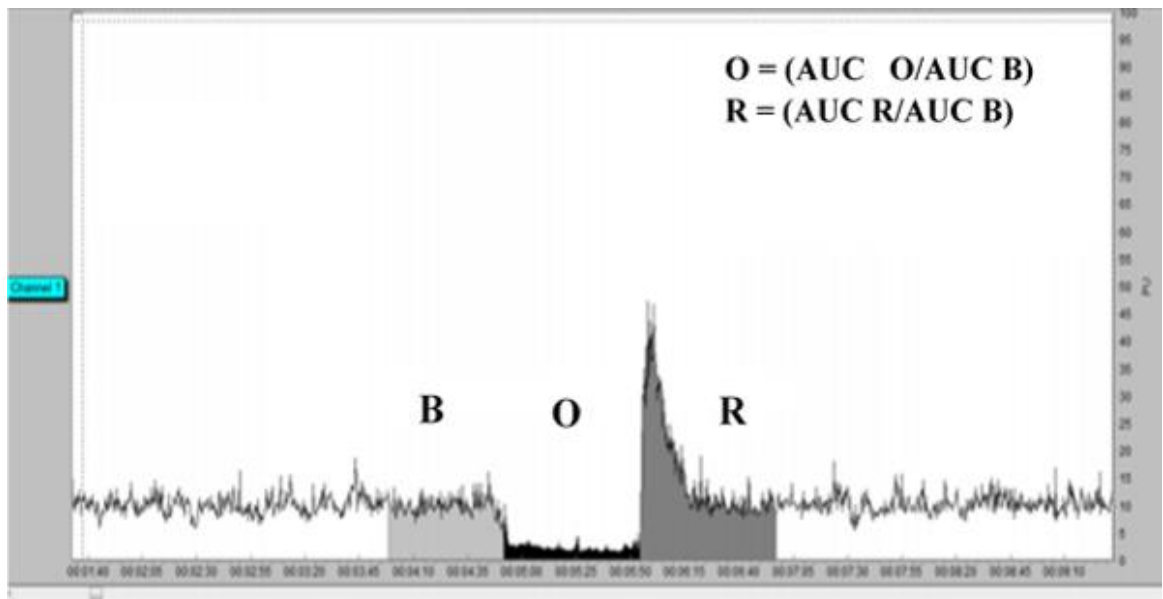
Koncentracije luteina u uzorcima seruma određene su prema protokolu Tzenga i sur. (2004) (114, 115). Uzorcima seruma dodana je deionizirana voda i 0,01% askorbinska kiselina (Gram-mol, GRAM-MOL doo, Zagreb, Hrvatska) otopljena u apsolutnom etanolu (Gram-mol GRAM-MOL doo, Zagreb, Hrvatska) i temeljito promiješana. Heksan (Carlo Erba, CARLO ERBA Reagents GmbH, Milano, Italija) je dodan u smjesu, miješan i centrifugiran na 2500 rpm / 20 min. Supernatant je odvojen i uparen, nakon čega je uslijedilo određivanje koncentracije luteina pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). HPLC kolona visoke rezolucije s end-capedom (Hypersil; veličina čestica  $5\text{ }\mu\text{m}$ ;  $4.6 \times 250\text{ mm}$ ) i C18 analitička kolona (Shim-pack GIST; veličina čestica  $5\text{ }\mu\text{m}$ ;  $250 \times 4,6\text{ mm}$ ) su kupljeni. Za određivanje koncentracija korišten je HPLC LC-30 NEXERA (Shimadzu, Japan, 2018.)

### 4.8. Procjena mikrovaskularne vazodilatacije ovisne o endotelu i endotel - neovisne vazodilatacije

Mjerenje mikrovaskularnog protoka krvi i testovi reaktivnosti provedeni su kod svih ispitanika pomoću laser Doppler flowmetrije (LDF) (MoorVMS-LDF, Axminster, UK), prije i nakon odgovarajućeg protokola prehrane. Osim toga, kako bi se ispitala uloga metabolita enzima COX-1 i COX-2 u mikrovaskularnim odgovorima, u odvojenom setu eksperimenata,

## 4. ISPITANICI I METODE

ponovljeni su testovi mikrovaskularne reaktivnosti kože nakon oralnog unosa 100 mg indometacina (neselektivnog inhibitora COX enzima) u oba studijska posjeta (116). Vazodilatacija mikrocirkulacije kože ovisna o endotelu ispitana je mjerenjem mikrovaskularnog odgovora na vaskularnu okluziju, PORH i na iontoforezom dodani Ach, dok je endotel neovisna vazodilatacija procijenjena iontoforezom natrij-nitroprusida (dilatacija izazvana natrijevim nitroprusidom). Sva mikrovaskularna ispitivanja provedena su prema protokolima koji su detaljno opisani u ranijim publikacijama naše istraživačke skupine (23, 97, 116, 117). *LDF* mjerenja provedena su ujutro nakon noćnog gladovanja, u prostoriji s kontroliranom temperaturom (23,5 °C +/- 0,5 °C). Mikrovaskularni protok krvi izražen je u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama (PU) i opisan kao površina ispod krivulje (AUC) korištenjem originalnog softvera kojeg je osigurao proizvođač (MoorVMS-PC v4.0, Axminster, UK). Mjerenje PORH-a izraženo je kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na početnu vrijednost (R-O%). Endotel ovisna dilatacija i endotel neovisna dilatacija izraženi su kao povećanje protoka nakon primjene acetilkolina ili natrij nitroprusida (SNP) u usporedbi s početnim protokom (prije dijetetskog protokola).



**Slika 5.** Slika prikazuje mjerenje mikrovaskularne reaktivnosti pomoću Laser doppler Flowmetra (MoorVMS-LDF, Axminster, UK); \*bazalni protok (B), okluzija (O), reperfuzija (R), površina ispod krivulje (AUC); (izvor: izradio autor disertacije).

### 4.9. Izolacija i krioprezervacija mononuklearnih stanica periferne krvi

Približno 16 mL pune krvi sakupljeno je u epruvete za venepunkciju od 10 mL koje sadrže EDTA (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, SAD) i

## 4. ISPITANICI I METODE

razrijeđeno s 1x fiziološkom otopinom puferiranom s fosfatom (PBS), omjer 1:1. Razrijeđeni uzorak je nadslojen na Ficoll-Paque® PLUS medij za centrifugiranje (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska). Uzorci su centrifugirani na 800 G 25 minuta. Mononuklearne stanice vidljive su kao mutni prsten (oblačić) koji razdvaja dva sloja - žutu plazmu i bezbojni medij, zatim su sakupljene i dva puta isprane u 1x PBS. Broj stanica i vitalnost procijenjeni su bojenjem s 0,4% otopinom tripan plavog (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i korištenjem Bürker-Türk komore za brojanje. Ohlađeni reagensi i puferi korišteni u izolaciji zagrijani su na sobnu temperaturu (RT, ~ 20-25 °C) prije izolacije. Uzorci su obrađeni unutar tri sata od uzorkovanja.

Za potrebe krioprezervacije korištena je mješavina dimetil sulfoksida (DMSO; Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) i FBS (engl. *fetal bovine serum*) u omjeru 1:9. Kriotubice u kojima se pohranjuje uzorak složene su u Mr. Frosty spremnik za zamrzavanje (Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) koji sadrži izopropilni alkohol i stavljen je u zamrzivač na -80°C na 24 sata prije nego što je uzorak prebačen u označene spremnike za daljnju pohranu.

### 4.10. Proteinska ekspresija enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti

U svrhu određivanja relativnog izražaja proteina iNOS, eNOS, nNOS, COX-1 i COX-2 iz izoliranih mononuklearnih stanica periferne krvi napravljen je Western blott prema uhodanoj metodi u našem laboratoriju (118–120). Homogenizacijski pufer (50 mM HEPES 150 Mm NaCl, 1 Mm EDTA, 10% glicerol, 1% TRIKON-X), koktel inhibitora proteaze 0,4 µl / 100 µl (SigmaAldrich) korišten je za homogenizaciju PBMC-a. Dodano je 200 µl pufera za homogenizaciju da se resuspendira  $1 \times 10^7$  PBMC. Sve se dobro izmiješa na mikseru (vortex) i drži na ledu 3 minute. Nakon toga slijedi centrifugiranje uzoraka tijekom 30 minuta na 15000 x g na 4°C. Supernatant se pipetira za daljnju analizu. Zatim je slijedila priprema uzorka za SDS-PAGE elektroforezu. Uzorci su kuhani u omjeru 1:1 na 95 °C tijekom 5 minuta s Laemmli puferom, kratko centrifugirani (*spin-down*) i nanieseni na gel. Nakon elektroforeze, uzorci su prebačeni na PVDF membranu i zatim inkubirani s primarnim antitijelom preko noći (COX-1 kunić PolyAB, Proteintech Europe, UK, #13393-1-AP, 1:500; COX-2 kunić PolyAB, Proteintech Europe, UK, #12375-1-AP, 1:500; iNOS kunić PolyAB, Novus Biological, SAD, #NB300-605, 1:500; eNOS kunić PolyAB, Novus Biological, SAD, #NB300-500, 1:1000; nNOS kunić PolyAB, Novus Biological, SAD, # NBP1-39681, 1:1000) preko noći na 4°C. Sljedeći dan, membrana je inkubirana s odgovarajućim sekundarnim protutijelom označenim

## 4. ISPITANICI I METODE

peroksidazom hrena (HRP) (kozji anti-zečji HRP, Abcam, UK, ab205718; kozji anti-miš HRP, Santa Cruz Biotechnology, SAD, sc-2005, oba u razrjeđenju 1:7500), nakon čega slijedi kemiluminiscencijska detekcija pomoću Pierce ECL Western Blotting supstrata (ThermoScientific) prema uputama proizvođača. Razine izražaja proteina normalizirane su prema izražaju  $\beta$ -aktina i predstavljene kao relativne razine proteina.

### 4.11. Mjerenje markera za oksidativni stres i antioksidativni kapacitet u serumu

Oksidativni stres mjeren je u serumu svih sudionika, prije i nakon dijetalnog protokola, spektrofotometrijskim mjerenjem produkata peroksidacije lipida (Reaktivne tvari s tiobarbiturnom kiselinom, TBARS), dok je antioksidativni kapacitet mjeren na isti način pomoću sposobnosti plazme za redukciju željeza (FRAP), prema prethodno opisanim protokolima iz našeg laboratorija (23,120). Razine proteina mijeloperoksidaze (MPO) u serumu izmjerene su kod svih sudionika, prije i nakon dijetalnog protokola, komercijalno dostupnim *in vitro* kitom za enzimski imun sorbentni test (ELISA) (Abcam, Cambridge, UK) na kompaktnom čitaču apsorpcije za mikropločice s 96 jažica (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, CA, SAD).

Spektrofotometrijska antioksidativna aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx) i katalaze (CAT) mjerena je prije i nakon dijetetskog protokola iz uzoraka seruma ispitanika pomoću metode za određivanje aktivnosti enzima naše istraživačke skupine (9, 120–122). Aktivnost ispitivanih enzima izražena je kao U (mg proteina)<sup>-1</sup>. Mjerenja su provedena pomoću Lambda 25 UV-Visspektrofotometra s UV WinLab 6.0 softverskim paketom (PerkinElmer for the Better, Waltham, MA, USA) na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

### 4.12. Mjerenje genskog izražaja pomoću rt PCR

Ukupna RNA ekstrahirana je TRI reagensom (Life Technologies, SAD) iz homogeniziranih pohranjenih uzoraka PBMC sudionika prema dostupnim protokolima koji su se prethodno primjenjivali u našem laboratoriju (123). Koncentracije RNA i čistoća uzorka određene su nanofotometrom P300 UV/VIS, IMPLN. Pročišćavanje uzorka i priprema cDNA izvedeni su prema uputama proizvođača Sigma-Aldrich i Applied Biosystems.

Određivanje genskog izražaja sintaze dušikovog oksida (eNOS - slijed: naprijed: 5'-CAACAGCATCTCCTGCTCAGA-3' i obrnuto 5'-CCACTTCCACTCCTCGTAGC-3'; nNOS - slijed: naprijed: 5'-ATTTATBCCTTTCCAGCC-3, i obrnuto 5'-AGGATCCAGGCTTCAGGCTA-3'; iNOS - slijed: naprijed 5'-



## 4. ISPITANICI I METODE

AGAGCCAGAAGCGCTATCAC-3', i obrnuto 5'-TTGAAGTGGTGC ACTCAGCA-3'), antioksidativni enzimi SOD2 (slijed: naprijed: 5'-GGCCTACGTGAACCT, revers 5'-GGCCTACGTGAACCT CAGGTTTGATGGCTTCCAGC-3'), GPx1 (slijed: naprijed: 5'-TATCGAGAATGTGGCGTCCC-3', i obrnuto 5'-TCTTGGCGTTCTCCTGATGC-3') i GPx4 (slijed: naprijed: 5'-TTCCGGTGTAAC3', revers-5' GTGGAGAGACGGTGTCCAAA-3') izveden je kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu (Bio-Rad CFX96) iz pohranjenih PBMC uzoraka sudionika. Ekspresija gena je normalizirana na gen gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH - sekvenca: naprijed 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3', i obrnuto 5'- AATTTGCCATGGGTGGAAT-3').

### 4.13. Dnevnik prehrane

Umjesto standardiziranih obrazaca, upitnik smo prilagodili pretpostavljenim prehranbenim navikama koje prevladavaju na području istraživanja uz mogućnost odabira ponuđenih odgovora u obliku tabelarnog prikaza, a ne ručnog zapisivanja, kako bismo izbjegli nevoljkost volontera prema popunjavanju obrasca i sudjelovanja u istraživanju. Obrazac je radi jednostavnosti i preglednosti koncipiran kao tablica. Tablice su podijeljene na četiri glavna dijela: doručak, ručak, večera i užina. Svaki obrok uključuje hranu i piće. Obroci su podijeljeni na: voće, povrće, mliječne proizvode, meso, ugljikohidrate, žitarice, napitke, slatkiše i orašaste plodove. Način pripreme i veličina porcija uzeti su u obzir ovisno o vrsti hrane. Sudionik popunjava tablicu stavljanjem znaka plus/kvačica na predviđena mjesta prema konzumaciji i pripremi hrane tog dana. Nakon svakog obroka nalazi se odjeljak pod nazivom "Komentari" gdje je potrebno naglasiti je li uzet neki dodatak prehrani koji bi mogao značajno utjecati ili promijeniti unos nutrijenata taj dan. Ako nije navedeno u tablici, ono što je konzumirano također se može napisati u ovom odjeljku. Veličine porcija opisane su kao: male (1/2 šalice / kriška / komad); srednja / normalna porcija (šalica/kriška/komad); velike (2 šalice / kriške / komada).

Nutritivni status i potrošnja energije određivani su i analizirani Nutri Prog-sofverom za nutricioniste i dijetetičare Klinike za endokrinologiju KBC-a Osijek.

### 4.14. Statističke metode

Statističke analize provedene su korištenjem Graph Pad Prism v6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) i Microsoft Excel 2016 (Microsoft Office 365, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

#### **4. ISPITANICI I METODE**

Normalnost distribucija testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina (standardna devijacija (SD)). Studentov t-test i Mann-Whitneyjevi testovi korišteni su za grupne usporedbe, dok su upareni t-test i Wilcoxonov test zbroja ranga korišteni za testiranje razlika između mjerenja unutar grupe. Korelacije između uparenih skupova podataka određene su Spearmanovim rang testom. Razina statističke značajnosti određena je na  $p < 0,05$ .

### 5. REZULTATI

#### 5.1. Antropometrijski, hemodinamski i biokemijski parametri

Nije bilo razlike u dobi sudionika između skupine CTRL i Nutri4 skupine. Ispitanici oba spola iz Nutri4 skupine i CTRL skupine bili su mršavi i imali su slične antropometrijske mjere (BMI i WHR) prije protokola istraživanja (Tablica 3.). Nije došlo do značajnih promjena u BMI ili WHR u s Nutri4 kupini i CTRL skupini nakon dijetetskog protokola. Isto tako nije bilo razlike u krvnom tlaku (SBP, DBP i MAP) između ispitivanih skupina prije i nakon dijetetskog protokola. Nutri4 Skupina imala je značajno veći HR od CTRL skupine prije dijetetskog protokola i nakon trotjednog dijetetskog protokola (Tablica 3.).

Nije bilo razlike između skupina ni u jednom od izmjerenih biokemijskih parametara prije dijetetskog protokola. Konzumacija jaja Nutri4 nije uzrokovala značajnu razliku u serumskoj koncentraciji HDL kolesterola i triglicerida u Nutri4 i CTRL skupini u usporedbi s mjerenjima prije dijetetskog protokola. Međutim, koncentracija LDL kolesterola u serumu je značajno povećana nakon konzumacije jaja u CTRL skupini u usporedbi sa Nutri4 skupinom u kojoj nije bilo promjene u serumskom LDL kolesterolu nakon konzumiranja jaja. Razina željeza u Nutri4 skupini značajno se smanjila (iako je ostala unutar referentnog intervala), dok u CTRL skupini nije bilo značajnih promjena u razinama željeza. Koncentracija glukoze u serumu bila je unutar referentnog intervala u obje skupine, iako je došlo do značajnog povećanja koncentracije glukoze u serumu u Nutri4 ispitanika nakon konzumiranja jaja u usporedbi s CTRL skupinom. U ispitivanim skupinama nije bilo promjena u kreatininskim i uratnim markerima bubrežne funkcije, dok se koncentracija ureje značajno povećala u skupini koja je jela Nutri4 obogaćena jaja u odnosu na CTRL skupinu ispitanika nakon protokola prehrane (također unutar referentnog intervala). Ostali izmjereni parametri bili su slični među skupinama i na njih nije utjecao dijetetski protokol.

#### 5.2. Sastav tijela i tjelesnih tekućina

Sastav tijela i tjelesnih tekućina prije i nakon dijetetskog protokola prikazan je u Tablici 4. Postotak masnoće značajno se povećao u Nutri4 skupini nakon konzumacije obogaćenih jaja. Nije bilo značajne razlike u % mase bez masti, % ukupne tjelesne vode, % izvanstanične vode, unutarstaničnoj vodi, tekućini plazme, intersticijskoj tekućini ili gustoći tijela prije i nakon dijetetskog protokola unutar CTRL skupine i Nutri4 skupine. Nije bilo razlike između skupina prije i nakon odgovarajućeg dijetetskog protokola.

## 5. REZULTATI

**Tablica 3.** Učinci običnih (CTRL skupina) i Nutri4 (Nutri4 skupina) obogaćenih kokošjih jaja na antropometrijske, hemodinamske i biokemijske parametre

Parametri	CTRL		P <sup>a</sup>	Nutri4		P <sup>a</sup>
	prije	poslije		prije	poslije	
N (Ž/M)	14 (6 / 9)			20 (7 / 13)		-
Godine	22 (3)			22 (2)		-
BW (kg)	78 (17)	77 (15)	0.875	72 (15)	72 (15)	0.815
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,3 (3,6)	24 (3,2)	0.888	23,5 (3,1)	23,5 (3,1)	0.901
WHR	0,84 (0,07)	0,84 (0,07)	0.889	0,81 (0,10)	0,81 (0,10)	0.806
SBP (mmHg)	110 (17)	108 (15)	0.813	109 (11)	104 (14)	0.805
DBP (mmHg)	72 (12)	69 (4)	0.856	78 (16)	72 (6)	0.456
MAP (mmHg)	85 (7)	82 (7)	0.425	88 (13)	84 (6)	0.276
HR (beats per minute)	65 (8)	65 (9)	0.657	78 (12)	<b>78 (11) †</b>	<b>0.756</b>
Eritrociti (x10E12/L)	4,7 (0,4)	4,8 (0,4)	0.556	4,9 (0,5)	4,9 (0,5)	0.550
Hemoglobin (g/L)	141 (14)	141 (16)	0.856	143 (12)	142 (13)	0.840
Hematokrit (%)	39 (3)	32 (16)	0.453	40 (3)	38 (10)	0.455
Leukociti (x10E9/L)	6,1 (1,9)	6 (1,2)	0.846	6,3 (1,7)	5,8 (1,9)	0.876
Trombociti (x10E9/L)	201 (65)	216 (64)	0.445	233 (32)	221 (32)	0.475
Urea (mmol/L)	5 (1,5)	5,5 (1,3)	0.756	5 (1)	5,7 (1,6)*	<b>0.022</b>
Kreatinin (μmol/L)	86 (18)	87 (14)	0.685	78 (13)	75 (12)	0.512
Urat (μmol/L)	330 (67)	318 (88)	0.469	296 (77)	289 (58)	0.455
Aspartat aminotransferaze (U/L)	25 (8)	25 (6)	0.896	22 (6)	22 (5)	0.896
Alanin aminotransferaze (U/L)	23 (8)	22 (7)	0.756	20 (15)	23 (12)	0.623
Gamma – glutamil transferaze (U/L)	14 (4)	14 (4)	0.999	17 (12)	18 (11)	0.899
Natrij (mmol/L)	139,6 (2,2)	139 (2,5)	0,896	139,7 (2,2)	139,2 (2,3)	0.801
Kalij (mmol/L)	4,2 (0,3)	4,3 (0,3)	0.846	4,1 (0,2)	4,2 (0,3)	0.795
Željezo (μmol/L)	16,4 (6,7)	13,8 (7,1)	0.453	21,3 (6,3) *	15,5 (6,3)	<b>0.011</b>
Transferin (g/L)	2,73 (0,56)	2,78 (0,71)	0.755	2,62 (0,34)	2,66 (0,32)	0.803
Glukoza (mmol/L)	4,6 (0,3)	4,6 (0,5)	0.856	4,4 (0,4)	4,9 (0,8)*	0.025
hsCRP (mg/L)	0,6 (0,5)	1,1 (1,4)	0.569	1,1 (0,9)	2,3 (0,9)	0.426
Kolesterol (mmol/L)	4,3 (0,8)	4,6 (1,5)	0.463	4,5 (0,5)	4,7 (0,7)	0.555
Trigliceridi (mmol/L)	0,8 (0,3)	0,9 (0,3)	0.456	1,1 (0,5)	0,9 (0,3)	0.526
HDL kolesterol (mmol/L)	1,5 (0,4)	1,4 (0,4)	0.763	1,3 (0,2)	1,3 (0,2)	0.765
LDL kolesterol (mmol/L)	2,5 (0,7)	2,9 (0,8) *	<b>0.017</b>	2,8 (0,4)	2,9 (0,7)	0.245

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina (standardna devijacija). BMI- indeks tjelesne mase; WHR- omjer struka i bokova; SBP- sistolički krvni tlak; DBP- dijastolički krvni tlak; MAP- srednji arterijski tlak; HR- otkucaji srca; HDL- lipoprotein visoke gustoće; LDL- lipoprotein niske gustoće. p<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom); Upareni t test; † P<0,05 razlika između skupina; CTRL skupina; Nutri4 skupina

**Tablica 4.** Utjecaj jaja na sastav tijela i status tjelesne tekućine u kontrolnoj skupini i Nutri4 skupini

Parametri	CTRL		p <sup>a</sup>	Nutri4		p <sup>a</sup>
	prije	poslije		prije	poslije	
Masa bez masnoća (%)	78,24 (7,31)	79,06 (7,70)	0.756	79,31 (7,08)	78,40 (6,87)	0.702
Mast (%)	21,76 (7,31)	20,94 (7,70)	0.625	20,69 (7,08)	<b>21,6 (6,87) *</b>	<b>0.024</b>
Ukupna tjelesna voda (%)	56,19 (4,62)	56,91 (5,28)	0.832	56,92 (5,20)	55,98 (4,02)	0.845
Izvanstanična voda (%)	41,22 (1,59)	41,77 (5,5)	0.775	41,37 (1,30)	42,08 (1,4)	0.720
Unutarstanična voda (%)	58,77 (1,41)	58,22 (1,68)	0.985	58,62 (1,30)	57,91 (3,47)	0.625
Tekućina plazme (L)	3,53 (0,84)	3,55 (0,99)	0.834	3,75 (0,82)	3,85 (0,84)	0.849
Intersticijske tekućine (L)	12,36 (2,92)	12,41 (3,45)	0.912	13,30 (2,90)	13,47 (2,94)	0.926
Gustoća tijela (kg/L)	1,05 (0,02)	1,05 (0,15)	0.944	1,05 (0,02)	1,05 (0,02)	0.975

Aritmetička sredina (standardna devijacija). p<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom

### 5.3. Profil masnih kiselina, koncentracija vitamina E, selen i luteina u serumu

Koncentracija EPA značajno se povećala u Nutri4 skupini nakon konzumacije jaja u odnosu na početnu vrijednost i u usporedbi s vrijednostima CTRL skupine. Koncentracija DHA značajno se povećala u Nutri4 skupini nakon konzumiranja funkcionalno obogaćenih jaja. Koncentracija vitamina E u serumu značajno se povećala u Nutri4 nakon dijetetskog protokola, dok je u CTRL skupini ta koncentracija ostala statistički nepromijenjena nakon konzumacije jaja (Tablica 5.). Koncentracija selen nakon trotjednog dijetalnog protokola ostala je statistički nepromijenjena u CTRL skupini i u skupini Nutri, dok je koncentracija luteina značajno povećana u Nutri4 nakon konzumacije jaja (Tablica 5.)

**Tablica 5.** Profil masnih kiselina, koncentracija vitamina E, selen i luteina u serumu

Parametri		CTRL		p <sup>a</sup>	Nutri4		p <sup>a</sup>
		prije	nakon		prije	nakon	
	SFA (μmol/L)						
	C4:0 Maslačna kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
	C6:0 Kaproinska kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
	C8:0 Kaprilna kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
	C10:0 Kaprinska kiselina	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-
	C11:0 Undecilna kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
	C12:0 Laurinska kiselina	<LOQ	20.80	-	<LOQ	<LOQ	-
	C13:0 Tridecilna kiselina	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-
	C14:0 Miristinska kiselina	40,4 (9,1)	36,3 (6,6)	0.126	50,5 (32,2)	40,3 (11,1)	0.111
	C15:0 Pentadecilna kiselina	12,2 (1,6)	12,7 (1,3)	0.863	13,7 (2,4)	27,9 (39,6)	0.096
	C16:0 Palmitinska kiselina	1258 (350)	1304 (332)	0.256	1295 (431)	1242 (314)	0.234

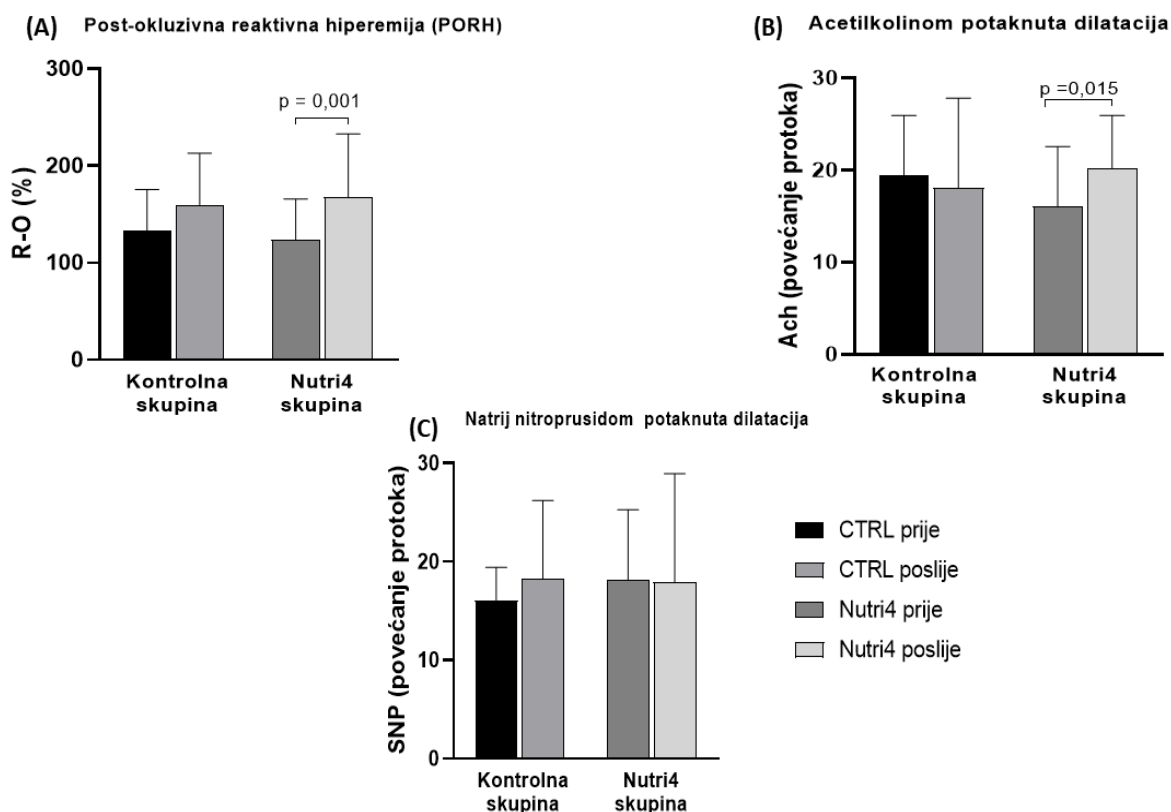
## 5. REZULTATI

(Nastavlja se na sljedećoj stranici)

Parametri		CTRL		p <sup>a</sup>	Nutri4		p <sup>a</sup>
		prije	nakon		prije	nakon	
SFA (μmol/L)							
	C17:0 Margarna kiselina	13,5 (1,7)	13,6 (2,6)	0.456	15,8 (3,8)	14,7 (4,0)	0.456
	C18:0 Stearinska kiselina	404 (111)	416 (137)	0.552	515 (140)	491 (132)	0.592
	C20:0 Arahidna kiselina	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-
	C21:0 Heneikozanoična kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
	C22:0 Behenska kiselina	<LOQ	10.2	-	<LOQ	<LOQ	-
	C23:0 Trikozanoična kiselina	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-
	C24:0 Lignocerinska kiselina	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	-
PUFA (μmol/L)							
n-5	C14:1[cis-9] Miristoleinska kiselina	<LOQ	<LOQ	-	11	<LOQ	-
	C15:1[cis-10] Cis-10-pentadecenska kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
n-7	C16:1[cis-9] Palmitoleinska kiselina	58,3 (14,9)	54,1 (17,7)	0.463	<b>95,4 (59,3) †</b>	73,6 (34,8)	0.102
	C17:1[cis-10] cis-10-heptadecenska kiselina	N/F	N/F	-	11,7 (3,6)	10,7 (1,3)	
n-9	C18:1[trans-9] Elaidinska kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
	C18:1[cis-9] Oleinska kiselina	691 (218)	656 (135)	0.596	872 (393)	758 (279)	0.426
	C20:1[cis-11] 11-eikosenska kiselina	7,8 (2,0)	6,2 (0,6)	0.325	8,8 (4,4)	9,2 (2,2)	0.367
	C22:1[cis-13] Eruka kiselina	9,2 (0,06)	9,1 (0,7)	0.825	7,4 (1,0)	7,9 (0,9)	0.746
	C24:1[cis-15] Nervonska kiselina	<LOQ	8.7 ± 0.6	-	7.2 ± 0.7	7.8 ± 0.7	0.856
n-6	C18:2[trans-9,12] Linoelaidinska kiselina	N/F	N/F	-	12,5	N/F	-
	C18:2[cis-9,12] Linolna kiselina	1148 (300)	1170 (298)	0.126	1223 (290)	1277 (461)	0.179
	C18:3[cis-6,9,12] gama-linolenska kiselina	19,9 (6,7)	17,2 (3,7)	0.523	27,3 (13,8)	23,2 (7,4)	0.387
	C21:2[cis-11,14] Eikozadienska kiselina	8,6 (1,9)	9,5 (2,6)	0.265	12,3 (5,8)	11,1 (3,6)	0.426
	C20:3[cis-8,11,14] Dihomo-gama-linolenska kiselina	54,1 (16,2)	54,1 (12,9)	0.756	78,7 (42,6)	69,3 (42,0)	0.332
	C20:4[cis-5,8,11,14] Arahidonska kiselina	298 (52)	354 (53)	0.101	390 (127)	369 (106)	0.321
	C22:2[cis-13,16] 13,16- Dokozadienična kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
n-3	C18:3[cis-9,12,15] alfa-linoleinska kiselina	17,2 (7,7)	16,0 (5,1)	0.665	16,4 (6,3)	21,1 (8,0)	0.375
	C20:3[cis-11,14,17] 11,14,17- Eikozatrienska kiselina	N/F	N/F	-	N/F	N/F	-
	C20:4[cis-5,8,11,14] Eikosa-5,8,11,14,17-pentaenska kiselina	15,1 (6,9)	14,1 (4,6)	0.456	13,7 (2,9)	<b>18,6 (5,6) *†</b>	<b>0.012</b>
	C22:6[cis-4,7,10,13,16,19] cis-4,7,10,13,16,19Dokozaheksaenoična kiselina	54 (19,9)	<b>89,9 (37,7) *</b>	0.026	65,6 (25,1)	<b>132,1 ± 64,7 *</b>	<b>0.001</b>
n-6/n-3 ratio		11,1	8,3	0.109	10,5	<b>6,3 *</b>	<b>0.021</b>
Vitamin E (μg/mL)		10,27 (3,67)	10,3 (3,68)	0.785	6,63 (3,22)	<b>11,26 (2,87) *</b>	<b>0.007</b>
Selen (μg/L)		62,44 (9,37)	66,37 (10,09)	0.456	64,88 (17,65)	68,88 (3,082)	0.136
Lutein (μmol/L)		0,199 (104)	0,199 (104)	0.896	0,153 (0,073)	<b>0,232 (0,078) *</b>	<b>0.019</b>
Aritmetička sredina (standardna devijacija); PUFA – polinezasićene masne kiseline SFA – zasićene masne kiseline; <LOQ - ispod granice kvantifikacije; N/F- nije pronađen*). p <sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom); Upareni t test; † P<0,05 razlika između skupina; CTRL skupina, Nutri4 skupina							

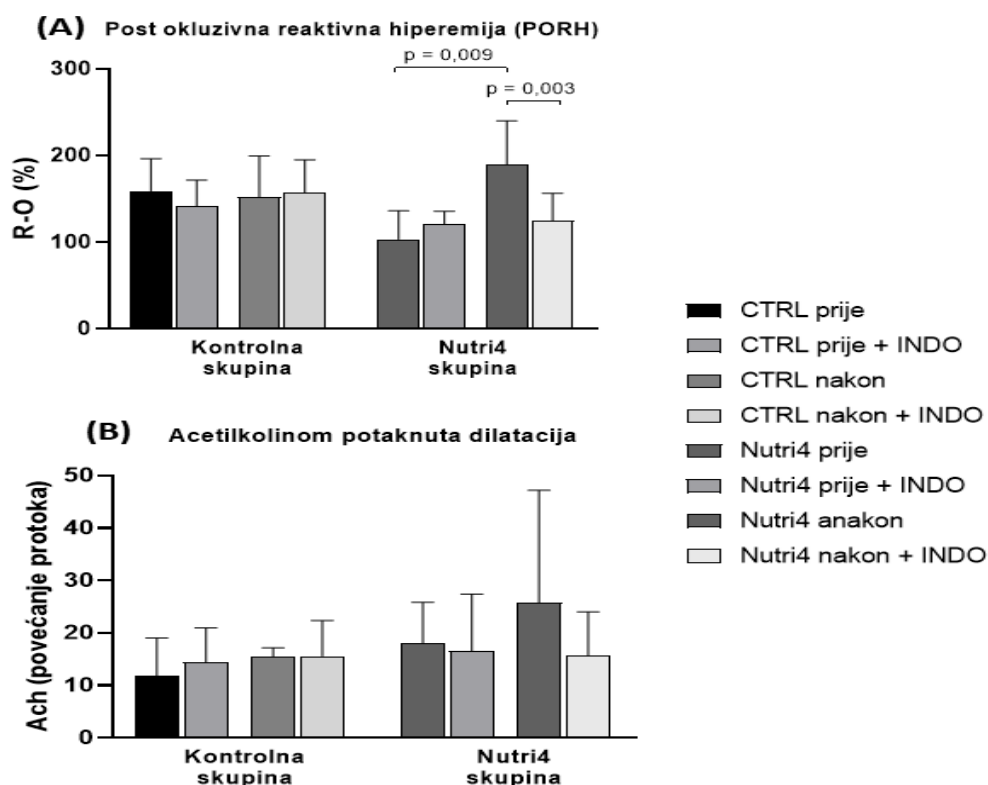
#### 5.4. Vazodilatacija ovisna o endotelu i vazodilatacija neovisna o endotelu u mikrocirkulaciji kože podlaktice

Postokluzijska reaktivna hiperemija (PORH) je značajno povećan u Nutri4 skupini nakon protokola u usporedbi s CTRL skupinom (Slika 6 A), dok nije bilo značajne promjene PORH-a u CTRL skupini nakon trotjednog dijetetskog protokola (Slika 6 A). Do značajnog povećanja Ach potaknute dilatacije došlo je u Nutri4 skupini nakon dijetetskog protokola, dok konzumacija običnih jaja nije utjecala na ACh potaknutu dilatacija u CTRL skupini (Slika 6 B). Dilatacija izazvana SNP-om bila je slična između skupina prije i nakon odgovarajućih dijetetskog protokola (Slika 6 C). PORH je značajno smanjen nakon primjene 100 mg indometacina (7 A), Ach potaknuta dilatacija je ostala nepromijenjena u skupini Nutri4, dok u CTRL skupini nije došlo do značajnih promjena u PORH-u i ACh potaknutoj dilataciji nakon primjene 100 mg indometacina (7 B).



**Slika 6.** Postokluzivna reaktivna hiperemija, ACh potaknuta dilatacija i SNP potaknuta dilatacija

(A); ACh potaknuta dilatacija (B) prije i poslije dijetetskog protokola; SNP potaknuta dilatacija (C) prije i poslije dijetetskog protokola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (standardna devijacija); Razina značajnosti\*  $p < 0,05$ ; upareni t-test prije i poslije dijetetskog protokola unutar skupine (CTRL skupine ili Nutri4 skupine).



**Slika 7.** Postokluzivna reaktivna hiperemija (A) i ACh potaknuta dilatacija (B) prije i poslije dijetetskog protokola sa ili bez primjene 100 mg indometacina.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (standardna devijacija); Razina značajnosti unutar skupine \* $p < 0,05$  upareni t-test prije i poslije dijetetskog protokola s primjenom indometacina. Razina značajnosti unutar skupina †  $p < 0,05$  upareni t-test prije i poslije dijetetskog protokola bez primjene indometacina.

### 5.5. Multipleksna i Simpleksna kvantifikacija adhezijskih molekula, koncentracija pro- i protuupalnih citokina u serumu

Serumske koncentracije pro- i protuupalnih citokina (IL-17A, IL-10) i TNF- $\alpha$  u CTRL i Nutri4 skupini, prije i nakon dijetetskog protokola, prikazane su Tablici 6. Nije bilo značajnih promjena IL-10 ili TNF- $\alpha$  (Slika 8 A i 8 B) u bilo kojoj od skupina nakon odgovarajućeg dijetetskog protokola. Koncentracija IL-17A značajno je smanjena u serumu nakon konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja (Nutri4 skupina) u usporedbi s vrijednostima prije konzumacije jaja (Slika 8 C).

Serumske koncentracije ICAM-1, VCAM-1, E-selektina, endoglina-1 prije i nakon konzumacije CTRL jaja i Nutri4 obogaćenih jaja, prikazane su u Tablici 5.5. Nisu uočene značajne promjene u CTRL, ni u Nutri4 skupini niti između skupina prije ili nakon dijetetskog protokola u usporedbi s vrijednostima prije konzumacije jaja.



## 5. REZULTATI

**Tablica 6.** Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske koncentracije IL-17A, IL-10, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1, E-selektin i endoglin-1 nakon trotjednog dijetetskog protokola.

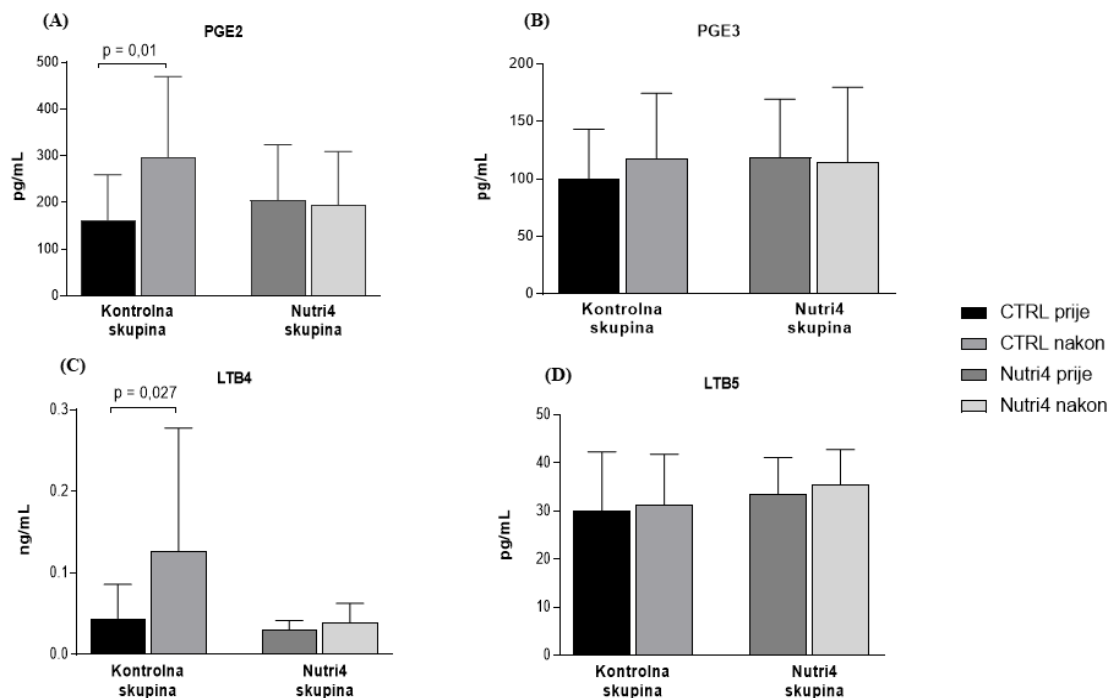
Parametar	CTRL		p <sup>a</sup>	Nutri 4		p <sup>a</sup>
	prije	poslije		prije	poslije	
IL 17-A	2,99 (0,47)	2,92 (0,75)	0.785	2.78 (0,60)	2,54 (0,31)*	0.026
IL 10	2,30 (1,36)	2,32 (0,93)	0.456	2.62 (0,93)	2,61 (0,73)	0.312
TNF alpha	4,94 (0,56)	5,27 (0,56)	0.236	5,13 (0,55)	5,44 (0,97)	0.156
sICAM - 1	2964 (1221)	2679 (1560)	0.109	3185 (1271)	3281 (1636)	0.136
sVCAM - 1	5217 (1756)	5793 (1212)	0.137	4082 (2590)	6211 (491)	0,126
E selektin	195 (39)	205 (40)	0.363	195 (37)	204 (40)	0.263
Endoglin 1	4129 (946)	3611 (1179)	0.126	3416 (731)	4029 (528)	0.095

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina (standardna devijacija). TNF- $\alpha$  – tumor nekroza faktor alfa; IL-17A - interleukin 17A; IL-10 - interleukin 10; ICAM-1- međustanična adhezijska molekula 1; sVCAM-1—topiva adhezijska molekula vaskularnih stanica 1). p<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom).

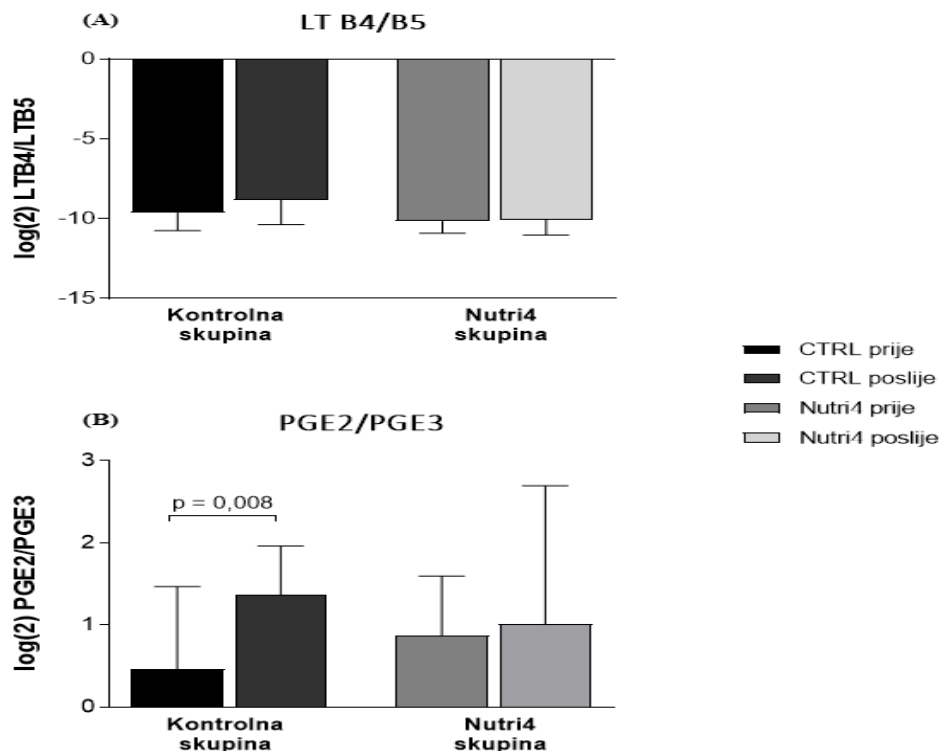
### 5.6. Promjene serumskih koncentracija pro- i protuupalnih lipidnih medijatora koji potječu iz n-6 (AA) i n-3 (EPA) masnih kiselina nakon dijetetskog protokola

Koncentracije proupalnih eikozanoida (LTB<sub>4</sub> i PGE<sub>2</sub>) iz AA u serumu i oksilipina koji sprječavaju upalu (LTB<sub>5</sub> i PGE<sub>3</sub>), prije i nakon dijetetskog protokola prikazani su na Slici 8. Serumske koncentracije PGE<sub>2</sub> (Slika 8 A) značajno se povećale nakon konzumacije običnih kokošnjih jaja, dok ovaj učinak nije uočen nakon konzumacije Nutri4 obogaćenih jaja. Koncentracija proupalnog LTB<sub>4</sub> (Slika 8 C) u serumu značajno se povećala u CTRL skupini nakon dijetetskog protokola dok je u Nutri4 skupini ostala nepromijenjena. Koncentracije protuupalnog LTB<sub>5</sub> u serumu ostale su nepromijenjene u obje skupine u usporedbi s početnim vrijednostima (Slika 8 D). Omjeri leukotriena B<sub>4</sub>/B<sub>5</sub> (Slika 9 A) i prostaglandina E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> (Slika 9 B) izračunati su i uspoređeni u svim mjerenjima. Oba omjera ostala su nepromijenjena u Nutri4 skupini, dok se omjer prostaglandina E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> značajno povećao u CTRL skupini.

## 5. REZULTATI



**Slika 8.** Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske koncentracije lipidnih medijatora. Porostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> (A); porostaglandin E<sub>3</sub>, PGE<sub>3</sub> (B); leukotrien B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> (C); leukotrien B<sub>5</sub>, LTB<sub>5</sub> (D); nakon dijetetskog protokola. t-test za zavisne uzorke: razina značajnosti : \*  $p < 0,5$ .



**Slika 9.** Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćene kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na omjer leukotriena B<sub>4</sub>/B<sub>5</sub> (A) i prostaglandina E<sub>2</sub>/E<sub>3</sub> (B) u serumu nakon dijetetskog protokola. t-test za zavisne uzorke; razina značajnosti \*  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

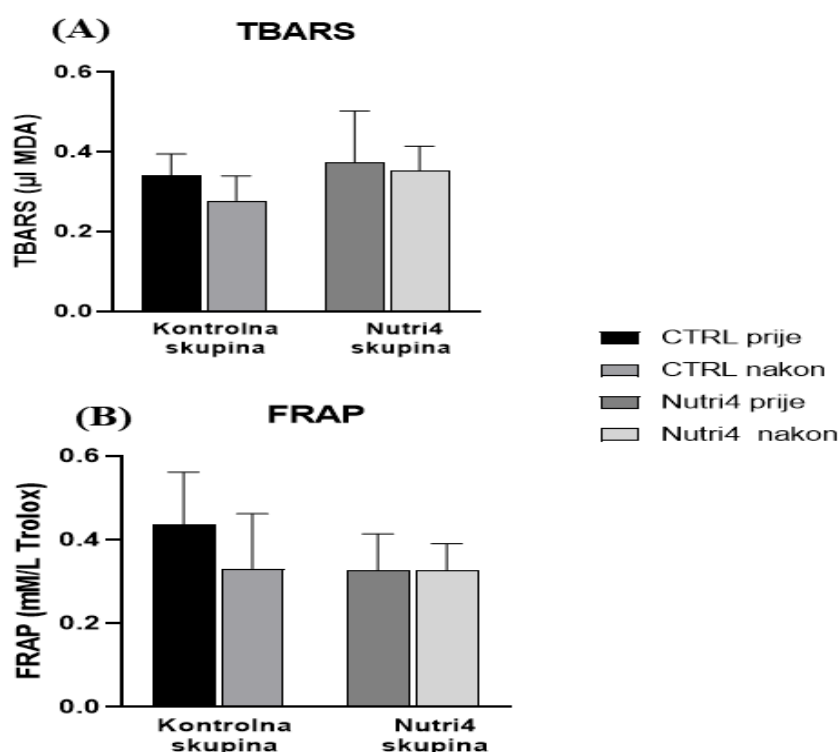
### 5.7. Oksidativni stres i antioksidativni kapacitet nakon protokola prehrane

Tri tjedna konzumacije jaja nisu značajno promijenile serumske vrijednosti TBARS-a ili FRAP-a ni u CTRL skupini ni u Nutri4 skupini u usporedbi s odgovarajućim početnim vrijednostima mjerenja (Slika 10).

Vrijednosti MPO u serumu su značajno povećane u Nutri4 skupini nakon konzumacije obogaćenih jaja u odnosu na početne vrijednosti (Slika 11). Vrijednosti MPO u CTRL skupini ostale su nepromijenjene nakon konzumacije običnih jaja.

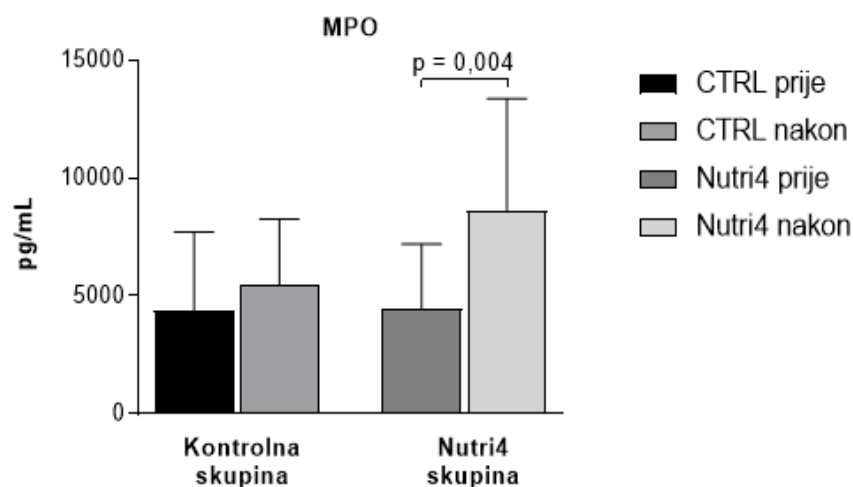
Aktivnost antioksidativnih enzima SOD, GPx i CAT u serumu nisu se značajno promijenile nakon dijetetskog protokola u obje skupine (Tablica 7.).

Kod relativnog genskog izražaja mRNA značajno je porastao genski izražaj nNOS-a (Slika 12 F) iz PBMC sudionika u Nutri4 skupini nakon dijetetskog protokola u usporedbi s osnovnim razinama (Slika 12). Genski izražaj ostalih mRNA antioksidativnih enzima ostao je nepromijenjen kod obje skupine ispitanika.



**Slika 10.** Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske razine oksidativnog stresa reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline, TBARS (10 A); i antioksidativnog kapaciteta sposobnosti plazme da reducira željezo, FRAP (10 B); nakon trojtjednog dijetetskog protokola.

## 5. REZULTATI

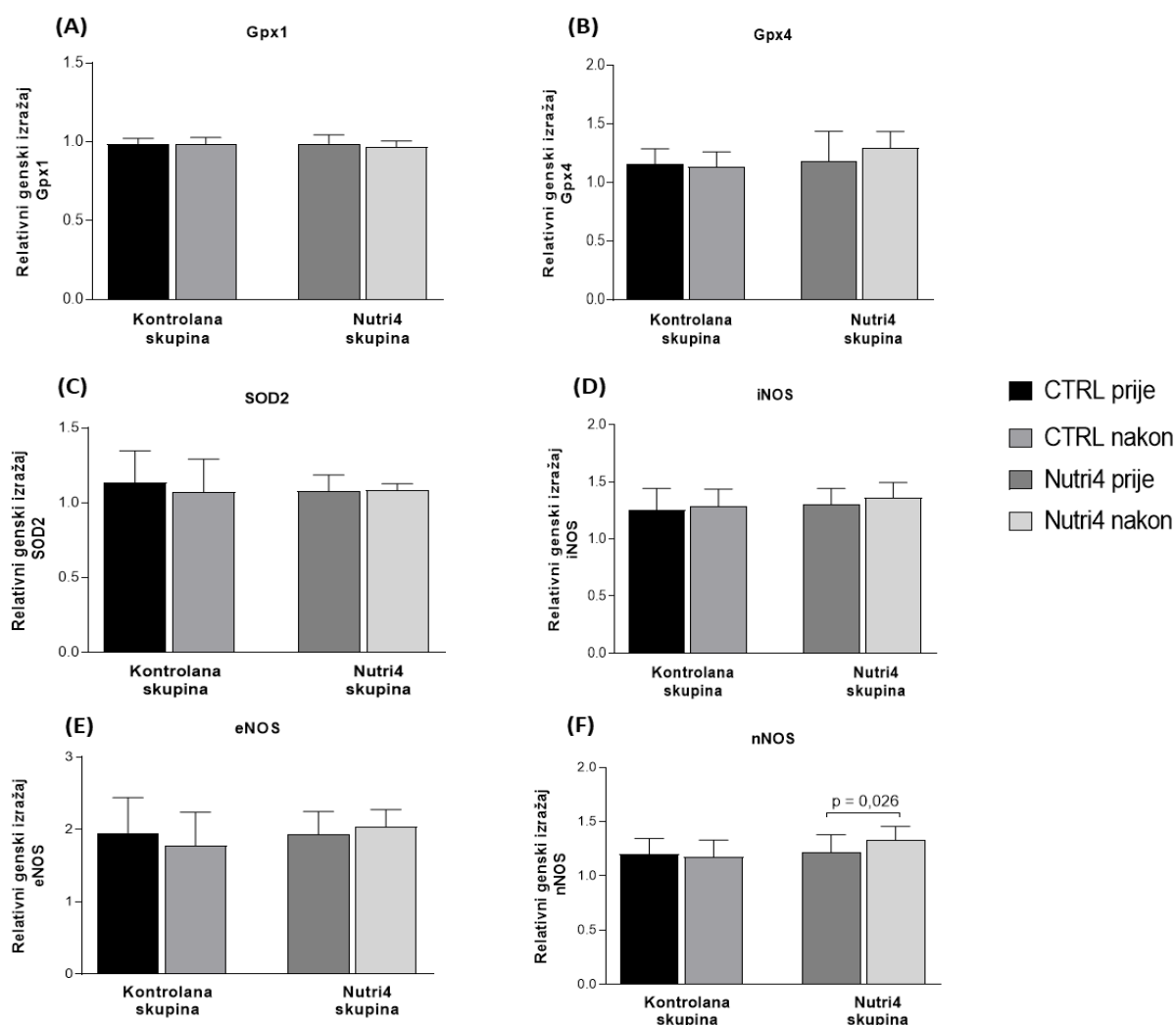


**Slika 11.** Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćene kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na serumske razine mijeloperoksidaze (MPO) nakon trotjednog dijetetskog protokola. t-test za zavisne uzorke; razina značajnosti \*  $p < 0,05$ .

**Tablica 7.** Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih jaja (Nutri4 skupina) na serumsku antioksidativnu aktivnost

Parametar	CTRL		p <sup>a</sup>	Nutri 4		p <sup>a</sup>
	prije	poslije		prije	poslije	
SOD U (mg/P) <sup>-1</sup>	7,76 (0,56)	7,61 (0,45)	0.456	8,04 (0,75)	7,65 (0,53)	0.512
GPx U (mg/P) <sup>-1</sup>	0,02 (0,004)	0,02 (0,001)	0.575	0,02 (0,002)	0,02 (0,002)	0.489
CAT U (mg/P) <sup>-1</sup>	3,91 (1,34)	4,95 (2,95)	0.266	4,72 (1,56)	6,48 (3,14)	0.156

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost (standardna devijacija). SOD, superoksid dismutaza; GPx, glutation peroksidaza; CAT, katalaza; CTRL skupina, Nutri4 skupina.



**Slika 12.** Utjecaj konzumacije običnih (CTRL skupina) i obogaćenih jaja (Nutri4 skupina) na relativni genski izražaj proteina uključenih na oksidativni stres i vazoreaktivnost iz PBMC nakon trotjednog dijetetskog protokola. Glutation peroksidaza 1, GPx1 (12 A); Glutation peroksidaza 4, GPx4 (12 B); Superoksid dismutaza 2, SOD2 (12 C); Inducibilna sintaza dušikovog oksida, iNOS(12 D); Endotelna sintaza dušikovog oksida ,eNOS (12 E); Neuralna sintaza dušikovog oksida, nNOS (12 F) iz PBMC nakon trotjednog dijetetskog protokola. t-test za zavisne uzorke; razina značajnosti  $p * <0,05$ .

### 5.8. Analiza povezanosti biokemijskih i antropometrijskih mjerenja, serumskih koncentracija lipidnih medijatora te biljega oksidativnog stresa i aktivnosti / izražaja antioksidativnih enzima

Provedena je analiza povezanosti kako bi se procijenio odnos između svih mjerenih parametara: biokemijskih i antropometrijskih mjerenja, serumskih koncentracija lipidnih

## 5. REZULTATI

medijatora dobivenih od PUFA, citokina, adhezijskih molekula, parametara oksidativnog stresa i aktivnosti / izražaja antioksidativnih enzima. Rezultati su sljedeći: BMI sudionika istraživanja pozitivno je povezan s razinama triglicerida u serumu u kontrolnoj skupini ( $r = 0,643$ ;  $p = 0,0001$ ) i s WHR-om u skupini 4Nutri ( $r = 0,550$ ;  $p = 0,0002$ ).

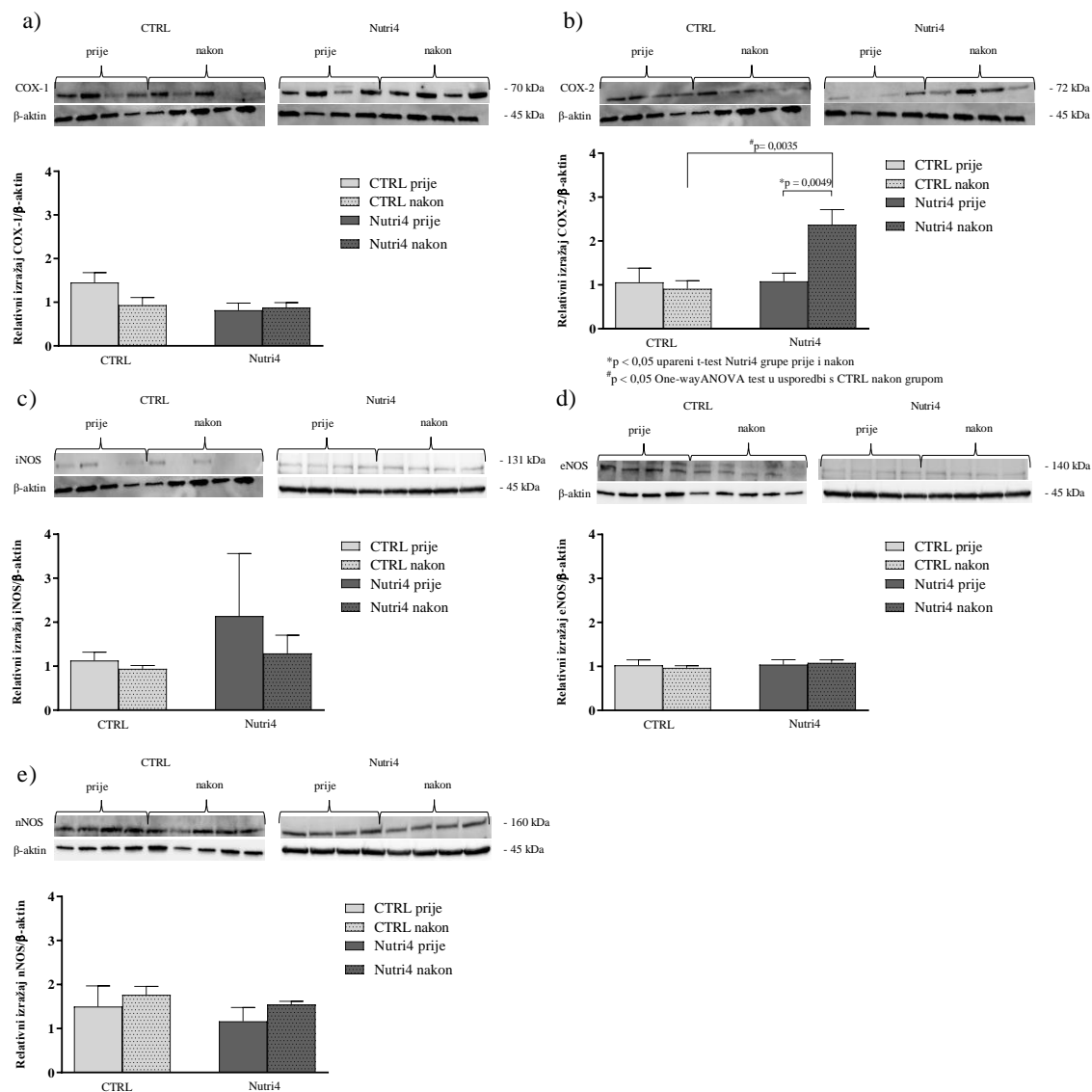
U kontrolnoj skupini, koncentracije MPO u serumu pozitivno su povezane s koncentracijama PGE2 u serumu ( $r = 0,646$ ;  $p = 0,002$ ) i negativno s aktivnošću SOD ( $r = -0,590$ ,  $p = 0,009$ ). Nadalje, koncentracije lipidnih medijatora PGE2 i LTB4 pozitivno su povezane nakon redovite konzumacije jaja ( $r = 0,546$ ,  $p = 0,002$ ). Također je postojala značajno pozitivna povezanost između serumskih koncentracija TNF- $\alpha$  i ICAM-1 ( $r = 0,587$ ;  $p = 0,02$ ), kao i između E-selektina i LDL-kolesterola ( $r = 0,643$ ;  $p = 0,004$ ). Uočena je jaka pozitivna povezanost između nNOS i iNOS u kontrolnoj skupini ( $r = 0,796$ ;  $p < 0,001$ ).

U Nutri4 skupini, koncentracije TNF- $\alpha$  u serumu su značajno negativno povezane s koncentracijama ICAM-1 ( $r = -0,665$ ;  $p = 0,003$ ) dok su pozitivno povezane s izražajem iNOS ( $r = 0,585$  ;  $p = 0,007$ ). Uočena je značajna negativna povezanost između serumskih koncentracija IL-17A i endoglina ( $r = -0,627$  ;  $p = 0,005$ ), te serumskih IL-17A i HDL-kolesterola ( $r = -0,432$  ;  $p = 0,045$ ), dok je IL-17A u serumu pozitivno je povezana s antioksidativnim potencijalom u uzorcima (FRAP) ( $r = 0,445$  ;  $p = 0,038$ ). Izražaj nNOS iz PBMC Nutri4 skupine negativno je povezana s kolesterolom ( $r = -0,458$  ;  $p = 0,01$ ) i razinama LDL-kolesterola u serumu ( $r = -0,464$  ;  $p = 0,009$ ).

### 5.9. Proteinski izražaj enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti

Do značajnog povećanja proteinskog izražaja došlo je u COX-2 proteinu u Nutri4 skupini u usporedbi s mjerenjem prije dijetetskog protokola i u usporedbi s CTRL skupinom nakon konzumacije kokošnjih jaja (nakon dijetetskog protokola). Nije bilo značajnih razlika u proteinskom izražaju nNOS, iNOS, eNOS i COX-1 ni u jednoj ispitivanoj skupini (Slika 13.).

## 5. REZULTATI



**Slika 13.** Relativni proteinski izražaj i reprezentativni blotovi. (a) Ciklooksigenaza 1 (COX-1); (b) Ciklooksigenaza 2 (COX-2); (c) Inducibilna sintaza dušikovog oksida (iNOS); (d) Endotelna sintaza dušikovog oksida (eNOS); i (e) Neuralna sintaza dušikovog oksida (nNOS) - u izoliranim mononuklearnim stanicama periferne krvi, određenih Western blot metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (standardna devijacija); Razina značajnosti \* $p < 0,05$ ; upareni t-test prije i nakon dijetetskog protokola, Razina značajnosti između skupina; # $p < 0,05$  jednosmjerni ANOVA test

### 5.10. Prehrambene navike kod zdravih mladih ispitanika

Pomoću standardiziranog upitnika prehrane ispitane su prehrambene navike ispitanika. U skupini ispitanika 29,17% osoba konzumira 5 i više obroka u danu. Vidljivo je kako nema statistički značajne razlike po spolu kod osoba koje preskaču jedan od obroka. Dnevne preporuke za unos voća i povrća iznose 5 jedinica po osobi. 54,2% ispitanika konzumira tri i manje jedinica voća i povrća dnevno. Pomoću Mann-Whitney U-testa uspoređen je unos voća i povrća prema spolu gdje nema statistički značajne razlike u konzumaciji navedenih namirnica. 12,5% ispitanika nije konzumiralo voće ili povrće za vrijeme provedbe istraživanja. Kroz naše istraživanje ispitanici su bili pitani o konzumaciji cjelovitih žitarica kao visokovrijednog izvora vlakana. 25,0% ispitanika nikada ne konzumira cjelovite žitarice u svojoj prehrani, dok ih svakodnevno konzumira 12,5% (18,2% muških i 7,7% ženskih ispitanika). 29,2% ispitanika u svojoj prehrani nekoliko puta tjedno ima zastupljeno nešto od proizvoda bogatih n-3 PUFA, dok ih 16,7% svakodnevno konzumira nešto od navedenih namirnica. 91,7% ispitanika navodi kako redovito u prehrani imaju zastupljene fermentirane mliječne proizvode, 50% ispitanika nešto od navedenih proizvoda konzumira svakodnevno (t-test,  $p = <0,05$  nema statistički značajne razlike po spolu). 16,7% ispitanika ne konzumira slatkiše, dok ih na dnevnoj razini konzumira 41,7%. 37,5% ispitanika ne zadovoljava dnevne preporuke za unosom vode, dok 20,8% ispitanika većinu tekućine unosi kroz konzumaciju sokova. 25,0% ispitanika navodi kako dnevno konzumira 2 kave. 29,2% ispitanika unosi više proteina (36,4% muških ispitanika i 23,1% ženskih ispitanika).



### 6. RASPRAVA

Ovo istraživanje je po prvi put ispitalo učinke konzumacije funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja (obogaćenih s četiri hranjiva; n-3 PUFA, vitamin E, lutein i selen) na vazodilataciju ovisnu i neovisnu o endotelu u mikrocirkulaciji zdravih mladih ispitanika. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinke konzumacije funkcionalno obogaćene hrane, u obliku obogaćenih jaja na koncentraciju n-3 PUFA u serumu te omjer n-6/n-3 PUFA za koji je utvrđeno da ima različite benefite na ljudski organizam. Nadalje, osim n-3 PUFA jaja su obogaćena i s ostala tri važna antioksidansa koji imaju važanu ulogu u održavanju oksidativne ravnoteže u ljudskom organizmu.

Ovim istraživanjem smo potvrdili da funkcionalnim obogaćenim jajima (n-3 PUFA, vitamin E, lutein i selen) možemo unijeti značajne razine n-3 PUFA u organizam te time smanjiti omjer n-6/n-3 PUFA što ima pozitivne učinke na vazodilataciju ovisnu o endotelu. Opaženi učinci konzumacije funkcionalne hrane na mikrovaskularnu reaktivnost se potencijalno mogu pripisati COX-2 proizvedenim metabolitima n-3 PUFA, a što je podržano povećanim izražajem COX-2 proteina zabilježenim nakon konzumacije Nutri4 jaja.

#### 6.1. Učinci konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na mikrovaskularnu funkciju

Kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok smrti u svijetu, a prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije uzrokuju i do 31% svih smrtnih slučajeva u svijetu. Jedan od glavnih čimbenika rizika povezanih s kardiovaskularnim bolestima je endotelna i vaskularna disfunkcija koja uzrokuje oštećenje vaskularne relaksacije i reaktivnosti (124). To potvrđuje i studija Schächinger i sur. (124) u kojoj su kod 147 koronarnih pacijenata procijenili vazoreaktivnost pomoću vasodilatatora acetilkolina (vasodilatacija ovisna o endotelu). Uz to je procjena vazoreaktivnosti načinjena testom simpatičke aktivacije hladnog pritiska na dlan ispitanika i dilatacije kao odgovor na nitroglicerina. Bolesnici koji su bolovali od različitih kardiovaskularnih bolesti (nestabilna angina, infarkt miokarda, perkutana transluminalna koronarna angioplastika, koronarna premosnica, ishemijski moždani udar ili revaskularizacija periferne arterije) imali su značajno oslabljene vazodilatatorske odgovore na povećan protok krvi. Nadalje, vaskularni protok krvi reguliran je složenim prilagodbama arteriolarnog tonusa i otpora mikrocirkulacije. Oštećenje mikrovaskularne funkcije dovodi do disfunkcije organa u bilo kojem tjelesnom sustavu, a samo oštećenje endotelne funkcije može dovesti do ateroskleroze i infarkta miokarda (125). Poznato je da se NO oslobađa kao parakrini relaksant iz vaskularnog endotela i ima ključnu ulogu u modulaciji mikrovaskularnog tonusa i

## 6. RASPRAVA

regionalnog protoka krvi te da njegov nedostatak može dovesti do razvoja srčanih oboljenja (126). Tako su u studiji Katz i sur. (127) pratili biomarkere endotelne funkcije u sustavnoj arterijskoj cirkulaciji (protokom posredovana dilatacija (FMD) u brahijalnoj arteriji) i plućnoj cirkulaciji (izdisana produkcija NO tijekom submaksimalnog vježbanja) kod 259 pacijenata tijekom 841 dana. Kod ispitanika sa smanjenom proizvodnjom NO bilo je zabilježeno 18 smrtnih ishoda i jedna hitna transplantacija tijekom srednjeg razdoblja praćenja od 396 dana. Stoga su došli do zaključka da su smanjena dilatacija i produkcija NO u izdahu bili povezani s povećanim rizikom od smrti ili hitne transplantacije. Na sami razvoj i tijek kardiovaskularnih bolesti utječu brojni čimbenici poput nepromijenjivih čimbenika (dob, spol, genetsko nasljeđe) i onih na kojih možemo utjecati, promjenjivi čimbenici (tjelesna neaktivnost, loše prehrabene navike, povišen krvni tlak, dijabetes tipa 2, dislipidemija, pretilost) (128). Stoga se u zadnje vrijeme sve više daje pažnje zdravoj prehrani zbog povezanosti između prehrabnenih navika i rizika nastanka kardiovaskularnih bolesti. Jedna od prvih kliničkih studija koja je dokazala ovu vezu je studija "Studija sedam zemalja" (129). Pokazala je povezanost između loših prehrabnenih navika (hrana bogata zasićenim masnoćama) i nastanka ishemijske bolesti srca (128).

Dobro je dokumentirano da vazokonstriksijski prostaglandini izvedeni iz n-6 PUFA posreduju u oslabljenim odgovorima ovisnim o endotelu u stanjima kao što su hipertenzija i visok unos soli hranom (130). S druge strane, n-3 PUFA se natječu s n-6 PUFA za puteve razgradnje i proizvodnju vazoprotektivnih metabolita (130). Npr. natječu se za proizvodnju prostaglandina i drugih medijatora proizvedenih aktivnošću COX enzima (131). U slučaju većeg omjera n-6 /n-3 PUFA, stvaraju se prostaglandini serije 2 (PGI<sub>2</sub>), leukotrieni serije 4 (LTB<sub>4</sub>) i tromboksani B serije 2 (TXB<sub>2</sub>), koji imaju vazokonstriksijske učinke, djeluju kao aktivatori trombocita i pokazuju proupalni potencijal (131). Ako omjer ide prema višim koncentracijama n-3 PUFA, tada dominira proizvodnja protuupalnih i vazodilatacijskih medijatora kao što su prostaglandini serije 3 (PGI<sub>3</sub>), leukotrieni serije 5 (LTB<sub>5</sub>) i tromboksani serije 3 (TXA<sub>3</sub>) (132). U ovom istraživanju došlo je do značajnog povećanja serumske koncentracije EPA i DHA, kao i smanjenja omjera n-6 / n-3 PUFA i povećane serumske koncentracije vitamina E i luteina u Nutri4 skupini. Rezultati ove disertacije potvrdili su i naša prethodna istraživanja u kojim su ispitanici konzumirali 1g n-3 PUFA u funkcionalno obogaćenim jajima te je zabilježena povišena koncentracija LTB<sub>5</sub>, kao i da konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja osigurava nutrijente za povećanje hranjivih tvari u krvi i potencijalno mijenja ravnotežu prostaglandina i leukotriena (10,96). To ima važan utjecaj na mikrovaskularnu reaktivnost i mikrocirkulacijski

## 6. RASPRAVA

protok krvi, budući da su PORH i Ach potaknuta dilatacija značajno poboljšani u Nutri4 skupini nakon unosa obogaćenih jaja s 1093 mg/dan n-3 PUFA, dok nije bilo promjena u kontrolnoj skupini. Ti dobiveni rezultati su u skladu sa studijom Stupin A i sur. gdje je Ach potaknuta dilatacija nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih 777 mg/dan n-3 PUFA značajno povećana (97). Time rezultati sugeriraju da mehanizmi pojačanog PORH mogu biti povezani s povećanom proizvodnjom COX metabolita, vjerojatno preko COX-2 puta, budući da je peroralna primjena indometacina, neselektivnog blokatora COX-1,2 oslabila PORH, a izražaj COX-2 proteina je povećan u Nutri4 skupini. Zanimljivo je da endotelni selenoproteini kontroliraju ravnotežu vaskularnog tonusa održavanjem ravnoteže superoksidni anion/NO, te sintezu eikosanoida reguliranjem aktivnosti COX-1, COX-2 i lipoksigenaze (10,132). U endotelu, NO izveden iz eNOS-a ima središnju ulogu u regulaciji protoka krvi i održavanju endotelne integriteta. Aktivnost eNOS i nNOS regulirana je unutarstaničnim kalcijem koji zauzvrat povećava aktivnost NOS i proizvodnju NO. Isto tako nNOS ima važan utjecaj na autoregulaciju lokalnog protoka krvi kroz izravne učinke na vaskularne glatke mišiće (133). To potvrđuje i studija Bachetti i sur. (134) u kojima su ispitivali endotelne stanice s citomiksinom (humani faktor nekroze tumora-alfa, interferon-gama i endotoksin E. coli) te su testirali aktivnost nNOS i eNOS mjerenjem pretvorbe L-arginina u L-citrulin s 1-(2-trifluorometilfenil)imidazolom (TRIM). Protein nNOS pridonio je ukupnoj proizvodnji L-citrulina jer je TRIM selektivno i ovisno o dozi smanjio sintezu L-citrulina u citosolnoj, ali ne i čestičnoj frakciji HUVEC-a. Time su zaključili da je funkcionalni nNOS-a ko-eksprimiran s tipom endotelne NOS-a u HUVEC-u, što ukazuje na moguću ulogu nNOS-a u regulaciji protoka krvi i da je ko-lokaliziran s proteinom eNOS. Nadalje, Seddon i sur (135). proveli su ispitivanje uloge nNOS-a u lokalnoj regulaciji krvožilnog protoka krvi kod zdravih ispitanika. Infuzija nNOS-specifičnog inhibitora S-metil-L-tiocitrulina (SMTC) u brahijalnu arteriju uzrokovala je smanjenje bazalnog protoka ovisno o dozi. Učinak SMTC-a ukinut je kofuzijom supstrata NO sintaze L-arginina, ali D-arginin nije utjecao na njega. Slično smanjenje bazalnog protoka postignuto je i s neselektivnim inhibitorom NO sintaze N(G)-monometil-L-argininom (L-NMMA). Kod doza koje su proizvele usporedivo smanjenje bazalnog protoka, samo L-NMMA ihibira vazodilataciju izazvanu acetilkolinom, međutim, i SMTC i L-NMMA inhibirali su vazodilatacijski odgovor podlaktice. Time su zaključili da je bazalni protok krvi u podlaktici kod ljudi reguliran još i s NO porijeklom od nNOS-a, za razliku od povećanja protoka krvi stimuliranog acetilkolinom, koje je, kao što je prethodno pokazano, prvenstveno posredovano eNOS-om. Ovi podaci pokazuju da vaskularni nNOS ima izrazitu lokalnu ulogu u fiziološkoj

## 6. RASPRAVA

regulaciji ljudskog mikrovaskularnog tonusa. Vaskularna funkcija često je modulirana i oksidativnim stresom, ROS, koji često smanjuje izražaj NOS. Peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) nastaje kao rezultat uklanjanja NO pomoću ROS. Rezultirajući  $\text{ONOO}^-$  ne samo da oksidira DNK, proteine i lipide, već također ometa važne vaskularne signalne putove. Stoga je poznato da povećanje ROS-a i naknadno povećano stvaranje  $\text{ONOO}^-$  smanjuju biorasplošivost NO i uzrokuju endotelnu disfunkciju (136). Selen kao esencijalni element u tragovima koji je neophodan za razne metaboličke procese, uključujući zaštitu od oksidativnog stresa i pravilan rad kardiovaskularnog sustava. Svojom ugradnjom u selenoproteine, od vitalnog je značaja za održavanje optimalnog kardiovaskularnog zdravlja, budući da su selenoproteini uključeni u brojne ključne procese, uključujući oksidativni stres, redoks regulaciju (137) što potkrepljuje i istraživanje Jucha i sur. (138) koju je činilo je 59 uzastopnih pacijenata hospitaliziranih zbog infarkta miokarda, liječenih primarnom perkutanom koronarnom intervencijom, a nedostatak selena nađen je u većine bolesnika s infarktom. Osim selena, iznimnu kardioprotektivnu ulogu ima i vitamin E i njegova uključenost u upali, homeostazi lipida i stabilnosti aterosklerotskog plaka (139). To su potvrdili sustavnim pregledom Nguyen i sur. (140) u randomiziranim kontroliranim ispitivanjima odraslih pacijenata odaci pokazuju da je dodatak vitamina E značajno smanjio VCAM-1, ICAM-1 C-reaktivni protein rezultati sugeriraju da suplementacija vitaminom E može pomoći u ublažavanju oksidativnog stresa te vaskularne i sistemske upale. Karotenoidi poput luteina su antioksidansi s potencijalnim protuupalnim svojstvima, štoviše suplementacija karotenoidima može modulirati imunološki odgovor (141). Dok su Chung RWS i sur. u studiji na 136 bolesnika (142) uočili povezanost kardiovaskularnih bolesti s koncentracijama IL-6 čije su PBMC 24 h tretirali s 25  $\mu\text{mol}$  luteina.

Prethodno smo pokazali da niske koncentracije unosa selena (0,030 mg/kg) mogu uzrokovati povećani oksidativni stres i smanjeni odgovor na Ach potaknutu dilataciju kao odgovor u štakora (143). Također, selen je bitan i za homeostazu endotelne stanice što potvrđuje studija (144) na animalnom modelu Hyc- inducirane endotelne disfunkcije koji su suplementirani sa selenom 2 g/kg/dan tijekom jednog tjedna. Relaksacija je mjerena pomoću izoliranih aortalnih prstena te je značajno povišena i iz čega se može zaključiti da selen štiti od homocisteinom izazvane disfunkcije. Nadalje, prekursori antioksidansa, poput selena, poznati su da pružaju zaštitu od razvoja nekoliko bolesti povezanih s oksidativnim stresom, uključujući hipertenziju. Tako su u komparativnoj presječnoj studiji Adriani i sur. (145) proveli istraživanje utjecaja razine konzumacije selena kod hipertenzivnih i normotenzivnih žena te su dobili značajnu razliku u razinama unosa selena između normotenzivnih i hipertenzivnih skupina gdje je unos

## 6. RASPRAVA

selena bio na strani normotezivne skupine. Nadalje, pasivno pušenje i razina stresa u hipertenzivnoj skupini bili su značajno viši od onih u normotenzivnoj skupini. Ovi rezultati podupiru našu hipotezu da selen može imati zaštitnu ulogu u vaskularnim bolestima. Povezanost serumskih vrijednosti selena s prevalencijom periferne arterijske bolesti potvrđuje studija (146) od 2062 muškaraca i žena iz SAD-a u dobi od 40 godina ili starijih koji su sudjelovali u Nacionalnom ispitivanju zdravlja i prehrane. Regresijskim modelima, prevalencija bolesti perifernih arterija smanjivala se s povećanjem razine selena u serumu do 150-160 ng/mL. Osim kardioprotektivne uloge selena, suplementacija selenom je i imunostimulirajuća, što se mjeri širokim rasponom parametara uključujući proliferaciju T stanica, aktivnost NK stanica, funkcije urođenih imunoloških stanica i mnogih drugih, a ovisi o osnovnom statusu selena u organizma (59). Najjači se učinci mogu vidjeti kada suplementacija podigne razinu selena s nedovoljne na odgovarajuću razinu (60).

Budući da su jaja obogaćena nutrijentima s antioksidativnim svojstvima (vitamin E, lutein i selen), može se nagađati da se dio korisnih učinaka na mikrovaskularni protok krvi može pripisati promjeni oksidativnog stresa i antioksidativnih obrambenih mehanizama. Primjerice, Barić i sur. (23) pokazali su da je uporaba vitamina E (800 IU/dan) i C (1000 mg/dan) sprječava povećani oksidativni stres i oštećenje funkcije mikrocirkulacije kod ispitanika na HS dijete. Međutim, u ovom doktoratu, serumski markeri oksidativnog stresa nisu promijenjeni prehranbenim protokolima.

Tijekom trotjednog dijetetskog protokola procijenjeni su biokemijski, antropološki i hemodinamski parametri. Iako su neki od njih (npr. željezo, kreatinin i glukoza) značajno promijenjene nakon dijetalnog protokola, sve uočene promjene bile su unutar referentnog intervala i kao takve nisu fiziološki značajne. Slično, u CTRL skupini došlo je do značajnog povećanja LDL-a nakon trotjednog dijetetskog protokola, međutim, malo iznad referentnih vrijednosti. Nadalje, konzumacija jaja nije promijenila koncentraciju jetrenih enzima ili hsCRP, što ukazuje na nedostatak njihovih potencijalnih štetnih učinaka.

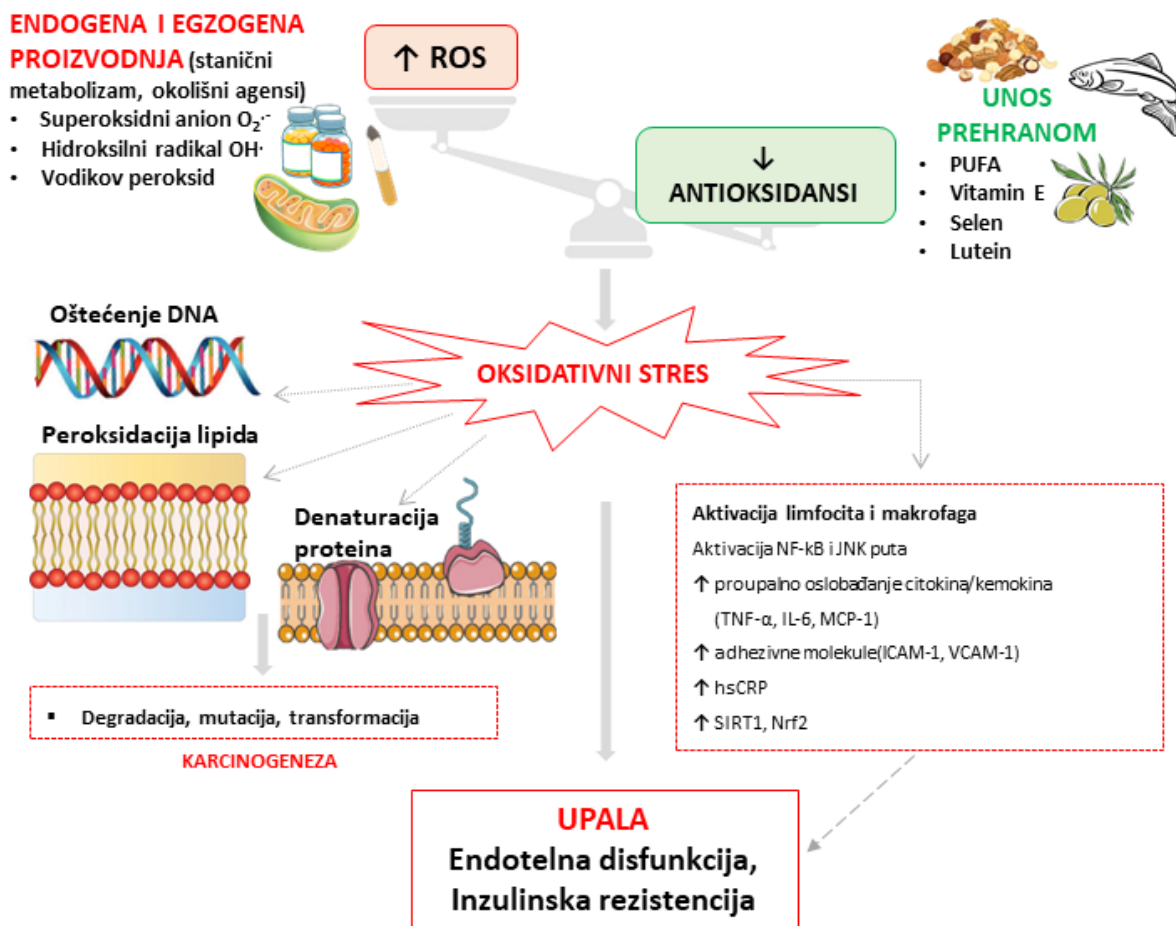
Pod dislipidemijom se najčešće ističu koronarna bolest srca, akutni infarkt miokarda, ishemijska bolest srca, a prehranbene navike mogu značajno utjecati na lipoproteine u serumu (147, 148). Pokazalo se da u bolesnika s hipertrigliceridemijom n-3 PUFA u dozama od 2 do 4 grama dnevno snižavaju trigliceride za 25-30%, dok se ukupni kolesterol ne mijenja (149,150). U dvostruko slijepoj kontroliranoj studiji Tousoulisa i sur. dodatak n-3 PUFA (46% EPA i 34% DHA) od 2 grama tijekom 12 tjedana poboljšala je endotelnu funkciju i krutost

## 6. RASPRAVA

arterija u pacijenata s metaboličkim sindromom (151). Isto tako, dugotrajna konzumacija EPA (1600 mg/dan) povećava vazodilataciju neovisnu o NO i o endotelu u bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću (152). Ovi su rezultati u skladu s našim prethodnim istraživanjem na zdravim ispitanicima u kojima je konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA pokazala povoljan učinak na mikrovaskularnu reaktivnost, endotelnu vazodilataciju i krvni tlak, kao i povoljna protuupalna svojstva (97,153). Stoga konzumacija funkcionalne hrane s korisnim omjerom n-6 /n-3 PUFA i s povećanim sadržajem n-3 PUFA, zajedno s drugim nutrijentima, može poslužiti kao novi način prevencije kardiovaskularnih bolesti. Ovo je potkrijepljeno rezultatima ove studije koja je pokazala značajno povećanu serumsku koncentraciju n-3 PUFA, luteina i Se i smanjeni omjer n-6 /n-3, čak i kod zdravih mladih sudionika.

### 6.2. Protuupalni učinci funkcionalno obogaćenih jaja

Upala je dio neposrednog odgovora tijela na infekciju ili ozljedu. Kao posljedica povećanog protoka krvi, povećava se propusnost kroz krvne kapilare što dopušta velikim molekulama (komplementu, antitijelima i citokinima) da napuste krvotok i prijeđu endotelnu stijenku te omogućuje pojačano kretanje leukocita iz krvotoka u okolno tkivo (154). Kretanje stanica u upalno ili zaraženo mjesto inducira se pojačanom regulacijom adhezijskih molekula kao što su ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin na površini endotelnih stanica, što omogućuje vezanje leukocita i naknadnu dijapedezu (155). Ključna poveznica između višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) i upale su eikozanoidi koji služe kao medijatori i regulatori upale. Budući da upalne stanice tipično sadrže visok udio n-6 PUFA arahidonske kiseline i niske udjele drugih PUFA, arahidonska kiselina obično je glavni supstrat za sintezu eikozanoida. Pro-upalni eikozanoidi, PGI<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> i TXB<sub>2</sub>, nastaju iz arahidonske kiseline imaju još i vazokonstriktivno djelovanje, dok PGI<sub>3</sub>, LTB<sub>5</sub> i TXA<sub>3</sub> djeluju protuupalno. Isto tako PGI<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, PGI<sub>3</sub>, LTB<sub>5</sub> mogu imati vazodilatacijsko djelovanje, dok TXB<sub>2</sub> i TXA<sub>3</sub> mogu imati vazokonstriksijsko djelovanje (156). Nadalje, povećana potrošnja dugolančanih n-3 PUFA, kao što su eikozapentaenska kiselina EPA i DHA rezultira povećanim udjelom tih masnih kiselina u fosfolipidima upalnih stanica. Budući da je manje supstrata dostupno za sintezu eikosanoida iz arahidonske kiseline rezultira smanjenom proizvodnjom PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, i LTB<sub>4</sub> u upalnim stanicama (123, 124). Iako je njihovo djelovanje u antagoniziranju metabolizma arahidonske kiseline ključni protuupalni učinak n-3 PUFA, ove masne kiseline imaju nekoliko drugih protuupalnih učinaka koji mogu proizaći iz promijenjene proizvodnje eikozanoida ili mogu biti neovisni o tome (125).



**Slika 14.** Neravnoteža između proizvodnje ROS i antioksidativne aktivnosti. Spojevi koji posjeduju antioksidativna i protuupalna svojstva, kao što su n-3 PUFA, vitamin E, selen i luteina, uglavnom potječu od unosa hranom, dakle iz egzogenih izvora kao što su riba, orašasti plodovi i maslinovo ulje. Proizvodnja ROS-a rezultat je i egzogenih i endogenih izvora (okoliš i stanični metabolizam). Povećana proizvodnja ROS-a i nedovoljna antioksidativna obrana može rezultirati oksidativnim stresom. Oksidativni stres dovodi do degradacije, mutacije i transformacije oštećenjem DNA, peroksidacijom lipida i denaturacijom proteina – događajima koji mogu uzrokovati karcinogeneza. Nadalje, oksidativni stres također djeluje kao okidač za upalni odgovor kroz aktivaciju specifičnih putova, povećanje razine proupalnih markera, transkripciju faktora i adhezijskih molekula, te konačno regrutiranje limfocita i makrofaga. PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline, ROS – reaktivne vrste kisika, NF- $\kappa$ B – nuklearni faktor kapa B, JNK - c- Jun N-terminalna kinaza, TNF – faktor nekroze tumora, IL – interleukin, ICAM – međustanična adhezija molekula, VCAM – molekula adhezije vaskularnih stanica, hsCRP – C-reaktivni protein visoke osjetljivosti, SIRT1 – sirtuin 1, Nrf2 - nuklearni faktor eritroidni 2–srodan faktor 2. ( Slika preuzeta iz rada Šušnjara P i sur. (157))

## 6. RASPRAVA

Glavni nalazi ove studije pokazuju da je konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja spriječila porast serumskih koncentracija proupalnih oksilipina ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{LTB}_2$ ) jer njihova povećana koncentracija može oštetiti vaskularnu funkciju i povećati krutost krvnih žila (158), kao i smanjenje serumskih koncentracija proupalnih citokina IL-17. To je bilo popraćeno pomakom u pozitivnoj korelaciji između TNF- $\alpha$  i ICAM-1 u kontrolnim uvjetima prema njihovoj značajnoj negativnoj korelaciji nakon konzumiranja obogaćenih kokošnjih jaja, kao i pojačanom izražaju nNOS. Prethodno smo pokazali umjerene protuupalne učinke funkcionalne hrane obogaćene n-3 PUFA u bolesnika s akutnim i kroničnim kardiovaskularnim sustavom (8) i njezin kardioprotektivni učinak i učinak eliminacije a upale u zdravoj odrasloj populaciji (96,153), što je dodatno podržano rezultatima drugih studija o suplementaciji n-3 PUFA (159–161).

Ovo istraživanje je proširilo mogućnosti da kokošja jaja služe kao funkcionalna hrana budući da ne postoje studije koje su ispitivale učinke konzumacije kombiniranih n-3 PUFA i antioksidansa u hrani. Hranjive tvari korištene za obogaćivanje jaja u ovom istraživanju (n-3 PUFA, selen, vitamin E i lutein) pojedinačno imaju važan utjecaj na upalni status i oksidativni stres u organizmu. Obogaćena jaja imaju značajno veći sadržaj n-3 PUFA, luteina i vitamina E u usporedbi s običnim jajima (Tablica 4.1.) (111). Uočena modifikacija proupalnih i manje upalnih medijatora u ovom istraživanju uglavnom se može pripisati konzumiranju n-3 PUFA. Protuupalni, odnosno koristan potencijal n-3 PUFA uglavnom se očituje kroz kompeticiju supstrata s n-6 PUFA (tj. put arahidonske kiseline) u enzimskim putevima ciklooksigenaza i lipoksigenaza (96). Ovisno o supstratu masne kiseline u suvišku, vezanje na aktivno mjesto enzima dovodi do proizvodnje pro- (od n-6 PUFA) ili protuupalnih lipidnih medijatora (od n-3 PUFA) (162). Na primjer, EPA se kompetitivno veže za COX-1 i COX-2 i potiče proizvodnju manje upalnog  $\text{PGE}_3$  dok potiskuje vezanje AA koje proizvodi visoko upalni  $\text{PGE}_2$  (160). Ovi lipidni medijatori imaju važnu ulogu u održavanju okoline citokina kroz izravne učinke na proizvodnju citokina i funkciju T limfocita (96,163) što dovodi do upalnih stanja ili stanja koja sprječavaju upalu. Oni također potiču mikrovaskularnu vazodilataciju u ljudskoj koži (164).

Vitamin E esencijalni je nutrijent koji služi kao snažan antioksidans u tkivima zbog svoje visoke biološke aktivnosti, hvatanja slobodnih radikala i mehanizma doniranja vodika uvelike ovisi o unosu drugih hranjivih tvari, osobito n-3 PUFA (165). PUFA su esencijalne strukturne komponente staničnih membrana budući da su ugrađene u lipidni sloj (166), dok vitamin E, koji je manjim dijelom i sastavni dio membrana, služi kao hvatač slobodnih radikala,



## 6. RASPRAVA

stabilizator membrane i zaštitnik polinezasićene lipidne membrane (167). Vitamin E i njegovi metaboliti smanjuju proupalne citokine i pospješuje protuupalni odgovor (168,169). Osim toga, vitamin E i njegovi metaboliti također su povezani s inhibicijom COX-a, specifičnom supresijom aktivnosti COX-2 (170,171). Konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja uzrokovala je značajan porast koncentracije vitamina E u serumu, dok nije pronađena značajna razlika u kontrolnoj skupini niti između skupina. To je u skladu s drugim provedenim studijama na zdravim odraslim osobama. Meydani i sur (172) pokazali su da je kratkotrajna suplementacija vitaminom E (800 mg/dan) povećala razine u serumu bez negativnih nuspojava kod starijih osoba. Slično, Hodis i sur. (173) su pokazali da je suplementacija  $\alpha$  - tokoferolom značajno povećava plazmatske razine vitamina E u zdravih odraslih osoba s umjereno povišenim razinama LDL-kolesterola. Nedavno se raspravljalo o vitaminu E u vezi s upalnim bolestima kože, budući da je navedeno da su razine vitamina E u serumu niže kod pacijenata koji pate od vitiliga, psorijaze, atopijskog dermatitisa i akni (174).

Postoji jaka veza između ROS-a, oksidativnog stresa i upalnog odgovora. U ovoj istraživanju, smanjenje serumskih razina IL-17A uglavnom je povezano s učincima suplementacije n-3 PUFA, što je ranije opisano u mišjim modelima za kolitis (175) i inducirani artritis (176), uz smanjenu ekspresiju mRNA drugih proupalnih citokina. Takav učinak potvrđuju naši prethodno objavljeni rezultati kod zdravih osoba (153) kod kojih je se serumska razina proupalnog interferon-gama (INF- $\gamma$ ) smanjila, dok su se razine protuupalnog IL-10 u serumu povećale nakon konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA. Pozitivna povezanost između serumskih koncentracija TNF- $\alpha$  i ICAM-1 u CTRL skupini ispitanika ukazuje na to da je endotel bio u stanju mirovanja. Također, u Nutri4 skupini otkrivena je značajno negativna korelacija između ICAM-1 i proupalnog PGE<sub>2</sub>. Prethodno navedene smanjene razine proupalnih markera kao što su IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 i CRP, također se djelomično mogu pripisati drugim dodanim nutrijentima, kao što je ranije objavljeno za suplementaciju selenom (177), vitaminom E (178,179) i luteinom (180), iako se ovi mehanizmi tek trebaju otkriti i istražiti jer je još uvijek malo dokaza u prilog ovoj hipotezi. Nadalje, pozitivna povezanost između TNF- $\alpha$  i ICAM-1 u kontrolnoj skupini pomaknut je prema značajnoj negativnoj povezanosti nakon konzumacije obogaćenih kokošnjih jaja. Ovo je zanimljiv nalaz, budući da TNF- $\alpha$  djeluje kao upalni citokin i pojačava ekspresiju ICAM-1 u akutnim upalnim stanjima (181,182), kao što su i citokini IL-1 ili IFN- $\gamma$  (183). Čini se da ICAM-1, koji se obično eksprimira u endotelnim stanicama u niskim koncentracijama, mijenja svoj put aktivacije u prisutnosti n-3 PUFA, što je prethodno elaborirao Goua i sur. (184). Također se može dogoditi da pod utjecajem hranjivih

## 6. RASPRAVA

tvari s antioksidativnim djelovanjem kao što su vitamin E, selen i lutein zbog veze između ICAM-1 i oksidativnog stresa potaknemo NF $\kappa$ B -a. put (185).

Iznenadujuće, koncentracija MPO u serumu bila je značajno povećana nakon konzumacije obogaćenih jaja, ali nije se promijenila nakon konzumacije običnih jaja u CTRL skupini. Međutim, nagađalo se da povećane razine MPO proteina možda nisu važne same po sebi u upalnom okruženju, već naknadno regrutiranje i aktivnost neutrofila (186). MPO utječe na funkcije neutrofila i proizvodnju citokina. On katalizira reakcije štetnih proizvoda samo u prisutnosti vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (187). U ovom istraživanju to teško da je slučaj budući da TBARS i FRAP nisu značajno promijenjeni nakon prehrambenih protokola. Sadašnji rezultati sugeriraju da povišene razine MPO proteina u Nutri4 skupini nisu dovele do pomaka prema upalnim stanjima, što je djelomično potvrđeno značajno smanjenim razinama proupalnog IL-17A u serumu sudionika koji su konzumirali obogaćena jaja. Unatoč tome, povećane razine MPO proteina obično su povezane s upalom, iako ovaj enzim također pokazuje snažna antifungalna i antibakterijska svojstva i njegov nedostatak može pojačati upalni odgovor (187). Doista, MPO može poslužiti kao protuupalni reagens u slučajevima kada nema infekcije, kao što je to kod sudionika ovog istraživanja, čije su razine hsCRP u serumu bile u referentnom rasponu jer nije bilo prisutne upale u vrijeme uključivanja ispitanika u pokuse (188).

Dušikov oksid (NO), visoko reaktivna signalna i obrambena molekula koju proizvodi sintaza dušikovog oksida (NOS) igra ključnu ulogu u patogenezi upalnog odgovora i ovisno o fiziološkim uvjetima u okolini, ponaša se kao anti- ili pro -upalni medijator (189, 190). Nedavne studije su pokazale da nNOS koji se uglavnom nalazi u jezgri endotelnih stanica u mirovanju, pridonosi vazodilataciji ovisnoj o endotelu, ima vaskularni zaštitni učinak, ali također ima ulogu u inicijaciji i ranoj fazi upalnog odgovora budući da njegova odsutnost pojačava proupalne citokine i povećava mobilizaciju leukocita što dovodi do pojačanog odgovora posredovanog citokinima (181–183). IFN- $\gamma$  zajedno s IL-17 pojačava upalu i pojačanu regulaciju iNOS-a (191). Trenutno je u skupini koja je konzumirala obogaćena kokošja jaja bio prisutan umjereni protuupalni učinak zbog povećanog izražaja mRNA nNOS-a i smanjene razine IL-17A u serumu nakon konzumacije obogaćenih jaja. n-3 PUFA (posebno DHA) i selen inhibiraju proizvodnju NO i izražaj iNOS-a kroz regulaciju razina staničnih glutaciona (GSH) (185, 192) dok DHA pojačava aktivnost nNOS-a (193). Budući da se naša ispitivana skupina sastojala od zdravih, mladih ljudi i da nema dokaza o prisutnosti upale ili

## 6. RASPRAVA

oksidativnog stresa, kao ni veće antioksidativne aktivnosti, čini se da nNOS ima važnu ulogu kao donor NO u mirovanju i stvaranje protuupalnog okoliša. Ovo je podržano negativnom povezanošću nNOS-a s kolesterolom/LDL-kolesterolom u skupini koja je konzumirala Nutri4 obogaćena jaja, dok je s iNOS-om pozitivno povezan samo u kontrolnoj skupini.

COX put je inhibiran dodatnim DHA, EPA i ALA (96, 162, 194), što je potvrđeno u trenutnom istraživanju. Zanimljivo je da je došlo do značajnog povećanja razina LTB4 i PGE2, ali i omjera PGE2/PGE3 nakon redovitog konzumiranja jaja. To može biti povezano s povećanim unosom arahidonske kiseline putem običnih jaja. Međutim, nije bilo značajnih promjena u koncentracijama LTB4 i PGE2 nakon konzumacije obogaćenih jaja, što sugerira da povoljan omjer n-3 i n-6 PUFA u tim jajima ima koristan protuupalni potencijal. To opravdava funkcionalnu hranu u svakodnevnoj prehrani.

### 6.3. Prehrambene navike zdravih mladih ispitanika

Odnos između zdrave prehrane i pozitivnih zdravstvenih ishoda dobro je poznat. Njegovanje zdrave prehrane ima potencijal za poboljšanje cjelokupnog zdravlja. Zdrava prehrana nastaje kada nečiji uobičajeni obrasci prehrane uključuju adekvatan unos hranjivih tvari i dovoljan, ali ne pretjeran, energetska unos za zadovoljenje energetske potreba pojedinca. Zapadnjački način života promijenio je prehrambene navike i način života među mlađom populacijom u zemljama u razvoju, što rezultira prekomjernom tjelesnom težinom te posljedično sklonijima razvoju dijabetes melitusa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti (195). Porast razine pretilosti među mladima vjerojatno je povezan s razinama tjelesne aktivnosti i prehrambenim navikama, uključujući povećanu konzumaciju gotove hrane i zaslađenih pića (196).

Ispitanicima smo između ostalog mjerili visinu i tjelesnu masu te računali indeks tjelesne mase (ITM). Prosječan ITM = 23,2 kg/m<sup>2</sup>. Imali smo jednu osobu s ITM iz skupine umjerena pothranjenost (ITM = 17,7), dok su 4 osobe imale povećanu tjelesnu masu, no nitko ne ulazi u kategoriju pretilosti. ITM se koristi za definiranje i dijagnosticiranje pretilosti prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) (197). U odraslih, WHO definira 'prekomjernu težinu' kao ITM od 25,0 do 29,9, a 'pretilost' kao ITM  $\geq$  30,0. Pretilost se dalje klasificira u tri stupnja ozbiljnosti: klasa I (ITM 30,0-34,9), klasa II (ITM 35,0-39,9) i klasa III (ITM  $\geq$  40,0). Prekomjerno taloženje masnoće u trbušnoj regiji naziva se 'abdominalna pretilost' i povezuje se s većim zdravstvenim rizicima. Prevalencija prekomjernog debljanja udvostručila se u cijelom svijetu te je utvrđeno da je otprilike trećina globalne populacije pretila ili ima prekomjernu tjelesnu težinu. Stopa pretilosti dramatično je porasla i kod muškaraca i

## 6. RASPRAVA

kod žena, te u svim dobnim skupinama, s proporcionalno većom prevalencijom kod starijih osoba i žena. Komorbiditeti povezani s ITM i pretilosti uključuju koronarnu bolest srca, hipertenziju i moždani udar, određene vrste raka, dijabetes melitus neovisan o inzulinu, bolest žučnog mjehura, dislipidemiju, osteoartritis i giht te plućne bolesti, uključujući apneju tijekom spavanja. (198).

Nadalje, pomoću standardiziranog upitnika ispitivali smo prehrabene navike ispitanika i uspoređivali rezultate sa smjernicama o prehrani. Prema principima mediteranske prehrane svaka osoba bi dnevno trebala konzumirati minimalno 5 obroka (tri glavna i dva međuobroka). U skupini naših ispitanika 29,17% osoba konzumira 5 i više obroka u danu. Vidljivo je kako nema statistički značajne razlike po spolu kod osoba koje preskaču jedan od obroka. Mediteranska prehrana, koja predstavlja obrazac prehrane koji se obično konzumira među populacijama koje graniče sa Sredozemnim morem, naširoko je poznata kao model zdrave prehrane zbog doprinosa povoljnom zdravstvenom stanju i boljoj kvaliteti života (199). Nekoliko studija u različitim populacijama utvrdilo je korisnu ulogu glavnih komponenti mediteranske prehrane na pojavu kardiovaskularnih bolesti i kroničnih degenerativnih bolesti. Tako je studija Lyon Diet Heart i sur. (200) u randomiziranom ispitivanju sekundarne prevencije imala za cilj testiranje, može li mediteranski tip prehrane smanjiti stopu recidiva nakon prvog infarkta miokarda u kojoj su ispitanike na mediteranskog prehrani pratili 27 tjedana te su došli do zaključka o blagotvornosti učinaka mediteranskog načina prehrane. Dok su Majem i sur. (201) napravili sustavni pregled i odabrali su ukupno 43 članka koja odgovaraju 35 različitih eksperimentalnih studija. Analizirani su rezultati za učinke mediteranske prehrane na lipoproteine, endotelnu rezistenciju, dijabetes i antioksidativni kapacitet, kardiovaskularne bolesti, artritis, rak, sastav tijela i psihičku funkciju. Mediteranska prehrana pokazala je povoljne učinke na razine lipoproteina, vazodilataciju endotela, inzulinsku rezistenciju, metabolički sindrom, antioksidativni kapacitet, miokardijalnu i kardiovaskularnu smrtnost te incidenciju raka kod pretilih pacijenata i onih s prethodnim infarktom miokarda. Rezultati otkrivaju mehanizme mediteranske prehrane u prevenciji bolesti, posebice u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti, ali i naglašavaju potrebu poduzimanja eksperimentalnih istraživanja i sustavnih pregleda u područjima primarne prevencije kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, dijabetesa, pretilosti, zaraznih bolesti, kognitivno oštećenje povezano sa starenjem. Mediteranski obrazac prehrane karakterizira visoka konzumacija voća, povrća i namirnica biljnog podrijetla (mahunarke, orašasti plodovi, sjemenke), upotreba maslinovog ulja i manja konzumacija mesa i mliječnih proizvoda, čime se osigurava veći unos

## 6. RASPRAVA

mikronutrijenata, uključujući antioksidativne hranjive tvari, kao i polifenole i druge biljne bioaktivne spojeve (202).

U našoj skupini ispitanika 54,2% ispitanika konzumira tri i manje jedinica voća i povrća dnevno dok su dnevne preporuke za unos voća i povrća iznose 5 jedinica po osobi. Pomoću Mann-Whitney U-testa usporedili smo unos voća i povrća prema spolu gdje nema statistički značajne razlike u konzumaciji navedenih namirnica. 12,5% ispitanika nije konzumiralo voće ili povrće za vrijeme provedbe istraživanja. Ipak, preporuke Europskog dijabetičkog društva navode kako se voće ne konzumira na kraju dana zbog metabolizma fruktoze. U našoj skupini ispitanika 45,8% ispitanika (38,5% ženskih i 54,5% muških) se drži navedenih smjernica. Voće, povrće i druga biljna hrana bogata je bioaktivnim fitokemikalijama koje mogu pružiti poželjne zdravstvene prednosti izvan osnovne prehrane kako bi se smanjio rizik od razvoja kroničnih bolesti (203). Studija Basu i sur. (204) provela je randomiziranu studiju na konzumaciji brusnica koju povezuju se s nekoliko dobrobiti za zdravlje kardiovaskularnog sustava kao što su oksidacija lipida, upala i dislipidemija, u ispitanika s metaboličkim sindromom te su došli do zaključka da niskokalorični sok od brusnice (2 šalice dnevno) značajno smanjuje oksidaciju lipida i povećava antioksidativni kapacitet plazme. Imunoprotektivni učinak zabilježio je i Karlsen (205) sa svojim suradnicima koji su ispitali učinak soka od borovnice na tijekom 4 tjedna te je studija rezultirala značajnim smanjenjem koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP), IL-6, IL-15 i monokina u plazmi. Stoga bi zdravstvene dobrobiti prehrane temeljene na biljnoj hrani mogle biti povezane s integriranim antioksidativnim i protuupalnim mehanizmima koji mogu učinkovito modulirati oksidativni i upalni stres kako bi spriječili bolesti povezane s prehranom.

Kroz naše istraživanje ispitanici su bili pitani i o konzumaciji cjelovitih žitarica kao visokovrijednog izvora vlakana. 25,0% ispitanika nikada ne konzumira cjelovite žitarice u svojoj prehrani, dok ih svakodnevno konzumira 12,5% (18,2% muških i 7,7% ženskih ispitanika). Dijetalna vlakna važna su komponenta prisutna u cjelovitim žitaricama i vjeruje se da su (barem djelomično) odgovorna za ove zdravstvene prednosti. Sastav prehrambenih vlakana cjelovitih žitarica vrlo je različit u odnosu na različite žitarice. Cjelovite žitarice bogate su i topivim i netopivim funkcionalnim prehrambenim vlaknima koja se uglavnom mogu klasificirati kao npr. celuloza, arabinoksilan,  $\beta$ -glukan, ksiloglukan i fruktan (206). U studiji Rebello i sur (207, 208) su procijenili da je li unos ukupnih ugljikohidrata, različitih vrsta ugljikohidrata i njihovih izvora hrane povezan sa smrtnošću od ishemijskih bolesti srca.

## 6. RASPRAVA

Prospektivno su ispitali povezanost unosa ugljikohidrata i smrtnosti kod 53469 sudionika Singapurske kineske zdravstvene studije s prosječnim praćenjem od 15 godina. Prehrana je procijenjena korištenjem polukvantitativnog upitnika o učestalosti unosa hrane te su došli do zaključka da korištenjem kruha od cjelovitih žitarica uvelike smanjuje od nastanka ishemijskih bolesti srca od oni koji su jeli rafinirane proizvode. Da su dijetalna vlakna i cjelovita zrna žitarica izvrstan odabir te da se pozitivno reflektira na lipide u krvi potvrđuje i studija Magnusdottir i sur. (209) u kojoj su sudionici u dobi od 30 - 65 godina, s indeksom tjelesne mase (ITM) 27 - 40 kg/m<sup>2</sup> i metaboličkim sindromom konzumirali prehranu bogatom cjelovitim žitaricama poput pšenice i raži tijekom 24 tjedna. Rezultati istraživanja su utvrdila pozitivnu povezanost cjelovitih žitaricama s lipidima u krvi.

Nadalje, 29,2% naših ispitanika u svojoj prehrani nekoliko puta tjedno ima zastupljeno nešto od proizvoda bogatih n-3 PUFA, dok ih 16,7% svakodnevno konzumira nešto od navedenih namirnica. n-3 PUFA djeluju protuupalno i imaju niz korisnih zdravstvenih učinaka u ljudskom razvoju i rastu, fluidnosti stanične membrane, n-3 PUFA također pridonose održavanju zdravlja ljudi korekcijom aritmija, inhibicijom agregacije trombocita i produljenjem vremena zgrušavanja, snižavanjem krvnog tlaka, snižavanjem triglicerida u serumu i homocisteina u plazmi, djeluju protuupalno i imunomodulatorno (210). Najbolji izvor n-3 PUFA iz prehrane su riba i orašasti plodovi. U brojnim velikim prospektivnim kohortnim studijama dokazano je da orašasti plodovi, posebno kikiriki i orasi, smanjuju morbiditet i mortalitet od kardiovaskularnih bolesti (211). Što potvrđuje studija Ferré i sur. (212) u kojoj analizirali povezanost između ukupnog unosa i određenih vrsta orašastih plodova i kardiovaskularnih bolesti, koronarne bolesti srca i rizika od moždanog udara te su zaključili da veća konzumacija ukupnih i specifičnih vrsta orašastih plodova bila je obrnuto povezana s ukupnom kardiovaskularnom bolešću i koronarnom bolesti srca. Nadalje, Zhang i sur. (213) u meta analizom procijenili utjecaja konzumacije ribe na incidenciju i mortalitet od kardiovaskularnih bolesti. Relevantne studije identificirane su iz baza podataka PubMed, Web of Science i Embase do listopada 2019. Analiza pokazala je da su incidencija i mortalitet KBS smanjeni za 4%, redom, s povećanjem konzumacije ribe od 20 g/dan. Ova meta-analiza pokazuje da je konzumacija ribe povezana s nižom incidencijom i smrtnošću od kardiovaskularnih bolesti. 91,7% ispitanika navodi kako redovito u prehrani imaju zastupljene fermentirane mliječne proizvode, (t-test, p<0,05 nema statistički značajne razlike po spolu). 16,7% ispitanika ne konzumira slatkiše, dok ih na dnevnoj razini konzumira 41,7%. Dnevne preporuke za unos tekućine iznose barem 1,5 L. Međutim, njezine prehrambene preporuke ili smjernice kliničkog

## 6. RASPRAVA

upravljanja ne dobivaju onoliko pažnje koliko zaslužuju. Unos i eliminacija vode ovise o nepostojanim čimbenicima koje je teško izmjeriti, a u isto vrijeme kompenzirati sposobnošću tijela da regulira homeostazu (214). 37,5% naših ispitanika ne zadovoljava navedene preporuke, dok 20,8% ispitanika većinu tekućine unosi kroz konzumaciju sokova. Postoje uvjerljivi mehanizmi i dokazi istraživanja koji podupiru sugestiju da prekomjerna konzumacija šećera izravno i neizravno potiče razvoj kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa 2 (215). Izravan put uključuje nereguliran jetreni unos i metabolizam fruktoze, što dovodi do nakupljanja lipida u jetri, dislipidemije, smanjene osjetljivosti na inzulin i povećanja razine mokraćne kiseline. Epidemiološki podaci sugeriraju da su ovi izravni učinci fruktoze relevantni za konzumaciju šećera koji sadrže fruktozu, saharoze koji su dominantni dodani šećeri. Konzumacija dodanog šećera povezana je s razvojem i/ili prevalencijom masne jetre, dislipidemijom, inzulinskom rezistencijom, hiperurikemijom, kardiovaskularnim bolestima i dijabetesom tipa 2, a mnoge od tih povezanosti neovisne su o porastu tjelesne težine ili ukupnom energetske unosu (216).

Proteini su važan dio svakodnevne prehrane i preporuka Europskog društva za dijabetes je da budu zastupljeni u sva tri glavna obroka. Njihovim unosom omogućujemo gradivne jedinice našem tijelu koje su jako bitne za rast i razvoj cijeloga organizma. Nadalje, proteini našem organizmu daju i duži osjećaj sitosti (zbog vremena razgradnje) te je idealan način za prevenciju pretilosti (217). Navedenog se pridržava 29,2% naših ispitanika (36,4% muških ispitanika i 23,1% ženskih ispitanika), što potvrđuje našu tezu kako su žene više ugljikohidratni, a muškarci proteinski tip.

Stoga konzumacija funkcionalne hrane s korisnim omjerom n-6 /n-3 PUFA i s povećanim sadržajem n-3 PUFA, zajedno s drugim nutrijentima, može poslužiti kao novi način prevencije kardiovaskularnih bolesti. Ovo je potkrijepljeno rezultatima ove disertacije koja je pokazala značajno povećanu serumsku koncentraciju n-3 PUFA, luteina i vitamina E te smanjeni omjer n-6 /n-3, čak i kod zdravih mladih sudionika, što bi moglo biti, barem djelomično, posredovano vazodilatatorskim metabolitima COX-2 puta razgradnje n-3 PUFA jer postoji jasno povećanje proteinske COX-2 u Nutri4 skupini. Tako opažena pojačana vazodilatacija ovisna o endotelu može se pripisati povećanoj koncentraciji n-3 PUFA i vjerojatno njihovih metabolita u serumu i/ili krvnim žilama.

Nadalje, naša grupa ispitanika sastojala se od mladih, zdravih odraslih osoba bez pratećih komorbiditeta, stoga nisu otkriveni oksidativni stres ili značajni protuupalni učinci. Snižene

## 6. RASPRAVA

razine proupalnog IL-17A u serumu i povećana ekspresija nNOS-a u Nutri4 skupini, zajedno s promjenom metabolita proizvedenih putem COX putova u CTRL skupini sugeriraju pomak prema protuupalnim stanjima kod sudionika koji su konzumirali obogaćena kokošja jaja, dok takve promjene nisu uočene u kontrolnoj skupini. Rezultati sugeriraju da kombinirano djelovanje n-3 PUFA i antioksidansa igra važnu ulogu u putu aktivacije nNOS i ta suradnja može imati zaštitnu ulogu u mirovanju, odnosno neupalnim stanjima.

Uvidom u prehrambene navike zdravih madih ispitanika u ovom istraživanju možemo zaključiti da stil života uvelike ovisi na načinu same prehrane što možemo vidjeti iz broja dnevnih obroka koja je manja od 5 preporučenij. Zadovoljavajuća činjenica je ta da ispitivana skupina jede raznoliko i raznovrsno čime je postignut balans unosa makro i mikronutrijenata za zdravo funkcioniranje organizma te smo potvrdili tezu da je kod muške populacije zatupljenija hrana proteinskog podrijetla, dok je kod žena ona većinom ugljikohidratna.

Postoji nekoliko ograničenja istraživanja (ili pokusa) provedenih u okviru ove doktorske disertacije. Nismo mjerili n-3 PUFA metaboličke produkte puta COX-1 ili COX-2. Međutim, postoji jasno povećanje izražaja proteina COX-2 u Nutri4 skupini, dok izražaj drugih enzima koji metaboliziraju PUFAs nije promijenjen nakon trodnevnog dijetetskog protokola. Stoga se opažena pojačana vazodilatacija ovisna o endotelu može pripisati povećanoj koncentraciji n-3 PUFA i vjerojatno njihovim metabolitima u serumu i/ili vaskulaturi. Drugo, iako razine selena nisu značajno povećane, pokazale su tendenciju povećanja u Nutri4 skupini, stoga bi se vremenski period konzumacije ili količina jaja mogla produžiti. Isto tako koncentracije NO koji je jedan od ključnih faktora u vazodilataciji u ovom istraživanju nije izmjeren.



### 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenom i luteinom ima povoljan učinak na mikrocirkulaciju zdravih mladih ispitanika te se ovi korisni učinci mogu uglavnom pripisati n-3 PUFA u jajima.
- Reaktivnost krvnih žila mikrocirkulacije je pojačana, što bi moglo biti, barem djelomično, posredovano vazodilatatorskim metabolitima COX-2 puta razgradnje n-3 PUFA.
- Konzumacija kokošjih jaja nema negativan učinak na biokemijske parametre, kao što su serumski lipidni profil i koncentracija jetrenih enzima, stoga, jaja čine zdravim prehranbenim izborom.
- Nije otkriven oksidativni stres ili značajni protuupalni učinak, međutim, snižene razine proupalnog IL-17A u serumu i povećana ekspresija nNOS-a u Nutri4 skupini zajedno s promjenom metabolita proizvedenih putem COX putova u kontrolnoj skupini, sugeriraju pomak prema protuupalnim stanjima kod sudionika koji su konzumirali obogaćena kokošja jaja, dok takve promjene nisu uočene u kontrolnoj skupini.
- Rezultati sugeriraju da kombinirano djelovanje n-3-PUFA i antioksidansa igra važnu ulogu u putu aktivacije nNOS i da može imati zaštitnu ulogu u mirovanju, ali i potencijalnu ulogu u stvaranju medijatora koji su zaduženi za mikrovaskularnu dilataciju.

### 8. SAŽETAK

**Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima na endotelnu funkciju i razinu oksidativnog stresa kod zdravih mladih ispitanika – Randomizirani kontrolirani pokus**

**Ciljevi:** Utvrditi učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitamina E, luteinom i selenom na vaskularnu reaktivnost mikrocirkulacije u odgovoru na reaktivnu hiperemiju u mladih zdravih ispitanika oba spola, razinu oksidativnog stresa i ciljanih proupalnih te protu-upalnih metabolita n-3 i n-6 PUFA kod mladih zdravih ispitanika oba spola.

**Dizajn studije:** Randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana, prospektivna, intervencijska studija. Protokol studije uključivao je dva dolaska, a ispitanicima je dana uputa da jedu tri tvrdo kuhana kokošja jaja dnevno tijekom tri tjedna (ID NCT04564690).

**Sudionici i metode:** Ispitanici su podijeljeni u CTRL skupinu (n=14) koja je konzumirala obična kokošja jaja (1,785 mg vitamina E, 0,330 mg luteina, 0,054 mg selena i 438 mg n-3 PUFA dnevno) i Nutri4 skupinu (n=20) koji su konzumirali obogaćena jaja (3,29 mg vitamina E, 1,85 mg luteina, 0,06 mg selena i 1026 mg n-3 PUFA dnevno), 3 jaja dnevno tijekom 3 tjedna. Prije i poslije dijetetskog protokola laser Doppler flowmetrijom mjeren je mikrovaskularni protok kože podlaktice kao odgovor na iontoforezu Ach i SNP, proteinski izražaj enzima (COX1, COX2, iNOS, eNOS i nNOS), serumske koncentracije n-3 PUFA, vitamina E, selena i luteina. Koncentracije lipidnih medijatora i citokina u serumu izmjerene su pomoću ELISA i kompleta reagensa s magnetskim zncima koji su obloženi antitijelima na Luminex platformi. Serumske koncentracije oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta mjerene su standardiziranim metodama, dok je genski izražaj izmjeran rtPCR-om iz mononuklearnih stanica periferne krvi. Upitnika ispitane su prehrambene navike ispitanika.

**Rezultati:** PORH i Ach potaknuta dilatacija bili su značajno poboljšani, izražaj COX2 proteina bila je značajno veća u Nutri4 skupini. Snižene su serumske razine proupalnog interleukina IL-17A i povećan genski izražaj nNOS u Nutri4 skupini. Serumske koncentracije n-3 PUFA, vitamina E i luteina bile su značajno više u Nutri4 skupini, dok je selen ostao nepromijenjen.

**Zaključak:** Povećan unos antioksidansa poput n-3 PUFA, vitamina E, luteina i selena može imati različite korisne učinke na organizam zbog povećane antioksidativne obrane te ima povoljan učinak na mikrovaskularni odgovor.

**Ključne riječi:** antioksidansi, funkcionalno obogaćena jaja, mikrovaskularna reaktivnost

### 9. SUMMARY

#### **The effect of the enriched eggs consumption with functional ingredients on endothelial function and the level of oxidative stress in healthy young subjects - A randomized controlled study**

**Objectives:** To determine the effect of the consumption of enriched hen eggs with n-3 PUFA, vitamin E, lutein and selenium on the vascular reactivity of the microcirculation in response to reactive hyperemia in young healthy subjects of both sexes, the level of oxidative stress and targeted pro-inflammatory and anti-inflammatory metabolites n-3 and n-6 PUFA in young healthy subjects of both sexes.

**Study Design:** A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective, interventional study. The study protocol included two visits, and subjects were asked to eat three hard-boiled heneggs per day for three weeks (ID NCT04564690).

**Participants and methods:** Subjects were divided into CTRL group (n=14) consumed regular hen eggs (1.785 mg of vitamin E, 0.330 mg of lutein, 0.054 mg of selenium and 438 mg of n-3 PUFAs daily), and Nutri4 group (n=20) who consumed enriched eggs (3.29 mg of vitamin E, 1.85 mg of lutein, 0.06 mg of selenium and 1026 mg of n-3 PUFAs daily), 3 eggs a day for 3 weeks. Before and after the dietary protocol, the microvascular flow of the forearm skin was measured by laser Doppler flowmetry in response to iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside, protein expression of enzymes (COX1, COX2, iNOS, eNOS and nNOS), serum concentrations of n-3 PUFA, vitamin E, selenium and lutein. Serum concentrations of lipid mediators and cytokines were measured using ELISA and complete antibody-based magnetic bead reagents on the Luminex platform. Serum concentrations of oxidative stress and antioxidant capacity were measured using standardized methods, while gene expression was measured by rtPCR from peripheral blood mononuclear cells. Using a questionnaire, the dietary habits of the subjects in the experiments were examined.

**Results:** PORH and Ach induced dilation were significantly enhanced, protein expression of COX2 was significantly higher in the Nutri4. The serum levels of the pro-inflammatory interleukin IL-17A in the serum were decreased and the gene expression of nNOS increased in the Nutri4 group. Serum concentrations of n-3 PUFA, vitamin E and lutein were significantly higher in the group consuming Nutri4 enriched eggs, while selenium remained unchanged compared to pre-diet values.

## 9. SUMMARY

**Conclusion:** Increased intake of antioxidants such as n-3 PUFA, vitamin E, lutein and selenium can have various beneficial effects on the body due to increased antioxidant defense and has a beneficial effect on the microvascular respons.

**Keywords:** antioxidants, functionally enriched eggs, microvascular reactivit

### 10. LITERATURA

1. Rebello C, Greenway FL, Dhurandhar NV. Functional foods to promote weight loss and satiety. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014 Nov;17(6):596–604.
2. Kralik G, Kralik Z, Grčević M, Škrtić Z. Obogaćivanje peradarskih proizvoda funkcionalnim sastojcima. *Poljoprivreda (Osijek)*. 2012;18(1):52–9.
3. Drenjančević I: K, Kralik Z, Mihalj M, Stupin A, Novak S, Grčević M. The effect of dietary intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiovascular health: revealing potentials of functional food. *Superfood and functional food - The development of superfoods and their roles as medicine*. 2017;207–32.
4. WHO CVD Risk Chart Working Group. World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *Lancet Glob Health*. 2019 Oct;7(10):e1332–45.
5. Petersen KS, Kris-Etherton PM. Diet Quality Assessment and the Relationship between Diet Quality and Cardiovascular Disease Risk. *Nutrients*. 2021 Nov 28;13(12):4305.
6. Sivasankaran S. The cardio-protective diet. *Indian J Med Res*. 2010 Nov;132(5):608–16.
7. Mann JJ. Diet and risk of coronary heart disease and type 2 diabetes. *Lancet*. 2002 Sep 7;360(9335):783–9.
8. Ćurić ŽB, Masle AM, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Stupin A, Mihaljević Z, et al. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome—A Randomized Study. *Biology (Basel)*. 2021 Aug 14;10(8):774.
9. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z, et al. Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals—Clinical Trial. *International journal of molecular sciences [Internet]*. 2020 [cited 2021 Mar 11];21(11). Available from: <https://www.bib.irb.hr/1066652>

## 10. LITERATURA

10. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Matic A, et al. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Prev Nutr Food Sci.* 2021 Dec 31;26(4):388–99.
11. Kaczmarek JL, Liu X, Charron CS, Novotny JA, Jeffery EH, Seifried HE, et al. Broccoli consumption affects the human gastrointestinal microbiota. *J Nutr Biochem.* 2019 Jan;63:27–34.
12. Conway MC, McSorley EM, Mulhern MS, Spence T, Wijngaarden E van, Watson GE, et al. The influence of fish consumption on serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentrations in women of childbearing age: a randomised controlled trial (the iFish Study). *Eur J Nutr.* 2021 Apr;60(3):1415–27.
13. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients.* 2016 Mar 2;8(3):128.
14. Ander BP, Dupasquier CM, Prociuk MA, Pierce GN. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol.* 2003;8(4):164–72.
15. Mehrdad R, Reza JNM, Tourandokht B, Reza VMM, Ali NG, Farshad RD, et al. Endothelium-Dependent Effect Of Sesame Seed Feeding On Vascular Reactivity Of Streptozotocin-Diabetic Rats: Underlying Mechanisms. 2013 Jan 1;12(3):377–85.
16. Kipp AP, Strohm D, Brigelius-Flohé R, Schomburg L, Bechthold A, Leschik-Bonnet E, et al. Revised reference values for selenium intake. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2015 Oct 1;32:195–9.
17. Zhao J, Xing H, Liu C, Zhang Z, Xu S. Effect of Selenium Deficiency on Nitric Oxide and Heat Shock Proteins in Chicken Erythrocytes. *Biol Trace Elem Res.* 2016 May;171(1):208–13.
18. Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders ART, Kok FJ. Blood pressure response to fish oil supplementation: meta-regression analysis of randomized trials. *J Hypertens.* 2002 Aug;20(8):1493–9.

## 10. LITERATURA

19. Adili R, Hawley M, Holinstat M. Regulation of platelet function and thrombosis by omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018 Nov;139:10–8.
20. Lovegrove JA, Lovegrove SS, Lesauvage SV, Brady LM, Saini N, Minihane AM, et al. Moderate fish-oil supplementation reverses low-platelet, long-chain n–3 polyunsaturated fatty acid status and reduces plasma triacylglycerol concentrations in British Indo-Asians. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2004 Jun 1;79(6):974–82.
21. Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones CJ, Lewis MJ. Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Feb;35(2):265–70.
22. Mihalj M, Stupin A, Kolobarić N, Tartaro Bujak I, Matić A, Kralik Z, et al. Leukocyte Activation and Antioxidative Defense Are Interrelated and Moderately Modified by n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Eggs Consumption—Double-Blind Controlled Randomized Clinical Study. *Nutrients.* 2020 Oct 13;12(10):3122.
23. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, et al. Enhanced antioxidative defense by vitamins C and E consumption prevents 7-day high-salt diet-induced microvascular endothelial function impairment in young healthy individuals. *Journal of clinical medicine.* 2020;9(3):843–52.
24. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Matić A, et al. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Prev Nutr Food Sci.* 2021 Dec 31;26(4):388–99.
25. Khan F, Elherik K, Bolton-Smith C, Barr R, Hill A, Murrie I, et al. The effects of dietary fatty acid supplementation on endothelial function and vascular tone in healthy subjects. *Cardiovasc Res.* 2003 Oct 1;59(4):955–62.
26. Żebrowska A, Hall B, Stolecka-Warzecha A, Stanula A, Sadowska-Krępa E. The Effect of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Serum Adipocytokines, Lipid Profile and Biochemical Markers of Inflammation in Recreational Runners. *Nutrients.* 2021 Jan 29;13(2):456.

## 10. LITERATURA

27. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res.* 1999 Jul;38(4):309–36.
28. Jargar JG, Dhundasi SA, Punekar MD. Status of  $\alpha$ -tocopherol concentration and oxidative stress in infertile females of Vijayapur District, northern Karnataka. 2017;7(10):5.
29. Neophytou CM, Constantinou AI. Drug Delivery Innovations for Enhancing the Anticancer Potential of Vitamin E Isoforms and Their Derivatives. *Biomed Res Int.* 2015;2015:584862.
30. Heller R, Hecker M, Stahmann N, Thiele JJ, Werner-Felmayer G, Werner ER. Alpha-tocopherol amplifies phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1177 and its short-chain derivative trolox stabilizes tetrahydrobiopterin. *Free Radic Biol Med.* 2004 Sep 1;37(5):620–31.
31. Wu D, Liu L, Meydani M, Meydani SN. Effect of vitamin E on prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> production by human aorta endothelial cells: mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1031:425–7.
32. Noguchi N, Hanyu R, Nonaka A, Okimoto Y, Kodama T. Inhibition of THP-1 cell adhesion to endothelial cells by alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol is dependent on intracellular concentration of the antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 2003 Jun 15;34(12):1614–20.
33. Koga T, Kwan P, Zubik L, Ameho C, Smith D, Meydani M. Vitamin E supplementation suppresses macrophage accumulation and endothelial cell expression of adhesion molecules in the aorta of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis.* 2004 Oct;176(2):265–72.
34. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res.* 2008 Mar;42(3):272–80.
35. Hatam LJ, Kayden HJ. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J Lipid Res.* 1979 Jul;20(5):639–45.



## 10. LITERATURA

36. Heitzer T, Herttuala SY, Wild E, Luoma J, Drexler H. Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999 Feb 1;33(2):499–505.
37. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. *New England Journal of Medicine*. 1993 May 20;328(20):1450–6.
38. Mi W, Jd E, Mj T, J M, Cw H. Multivitamin use and mortality in a large prospective study. *American journal of epidemiology* [Internet]. 2000 Jul 15 [cited 2023 Jan 29];152(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10909952/>
39. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996 Mar 23;347(9004):781–6.
40. Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 2008 Mar 15;44(6):1203–8.
41. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition*. 1999 Mar;15(3):255.
42. Combs GF. Selenium in global food systems. *Br J Nutr*. 2001 May;85(5):517–47.
43. Brigelius-Flohé R, Banning A, Schnurr K. Selenium-Dependent Enzymes in Endothelial Cell Function. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2003 Apr;5(2):205–15.
44. Ruseva B, Atanasova M, Georgieva M, Shumkov N, Laleva P. Effects of selenium on the vessel walls and anti-elastin antibodies in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 2012 Feb;237(2):160–6.
45. Bentley-Hewitt KL, Chen RKY, Lill RE, Hedderley DI, Herath TD, Matich AJ, et al. Consumption of selenium-enriched broccoli increases cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated ex vivo, a preliminary human intervention study. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Dec;58(12):2350–7.

## 10. LITERATURA

46. Mahmoodpoor A, Hamishehkar H, Shadvar K, Ostadi Z, Sanaie S, Saghaleini SH, et al. The Effect of Intravenous Selenium on Oxidative Stress in Critically Ill Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Immunol Invest*. 2019 Feb;48(2):147–59.
47. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2002 Nov 19;106(21):2747–57.
48. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
49. Swart R, Schutte AE, van Rooyen JM, Mels CMC. Serum selenium levels, the selenoprotein glutathione peroxidase and vascular protection: The SABPA study. *Food Research International*. 2018 Feb;104:69–76.
50. Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings ES, Bierl C, et al. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Apr;282(4):H1255-1261.
51. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2003 Oct 23;349(17):1605–13.
52. Chrissobolis S, Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, Dayal S, Lentz SR, et al. Glutathione Peroxidase-1 Plays a Major Role in Protecting Against Angiotensin II-Induced Vascular Dysfunction. *Hypertension*. 2008 Apr;51(4):872–7.
53. Arteni AA, Fradot M, Galzerano D, Mendes-Pinto MM, Sahel JA, Picaud S, et al. Structure and Conformation of the Carotenoids in Human Retinal Macular Pigment. *PLoS One*. 2015 Aug 27;10(8):e0135779.
54. Alves-Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett*. 2004 Apr 15;150(1):57–83.
55. Kaulmann A, Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutr Res*. 2014 Nov;34(11):907–29.

## 10. LITERATURA

56. Ozawa Y, Sasaki M, Takahashi N, Kamoshita M, Miyake S, Tsubota K. Neuroprotective effects of lutein in the retina. *Curr Pharm Des.* 2012;18(1):51–6.
57. Torregrosa-Crespo J, Montero Z, Fuentes JL, Reig García-Galbis M, Garbayo I, Vílchez C, et al. Exploring the Valuable Carotenoids for the Large-Scale Production by Marine Microorganisms. *Mar Drugs.* 2018 Jun 8;16(6):203.
58. Zhang H, Yang W, Li Y, Hu L, Dai Y, Chen J, et al. Astaxanthin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2018 Mar;56:18–28.
59. Cheng HM, Koutsidis G, Lodge JK, Ashor A, Siervo M, Lara J. Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2017 Feb;257:100–8.
60. Huang Y, Chen H, Su Y, Liu H, Hu J, Hong K. Increased blood alpha-carotene, all-trans-Beta-carotene and lycopene levels are associated with beneficial changes in heart rate variability: a CVD-stratified analysis in an adult population-based study. *Nutr J.* 2021 May 11;20(1):43.
61. Khalighi Sikaroudi M, Saraf-Bank S, Clayton ZS, Soltani S. A positive effect of egg consumption on macular pigment and healthy vision: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Sci Food Agric.* 2021 Aug 15;101(10):4003–9.
62. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol.* 1987 Mar;18(3):234–9.
63. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc.* 1966;25(6):1773–83.
64. Bennett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol.* 1959 Feb;196(2):381–90.
65. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007 Feb 2;100(2):158–73.
66. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev.* 1999 Jul;79(3):703–61.

## 10. LITERATURA

67. Okada H, Takemura G, Suzuki K, Oda K, Takada C, Hotta Y, et al. Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions. *Crit Care*. 2017 Oct 23;21(1):261.
68. Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol*. 1997 May;171(2):205–11.
69. Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981 Sep;218(3):739–49.
70. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin  $x$ ), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*. 1977 Jan 1;1(8001):18–20.
71. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):197–201.
72. Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Circ Res*. 1999 Feb 5;84(2):210–9.
73. Chien S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. *Ann Biomed Eng*. 2008 Apr;36(4):554–62.
74. Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017 Jan;219(1):152–61.
75. Vanhoutte PM, Tang EHC. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J Physiol*. 2008 Nov 15;586(22):5295–304.

## 10. LITERATURA

76. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988 Mar 31;332(6163):411–5.
77. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:851–76.
78. Rubanyi GM, Botelho LH. Endothelins. *FASEB J*. 1991 Sep;5(12):2713–20.
79. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527–61.
80. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*. 1992 Jun;85(6):2284–90.
81. Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem J*. 1980 Aug 15;190(2):421–9.
82. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):685–93.
83. Jung F, Franke RP, Mrowietz C, Wolf S, Kiesewetter H. Capillary occlusion and secondary angiogenesis in a patient with Raynaud’s phenomenon. *J Vasc Res*. 1992;29(2):71–4.
84. Blocki A, Beyer S, Jung F, Raghunath M. The controversial origin of pericytes during angiogenesis - Implications for cell-based therapeutic angiogenesis and cell-based therapies. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;69(1–2):215–32.
85. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 1998 Sep;25(4–5):385–91.
86. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem*. 1999 Jan;45(1):7–17.

## 10. LITERATURA

87. Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993 Oct;92(4):1866–74.
88. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation.* 2007 May 8;115(18):2390–7.
89. Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, et al. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation.* 2009 Aug 11;120(6):502–9.
90. Leng GC, Fowkes FG, Donnan PT, Housley E. Reactive hyperemia test in a random sample of the general population. *J Vasc Surg.* 1993 Mar;17(3):479–86.
91. Wilkinson IB, Webb DJ. Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol.* 2001 Dec;52(6):631–46.
92. Rocha M, Apostolova N, Hernandez-Mijares A, Herance R, Victor VM. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: mitochondria-targeted therapeutics. *Curr Med Chem.* 2010;17(32):3827–41.
93. Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front Physiol.* 2012 Dec 5;3:441.
94. Saboori S, Koohdani F, Nematipour E, Yousefi Rad E, Saboor-Yaraghi AA, Javanbakht MH, et al. Beneficial effects of omega-3 and vitamin E coadministration on gene expression of SIRT1 and PGC1 $\alpha$  and serum antioxidant enzymes in patients with coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016 Jun;26(6):489–94.
95. Jamilian M, Hashemi Dizaji S, Bahmani F, Taghizadeh M, Memarzadeh MR, Karamali M, et al. A Randomized Controlled Clinical Trial Investigating the Effects of Omega-3 Fatty Acids and Vitamin E Co-Supplementation on Biomarkers of Oxidative Stress, Inflammation and Pregnancy Outcomes in Gestational Diabetes. *Can J Diabetes.* 2017 Apr;41(2):143–9.

## 10. LITERATURA

96. Kolobarić N, Drenjančević I, Matic A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Mihalj M. Dietary Intake of n-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults—A Randomised Study. *Nutrients*. 2021 Jun;13(6):1851.
97. Stupin A, Rasic L, Matic A, Stupin M, Kralik Z, Kralik G, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs consumption enhances microvascular reactivity in young healthy individuals. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018 Oct;43(10):988–95.
98. Islam MA, Khandker SS, Kotyla PJ, Hassan R. Immunomodulatory Effects of Diet and Nutrients in Systemic Lupus Erythematosus (SLE): A Systematic Review. *Front Immunol*. 2020;11:1477.
99. Allom V, Mullan B. Maintaining healthy eating behaviour: experiences and perceptions of young adults. *Nutrition & Food Science*. 2014 Jan 1;44(2):156–67.
100. Hutchesson MJ, Rollo ME, Krukowski R, Ells L, Harvey J, Morgan PJ, et al. eHealth interventions for the prevention and treatment of overweight and obesity in adults: a systematic review with meta-analysis. *Obes Rev*. 2015 May;16(5):376–92.
101. Blondin SA, Mueller MP, Bakun PJ, Choumenkovitch SF, Tucker KL, Economos CD. Cross-Sectional Associations between Empirically-Derived Dietary Patterns and Indicators of Disease Risk among University Students. *Nutrients*. 2015 Dec 24;8(1):3.
102. Stok FM, Renner B, Clarys P, Lien N, Lakerveld J, Deliëns T. Understanding Eating Behavior during the Transition from Adolescence to Young Adulthood: A Literature Review and Perspective on Future Research Directions. *Nutrients*. 2018 May 24;10(6):667.
103. Global action plan for the prevention and control of NCDs 2013–2020 [Internet]. [cited 2023 Jan 29]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241506236>
104. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med*. 2017 Jul 19;15(1):131.

## 10. LITERATURA

105. Yu E, Rimm E, Qi L, Rexrode K, Albert CM, Sun Q, et al. Diet, Lifestyle, Biomarkers, Genetic Factors, and Risk of Cardiovascular Disease in the Nurses' Health Studies. *Am J Public Health*. 2016 Sep;106(9):1616–23.
106. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*. 2005 Feb;81(2):341–54.
107. Pistollato F, Iglesias RC, Ruiz R, Aparicio S, Crespo J, Lopez LD, et al. Nutritional patterns associated with the maintenance of neurocognitive functions and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A focus on human studies. *Pharmacol Res*. 2018 May;131:32–43.
108. Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr*. 2011 Dec;14(12A):2274–84.
109. Marcason W. What Are the Components to the MIND Diet? *J Acad Nutr Diet*. 2015 Oct;115(10):1744.
110. Adamsson V, Reumark A, Cederholm T, Vessby B, Risérus U, Johansson G. What is a healthy Nordic diet? Foods and nutrients in the NORDIET study. *Food Nutr Res*. 2012;56.
111. Kralik G, Kralik Z, Grčević M, Kralik I, Gantner V. Enrichment of table eggs with functional ingredients. *Journal of Central European agriculture*. 2018;19(1):72–82.
112. Kralik I, Kralik G, Gvozdanović K. Specifics of table eggs production in the Republic of Croatia. :11.
113. Suresh K. An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4(1):8–11.
114. Tzeng MS, Yang FL, Wang-Hsu GS, Chen BH. Determination of major carotenoids in human serum by liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis [Internet]*. 2020 Jul 14 [cited 2022 Jul 29];12(1). Available from: <https://www.jfda-online.com/journal/vol12/iss1/13>



## 10. LITERATURA

115. Leeson S, Caston L. Enrichment of eggs with lutein. *Poult Sci.* 2004 Oct;83(10):1709–12.
116. Cavka A, Cosic A, Jukic I, Jelakovic B, Lombard JH, Phillips SA, et al. The role of cyclo-oxygenase-1 in high-salt diet-induced microvascular dysfunction in humans. *J Physiol.* 2015 Dec 15;593(24):5313–24.
117. Stupin M, Stupin A, Rasic L, Cosic A, Kolar L, Seric V, et al. Acute exhaustive rowing exercise reduces skin microvascular dilator function in young adult rowing athletes. *European journal of applied physiology.* 2018;118(2):461–74.
118. Mihaljević Z, Matic A, Stupin A, Frkanec R, Kelava V, Tartaro Bujak I, et al. Arachidonic Acid Metabolites of CYP450 Enzymes and HIF-1 $\alpha$  Modulate Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Sprague-Dawley Rats under Acute and Intermittent Hyperbaric Oxygenation. *International journal of molecular sciences [Internet].* 2020 [cited 2022 Feb 17];21(17). Available from: <https://www.bib.irb.hr/1076769>
119. Matic A, Jukic I, Stupin A, Baric L, Mihaljevic Z, Unfirer S, et al. High salt intake shifts the mechanisms of flow-induced dilation in the middle cerebral arteries of Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018 Sep 1;315(3):H718–30.
120. Mihaljević Z, Matic A, Stupin A, Barić L, Jukić I, Drenjančević I. Acute hyperbaric oxygenation, contrary to intermittent hyperbaric oxygenation, adversely affects vasorelaxation in healthy Sprague-Dawley rats due to increased oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity [Internet].* 2018 [cited 2022 Feb 17];2018. Available from: <https://www.bib.irb.hr/925770>
121. Cosic A, Jukic I, Stupin A, Mihalj M, Mihaljevic Z, Novak S, et al. Attenuated flow-induced dilatation of middle cerebral arteries is related to increased vascular oxidative stress in rats on a short-term high salt diet. *J Physiol.* 2016 Sep 1;594(17):4917–31.
122. Vuković R, Blažetić S, Oršolić I, Heffer M, Vari SG, Gajdoš M, et al. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. *Croat Med J.* 2014 Jun;55(3):218–27.
123. D'Ilio S, Violante N, Caimi S, Di Gregorio M, Petrucci F, Senofonte O. Determination of trace elements in serum by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass

## 10. LITERATURA

- spectrometry: developing of a method with a desolvating system nebulizer. *Anal Chim Acta*. 2006 Jul 28;573–574:432–8.
124. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000 Apr 25;101(16):1899–906.
125. Toda N, Tanabe S, Nakanishi S. Nitric Oxide-Mediated Coronary Flow Regulation in Patients with Coronary Artery Disease: Recent Advances. *Int J Angiol*. 2011 Sep;20(3):121–34.
126. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovascular Research*. 1999 Aug 15;43(3):572–9.
127. Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I, Balidemaj K, Dimayuga C, Hudaihed A, et al. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2005 Jan 25;111(3):310–4.
128. Authors/Task Force Members:, Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Ž, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)†. *European Heart Journal*. 2012 Jul 1;33(13):1635–701.
129. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018 Jun;71(6):1269–324.
130. Das UN. Arachidonic acid in health and disease with focus on hypertension and diabetes mellitus: A review. *J Adv Res*. 2018 Jan 4;11:43–55.

## 10. LITERATURA

131. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 2008 Mar;47(2):147–55.
132. Arnold C, Konkol A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of w-6 and w-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacological Reports*. 2010;12.
133. Melikian N, Seddon MD, Casadei B, Chowienczyk PJ, Shah AM. Neuronal Nitric Oxide Synthase and Human Vascular Regulation. *Trends Cardiovasc Med*. 2009 Nov;19(8):256–62.
134. Bachetti T, Comini L, Curello S, Bastianon D, Palmieri M, Bresciani G, et al. Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Nov;37(5):939–45.
135. Seddon MD, Chowienczyk PJ, Brett SE, Casadei B, Shah AM. Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo. *Circulation*. 2008 Apr 15;117(15):1991–6.
136. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989 Nov;161(5):1200–4.
137. Shimada BK, Alfulajj N, Seale LA. The Impact of Selenium Deficiency on Cardiovascular Function. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 2;22(19):10713.
138. Frączek-Jucha M, Szłószarczyk B, Kabat M, Czubek U, Nessler J, Gackowski A. Low triiodothyronine syndrome and serum selenium status in the course of acute myocardial infarction. *Pol Merkur Lekarski*. 2019 Aug 30;47(278):45–51.
139. Sozen E, Demirel T, Ozer NK. Vitamin E: Regulatory role in the cardiovascular system. *IUBMB Life*. 2019 Apr;71(4):507–15.
140. Nguyen TTU, Yeom J hyun, Kim W. Beneficial Effects of Vitamin E Supplementation on Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Oxidative Stress Biomarkers in Patients Receiving Hemodialysis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 3;22(21):11923.

## 10. LITERATURA

141. Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(11):1290–324.
142. Chung RWS, Leanderson P, Lundberg AK, Jonasson L. Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2017 Jul;262:87–93.
143. Stupin A, Cosic A, Novak S, Vesel M, Jukic I, Popovic B, et al. Reduced Dietary Selenium Impairs Vascular Function by Increasing Oxidative Stress in Sprague-Dawley Rat Aortas. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Jun;14(6):591.
144. Ren H, Mu J, Ma J, Gong J, Li J, Wang J, et al. Selenium Inhibits Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction and Apoptosis via Activation of AKT. *CPB*. 2016;38(3):871–82.
145. Adriani M, Diarry VIP, Abdulah R, Wirjatmadi B. Selenium Intake in Hypertensive and Normotensive Post-Menopausal Indonesian Women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61(4):322–5.
146. Bleys J, Navas-Acien A, Laclaustra M, Pastor-Barriuso R, Menke A, Ordovas J, et al. Serum selenium and peripheral arterial disease: results from the national health and nutrition examination survey, 2003-2004. *Am J Epidemiol*. 2009 Apr 15;169(8):996–1003.
147. Minieri M, Di Nardo P. Nutrients: the environmental regulation of cardiovascular gene expression. *Genes Nutr*. 2007 Nov;2(2):163–8.
148. Iacoviello L, Santimone I, Latella MC, de Gaetano G, Donati MB. Nutrigenomics: a case for the common soil between cardiovascular disease and cancer. *Genes Nutr*. 2008 Apr;3(1):19–24.
149. Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, et al. Early Protection Against Sudden Death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2002 Apr 23;105(16):1897–903.
150. Streppel MT, Ocke MC, Boshuizen HC, Kok FJ, Kromhout D. Long-term fish consumption and n-3 fatty acid intake in relation to (sudden) coronary heart disease death: the Zutphen study. *European Heart Journal*. 2008 Jul 10;29(16):2024–30.

## 10. LITERATURA

151. Tousoulis D, Plastiras A, Siasos G, Oikonomou E, Verveniotis A, Kokkou E, et al. Omega-3 PUFAs improved endothelial function and arterial stiffness with a parallel antiinflammatory effect in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2014 Jan;232(1):10–6.
152. Tagawa H, Shimokawa H, Tagawa T, Kuroiwa-Matsumoto M, Hirooka Y, Takeshita A. Long-Term Treatment with Eicosapentaenoic Acid Augments Both Nitric Oxide-Mediated and Non-Nitric Oxide-Mediated Endothelium-Dependent Forearm Vasodilatation in Patients with Coronary Artery Disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1999 Apr;33(4):633–40.
153. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z, et al. 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 Jun 10;21(11):E4149.
154. Calder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006 Jun 1;83(6):1505S-1519S.
155. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*. 2001 Sep;36(9):1007–24.
156. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108(1):15–23.
157. Šušnjara P, Kolobarić N, Matic A, Mihaljević Z, Stupin A, Marci S, et al. Consumption of Hen Eggs Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Vitamin E and Lutein Incites Anti-Inflammatory Conditions in Young, Healthy Participants — A Randomized Study. *FBL*. 2022 Dec 27;27(12):332.
158. Avendaño MS, Martínez-Revelles S, Aguado A, Simões MR, González-Amor M, Palacios R, et al. Role of COX-2-derived PGE2 on vascular stiffness and function in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2016 May;173(9):1541–55.

## 10. LITERATURA

159. Zehr KR, Walker MK. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial function in humans at risk for atherosclerosis: A review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018 Jan;134:131–40.
160. Schunck WH, Konkel A, Fischer R, Weylandt KH. Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases. *Pharmacol Ther.* 2018 Mar;183:177–204.
161. Manuelli M, Della Guardia L, Cena H. Enriching Diet with n-3 PUFAs to Help Prevent Cardiovascular Diseases in Healthy Adults: Results from Clinical Trials. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 18;18(7):1552.
162. Araujo P, Belghit I, Aarsæther N, Espe M, Lucena E, Holen E. The Effect of Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids on the Production of Cyclooxygenase and Lipoxygenase Metabolites by Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Nutrients.* 2019 Apr 27;11(5):966.
163. Simonetto M, Infante M, Sacco RL, Rundek T, Della-Morte D. A Novel Anti-Inflammatory Role of Omega-3 PUFAs in Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Nutrients.* 2019 Sep 23;11(10):2279.
164. Larkin SW, Fraser L, Showell HJ, Williams TJ, Warren JB. Prolonged microvascular vasodilation induced by leukotriene B4 in human skin is cyclooxygenase independent. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Jan;272(1):392–8.
165. Zhao Y, Monahan FJ, McNulty BA, Li K, Bloomfield FJ, Duff DJ, et al. Plasma n-3 polyunsaturated fatty status and its relationship with vitamin E intake and plasma level. *Eur J Nutr.* 2017 Apr;56(3):1281–91.
166. Brand A, Bauer NG, Hallott A, Goldbaum O, Ghebremeskel K, Reifen R, et al. Membrane lipid modification by polyunsaturated fatty acids sensitizes oligodendroglial OLN-93 cells against oxidative stress and promotes up-regulation of heme oxygenase-1 (HSP32). *J Neurochem.* 2010 Apr;113(2):465–76.
167. Wang X, Quinn PJ. The location and function of vitamin E in membranes (review). *Mol Membr Biol.* 2000;17(3):143–56.

## 10. LITERATURA

168. Sarir H, Emdadifard G, Farhangfar H, TaheriChadorneshin H. Effect of vitamin E succinate on inflammatory cytokines induced by high-intensity interval training. *J Res Med Sci.* 2015 Dec;20(12):1177–81.
169. Pein H, Ville A, Pace S, Temml V, Garscha U, Raasch M, et al. Endogenous metabolites of vitamin E limit inflammation by targeting 5-lipoxygenase. *Nat Commun.* 2018 Sep 20;9(1):3834.
170. Jiang Q, Yin X, Lill MA, Danielson ML, Freiser H, Huang J. Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 23;105(51):20464–9.
171. Nazrun AS, Norazlina M, Norliza M, Nirwana SI. The anti-inflammatory role of vitamin e in prevention of osteoporosis. *Adv Pharmacol Sci.* 2012;2012:142702.
172. Meydani SN, Meydani M, Rall LC, Morrow F, Blumberg JB. Assessment of the safety of high-dose, short-term supplementation with vitamin E in healthy older adults. *Am J Clin Nutr.* 1994 Nov;60(5):704–9.
173. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Mahrer PR, Sevanian A, Liu C ran, et al. Alpha-tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis: the Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). *Circulation.* 2002 Sep 17;106(12):1453–9.
174. Liu X, Yang G, Luo M, Lan Q, Shi X, Deng H, et al. Serum vitamin E levels and chronic inflammatory skin diseases: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2021;16(12):e0261259.
175. Monk JM, Hou TY, Turk HF, Weeks B, Wu C, McMurray DN, et al. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Decrease Obesity-Associated Th17 Cell-Mediated Inflammation during Colitis. *PLoS One.* 2012 Nov 16;7(11):e49739.
176. Kim JY, Lim K, Kim KH, Kim JH, Choi JS, Shim SC. N-3 polyunsaturated fatty acids restore Th17 and Treg balance in collagen antibody-induced arthritis. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194331.

## 10. LITERATURA

177. Zake T, Kalere I, Upmale-Engela S, Svirskis S, Gersone G, Skesters A, et al. Plasma levels of Th17-associated cytokines and selenium status in autoimmune thyroid diseases. *Immun Inflamm Dis*. 2021 May 4;9(3):792–803.
178. Lira FS, Rosa JC, Cunha CA, Ribeiro EB, do Nascimento CO, Oyama LM, et al. Supplementing alpha-tocopherol (vitamin E) and vitamin D3 in high fat diet decrease IL-6 production in murine epididymal adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes following LPS stimulation. *Lipids Health Dis*. 2011 Feb 27;10:37.
179. Belisle SE, Leka LS, Dallal GE, Jacques PF, Delgado-Lista J, Ordovas JM, et al. Cytokine response to vitamin E supplementation is dependent on pre-supplementation cytokine levels. *Biofactors*. 2008;33(3):191–200.
180. Yanai R, Chen S, Uchi SH, Nanri T, Connor KM, Kimura K. Attenuation of choroidal neovascularization by dietary intake of  $\omega$ -3 long-chain polyunsaturated fatty acids and lutein in mice. *PLoS One*. 2018 Apr 25;13(4):e0196037.
181. Costa ED, Rezende BA, Cortes SF, Lemos VS. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol*. 2016;7:206.
182. Chakrabarti S, Chan CK, Jiang Y, Davidge ST. Neuronal nitric oxide synthase regulates endothelial inflammation. *J Leukoc Biol*. 2012 Jun;91(6):947–56.
183. Handy RL, Moore PK. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br J Pharmacol*. 1998 Mar;123(6):1119–26.
184. Goua M, Mulgrew S, Frank J, Rees D, Sneddon AA, Wahle KWJ. Regulation of adhesion molecule expression in human endothelial and smooth muscle cells by omega-3 fatty acids and conjugated linoleic acids: involvement of the transcription factor NF-kappaB? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008 Jan;78(1):33–43.
185. Komatsu W, Ishihara K, Murata M, Saito H, Shinohara K. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2003 Apr 15;34(8):1006–16.



## 10. LITERATURA

186. Arnhold J. The Dual Role of Myeloperoxidase in Immune Response. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 29;21(21):8057.
187. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys.* 2018 Feb 15;640:47–52.
188. Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. Neutrophil-Mediated Regulation of Innate and Adaptive Immunity: The Role of Myeloperoxidase. *J Immunol Res.* 2016;2016:2349817.
189. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology.* 2007 Dec;15(6):252–9.
190. Umar S, van der Laarse A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem.* 2010 Jan;333(1–2):191–201.
191. Gao Q, Liu Y, Wu Y, Zhao Q, Wang L, Gao S, et al. IL-17 intensifies IFN- $\gamma$ -induced NOS2 upregulation in RAW 264.7 cells by further activating STAT1 and NF- $\kappa$ B. *International Journal of Molecular Medicine.* 2016 Feb 1;37(2):347–58.
192. Prabhu KS, Zamamiri-Davis F, Stewart JB, Thompson JT, Sordillo LM, Reddy CC. Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation. *Biochem J.* 2002 Aug 15;366(Pt 1):203–9.
193. Engström K, Saldeen AS, Yang B, Mehta JL, Saldeen T. Effect of fish oils containing different amounts of EPA, DHA, and antioxidants on plasma and brain fatty acids and brain nitric oxide synthase activity in rats. *Ups J Med Sci.* 2009 Dec;114(4):206–13.
194. Malkowski MG, Thuresson ED, Lakkides KM, Rieke CJ, Micielli R, Smith WL, et al. Structure of Eicosapentaenoic and Linoleic Acids in the Cyclooxygenase Site of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1\*. *Journal of Biological Chemistry.* 2001 Oct 5;276(40):37547–55.
195. Amuna P, Zotor FB. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. *Proc Nutr Soc.* 2008 Feb;67(1):82–90.

## 10. LITERATURA

196. Ludwig DS, Peterson KE, Gortmaker SL. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):505–8.
197. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i–xii, 1–253.
198. Ryan D, Barquera S, Barata Cavalcanti O, Ralston J. The Global Pandemic of Overweight and Obesity. In: Kickbusch I, Ganten D, Moeti M, editors. *Handbook of Global Health* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2021 [cited 2023 Jan 31]. p. 739–73. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45009-0\\_39](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45009-0_39)
199. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*. 1995 Jun;61(6 Suppl):1402S-1406S.
200. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 Feb 16;99(6):779–85.
201. Serra-Majem L, Roman B, Estruch R. Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutr Rev*. 2006 Feb;64(2 Pt 2):S27-47.
202. Abdelhamid A, Jennings A, Hayhoe RPG, Awuzudike VE, Welch AA. High variability of food and nutrient intake exists across the Mediterranean Dietary Pattern—A systematic review. *Food Sci Nutr*. 2020 Jul 29;8(9):4907–18.
203. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr*. 2004 Dec;134(12 Suppl):3479S-3485S.
204. Basu A, Betts NM, Ortiz J, Simmons B, Wu M, Lyons TJ. Low-calorie Cranberry Juice Decreases Lipid Oxidation and Increases Plasma Antioxidant Capacity in Women with Metabolic Syndrome. *Nutr Res*. 2011 Mar;31(3):190–6.

## 10. LITERATURA

205. Karlsen A, Paur I, Bøhn SK, Sakhi AK, Borge GI, Serafini M, et al. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-kappaB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur J Nutr.* 2010 Sep;49(6):345–55.
206. P. NPV, Joye IJ. Dietary Fibre from Whole Grains and Their Benefits on Metabolic Health. *Nutrients.* 2020 Oct 5;12(10):3045.
207. Rebello SA, Koh H, Chen C, Naidoo N, Odegaard AO, Koh WP, et al. Amount, type, and sources of carbohydrates in relation to ischemic heart disease mortality in a Chinese population: a prospective cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2014 Jul 1;100(1):53–64.
208. Rebello C, Greenway FL, Dhurandhar NV. Functional foods to promote weight loss and satiety. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014 Nov;17(6):596–604.
209. Magnúsdóttir OK, Landberg R, Gunnarsdóttir I, Cloetens L, Åkesson B, Rosqvist F, et al. Whole grain rye intake, reflected by a biomarker, is associated with favorable blood lipid outcomes in subjects with the metabolic syndrome--a randomized study. *PLoS One.* 2014;9(10):e110827.
210. Li D, Wahlqvist ML, Sinclair AJ. Advances in n-3 polyunsaturated fatty acid nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2019;28(1):1–5.
211. Chareonrungrueangchai K, Wongkawinwoot K, Anothaisintawee T, Reutrakul S. Dietary Factors and Risks of Cardiovascular Diseases: An Umbrella Review. *Nutrients.* 2020 Apr 15;12(4):1088.
212. Guasch-Ferré M, Liu X, Malik VS, Sun Q, Willett WC, Manson JE, et al. Nut Consumption and Risk of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Nov 14;70(20):2519–32.
213. Zhang B, Xiong K, Cai J, Ma A. Fish Consumption and Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. *Nutrients.* 2020 Jul 29;12(8):2278.
214. Salas Salvadó J, Maraver Eizaguirre F, Rodríguez-Mañas L, Saenz de Pipaón M, Vitoria Miñana I, Moreno Aznar L. [The importance of water consumption in health and disease prevention: the current situation]. *Nutr Hosp.* 2020 Oct 21;37(5):1072–86.

## 10. LITERATURA

215. Bray GA, Popkin BM. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. *Diabetes Care*. 2014 Apr;37(4):950–6.
216. Stanhope KL. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016 Feb;53(1):52–67.
217. Simonson M, Boirie Y, Guillet C. Protein, amino acids and obesity treatment. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(3):341–53.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Petar Šušnjara, mag. med. lab. diagn.

**Datum rođenja:** 04. kolovoza, 1994.

**Email adresa:** psusnjara@mefos.hr

### **Radno iskustvo**

- 2019. – u tijeku  
doktorand asistent na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osije, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer Osijek

### **Obrazovanje:**

- 2019 – u tijeku  
Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek
- 2015. – 2019. – Osijek, Hrvatska  
Preddiplomski i diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinsko fakultet Osijek, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer Osijek

### **Jezične sposobnosti:**

- Materinji jezik: hrvatski
- Ostalo: engleski

### **Priznanja i nagrade:**

- 2021 – Dekanova nagrada za izvannastavne aktivnosti i doprinosu ugleda Medicinskog fakulteta znanosti, struke te promoviranju zdravlja i prevencije za kardiovaskularne bolesti.
- 2022- Priznanje Hrvatske lige za hipertenziju radi promicanja zdravlja i aktivnosti na raznim sastavnicama
- 2022 – Dekanova nagrada za izvannastavne aktivnosti i doprinosu ugleda Medicinskog fakulteta znanosti, struke te promoviranju zdravlja i prevencije za kardiovaskularne bolesti u okviru aktivnosti FiziOS udruge

**Projekti:**

- Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinska ispitivanja funkcionalne hrane, # KK.01.1. 1.01.0010.- istraživač, doktorand
- IP16-MEFOS-2022: „Učinak karnozina na vaskularnu funkciju Sprague-Dawley štakora na visoko slanoj dijeti“, voditeljica projekta doc.dr.sc. Zrinka Mihaljević
- IP5-MEFOS-2021: „Uloga adenzinskih A1 i A2A receptora u mehanizmima vaskularne reaktivnosti nakon hiperbarične oksigenacije - molekularni pristup“, voditeljica projekta doc.dr.sc. Zrinka Mihaljević
- IP2-MEFOS-2020: „Učinci djete sa smanjenim unosom kuhinjske soli na Th17-posredovanu upalu i vaskularnu reaktivnost kod oboljelih od vulgarne psorijaze“; voditeljica projekta izv.dr. sc. Martina Mihalj

**Članci u časopisima i pregledni članci u časopisima CC:**

1. **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Stupin A, et al. Consumption of Nutritionally Enriched Hen Eggs Enhances Endothelium-Dependent Vasodilation via Cyclooxygenase Metabolites in Healthy Young People—A Randomized Study. *Nutrients* 2023; 15: 1599. Rad iz disertacije
2. **Šušnjara P**, Kolobarić N, Matic A, Mihaljević Z, Stupin A, Marzi S, et al. Consumption of Hen Eggs Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Vitamin E and Lutein Incites Anti-Inflammatory Conditions in Young, Healthy Participants — A Randomized Study. *FBL*. 2022 Dec 27;27(12):332. Rad iz disertacije
3. Knezović A, Kolobarić N, Drenjančević I, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, Jukić I, et al. Role of Oxidative Stress in Vascular Low-Grade Inflammation Initiation Due to Acute Salt Loading in Young Healthy Individuals. *Antioxidants* [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 3];11(3).

4. Stupin A, Cvetko A, Kralik G, Mihalj M, **Šušnjara P**, Kolobarić N, et al. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs consumption on IgG and total plasma protein N-glycosylation in healthy individuals and cardiovascular patients. *Glycobiology*. 2021 Sep 20;31(9):1163–75.
5. Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matić A, Kozina N, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, et al. Carnosine, small but mighty - prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. *Antioxidants* [Internet]. 2021;
6. Breškić Ćurić Ž, Masle AM, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Stupin A, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, et al. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome—A Randomized Study. *Biology* [Internet]. 2021 [cited 2023 Feb 3];10(8).
7. Stupin A, Drenjančević I, **Šušnjara P**, Debeljak Ž, Kolobarić N, Jukić I, et al. Is There Association between Altered Adrenergic System Activity and Microvascular Endothelial Dysfunction Induced by a 7-Day High Salt Intake in Young Healthy Individuals. *Nutrients*. 2021 May 20;13(5):1731.
8. Kolobarić N, Drenjančević I, Matić A, **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Mihalj M. Dietary Intake of n-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults—A Randomised Study. *Nutrients*. 2021 Jun;13(6):1851.
9. Kolar L, Stupin M, Stupin A, **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Matić A, et al. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Prev Nutr Food Sci*. 2021 Dec 31;26(4):388–99.
10. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, **Šušnjara P**, Kolar L, Mihaljević Z, et al. 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 Jun 10;21(11):4149.

11. Kolobarić N, Gradinjan Centner M, **Šušnjara P**, Matić A, Drenjančević I. Anthropometric and Biochemical Parameters in Relation to Dietary Habits as Early Indicator of Cardiovascular Impairment in Young Adult Cohort. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(24):1–14.
12. Kolobarić N, Stupin A, **Šušnjara P**, Barić L, Matić A. Effect of low selenium diet on glutathione peroxidase 3 concentration in male Sprague- Dawley rats serum. *Southeastern European Medical Journal*. 2019;3(1):50–9.

### **Članci u časopisima i pregledni članci u drugim časopisima:**

#### **Konferencijski radovi u CC časopisima:**

1. **Šušnjara P**, Galovic O, Kolobaric N, Stupin A, Mihaljevic Z, Drenjancevic I. Influence of Functionally Enriched Eggs Consumption on the Level of Vitamin E in the Serum of Healthy Young Subjects. 2022;125.
2. **Šušnjara P**, Kolobaric N, Drenjancevic I, Mihaljevic Z. Anti-Inflammatory Potential of Quatro Eggs Consumption in Healthy Young Individuals. 2021;42.
3. **Šušnjara P**, Matic A, Mihaljevic Z, Drenjancevic I. Influence of hyperbaric oxygenation on mRNA expression of antioxidative enzymes in blood vessels of male Sprague-Dawley rats. *RECOOP Student Conference 2019 Abstract Book*. 2019;28.
4. Mujkić R, Šnajder Mujkić D, **Šušnjara P**, Matić A, Rožac K, Ilić I, et al. IL-6 and IL-8 gene expression in male children with obesity: A possibly early atherosclerotic inflammatory predictor. *Journal of Bioanthropology*. 2022;164.
5. Mujkić R, Šnajder Mujkić D, **Šušnjara P**, Ilić I, Grgić A, Divković D, et al. Gene expression of collagen VI alpha 3 (COL6A3) as indicator of adipose tissue inflammation in early childhood. *ZoomForward2022: European Congress on Obesity Obes Facts 2022 ; 15(suppl 1):1-240*. 2022;213.



6. Grinžek T, **Šušnjara P**, Kolobarić N, Drenjančević I. MRNA Expression of Enzymes COX1, COX2, eNOS AND iNOS in Athletes Consuming Enriched Hen Eggs. 4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences - Book of Abstracts. 2022;29.
7. Lagator M, **Šušnjara P**, Kolobarić N, Drenjančević I. MRNA Expression of Antioxidant Enzymes in Athletes Consuming Enriched Hen Eggs. 4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences - Book of Abstracts. 2022;31.
8. Kovač L, Đambić V, **Šušnjara P**, Kibel A, Mihaljević Z. Influence of Oxygen on Adenosine A1 and A2a Receptor Gene Expression in Cerebral Blood Vessels of Sprague-Dawley Rats. 4th International Student and 17th Bridges in Life Sciences Conferences. 2022;30.
9. Kolobarić N, Gradinjan Centner M, **Šušnjara P**, Matić A, Drenjančević I. Anthropometric and Biochemical Parameters in Relation to Dietary Habits as Early Indicator of Cardiovascular Impairment in Young Adult Cohort. 16 th RECOOP Bridges in Life Sciences Video Conference Abstract Book. 2021;47.
10. Kozina N, **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Perica A, Drenjančević I. The establishment of the method for measurement of the markers of oxidative stress in HeLa cell culture. The 12th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation - Abstract Book [Internet]. 2018;
11. Ćosić A, Heffer M, Balog M, Ivić V, Gaspar R, **Šušnjara P**, Vari SG, et al. Different antioxidative enzymes expression in aorta and brain blood vessels in obese prediabetic elderly rats of both sexes treated with metformin or liraglutide. RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference Book of Abstracts. 2017;52.

**Kongresna izvješća (sažeci) u drugim časopisima:**

1. **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Stupin A, Kolobarć N, Drenjančević I. Positive effect of consumption of functionally enriched food on microcirculation of healthy young subjects. 2022;9.
2. **Šušnjara P**, Galović O, Kolobarić N, Mihaljević Z, Drenjančević I. Mjerenje koncentracije luteina u serumu kod mladih zdravih ispitanika. 2022;
3. **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Stupin A, Kolobarić N, Drenjančević I. Influence of consumption of eggs enriched with functional compounds on endothelial function in healthy young subjects. 2022;19.
4. **Šušnjara P**, Stupin A, Kolobarić N, Mihaljević Z, Drenjančević I. Four Nutrients - Enriched Hen Eggs Consumption Improves Skin Microvascular Reactivity in Healthy Individuals. XII ISIN Conference on Immunonutrition July 14– 16, 2021 (Online): Abstracts in Annals of Nutrition and Metabolism. 2021;12.
5. **Šušnjara P**, Drenjančević I, Jelaković B, Jukić I, Kolobarić N, Mihaljević Z, et al. Microvascular reactivity in hypertensive and apparently healthy individuals in a random sample of the adult population (Solin, Croatia) – preliminary data from research project Epidemiology of arterial hypertension and salt intake in Croatia (EH-UH 2). 2021;1.
6. **Šušnjara P**, Stupin A, Kaprel R, Vidović S, Kolar M, Kolobarić N, et al. The role of cyclooxygenase in the mechanisms of vascular reactivity in the skinmicrocirculation of young healthy individuals. 2021;26.
7. **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Matić A, Kolobarić N, Šafer I, Drenjančević I. 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. 14th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation. 2020;33.
8. Drenjančević I, Kolar L, Stupin M, Stupin A, **Šušnjara P**, Jukić I, et al. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in athletes consuming functional food enriched with n-3 PUFAs, lutein, selenium and vitamin E. 2022;
  9. Drenjančević I, Kolar L, Stupin M, **Šušnjara P**, Kolobarić N, Mihaljević Z, et al. Antioxidants supplementation in a form of functional food enhances oxidative status of competitive athletes. *Acta Physiologica* September 2022, Volume 236, Supplement 725- *Europhysiology 2022 Book of Abstracts*. 2022;724.
  10. Knezović A, Drenjančević I, Mihalj M, Kolobarić N, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, et al. Role of oxidative stress in inflammatory response induced by a 7-day high-salt diet in salt-resistant healthy individuals. *Stevo Julius Zagreb conference Book of Abstracts*. 2022;41.
  11. Kolobarić N, Mihalj M, **Šušnjara P**, Matić A, Drenjančević I. Imunoprotektivni učinci funkcionalno obogaćenih n-3 PUFA kokošnjih jaja nakon trojednog dijetalnog protokola kod mladih, zdravih ljudi. *XXVII međunarodno savjetovanje krmiva 2022 - zbornik sažetaka*. 2022;82.
  12. Mihaljević Z, Stupin A, Mihalj M, Selthofer-Relatić K, Kibel A, Breškić Ćurić Ž, **Šušnjara P**, et al. Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) na hsCRP i upalne citokine u serumu bolesnika s aterosklerotskom koronarnom bolešću. *Zbornik sažetaka 27 Međunarodnog savjetovanja krmiva 2022*. 2022;84.
  13. Perić L, Drenjančević I, Kolar M, **Šušnjara P**, Stupin A. 7-Days High-Salt Diet Affects NO-Mediated Microvascular Endothelial Vasodilation In Young Healthy Individuals. *Journal of Hypertension* June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e34. 2022;E34.
  14. Kolobarić N, Mihalj M, **Šušnjara P**, Matić A, Drenjančević I. Dietary intake of n-3 PUFAs enriched hen eggs changes Treg population frequencies in PBMCs of young,

healthy individuals –randomized controlled study. Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2022 - Abstract Book. 2022;36.

15. Kolar L, Stupin M, **Šušnjara P**, Stupin A, Drenjančević I. Functional Food Enriched in N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Lutein and Vitamin E Enhances Microvascular Endothelial Function of Competitive Athletes. *Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e205. 2022;E205.*
16. Mihaljević Z, Kozina N, Kibel A, **Šušnjara P**, Biljan D, Lenz I, et al. Effect of carnosine on vascular function of Sprague-Dawley rats on a high-salt diet – a pilot study. 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian Physiological Society - Book of Abstracts. 2022;76.
17. Knezović A, Kolobarić N, Drenjančević I, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, Jukić I, et al. 7-Days High Salt Diet Affects the Production of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Young Healthy Individuals. *Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e241. 2022;E241.*
18. Tarnovski L, Frkanec S, Katić L, Štrbac T, **Šušnjara P**, Lovaković J, et al. Poor Hypertension Control and Disappearance of Mediterranean Life Style on the Croatian Adriatic Islands. Hunt on the Silent Killer (HSK) - Opportunistic Public Health Action. *Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e208. 2022;E208.*
19. Drenjančević I, Stupin A, **Šušnjara P**, Kolobarić N, Kolar L, Masle AM, et al. Does Functional Food Provide Benefits for Cardiovascular Health? Ongoing Studies in Scientific Centre of Excellence. *Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e206. 2022;E206.*
20. Mihaljević Z, Jukić I, Matić A, Stupin A, Kolobarić N, Kozina N, **Šušnjara P**, et al. Permissive role of angiotensin ii in maintenance of endothelium-dependent vasodilation in cerebral microcirculation. *Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e282. 2022;E282.*

21. Kos M, **Šušnjara P**, Nađ T, Kolobarić N, Stupin A, Drenjančević I, et al. Oxidative stress level in children with essential arterial hypertension. 3rd Regional Congress of Physiological Societies and 5th Congress of Croatian Physiological Society : Abstract book. 2022;27.
22. Bonet S, Popović F, Šego B, Vidović S, Bačun T, **Šušnjara P**, et al. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 among students of Faculty of Medicine Osijek and its correlation with body mass index. OSCON Book of Abstracts [Internet]. 2022;
23. Mihaljević Z, Stupin A, Breškić Ćurić Ž, Mihalj M, Kolobarić N, **Šušnjara P**, et al. Effect of Functionally Enriched Eggs Consumption in patients with chronic coronary artery disease on vascular inflammation promoters. Acta Physiologica. 2022;907.
24. Stupin M, Kolar L, Stupin A, Jukić I, **Šušnjara P**, Mihaljević Z, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids enriched hen eggs consumption enhances microvascular endothelial function in professional athletes. ESH-ISH 2021 Abstract Book [Internet]. 2021;
25. Barić L, Drenjančević I, Matić A, **Šušnjara P**, Stupin M, Kolobarić N, et al. The effect of 7-day high-salt diet on serum antioxidant enzymes protein concentrations: does antioxidant vitamins supplementation matter? ESH-ISH 2021 Abstract Book [Internet]. 2021;
26. Knezović A, Kolobarić N, Drenjančević I, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, Jukić I, et al. Immune Responses and Endothelial Activation Following 7-Day High-Salt Diet in Young Healthy Individuals. 3rd Young scientist day – Conference Abstract Book. 2021;9.
27. Mihaljević Z, Knezović A, **Šušnjara P**, Mihalj M, Drenjančević I, Stupin A. Systemic Pro-Inflammatory Cytokines' Level Following 7-Day High-Salt Diet in Healthy Young Individuals. XII ISIN Conference on Immunonutrition July 14–16, 2021 (Online): Abstracts in Annals of Nutrition and Metabolism. 2021;16.

28. Kolobarić N, Matić A, **Šušnjara P**, Mihalj M, Drenjančević I. N-3-Polyunsaturated Fatty Acids-Enriched Eggs Consumption Increases Serum Concentrations of E-Series Resolvins in Young Healthy Participants. *Annals of Nutrition & Metabolism ; XII ISIN Conference on Immunonutrition July 14–16, 2021 (Online): Abstracts.* 2021;11.
29. Breškić Ćurić Ž, Masle AM, Selthofer Relatić K, Kristina, Kibel A, Stupin A, **Šušnjara P**, et al. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih s 4 funkcionalna elementana mikrovaskularnu funkciju u pacijenata s kroničnom koronarnom bolesti. 2021;2.
30. Jukić I, Stupin A, Kolar L, Perić L, Vincetić I, **Šušnjara P**, et al. Assessment of microvascular reactivity in randomly selected adult populationehuh study croatian scientific foundation. 2021;
31. Stupin A, Jukić I, Kolar L, Stupin M, **Šušnjara P**, Matić A, et al. Does the endothelium of competitive athletes benefit from the consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs? – Paper presentation. *Science 4 Health Book of Abstracts.* 2021;27.
32. Drenjančević I, Stupin A, Mihaljević Z, Breškić Ćurić Ž, Masle AM, **Šušnjara P**, Kibel A, et al. Changes in serum levels of inflammatory biomarkers in patients with acute and chronic coronary syndrome consuming n-3 polyunsaturated fatty acid enriched hen eggs - a randomized study. *Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2021, Abstract book.* 2021;40.
33. Kolobarić N, Drenjančević I, Matić A, **Šušnjara P**, Mihaljević Z, Mihalj M. DIETARY n-3 PUFAs Increase anti-inflammatory cytokine TGF-B1 production by pbmcs following pma/ionomycin stimulation. *15th Annual Meeting of Croatian Physiological Society wih International Participation Program and Abstract Book.* 2021;47.
34. Drenjančević I, Jukić I, Kolobarić N, Stupin A, Matić A, Kozina N, **Šušnjara P**, et al. Antioxidative and anti-inflammatory characteristics of carnosine- a perspective for use in functional food. *15th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation- abstract book.* 2021;22.

35. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Mihalj M, Selthofer-Relatić K, Kibel A, **Šušnjara P**, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched chicken eggs consumption in patients with known atherosclerotic coronary artery disease on pro-inflammatory cytokines. The 14th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation „Homeostasis – From Cell to Organ“ - Abstract Book [Internet]. 2020;
36. Mihaljević Z, Jukić I, Matić A, Stupin A, Mihalj M, **Šušnjara P**, Kibel A, et al. Ion channels modulation after acute and intermittent hyperbaric oxygen exposure – changes in vascular relaxation mechanism. The 14th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation „Homeostasis – From Cell to Organ“ - Abstract Book [Internet]. 2020;
37. Stupin A, Drenjančević I, Barić L, Matić A, **Šušnjara P**, Stupin M, et al. Vitamins C and E supplementation during 7-day high-salt intake prevents impairment of microvascular endothelium-dependent vasodilation in young healthy individuals. The 14th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation „Homeostasis – From Cell to Organ“ - Abstract Book [Internet]. 2020;
38. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, **Šušnjara P**, Kolar L, Mihaljević Z, et al. Original research article presentation: anti-inflammatory potential of n-3 polyunsaturated fatty acids enriched hen eggs consumption in improving microvascular endothelial function of healthy individuals-clinical trial. Round Table: Why to consume functional food? [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 3];
39. Mihalj M, Matić A, **Šušnjara P**, Drenjančević I. Short Term Blockade of Angiotensin II Type 1 Receptor by Losartan Effects on Blood Leukocyte Subpopulations' ROS and RNS Levels in SpragueDawley Rats. *Journal of Vascular Research* 56:1-134. 2019;82.
40. Kozina N, Matić A, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, Vuković A, Vuković R, et al. The Effect of High Salt Dietary Intake and Angiotensin II Infusion on Activity of Antioxidative Enzymes in Serum of Sprague-Dawley Rats. *Journal of Vascular Research* 56:1–134. 2019;67.

41. Mihaljević Z, Matić A, Stupin A, Jukić I, **Šušnjara P**, Kozina N, et al. Angiotensin II-Type 1 Receptor Blockade with Losartan Affects the Expression of Enzymes Involved in Vascular Reactivity and Balance of Vascular Oxidative Stress of Sprague-Dawley Rats. *Journal of Vascular Research* 56:1–134. 2019;82.
42. Drenjančević I, Stupin A, Barić L, Stupin M, Mihalj M, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, et al. Increased Oxidative Stress Underlies Impaired Endothelial Function and Vascular Reactivity with High Salt Dietary Intake, Independently of Blood Pressure Changes – Translational Studies. *Journal of Vascular Research* 56(suppl 1):1–134. 2019;29.
43. Drenjancevic I, Mihalj M, Stupin A, Matić A, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, Jukić I, et al. Functional food in cardiovascular protection- effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. 12 međunarodna znanstvena i stručna konferencija Hranom do zdravlja. 2019;56.
44. Breškić Ćurić Ž, Selthofer-Relatić K, Stupin M, Šerić V, Matić A, **Šušnjara P**, Kibel A, et al. Effect of n-3 Polysaturated Fatty Acids-enriched Chicken Eggs Consumption on the Microcirculatory Function and Blood Biochemical Markers in Patients with Known Atherosclerotic Coronary Artery Disease - Preliminary Results. 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation - Abstract Book. 2019;O3.
45. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Matić A, **Šušnjara P**, Barić L, et al. Can n-3 PUFA Functional Food Affect Healthy Endothelium in Athletes? 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation - Abstract Book. 2019;O7.
46. Mihaljević Z, Mišir M, Radmilović M, Justić H, Grgić S, Matić A, **Šušnjara P**, et al. Establishing the model of tMCAO induced stroke in TFF3<sup>-/-</sup> knockout mice. *Acta physiologica* Volume 227, Issue S718. 2019;87.
47. Matić A, Mihaljević Z, **Šušnjara P**, Kolobarić N, Stupin A, Drenjančević I. Angiotensin II Infusion Changes Hypoxia- Inducible Factor 1 (HIF-1) And Its Accompanying Genes Expression in Cerebral Microcirculation of High Salt Fed Sprague-Dawley Rats. *Acta physiologica* Volume 227, Issue S718. 2019;163.



48. Matic A, Mihaljević Z, Jukić I, Kolobarić N, **Šušnjara P**, Stupin A, et al. Angiotensin II Supplementation by Miniosmotic Pumps Reduces the Level of Oxidative Stress Induced by High Dietary Salt Intake in Rat Microcirculation. *Journal of Vascular Research* 56:1–134. 2019;78.

### **Ostalo:**

1. Lagator M, Rebeka K, Šušnjara P, Mišir M, Drenjančević I. Stroke as a consequence of hypertension. 2021;6.
2. Stupin M, Medić L, Šušnjara P, Drenjančević I. Od hipertenzije do hipertenzivne i ishemijske bolesti srca. 2021;2.
3. Vidović S, Pavlović V, Šušnjara P, Jelić Vuković M, Drenjančević I. Hipertenzivna retinopatija. 2021;1.
4. Grinžek T, Nikolina K, Šušnjara P, Haršanji Drenjančević I. COVID-19 i hipertenzija. 2021 [cited 2023 Feb 3];
5. Kolar M, Mihaljević D, Šušnjara P, Drenjančević I. Kronična bubrežna bolest i arterijska hipertenzija. 2021;1.

### **Članstvo u znanstvenim društvima i udrugama:**

- Hrvatsko fiziološko društvo
- Hrvatsko društvo za hipertenziju
- Hrvatska liga za hipertenziju

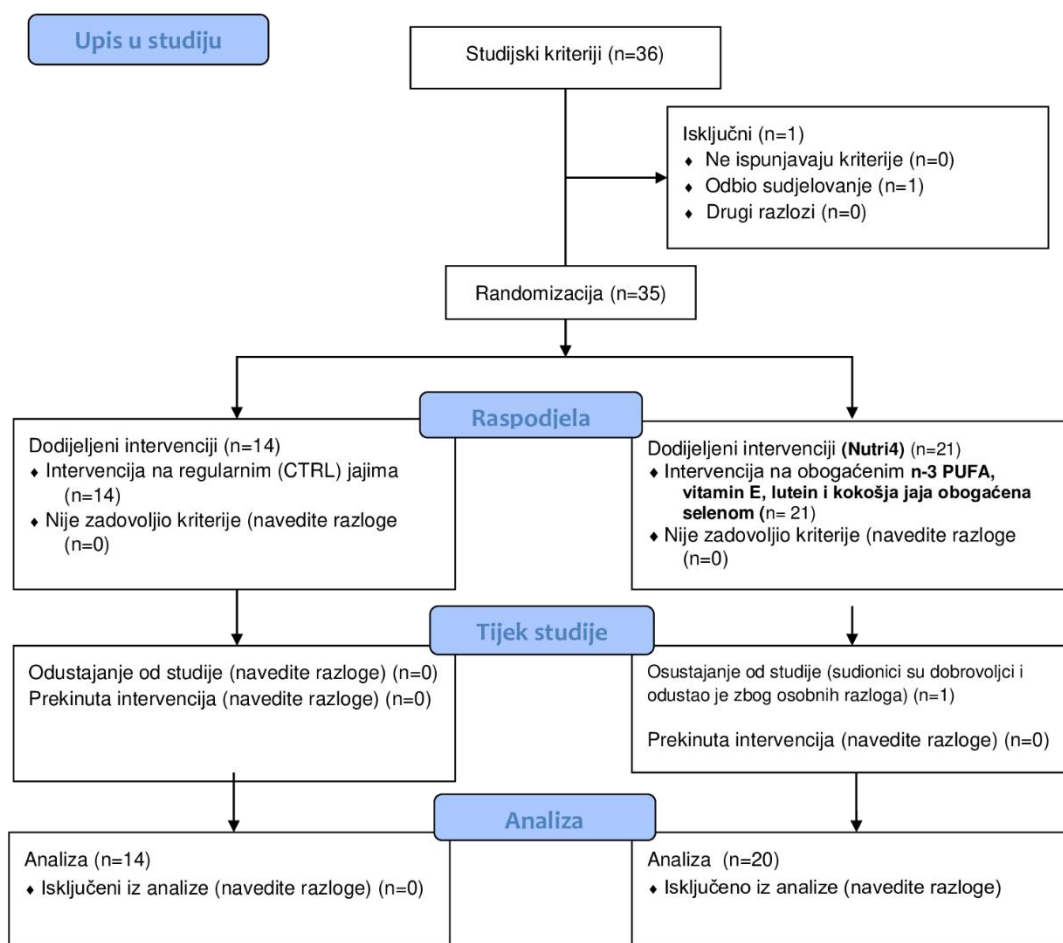
**12. PRILOZI**

**Prilog 1.** Consort dijagram

**Prilog 2.** 24 satni prehrambeni obrazac



## CONSORT 2010 Flow Diagram



Datum: \_\_\_\_\_

**24 satni prehrambeni obrazac**

- obrazac -

IME I PREZIME: \_\_\_\_\_

DATUM ROĐENJA: \_\_\_\_\_

SPOL:      Ž      M

VISINA: \_\_\_\_\_

TEŽINA: \_\_\_\_\_

Svaki ispitanik na prvom mjerenju dobije 3 identična obrasca za praćenje konzumacije namirnica u posljednja 24 sata. Ispunjene obrasce predaje istraživaču na zadnjem mjerenju. Dva obrasca se ispunjavaju za vrijeme radnog tjedna (npr. ponedjeljak i četvrtak), a treći za vrijeme vikenda (npr. nedjelja). Ispitanik će biti obaviješten porukom ili e-mailom od strane ispitivača kada treba popuniti obrazac za dan ranije. Obrazac je sastavljen u obliku tablice koja sadrži 4 glavne podjele: **DORUČAK**, **RUČAK**, **VEČERA** i **MEDUOBROK**. Svaki obrok podrazumijeva hranu i piće. Obroci su podijeljeni na: **VOĆE** (svježe/sušeno), **POVRĆE** (svježe/smrznuto/kuhano/pečeno), **MLJEČNI PROIZVODI** (mlijeko/sir/jogurt), **MESO** (bijelo/crveno/riba/prerađevine), **UGLIKOHIDRATI** (kruh/tijestenina/peciva/krumpir/riža), **ŽITARICE** (zobene/kukuruzne/zaslađene), **PIĆE** (voda/mineralna voda/kava/kava s mlijekom/čaj/prirodni sok/gazirani sok/alkohol), **GRICKALICE** (čokolada/čips/keksi/kolači), **ORAŠASTI PLODOVI** (bademi/lješnjaci/orasi). Uzima se u obzir način pripreme te veličina porcija ovisno o kojoj namirnici se radi. Ispitanik popunjava tablicu na način da stavlja pluseve na mjesta predviđena za to, a u skladu s onim što je tog dana konzumirao i na koji način je pripremljeno. Nakon svakog obroka nalazi se odjeljak pod nazivom **KOMENTAR** gdje je potrebno naglasiti da li je ispitanik uzimao nekakav dodatak prehrani odnosno bilo što što bi moglo značajnije utjecati na unos nutrijenata taj dan ili pak ako ne postoji navedeno u tablici ono što je konzumirano može se nadopisati ispod tablice. Ukoliko je neki od obroka preskočen također naznačiti.

\***PORCIJE**: mala - pola šalice ili kriške (pola normalne); srednja - šalice ili kriška ili komad (normalna porcija); velika - 2 šalice ili kriške ili komada (2x normalna)

\***KONZUMACIJA** (mliječni proizvodi i orašasti plodovi): zasebno – šalice mlijeka, komad sira, šaka badema; kao dio – žitarice sa mlijekom, sendvič sa sirom, žitarice sa orašastim plodovima.

## 12. PRILOZI

Veličina porcija obroka:

Datum: \_\_\_\_



Datum: \_\_\_\_\_

<b>DORUČAK</b>	<b>MLJEČNI PROIZVODI</b>		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina				
		<b>PODJELA</b>	zasebno	kao dio	mala	srednja	Velika		
		Sir							
		Mlijeko							
		Jogurt							
	_____								
	<b>MESO</b>		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		<b>PODJELA</b>	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
		Bijelo meso							
		Crveno meso							
		Riba							
		Prerađevine							
	_____								
	<b>UGLIKOHIDRATI</b>		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		<b>PODJELA</b>	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
		Kruh							
		Peciva							
		Tijestenina							
Krumpir									
Riža									
_____									

Datum: \_\_\_\_\_

<b>DORUČAK</b>	<b>VOĆE</b>		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina				
		<b>PODJELA</b>	sviježe	sušeno	mala	srednja	Velika		
		Jabuka/Kruška							
		Banana							
		Bobičasto							
	_____								
	<b>POVRĆE</b>		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		<b>PODJELA</b>	sviježe	smrznuto	kuhano	pečeno	Mala	srednja	velika
		Mahunarke							
		Gomoljasto/Korijenasto							
		Kupusnjače							
		Lukovice							
		Tikve							
	_____								
	<b>ŽITARICE</b>		VELIČINA PORCIJE/količina						
		<b>PODJELA</b>	mala	srednja	velika				
		Zobene							
		Kukuruzne							
Zaslađene									
_____									

Datum: \_\_\_\_\_

DORUČAK	ORAŠASTI PLODOVI	NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina							
		PODJELA	zasebno	kao dio	mala	srednja			Velika		
		Bademi									
		Lješnjaci									
		Orasi									
	PIĆE	KOLIČINA									
		PODJELA	Čaša/šalica	2x	3x	5x	Više od 5x				
		Voda									
		Mineralna voda									
		Kava									
Kava s mlijekom											
Čaj											
Prirodni sok											
Gazirani sok											
Alkohol											

KOMENTAR:

Datum: \_\_\_\_\_

RUČAK	MESO	NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina			
		PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
		Bijelo meso							
		Crveno meso							
	Riba								
	UGLIKOHIDRATI	NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina			
		PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
		Kruh							
		Peciva							
		Tijestenina							
Krumpir									
Riža									
POVRĆE	NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina				
	PODJELA	svježe	smrznuto	kuhano	pečeno	mala	srednja	velika	
	Mahunarke								
	Gomoljasto/Korijenasto								
	Kupusnjače								
	Lukovice								
	Tikve								
_____									

Datum: \_\_\_\_\_

RUČAK	PIĆE	KOLIČINA							
		PODJELA	Čaša/šalica	2x	3x	5x			Više od 5x
		Voda							
		Mineralna voda							
		Kava							
		Kava s mlijekom							
		Čaj							
		Prirodni sok							
		Gazirani sok							
	Alkohol								
JUHE	PORCIJA								
	PODJELA	1x	2x			3x			
	Pileća								
	Goveđa								
	Povrtna								
	Krem								

KOMENTAR:

Datum: \_\_\_\_\_

VEČERA	MLIJEČNI PROIZVODI	NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina					
		PODJELA	zasebno	kao dio	mala	srednja			velika
		Sir							
		Mlijeko							
		Jogurt							
	_____								
	MESO	NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina			
		PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	mala	srednja	velika
		Bijelo meso							
		Crveno meso							
Riba									
Prerađevine									
_____									
UGLJIKOHIDRATI	NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina				
	PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	mala	srednja	velika	
	Kruh								
	Peciva								
	Tijestenina								
	Krumpir								
Riža									



Datum: \_\_\_\_\_

VEČERA	VOĆE		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina					
		PODJELA	sviježe	sušeno	mala	srednja	velika			
		Jabuka/Kruška								
		Banana								
		Bobičasto								
	_____									
	POVRĆE		NAČIN PRIPREME			VELIČINA PORCIJE/količina				
		PODJELA	sviježe	smrznuto	kuhao	pečeno	mala	srednja	velika	
		Mahunarke								
		Gomoljasto/Korijenasto								
Kupusnjače										
Lukovice										
Tikve										
_____										
ŽITARICE		VELIČINA PORCIJE/količina								
	PODJELA	mala	srednja	velika						
	Zobene									
	Kukuruzne									
	Zaslađene									
	_____									

Datum: \_\_\_\_\_

VEČERA	PIĆE		KOLIČINA						
		PODJELA	Čaša/šalica	2x	3x	5x	Više od 5x		
		Voda							
		Mineralna voda							
		Kava							
		Kava s mlijekom							
		Čaj							
		Prirodni sok							
		Gazirani sok							
		Alkohol							

KOMENTAR:

Datum: \_\_\_\_\_

MEĐUOBROK	ORAŠASTI PLODOVI	NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina			
		PODJELA	zasebno	kao dio	mala	srednja	velika
		Bademi					
		Lješnjaci					
		Orasi					
	_____						
	VOĆE	NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina			
		PODJELA	svježe	sušeno	mala	srednja	velika
		Jabuka/Kruška					
		Banana					
Agrumi							
Bobičasto							
_____							
GRICKALICE	VELIČINA PORCIJE/količina						
	PODJELA	mala	srednja	velika			
	Čokolada						
	Čips						
	Keksi						
	Kolači						
	_____						

Datum: \_\_\_\_\_

	PIĆE	KOLIČINA					
		PODJELA	Čaša/šalica	2x	3x	5x	Više od 5x
		Voda					
		Mineralna voda					
		Kava					
		Kava s mlijekom					
		Čaj					
		Prirodni sok					
		Gazirani sok					
		Alkohol					

KOMENTAR:

