

# UTJECAJ KONZUMACIJE KOKOŠJIH JAJA OBOGAĆENIH OMEGA-3 MASNIM KISELINAMA, LUTEINOM, VITAMINOM E I SELENOM NA KARDIOVASKULARNU FUNKCIJU I IMUNOLOŠKI SUSTAV KOD BOLESNIKA S AKUTNIM KORONARNIM SINDROMOM ...

---

Masle, Ana Marija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:624170>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ana Marija Masle

UTJECAJ KONZUMACIJE KOKOŠJIH JAJA OBOGAĆENIH OMEGA-3 MASNIM  
KISELINAMA, LUTEINOM, VITAMINOM E I SELENOM NA KARDIOVASKULARNU  
FUNKCIJU I IMUNOLOŠKI SUSTAV KOD BOLESNIKA S AKUTNIM KORONARNIM  
SINDROMOM – RANDOMIZIRANI KONTROLIRANI POKUS

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandar Kibel, dr. med.

Komentorica rada: izv. prof. prim. dr. sc. Tatjana Bačun, dr. med.

Rad ima 135 listova.

Ovo istraživanje napravljeno je u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti (ZCI) za personaliziranu brigu o zdravlju (K.K.01.1.1.01.0010), znanstvene jedinice za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane (voditeljica: prof. dr. sc. Ines Drenjančević s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku).



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**

# SADRŽAJ

Popis korištenih kratica .....	iv
Popis slika .....	vi
Popis tablica .....	vii
1. UVOD .....	1
1. Akutni koronarni sindrom (AKS) .....	1
1.1. Endotelna funkcija i disfunkcija.....	2
1.2. Upala i citokini u aterosklerozi .....	3
1.3. Oksidativni stres.....	5
1.3.1. Enzimski antioksidansi.....	7
1.3.1.1. Enzim superoksid-dismutaza .....	7
1.3.1.2. Enzim katalaza .....	7
1.3.1.3. Enzim glutation-peroksidaza.....	8
1.3.2. Metode procjene oksidativnoga stresa i antioksidativnoga kapaciteta.....	8
1.3.3. Oksidativni stres pri koronarnoj arterijskoj bolesti .....	9
1.4. Polinezasićene masne kiseline (PUFA).....	10
1.4.1. Kemijska struktura, klasifikacija i metabolizam .....	10
1.4.2. Izvori PUFA-e u hrani.....	11
1.4.3. Kardioprotektivni učinci omega-3 masnih kiselina (n-3 PUFA) .....	12
1.5. Lutein .....	15
1.6. Vitamin E .....	16
1.6.1. Kemijska struktura, metabolizam i učinci vitamina E .....	16
1.6.2. Izvor vitamina E u hrani i preporučeni dnevni unos .....	17
1.7. Selen.....	17
1.7.1. Oblici selena, metabolizam i učinci .....	17
1.7.2. Izvori selena u hrani i preporučeni dnevni unos .....	19
1.8. Funkcionalna hrana .....	19
1.8.1. Kokošja jaja obogaćena funkcionalnim sastojcima .....	21
2. HIPOTEZA .....	23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
4. MATERIJAL I METODE.....	25
4.1. Ustroj studije .....	25
4.2. Ispitanici.....	26
4.3. Protokol istraživanja .....	27
4.3. Preliminarno istraživanje s jajima obogaćenim samo polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA) .....	31
4.4. Određivanje antropometrijskih mjera, sastav tijela i tjelesnih tekućina bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	32

4.5. Određivanje hemodinamskih parametara (promjene arterijskoga krvnoga tlaka) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	32
4.6. Određivanje slobodnih masnih kiselina, lipidograma i biokemijskih parametara u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	33
4.7. Određivanje koncentracije luteina, vitamina E, seleno u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	34
4.8. Mjerenje oksidativnoga stresa i pokazatelja antioksidativnoga kapaciteta u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	35
4.9. Mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	36
4.10. Mjerenje proteinskoga izražaja enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, i nNOS) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	36
4.11. Određivanje koncentracije proteina pro- i protuupalnih citokina i kemokina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	37
4.12. Mjerenje protoka krvi i vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	37
4.13. Mjerenje debljine kompleksa intime medije karotidne arterije u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	38
4.14. Statistička analiza.....	39
5. REZULTATI.....	40
5.1. Rezultati preliminarnoga istraživanja - uloga jaja obogaćenih n-3 PUFA-om na lipidni profil, razinu upalnih medijatora i mikrovaskularnu funkciju bolesnika s koronarnom bolešću srca .....	40
5.2. Karakteristike ispitanika.....	46
5.3. Antropometrijskih parametri, sastav tijela i tjelesnih tekućina bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	47
5.4. Debljina intime medije vaskularne stijenke karotidne arterije bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	48
5.5. Krvna slika, biokemijski parametri te udio slobodnih masnih kiselina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	49
5.6. Hemodinamski parametri i procjena varijabilnosti srčanoga ritma bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	60
5.7. Vrijednosti koncentracije luteina, vitamina E i seleno u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	63
5.8. Aktivnosti antioksidativnih enzima u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	67
5.9. Promjena biomarkera oksidativnoga stresa (TBARS) i antioksidativnoga kapaciteta (FRAP) u pacijenata s akutnim koronarnim sindromom .....	71
5.10. Promjena pro- i protuupalnih citokina i kemokina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	74
5.11. Mjerenja krvnoga protoka i vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože pacijenata s AKS-om .....	76
5.12. Mjerenje proteinskoga izražaja enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, i nNOS) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	80
6. RASPRAVA .....	82
6.1. Promjena antropometrijskih i hemodinamskih parametara u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom .....	84

6.2. Krvna slika i promjena biokemijskih parametara seruma u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom .....	85
6.3. Promjene u lipidnom profilu seruma i koncentracije jetrenih enzima u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom .....	87
6.4. Promjena koncentracije luteina, vitamina E i selena u serumu bolesnika s AKS-om nakon dijetetskoga protokola .....	89
6.5. Promjena aktivnosti antioksidativnih enzima, oksidativnoga stresa i antioksidativnoga kapaciteta bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom .....	91
6.6. Promjene citokina i kemokina u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom .....	94
6.7. Promjene u proteinskom izražaju enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, nNOS) u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom .....	97
6.8. Promjene u PORH-u, ACh-u i SNP-u u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom .....	99
7. ZAKLJUČCI.....	103
8. SAŽETAK .....	104
9. SUMMARY .....	105
10. LITERATURA.....	106
11. ŽIVOTOPIS .....	121

## Popis korištenih kratica

- ACE inhibitori** - inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *Angiotensin-converting enzyme inhibitors*)
- ACh** - acetilkolin
- AKS** - akutni koronarni sindrom
- ALA** -  $\alpha$ -linolenska kiselina
- ALT** - alanin-aminotransferaza
- ARA** - arahidonska kiselina
- AST** - aspartat aminotransferaza
- BMI** - indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)
- BP** - arterijski (krvi) tlak
- CAT** - katalaza
- CV** - kardiovaskularni
- DBP** - dijastolički krvni tlak (engl. *diastolic blood pressure*)
- DHA** - dokosaheksaenoična kiselina
- ECW%** - udio izvanstanične tekućine (engl. *extracellular water*)
- ED** - endotelna disfunkcija
- eNOS** - endotelna dušik-oksidi sintetaza (engl. *endothelial nitric-oxide synthase*)
- EPA** - eikosapentaenoična kiselina
- FFM%** - udio nemasnog tkiva (engl. *fat free mass*)
- FM%** - udio masnog tkiva (engl. *fat mass*)
- FRAP** - sposobnost plazme da reducira željezo (engl. *the ferric reducing ability of plasma*)
- GGT** -  $\gamma$ -glutamilttransferaza
- GPx** - glutation-peroksidaza
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - vodikov peroksid
- HDL-kolesterol** - kolesterol lipoprotein velike gustoće
- HF** - ili VF kao visoka frekvencija (engl. *High Frequency*). Predstavlja dio spektralne gustoće snage u frekvencijskoj domeni raspoređen u visokim frekvencijama raspona od 0,15 do 0,4 Hz
- HR** - puls (engl. *heart rate*)
- hsCRP** - visoko osjetljivi C-reaktivni protein (engl. *high sensitivity C reactive protein*)
- ICAM** - intracelularna adhezijska molekula
- ICW%** - udio unutarstanične tekućine (engl. *intracellular water*)
- IL** - Interleukin
- INF $\gamma$**  - interferon gamma
- iNOS** - inducibilna dušik-oksidi sintetaza (engl. *inducible nitric-oxide synthase*)
- KVB** - kardiovaskularne bolesti
- LA** - linolna kiselina



<b>LD</b>	- laser Doppler
<b>LDF</b>	- mjerenje protokola laser Dopplerom (engl. <i>laser Doppler flowmetry</i> )
<b>LDL-kolesterol</b>	- kolesterol lipoprotein male gustoće
<b>LF</b>	- ili NF kao niska frekvencija (engl. <i>Low frequency</i> ). Predstavlja dio ukupne snage određene spektralnom analizom raspoređen u niskim frekvencijama raspona od 0,04 - 0,15 Hz.
<b>LF/HF</b>	- Omjer između snage niskih frekvencija i snage visokih frekvencija
<b>MAP</b>	- srednji arterijski tlak (engl. <i>mean arterial pressure</i> )
<b>MCP-1</b>	- monocitni kemoatraktantni protein 1
<b>Mean RR</b>	- prosječna vrijednost udaljenosti dva uzastopna R-vala
<b>n-3 PUFA</b>	- n-3 polinezasićene masne kiseline
<b>nNOS</b>	- neuronalna dušik-oksida sintetaza (engl. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
<b>NO</b>	- dušikov (II) oksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
<b>NOS</b>	- dušik-oksida sintaza (engl. <i>nitric-oxide synthase</i> )
<b>pNN50</b>	- postotak RR-intervala koji su međusobno različiti više od 50 ms
<b>PORH</b>	- post-okluzivna reaktivna hiperemija (engl. <i>post-occlusion reactive hyperemia</i> )
<b>RMS-SD</b>	- kvadratni korijen srednje vrijednosti zbroja kvadratnih razlika između susjednih RR-intervala
<b>R-O%</b>	- postotak promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na bazalne vrijednosti
<b>ROS</b>	- reaktivni oblici kisika (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SBP</b>	- sistolički krvni tlak (engl. <i>systolic blood pressure</i> )
<b>SDNN</b>	- standardna devijacija svih NN-intervala (RR-intervali), odnosno drugi korijen njihove varijance
<b>SNP</b>	- natrijev nitroprusid
<b>SOD</b>	- superoksid-dismutaza
<b>STEMI</b>	- infarkt miokarda sa ST-elevacijom
<b>TBARS</b>	- reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline (engl. <i>the thiobarbituric acid reactive substances</i> )
<b>TBW%</b>	- udio ukupne tjelesne tekućine (engl. <i>total body water</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	- faktor tumorske nekroze alpha
<b>WHR</b>	- omjer struk-bokovi (engl. <i>waist-to-hip ratio</i> )
<b><math>\alpha</math>-TTP</b>	- $\alpha$ -tokoferol prijenosni protein

## Popis slika

Slika 1. Kemijska struktura n-3 i n-6 polinezasićenih masnih kiselina (n-3, n-6 PUFA) .....	11
Slika 2. Kardioprotektivni učinci n-3 polinezasićenih masnih kiselina.....	13
Slika 3. Kemijska struktura molekule $\alpha$ -tokoferola.....	16
Slika 4. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na ukupni kolesterol u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	53
Slika 5. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednost triglicerida u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	54
Slika 6. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednost HDL-kolesterola (kolesterol lipoprotein velike gustoće) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	55
Slika 7. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednost LDL-kolesterola (kolesterol lipoprotein male gustoće) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	56
Slika 8. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na koncentraciju luteina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. ....	64
Slika 9. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na koncentraciju vitamina E u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	65
Slika 10. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na koncentraciju selena u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	66
Slika 11. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na aktivnost enzima katalaze (CAT) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	68
Slika 12. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPx) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.	69
Slika 13. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom	70
Slika 14. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na biomarkere oksidativnoga stresa (TBARS) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	72
Slika 15. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na antioksidativni kapacitet (FRAP) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	73
Slika 16. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednosti post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom	77
Slika 17. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednosti acetilkolinom inducirane dilatacije (Ach ID) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom	78
Slika 18. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednosti natrijevim nitroprusidom inducirane dilatacije (SNP ID) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	79

## Popis tablica

Tablica 1. Rezultati određivanja profila masnih kiselina i udjela luteina, vitamina E i selena u kokošnjim jajima.....	29
Tablica 2. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA (n-3 PUFA) na profil slobodnih masnih kiselina u serumu kardiovaskularnih bolesnika .....	42
Tablica 3. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na lipidni profil u serumu bolesnika oboljelih od akutnog (Ac - CAD) i kroničnog koronarnog sindroma (Ch - CAD) .....	43
Tablica 4. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA (n-3 PUFA) na koncentraciju proteina pro- i protuupalnih citokina i kemokina u serumu bolesnika oboljelih od akutnog (Ac - CAD) i kroničnog koronarnog sindroma (Ch - CAD).....	44
Tablica 5. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i n-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja (n-3 PUFA) na mikrovaskularni odgovor kože na vaskularnu okluziju (postokluzivna reaktivna hiperemija, PORH), razinu oksidativnog stresa (TBARS), antioksidativni kapacitet (FRAP) i aktivnost antioksidativnog enzima (GPx) u serumu bolesnika oboljelih od akutnog (Ac - CAD) i kroničnog koronarnog sindroma (Ch - CAD).....	45
Tablica 6. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na antropometrijske parametre, sastav tijela i tjelesnih tekućina bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	47
Tablica 7. Mjerenje debljine intime medije karotidnih arterija bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	48
Tablica 8. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na parametre krvne slike bolesnika oboljelih od akutnoga koronarnog sindroma .....	51
Tablica 9. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na biokemijske parametre u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	52
Tablica 10. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na jetrene enzime u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	57
Tablica 11. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri 4) na profil slobodnih masnih kiselina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	58
Tablica 12. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na hemodinamske parametre bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	61
Tablica 13. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na procjenu varijabilnosti srčanog ritma (HRV) bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	62
Tablica 14. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na pro- i protuupalne citokine i kemokine u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.....	75
Tablica 15. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na proteinski izražaj enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, i nNOS) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom .....	81

## 1. UVOD

### 1. Akutni koronarni sindrom (AKS)

Bolest koronarnih arterija, karakterizirana nakupljanjem aterosklerotskoga plaka u epikardijalnim koronarnim arterijama, vodeći je uzrok smrtnosti u svijetu, unatoč golemim postignućima u liječenju (1, 2). Ovisno o procesu zahvaćanja epikardijalnih arterija, razlikujemo bolesnike s akutnom i kroničnom koronarnom bolešću (3, 4).

Akutni koronarni sindrom (AKS) odnosi se na skupinu stanja koja uključuju iznenadni poremećaj protoka krvi u srčanom mišiću, često zbog blokade u koronarnoj arteriji. AKS uključuje stanja kao što su nestabilna angina, infarkt miokarda bez ST-elevacije (NSTEMI) i infarkt miokarda s ST-elevacijom (STEMI). AKS može biti stanje opasno po život i zahtijeva hitno medicinsko liječenje. Postoje dokazi koji sugeriraju da bolesnici s AKS-om mogu imati oslabljenu mikrovaskularnu funkciju, što može doprinijeti razvoju i progresiji AKS-a. Mikrovaskularna disfunkcija karakterizirana je oštećenim protokom krvi i perfuzijom u malim krvnim žilama, a povezana je s nepovoljnim ishodima u bolesnika s AKS-om.

Infarkt miokarda sa ST-elevacijom (STEMI) predstavlja akutnu ishemiju miokarda nastalu potpunom okluzijom koronarnih krvnih žila, te se zajedno s nestabilnom anginom pectoris i infarktom miokarda bez ST-elevacije ubraja u akutni koronarni sindrom (AKS) (5). Iako prevalencija kardiovaskularnih bolesti (KVB) raste na globalnoj razini, regije u razvoju imaju i višu stopu incidencije i smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (6).

Prema istraživanju Hrvatskoga zavoda za javno zdravstvo iz 2019., kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok smrti s 22.020 umrlih i 42,5 % ukupne smrtnosti. Za muškarce je udio kardiovaskularnih bolesti u ukupnoj smrtnosti bio 37 %, a za žene 48 %. Najčešća pojedinačna dijagnoza smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti za sve dobne skupine muškaraca i žena je kronična ishemijska bolest srca, dok su prve četiri dijagnoze za oba spola akutni infarkt miokarda, nespecificirani inzult i hipertenzivna bolest srca (7).

Etiopatogenezi akutnoga koronarnog sindroma najčešće doprinose stanja kao što su dislipidemija, arterijska hipertenzija i dijabetes melitus (8). Studijama je pokazano da hiperkolesterolemija, posebice visoka razina kolesterola lipoproteina male gustoće (LDL), povećava oksidativni stres i upalu, što rezultira u konačnici smanjenom bioraspoloživosti dušikovoga oksida kao jednoga važnog vazodilatatora endotela (9). Povećana razina oksidativnoga stresa, kao i stvaranje visokih razina proupalnih citokina (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), dovodi do razvoja endotelne disfunkcije (10).

Studija koju su proveli Ma i suradnici (2019.) pokazala je da su učestalost cirkulirajućih Th17 stanica i razine IL-17, IL-6 i IL-23 značajno više u bolesnika s AKS-om u usporedbi s bolesnicima sa stabilnom anginom pektoris, što ukazuje na to da imunološki odgovor posredovan Th17 stanicama može potaknuti upalnu progresiju destabilizacije plaka i razvoj AKS-a (11). Osim toga, studija Gagera i suradnika (2020.) pokazala je da je IL-6 pouzdan prediktor smrtnosti bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (12). Međutim, iako je studija koju su proveli Piccioni i suradnici (2020.) pokazala da je IL-17 u korelaciji s razvojem koronarne arterijske bolesti, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila povezanost razine IL17 kao prediktora smrtnosti i razvoja arterijske bolesti u bolesnika s AKS-om (13).

### **1.1. Endotelna funkcija i disfunkcija**

Funkcija endotela je regulacija vaskularnoga tonusa na nekoliko načina: inhibicijom agregacije trombocita, modulacijom migracije leukocita, regulacijom proliferacije glatkih mišićnih stanica i kontrolom produkcije citokina. Endotel je zaslužan za regulaciju krvnoga protoka otpuštanjem tvari koje uzrokuju vazodilataciju: dušikova oksid (NO), prostaciklina (PGI<sub>2</sub>) i različitih metabolita citokroma P450 (CYP 450). Važna je uloga dušikovoga oksida, osim što uzrokuje otpuštanje glatkih mišićnih stanica, to što inhibira agregaciju trombocita, adheziju monocita i ekspresiju adhezijskih molekula (14). Ujedno, s ciljem zadovoljavajućega održavanja vaskularnoga tonusa, endotel otpušta i vazokonstriksijske čimbenike: endotelin 1, tromboksan i prostaglandin F<sub>2α</sub>. Ako nastupe oštećenje endotela i poremećaj u ravnoteži vazodilatacijskih i vazokonstriksijskih čimbenika, nastaje stanje nazvano endotelna disfunkcija (15). U patogenezi ateroskleroze, te samim time u razvoju kardiovaskularnih bolesti, endotelna disfunkcija predstavlja inicijalni korak (15, 16).

Endotelna disfunkcija, osim što predstavlja poremećenu vazodilataciju ovisnu o endotelu, ujedno uključuje i specifično stanje „endotelne aktivacije“ koje je karakterizirano proupalnim, proliferativnim i prokoagulacijskim miljeom koji pogoduje svim fazama aterogeneze (17). U samom početku disfunkcionalni endotel izlaže adhezijske proteine (npr. selektin, međustaničnu adhezijsku molekulu (ICAM) i vaskularnu staničnu adhezijsku molekulu), što olakšava aktivaciju monocita i njihovo prianjanje na disfunkcionalno područje. Potom, pojačava aktivaciju i agregaciju trombocita. Zatim, aktivirani trombociti služe kao posrednici upale, izražavajući različite receptore u interakciji s leukocitima i aktiviranim endotelom, održavajući patološki proces.

Ti proteini olakšavaju dovođenje i internalizaciju cirkulirajućih monocita u subendotelni prostor, gdje oni postaju makrofagi.

U konačnici dolazi do pojačanoga prodiranja cirkulirajućih lipida u sloj intime. LDL-kolesterol veže se za proteoglikane subendotelnoga prostora, gdje prolazi kroz oksidativni proces. Oksidirani kolesterol potom fagocitiraju makrofagi. Prisutnost oksidiranih lipida pokreće niz proupalnih reakcija putem različitih medijatora (npr. TNF- $\alpha$ , IL-1, monocitni kemoatraktantni protein 1 (MCP-1)), održavajući aktivaciju i regrutiranje monocita i makrofaga i upalnih stanica. Makrofagi, fagocitiranjem lipidnoga materijala, postaju pjenaste stanice. Neuspjeh makrofaga da uklone kolesterol sa stijenke krvne žile potiče njihovu apoptotičku smrt, otpuštajući kolesterol u stijenku krvne žile, te upalne tvari kao što je tkivni faktor i matriks metaloproteaze, čineći tako aterosklerotične lezije sklonijima pucanju (18).

## 1.2. Upala i citokini u aterosklerozi

Razvoju ateroskleroze, a samim time i akutnom koronarnom sindromu, doprinose različiti upalni procesi unutar arterijske stijenke. Citokini koji predstavljaju male proteinske molekule producirani su iz stanica bitnih za njihovu međusobnu interakciju i komunikaciju. Oni sudjeluju u svim fazama ateroskleroze i imaju važan utjecaj na patogenezu ove bolesti (19).

Citokine stvaraju mnoge stanične populacije, ali najčešće su to su pomoćne T-stanice i makrofagi. Također ih mogu proizvesti dendritične stanice i mastociti.

Citokini djeluju kao signalne molekule i humoralni regulatori aktivnosti, diferencijacije, proliferacije i proizvodnje stanica i drugih citokina (20). Ovisno o njihovom djelovanju i stanicama u kojima su nastali, razlikujemo različite vrste citokina (19, 21, 22):

- limfokine,
- monokine,
- kemokine,
- interleukine,
- čimbenike nekroze tumora (TNF), interferone (IFN) i transformirajući čimbenici rasta (TGF).

Citokini se mogu podijeliti na pro-upalne i protu-upalne na temelju njihove funkcije (19,22). Pro-upalni citokini proizvode se uglavnom od aktiviranih makrofaga i sudjeluju u reguliranju

upalnih reakcija, poput IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-23, IL-6 i IL-9. Protu-upalni citokini su skup molekula koje kontroliraju pro-upalne odgovore, poput IL-22, IL-21 i IL-10.

Upalne stimulacije poput izlučivanja citokina i kemokina mogu aktivirati endotel i uzrokovati adheziju monocita i drugih leukocita, što je početni događaj u infiltraciji i ekstravazaciji na mjestu ozljede (23).

Upala je složeni patofiziološki proces i predstavlja odgovor imunološkoga sustava (urođenoga i stečenog) na vanjske štetne čimbenike, karakteriziran nakupljanjem upalnih stanica i produkcijom citokina (24). Razvoj upalnoga procesa dolazi u nekoliko koraka i uključuje regrutiranje stanica, oslobađanje upalnih medijatora i promjene propusnosti koje umanjuju oštećenje i uspostavljaju homeostazu u tkivima i organima kroz procese ublažavanja (25).

Nesposobnost imunološkoga sustava da učinkovito smanji i riješi upalu, što dovodi do neuspjeha u postizanju ravnoteže, može rezultirati razvojem bolesti poput kardiovaskularnih bolesti. (26).

Upala igra ključnu ulogu u svim stadijima ateroskleroze: endotelnoj disfunkciji; regrutiranju imunoloških stanica; modifikaciji LDL-a; stvaranju pjenastih stanica; apoptozi pjenastih stanica; rupturi plaka; i trombozi. Upalni odgovor kod ateroskleroze također je reguliran i urođenim i stečenim imunološkim sustavom putem djelovanja citokina (27).

Citokini moduliraju permeabilnost endotelnih stanica (19, 28) na način da IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  uzrokuju reorganizaciju citoskeleta aktina i tubulina u endotelnim stanicama, čime se otvaraju praznine između susjednih stanica (29). Aktivirane endotelne stanice oslobađaju niz kemokina i drugih citokina koji zatim uzrokuju regrutiranje cirkulirajućih imunoloških stanica, osobito monocita i T-limfocita (28). Osim toga, endotelne stanice eksprimiraju adhezijske proteine, kao što su intercelularna adhezijska molekula-1 (ICAM-1) i vaskularna stanična adhezijska molekula-1 (VCAM-1), koji sudjeluju u regrutiranju imunoloških stanica (28).

Čvrsto prianjanje monocita na endotelne stanice zahtijeva vezanje adhezijskih molekula na integrine na monocitima: VCAM-1 na integrin  $\alpha 4\beta 1$  i ICAM-1 na  $\alpha L\beta 2$  (antigen 1 ili LFA1 povezan s funkcijom limfocita). Transmigracija monocita preko endotela posredovana je kemokinima koje proizvode ne samo endotelne stanice nego i druge stanice prisutne u leziji, kao što su SMC i emigrirani leukociti zajedno s VCAM-1 i molekulom adhezije endotelnih stanica trombocita-1 (30–32).

Smanjivanje upale izazvane citokinima i poticanje djelovanja protuupalnih citokina predstavljaju potencijalne terapijske puteve. N-3 PUFA djeluju imunomodulacijski na proces

ateroskleroze, smanjujući stopu odgovora na citokine i upalu. Razumijevanje uloge različitih citokina u aterosklerozi i proučavanje patofiziologije aterosklerotskoga procesa pomaže u pristupu liječenja akutnoga koronarnog sindroma (33).

Statini i ateroprotektivni agonisti nuklearnih receptora smanjuju signalizaciju i ekspresiju gena posredovanu određenim citokinima (34, 35), i to bi moglo biti odgovorno, barem djelomično, za njihove korisne učinke. Osim toga, ateroprotektivni učinci određenih tvari na ateroskrozu u sustavima mišjih modela pripisani su TGF- $\beta$  (36). Trenutno se procjenjuje niz protuupalnih terapija usmjerenih na manipuliranje djelovanjem citokina (28, 37). Terapijski pristupi ne moraju biti ograničeni na same citokine. Na primjer, mnoga istraživanja na sustavima mišjih modela pokazala su zaštitnu ulogu regulatornih T-stanica i citokina koje oni proizvode (IL-10 i TGF- $\beta$ ) (38, 39).

Mnoge studije istražuju potencijal pristupa koji povećavaju razine/djelovanje regulatornih T-stanica ili stimuliraju imunološku toleranciju na antigene povezane s aterosklerozom (38). Manipuliranje signalizacijom citokina predstavlja još jedan pristup i može uključivati inhibitore malih molekula koji umanjuju djelovanje proupalnih komponenti ili pojačavaju one koje su prirodno prisutne da priguše upalu. Nekodirajuća RNA, osobito mikroRNA (miRNA), pojavljuju se kao buduće potencijalne mete u prigušivanju upale posredovane citokinima kod ateroskleroze (40). Na primjer, nedostatak miR155, čiju ekspresiju stimulira miR-342-5p (41), smanjuje upalne odgovore u sustavima mišjih modela (42). Buduća istraživanja pružit će informacije o potencijalu terapije miRNA i poboljšati trenutne pristupe usmjerene na manipuliranje djelovanjem citokina u aterosklerozi.

### **1.3. Oksidativni stres**

Oksidacija je prirodni i neophodni proces u tijelu. Neravnoteža u omjeru slobodnih radikala i antioksidanasa, kada slobodni radikali nedovoljno ili loše neutraliziraju antioksidansi, može dovesti do stanja poznatog kao oksidativni stres (43). Povećana proizvodnja slobodnih radikala, koja premašuje sposobnost tijela da ih neutralizira, uzrokuje oksidativni stres (44), tj. stanje u kojemu oksidacija dominira antioksidativnim sustavom u tijelu (45).

Slobodni radikali su atomi ili molekule koji u svojim vanjskim orbitalama sadrže nesparene elektrone (npr. superoksidni anion ( $O_2^-$ ) i hidroksilni radikal (HO)), a nastaju pucanjem kemijskih veza unutar molekula uslijed djelovanja štetnih čimbenika na organizam, kao što su ultraljubičasto zračenje, ionizirajuće zračenje, konzumacija alkohola i cigareta i sl. (46).



Slobodni radikali su vrlo aktivni zbog nesporenog elektrona u njihovoj vanjskoj ljusci (47) i traže spajanje s drugim molekulama kako bi osigurali nesporeni elektron i ponovno postali stabilni (48). To rezultira nizom kemijskih reakcija oksidacije u tijelu (49).

Unutar tijela, procesi poput mitohondrijske oksidativne fosforilacije i staničnog odgovora na strane tvari (npr. citokini, bakterije, ksenobiotici) dovode do nastanka reaktivnih spojeva kisika (ROS), koji su jedan od važnih slobodnih radikala. To su molekule kisika poput  $H_2O_2$ ,  $O^{\cdot-}$ , ozona, singlet kisika i organskih peroksida koje se razdvajaju u pojedinačne atome s nesporenim elektronima, stvarajući reaktivne molekule (50).

Mala količina ROS-a je normalna u aerobnom organizmu, ali visoka aktivnost koja prelazi ravnotežu antioksidanasa može dovesti do oštećenja DNK, proteina, masnog tkiva i tkiva, što uzrokuje bolesti kao što su dijabetes, ateroskleroza, upalni procesi, hipertenzija, bolest srca, neurodegeneracije i može izazvati nastanak tumora (49).

Stvaranje ROS-a igra važnu ulogu u obrambenom mehanizmu imunološkog sustava. To dovodi do uništenja štetnih mikroorganizama, ali također može dovesti do oštećenja tkiva domaćina. Količina oštećenja ovisi o sposobnosti aktiviranja antioksidansa kao obrambenog mehanizma (51). Oštećenje tkiva zbog kisikovih radikala naziva se oksidativnim oštećenjem, a antioksidansi štite od štetnog djelovanja ROS-a.

Proces starenja povezan je s oksidativnim stresom. Slobodni radikali uzrokuju oksidacijske reakcije koje mogu biti štetne ili korisne, a ispravno funkcioniranje slobodnih radikala pomaže u borbi protiv patogena. Međutim, ROS u umjerenim koncentracijama su važni za signalnu regulaciju staničnih procesa.

Antioksidansi su obrambeni mehanizmi tijela koji neutraliziraju učinke ROS-a, štiteći stanice od oštećenja i bolesti. Antioksidansi su molekule koje stabiliziraju slobodne radikale tako što im doniraju elektrone.

Uklanjanje slobodnih radikala iz organizma vrši se na različite načine, prema mehanizmu djelovanja (52):

- inhibicija slobodnih radikala preventivnim antioksidansima (albumin, ceruloplazmin, transferin, feritin i drugi proteini koji vežu metale),
- uklanjanje postojećih slobodnih radikala pomoću antioksidanasa (superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, katalaza zajedno s manjim molekulama, kao što su flavonoidi, karotenoidi, mokraćna kiselina, bilirubin i askorbat)

- popravak oštećenih biomolekula pomoću reparativnih enzima.

Obrambeni antioksidativni mehanizmi mogu se definirati kao enzimski i neenzimski antioksidansi. Najvažniji antioksidativni enzimi su superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza (GPx), katalaza (CAT) i mijeloperoksidaza (MPO) koji imaju štetne oksidativne metaboličke intermedijere. Ovi enzimi za svoju katalitičku aktivnost zahtijevaju kofaktore selen (Se), cink, bakar, željezo i magnezij (53).

U organizam se unose neenzimski antioksidansi iz hrane (A, C, E,  $\beta$ -karoten, flavonoidi, selen, cink, taurin, hipotaurin, glutation i lignani) i nastaju kao produkt metaboličkih reakcija (Q, glutation i lipoična kiselina) (54).

Kako tijelo stari, razine antioksidansa se smanjuju, što dovodi do neravnoteže s prooksidativnim molekulama. Učinkovitost antioksidansa s godinama opada pa ih je potrebno unositi hranom (55).

### **1.3.1. Enzimski antioksidansi**

#### **1.3.1.1. Enzim superoksid-dismutaza**

Superoksid-dismutaza (SOD) su enzimi koji štite stanice od oštećenja tako što kataliziraju reakciju dismutacije superoksidnog aniona u kisik i vodikov peroksid.

Postoje tri izoforme SOD-a: bakar-cink-SOD u citoplazmi, mangan-SOD u mitohondrijima i izvnanstanični SOD u izvanstaničnom prostoru (56, 57).

SOD je enzim koji štiti tkiva od štetnih učinaka slobodnih radikala tako što katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u kisik i vodikov peroksid (58). Ova zaštita temelji se na pretvaranju štetnih superoksidnih radikala u manje reaktivne (59).

#### **1.3.1.2. Enzim katalaza**

Katalaza (CAT) je enzim koji uklanja visoke koncentracije vodikovog peroksida u tijelu. Djeluje u eritrocitima, hepatocitima i djelomice u bubrezima. Svaka molekula katalaze može razgraditi velik broj molekula  $H_2O_2$  u sekundi (47).

Radi tako što reagira s  $H_2O_2$  i donorima vodika u obliku vode i kisika. Unatoč nevažnosti u nekim stanicama, igra ključnu ulogu u prilagodbi stanice na oksidativni stres. Održava koncentraciju kisika za kemijske redukcije i zaštitu od toksina (59, 60).

### 1.3.1.3. Enzim glutation-peroksidaza

Enzima glutation-peroksidaza (GPx) reducira  $H_2O_2$  i monomerni glutation na molekule vode i glutation-disulfida, te također reducira lipidne hidroperoksidi (61). Ima vezno mjesto za Se, koji oksidira u reakciji s  $H_2O_2$  (62). GPx nalazi se u citoplazmi i mitohondrijima stanica. Smanjuje se  $H_2O_2$  u mitohondriju, proizvedenom iz reakcije dismutacije superoksida, pod djelovanjem SOD2. Glutation-peroksidaza je uključena u zaštitu od oksidativnoga stresa sudjelovanjem u prijenosu aminokiselina kroz staničnu membranu, uklanjajući hidroksilne radikale i singletni kisik, čime detoksificira  $H_2O_2$  i lipidni peroksid kroz katalitičko djelovanje GPx. Može zamijeniti aktivne oblike najvažnijih vitamina, a to su vitamini C i E (63).

Glutation-peroksidaza 3 (GPx3) je jedini enzim iz skupine GPx koji djeluje u izvanstaničnom prostoru. Supstrati za taj enzim su  $H_2O_2$  i fosfolipidni hidroperoksidi, koji imaju značajnu ulogu u antioksidativnim procesima u krvi (64) jer smanjuju oksidativni stres redukcijom  $H_2O_2$  i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole i kisik (65). Budući da se povećana aktivnost GPx3 javlja kod određenih podtipova tumora, poput tumora jajnika (66), također se može koristiti kao biomarker.

### 1.3.2. Metode procjene oksidativnoga stresa i antioksidativnoga kapaciteta

Oksidativni stres odnosi se na neravnotežu između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i sposobnosti tijela da detoksificira ili popravi nastalu štetu. ROS su visoko reaktivne molekule koje mogu oštetiti stanične komponente, kao što su DNA, proteini i lipidi, ako njihove razine postanu previsoke. Antioksidativni kapacitet odnosi se na sposobnost tjelesnih antioksidativnih sustava da neutraliziraju ili čiste ROS, štiteći stanice i tkiva od njihovih štetnih učinaka.

Za procjenu oksidativnoga stresa i antioksidativnoga kapaciteta u biološkim uzorcima postoje različite metode, uključujući (67):

- Mjerenje ROS-a ili markera oksidativnoga stresa: nekoliko biomarkera, poput malondialdehida (MDA), 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina (8-OHdG) i 4-hidroksinonenala (4-HNE), mogu se mjeriti u različitim biološkim uzorcima (npr. krv, urin, tkiva) s ciljem procjene razine oštećenja izazvanoga ROS-om. Na primjer, razine ROS-a mogu se mjeriti u uzorcima krvi ili urina pomoću tehnika kao što su kemiluminiscencija ili fluorescentni testovi.

- Testovi aktivnosti enzima: aktivnost enzima uključenih u antioksidacijsku obranu, kao što su SOD, CAT i GPx, može se mjeriti kako bi se procijenio antioksidativni kapacitet tijela. Ti se enzimi mogu mjeriti u uzorcima krvi ili tkiva pomoću tehnika kao što su spektrofotometrija ili ELISA.
- Testovi peroksidacije lipida: razina peroksidacije lipida, koja je mjera oksidativnoga oštećenja lipida, može se procijeniti pomoću tehnika kao što je TBARS test. Taj se test može provesti na uzorcima krvi ili tkiva.
- Testovi za ukupni antioksidativni kapacitet: nekoliko testova, kao što su TEAC test (od engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*), FRAP metoda (od engl. *ferric reducing ability of plasma*), ili test kapaciteta apsorpcije kisikovih radikala (ORAC) koji se mogu koristiti za mjerenje ukupnoga antioksidativnog kapaciteta uzorka. Ti se testovi mogu provesti na uzorcima krvi ili tkiva.
- Testovi karbonilacije proteina: karbonilacija proteina, mjera oksidativne modifikacije proteina, može se procijeniti pomoću testa s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH). Taj se test može provesti na uzorcima krvi ili tkiva.
- Oštećenje DNK-a izazvano oksidativnim stresom: razina oštećenja DNK-a izazvana oksidativnim stresom može se izmjeriti tehnikama kao što su komet test ili jednostanični test elektroforeze u gelu.

### 1.3.3. Oksidativni stres pri koronarnoj arterijskoj bolesti

Dislipidemija, kao i neravnoteža između proizvodnje ROS-a i enzimskih i neenzimskih antioksidativnih zaštitnih sustava, dovodi do endotelne disfunkcije i ateroskleroze koronarnih arterija (68). Brojna istraživanja pokazala su poremećenu ravnotežu prooksidansa i antioksidansa u bolesnika s KB-om (69–72).

Oksidativni stres danas se smatra novim čimbenikom rizika odgovornim za razvoj AKS-a, koji utječe na početak, prognozu, kvalitetu života i preživljenje bolesnika (73). Osim što je povezan s aterosklerozom, oksidativni stres može izazvati oksidacijsku modifikaciju ili oštećenje peroksidacijom lipida na razini deoksiribonukleinskih kiselina (DNK) i proteina s štetnim učincima na strukturu i funkciju krvožilnoga sustava (74). Osim klasičnih slobodnih kisikovih radikala (superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksil (OH), peroksil (RO), hidroperoksil ( $HRO^-$ )), pokazalo se da je reaktivni oksidativni stres uvjetovan i procesom

oksidativnoga stresa dušikovih vrsta (RNS), posebice peroksinitrita ( $\text{ONOO}^-$ ) (75). Znamo da ROS oštećuje ključne molekule u signalnim putovima uključenima u vaskularnu upalu, oštećuje bitne biomolekule u stanicama i sudjeluje u oksidativnoj modifikaciji lipida što ih čini aterogenima (76). Najvažniji izvori oksidativnoga stresa su fagocitni izoform NADPH oksidaze (Nox2 i u manjoj mjeri Nox1) sa svojom regulatornom podjedinicom p47phox, ksantin oksidaza (XO) i disregulirani eNOS (77).

Uobičajeni čimbenici rizika (hiperlipidemija, hiperglikemija, pušenje, hipoksija itd.) aktiviraju NADPH oksidazu različitim signalnim putovima. Sada je poznato da pojačano otpuštanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) pomoću NADPH oksidaza i mitohondrijskih enzima rezultira hipertrofijom kardiomiocita, fibrozom i povećanjem metaloproteinaza. Različite studijske skupine izvijestile su o značajnom smanjenju antioksidativnih parametara u bolesnika s AKS-om. Važno je naglasiti da, prema dosadašnjim podacima, bolesnici s višežilnim stenozama koronarnih arterija imaju značajno višu razinu MDA-a i značajno nižu razinu aktivnosti GSH-a, TAC-a i GPx-a od bolesnika s dvostrukom i jednostrukom koronarnom bolešću, što jasno navodi na zaključak da što je veći broj stenoza koronarnih arterija, to je viša razina oksidativnoga stresa (76).

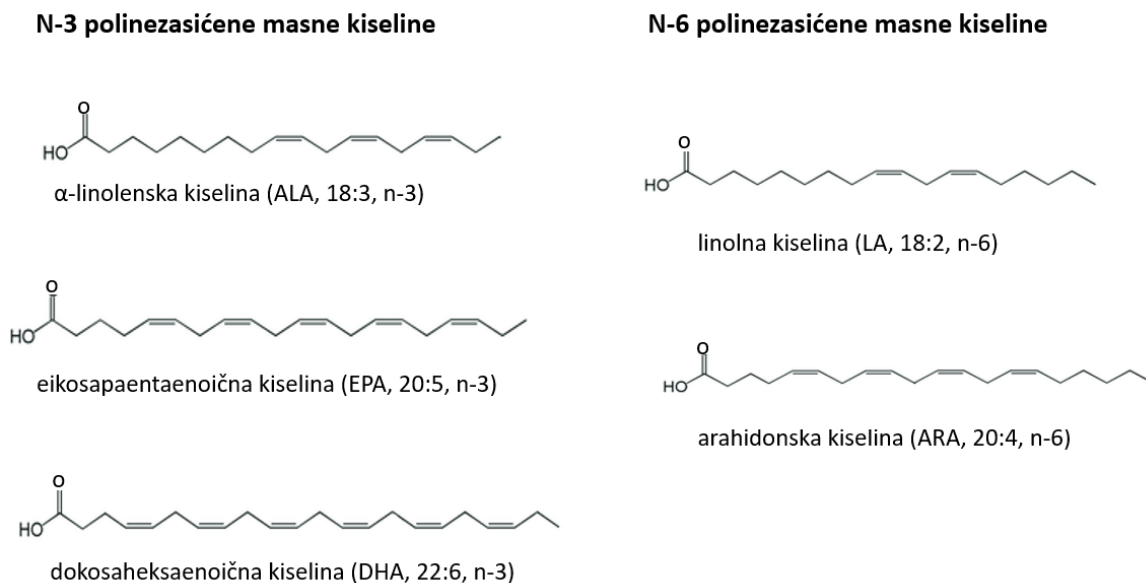
#### **1.4. Polinezasićene masne kiseline (PUFA)**

##### **1.4.1. Kemijska struktura, klasifikacija i metabolizam**

Polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA) su tip masnih kiselina koje imaju više od jedne nezasićene ili dvostruke veze u ugljikovom lancu. To ih čini nestabilnima zbog rizika od pucanja dvostruke veze. Podijeljene su prema dužini lanca, broju dvostrukih veza i poziciji prve dvostruke veze.

Tako razlikujemo omega-3 PUFA s prvom dvostrukom vezom na C3 (predstavnik  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA, C18:3, n-3)), i omega-6 PUFA s prvom dvostrukom vezom na C6 (predstavnik je linolna kiselina (LA, C:182, n-6)). Te vrste masnih kiselina (LA i ALA) su esencijalne, što znači da se moraju unijeti hranom jer ih organizam ne može sintetizirati.

Nakon unosa, metabolički se razgrađuju u organizmu, posebno u jetri, gdje procesima elongacije i desaturacije iz ALA-e nastaju omega-3 PUFA, kao što su dokosaheksaenoična (DHA) i eikosapentaenoična kiselina (EPA). Metaboličkom pretvorbom iz LA-e nastaju ostale omega-6 PUFA, kao što je arahidonska kiselina (ARA) (78–81). Shematski prikaz kemijskih struktura n-3 i n-6 PUFA prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Kemijska struktura n-3 i n-6 polinezasićenih masnih kiselina (n-3, n-6 PUFA)

#### 1.4.2. Izvori PUFA-e u hrani

Izvori  $\alpha$ -linolenske kiseline (ALA) su listovi zelenoga lisnatog povrća (u kloroplastima) te lanenom, sojinom ili repičinom ulju. Dokosaheksaenična kiselina je omega-3 (n-3) dugolančana polinezasićena masna kiselina koja je biološki aktivan krajnji proizvod esencijalne masne kiseline, ALA. Također, važna je za razvoj živčanoga sustava jer je sastavni dio fosfolipidne membrane stanica mozga i retine. DHA se primarno dobiva iz ribe, posebno masne ribe poput haringe, tune i lososa, te i iz kokošnjih n-3 jaja.

Također je ima u incunima, skuši, sardinama (82). Eikosapentaenoična kiselina (EPA) je prekursor DHA-a i metabolizira se u DHA-a u jetri. DHA i EPA igraju važnu ulogu u protuupalnoj sintezi eikosanoida/dokosanoida, signalnim događajima, ekspresiji gena i ekspresiji citokina.

Arahidonska kiselina je omega-6 (n-6) dugolančana polinezasićena masna kiselina koja je biološki aktivan krajnji proizvod linolne kiseline. Glavna je komponenta moždanih fosfoglicerida (općenito u većim koncentracijama u usporedbi s DHA-om), a također ima protupalnu ulogu u sintezi eikosanoida/dokosanoida.

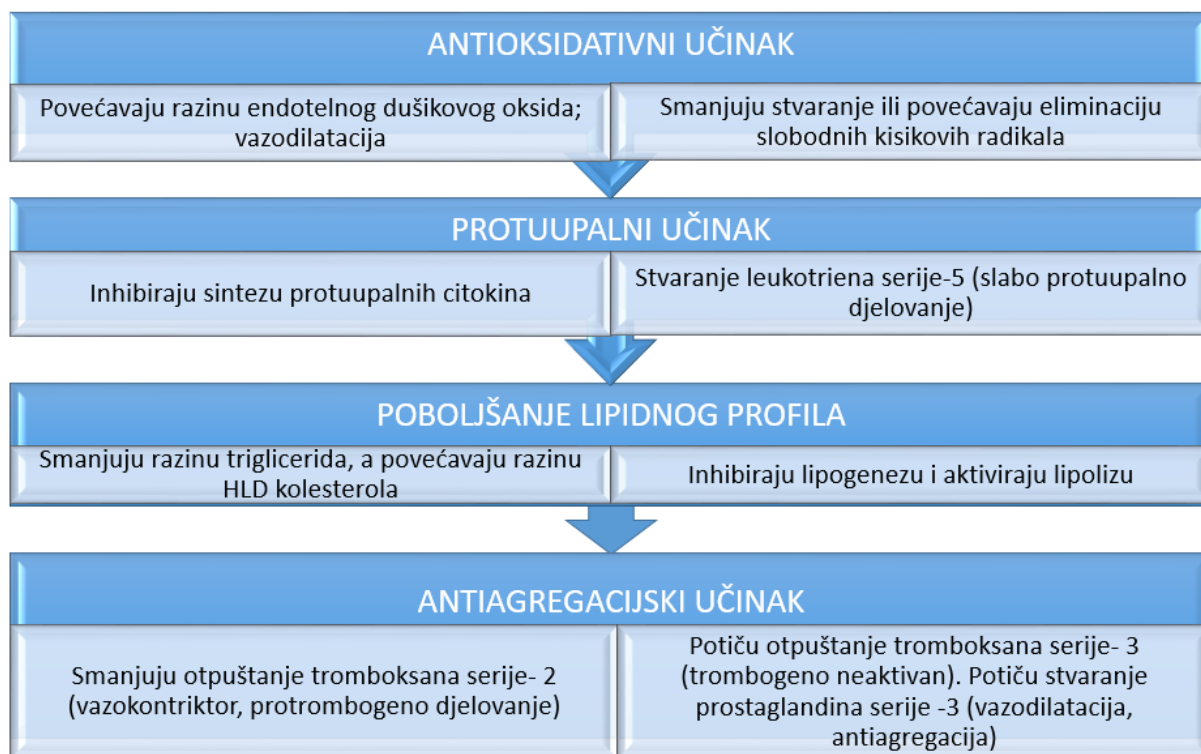
ARA se može dobiti izravno iz hrane životinjskoga podrijetla ili suncokretovoga, kukuruznog ili sojina ulja, koja su bogata n-6 linolnom kiselinom (83, 84).

### 1.4.3. Kardioprotektivni učinci omega-3 masnih kiselina (n-3 PUFA)

S obzirom na to da je AKS stanje najvišega stupnja hitnosti, a uz to i vodeći uzrok smrtnosti, izuzetno je važno prioritizirati prevenciju te bolesti. Naime, nekoliko velikih randomiziranih kliničkih ispitivanja pokazalo je da prehrambeni unos n-3 polinezasićenih masnih kiselina (engl. *n-3 PUFA*) poboljšava prognozu bolesnika s nedavno preboljelim infarktom miokarda (85, 86). Snažan je potencijal potrošnje n-3 polinezasićenih masnih kiselina, posebno eikosapentaenoične kiseline (EPA) i dokosaheksaenoične kiseline (DHA), u smanjivanju razine triglicerida u krvi, arterijskoga krvnog tlaka, učestalosti tromboze te rizika od iznenadnih smrti zbog infarkta miokarda (87).

U studiji Stupina i sur. (2020.), istraživana je utjecaj n-3 PUFA na funkciju endotela (88). Pokazalo se da ugradnja n-3 PUFA u membranu endotelne stanice modulira njezinu funkciju na nekoliko načina: povećava proizvodnju dušikovoga oksida (NO), smanjuje izlučivanje ROS-a, smanjuje upalni odgovor i povećava ekspresiju drugih vazodilatatora (eikosanoida). Eikosanoidi su hormoni u tkivima koji upravljaju upalnim procesima i odgovorima imunološkog sustava. Proizvedeni su iz različitih vrsta PUFA, n-3 i n-6, te se razlikuju po strukturi i učinku. Omega-3 eikosanoidi djeluju antiagregacijski, protuupalno i vazodilatativno, dok omega-6 eikosanoidi imaju obrnuti učinak (pro-upalno, vazokonstriktivno i protrombogeno). Koja vrsta eikosanoida će se stvoriti, ovisi o konkurentnom mehanizmu između PUFA n-3 i n-6 i enzima koji sudjeluju u sintezi eikosanoida (78, 89–91). n-3 PUFA (kao i n-6 PUFA, kao što je arahidonska kiselina) prekursori su oksilipina i njihove podskupine eikosanoida, uključujući prostaglandine (PG), tromboksane (TX) i leukotrijene (LT), koji su važni medijatori i regulatori upale (92, 93). Stoga bi se moglo pretpostaviti da povećan unos n-3 PUFA hranom može promijeniti profil oksilipina u koronarnim arterijama i imati blagotvoran učinak na krvožilnu funkciju i upalu u bolesnika s koronarnom bolešću. Farmakološki dodaci obogaćeni n-3 PUFA-om povećavaju antioksidativni kapacitet, te time i vaskularnu reaktivnost kod bolesnika s koronarnom bolešću (94).

Na Slici 2. shematski su prikazani učinci n-3 PUFA na kardiovaskularnu funkciju. Konzumacija otprilike 1 g PUFA-e dnevno preporučena je bolesnicima s kardiovaskularnom bolešću zbog potencijalno korisnih kardiovaskularnih učinaka, osobito jer nema značajnih interakcija između dodataka n-3 PUFA-e i niza lijekova koji ti bolesnici često uzimaju (95).



Slika 2. Kardioprotektivni učinci n-3 polinezasićenih masnih kiselina

n-3 PUFA masne kiseline imaju antioksidativna svojstva koja sprečavaju endotelnu disfunkciju, tj. smanjenje sposobnosti krvnih žila da se šire zbog nedostatka dušikovoga oksida (NO). NO je ključna molekula za širenje krvnih žila i sprečavanje upale i nakupljanja plaka u arterijama. Sintetaza dušikova oksida (engl. *nitric oxide synthase*, NOS) je enzim koji katalizira proizvodnju NO-a iz aminokiseline L-arginina.

Postoje tri izoforme (ili oblika) NOS-a, svaka s različitim svojstvima i funkcijama:

- Neuronski NOS (nNOS) nalazi se u živčanim stanicama i uključen je u regulaciju neurotransmisije, protoka krvi i lučenja inzulina.
- Inducibilni NOS (iNOS) nalazi se u različitim stanicama, uključujući makrofage i stanice glatkih mišića, a induciran je citokinima i drugim upalnim podražajima. iNOS proizvodi velike količine NO-a, za koji se pokazalo da igra ulogu u obrambenim mehanizmima domaćina i ozljedama tkiva.
- Endotelni NOS (eNOS) nalazi se u endotelnim stanicama koje oblažu krvne žile i odgovoran je za bazalnu proizvodnju NO-a koji regulira vaskularni tonus i protok krvi. eNOS je također uključen u regulaciju funkcije trombocita, adhezije leukocita i proliferacije stanica glatkih mišića.



n-3 PUFA-e mogu povećati proizvodnju NO-a reguliranjem sastava kaveola u endotelnim stanicama, a one su uključene u signalne putove koji kontroliraju dilataciju krvnih žila.

Točnije, EPA i DHA mogu aktivirati enzime koji proizvode NO, kao što je eNOS, a DHA također može aktivirati signalne putove koji dovode do povećane aktivnosti eNOS-a i proizvodnje NO-a.

Sve u svemu, n-3 PUFA-e imaju blagotvorne učinke na zdravlje krvnih žila jer povećavaju dostupnost NO-a i time poboljšavaju funkciju eNOS-a, što može ublažiti endotelnu disfunkciju i smanjiti rizik od AKS-a. Postoji određeno istraživanje koje je pokazalo da konzumacija dva n-3 PUFA-om obogaćena kokošja jaja dnevno tijekom tri tjedna (~ 410 mg n-3 PUFA dnevno) imaju imunomodulatorni učinak, bez utjecaja na mikrovaskularnu reaktivnost kože mladih zdravih osoba (96).

Međutim, povećanje količine n-3 PUFA-e u dnevnoj prehrani na 1053 g dnevno tijekom tri tjedna povećalo je koncentraciju n-3 PUFA-e bez seruma i poboljšalo mikrovaskularnu reaktivnost kože, uz smanjenje proupalnih citokina (npr. INF- $\gamma$ ) i povećanje protuupalnih citokina u serumu (IL-10) u mladih zdravih osoba (88).

Nadalje, bolesnici s metaboličkim sindromom koji su pet tjedana konzumirali dva kuhana jaja obogaćena n-3 PUFA-om dnevno, značajno su smanjili ukupni kolesterol, LDL-kolesterol i razinu krvnoga tlaka, dok su povećali HDL-kolesterol (97). Sve u svemu, to podupire obrazloženje istraživanja potencijalno korisnoga učinka unosa n-3 PUFA-e u obliku funkcionalne hrane na vaskularnu reaktivnost ovisnu o endotelu (97, 98).

Prema studiji iz 2022. Peng An. i suradnika, koji su obuhvatili i sustavno kvantificirali 884 radomizirane kontrolirane intervencijske studije koje su ispitivale utjecaj 27 različitih vrsta mikronutrijenata na rizik od kardiovaskularnih bolesti, zaključeno je da suplementacija s n-3 PUFA-om smanjuje rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti te infarkta miokarda, za razliku od drugih mikronutrijenata (99).

Za smanjenje rizika od KVB u općoj populaciji, Francuska agencija za sigurnost hrane (ANSES) preporučuje dnevni unos od 500 mg kombiniranih EPA i DHA. Međutim, ova se preporuka povećava do 750 mg/dan za osobe s povećanim profilom kardiovaskularnog rizika (100). Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) zaključila je da je suplementacija n-3 PUFA-om sigurna sve dok njezin unos ne prelazi 2 g/dan (101).

### 1.5. Lutein

Lutein i njegov stereoizomerni zeaksantin članovi su obitelji karotenoida (102). Zbog njihove kemijske strukture i interakcije s biološkim membranama, smatra se da karotenoidi imaju antioksidativna svojstva (103).

Lutein se ne može samostalno sintetizirati u organizmu, stoga se unosi putem hrane ili suplementima. Kristalni lutein (općeprihvaćeno sigurni lutein) lako se apsorbira iz hrane i dodataka prehrani, dok, da bi ušli u krvotok, esteri luteina zahtijevaju prethodnu deesterizaciju intestinalnim enzimima (104).

Izvori luteina su žumanjak jajeta, povrće kao što su špinat, kelj, karfiol, crvena paprika i razno voće. Od esencijalne je važnosti za očuvanje normalnoga vida, jer je koncentriran u središnjem dijelu mrežnice koji se naziva žuta pjega, a odgovorna je za oštrinu vida. Stoga, studije pokazuju da suplementacija luteinom rezultira povećanjem makularnoga pigmenta i poboljšanjem vida kod bolesnika sa senilnom makularnom degeneracijom i drugim očnim bolestima (102, 104).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na potencijalnu mogućnost primjene antioksidanasa u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL) u krvnim žilama ima važnu ulogu u razvoju aterosklerotskih lezija, a unos antioksidanasa hranom povećava otpornost LDL-a na oksidaciju. Stoga karotenoidi iz prehrane mogu imati blagotvorne učinke na zdravlje kardiovaskularnoga sustava. Njihova sposobnost apsorpcije lipidnih peroksida, reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i dušikovoga oksida (NO) povezana je s njihovim antioksidativnim svojstvima (102).

Ostala svojstva karotenoida u prevenciji kardiovaskularnoga rizika uključuju snižavanje krvnoga tlaka, smanjenje proupalnih citokina i upalnih markera (kao što je C-reaktivni protein) i poboljšanje inzulinske osjetljivosti mišićnog, jetrenoga i masnog tkiva (105, 106).

Protuupalna svojstva lutein pokazuje inhibirajući proizvodnju TNF- $\alpha$ , interleukina 6 (IL-6), prostaglandina 2 (PGE-2), monocitnoga kemotaktičkog proteina 1 (MCP-1) i makrofagnoga upalnog proteina 2 (MIP-2) (107).

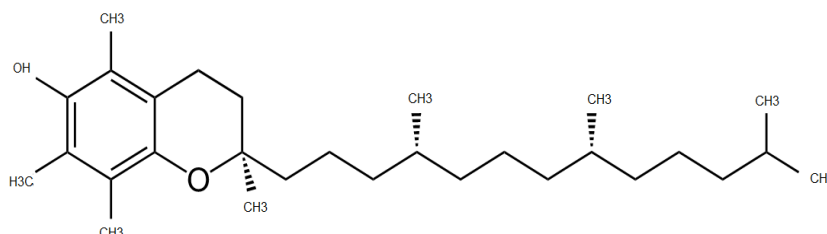
Istraživanjima je dokazano da smanjivanjem peroksidacije i apoptoze miocita lutein sprečava oštećenje miokarda ishemijom (108). U studiji H. J. Chunga procjenjivali su odnose između plazmatskih razina interleukina (IL)-6 i pojedinačnih karotenoida u plazmi bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti te potom procjenjivali protuupalne učinke jednoga karotenoida, luteina, u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC) bolesnika s koronarnom

arterijskom bolesti. Zaključak studije upućuje na to da lutein ima potencijalnu ulogu u razrješenju kronične upale kod bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću (109).

## 1.6. Vitamin E

### 1.6.1. Kemijska struktura, metabolizam i učinci vitamina E

Vitamin E (tokoferol) je vitamin topljiv u mastima s antioksidativnim svojstvima, štiti polinezasićene masne kiseline u staničnoj membrani od oksidacije i razaranja. Kao i drugi vitamini, ne može se sintetizirati u organizmu, već ga je potrebno unositi prehranom u malim količinama kako bi se spriječili poremećaji metabolizma. Postoji više oblika izomera tokoferola (alfa, beta, gama, delta) i srodnih spojeva, kao što su tokotrienoli. Primarni bioaktivni oblik koji je najpoznatiji po svojoj ulozi u ljudskom zdravlju je  $\alpha$ -tokoferol (110).



Slika 3. Kemijska struktura molekule  $\alpha$ -tokoferola

Metabolizam vitamina E odvija se u jetri koja je glavni regulator razine vitamina u tijelu. Nakon što se vitamin E iz prehrane ili iz suplemenata apsorbira i transportira do jetre, od svih izomera tokoferola, jedino se  $\alpha$ -tokoferol veže za protein za prijenos  $\alpha$ -tokoferola ( $\alpha$ -TTP) i prenosi u plazmu. Sam metabolizam vrši se pomoću citokroma P450, prolazeći nekoliko krugova  $\beta$ -oksidacije i potom se nakon konjugacije izlučuju putem žuči ili urina (111).

$\alpha$ -tokoferol djeluje kao antioksidans na način da hvata peroksilne radikale te tako sprečava oksidaciju PUFA-e u membranama (112). Osim što su n-3 PUFA-e pokazale kardioprotektivne učinke, obogaćivanje jaja drugim elementima u tragovima koji imaju antioksidativne učinke, kao što su vitamin E, selen i lutein moglo bi biti od dodatne koristi (113–117). n-PUFA su osjetljive na oštećenje od slobodnih radikala kisika, a prekomjerna lipidna peroksidacija dovodi do njihove razgradnje i povećava rizik od razvoja ateroskleroze. Vitamin E može spriječiti početak lipidne peroksidacije hvatajući slobodne radikale i pretvarajući ih u neštetne oblike (47). Nekoliko opservacijskih studija pokazalo je da je veći unos vitamina E iz prehranbenih izvora ili dodataka povezan s manjim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (114). Vitamin E

pokazao je učinak u neurodegenerativnim procesima, ističući svojstva poput antioksidativnoga i protuupalnog djelovanja. Također se pokazalo da utječe na staničnu signalizaciju i dovodi do snižavanja razine kolesterola (118). Ujedno su neki od učinaka vitamina E, tj.  $\alpha$ -tokoferola, da inhibira staničnu proliferaciju, agregaciju trombocita, na način da inhibira protein kinazu C, ključnu molekulu uključena u regulaciji profilaracije i diferencijacije stanica. Vitamin E ima ulogu i u metabolizmu arahidonske kiseline (112).

Povoljan učinak vitamin E na prevenciju kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze potkrepljuje studija Haeri S. M. J. i suradnika na animalnim modelima. Oni su kroz šest tjedana hranili kuniće prehranom koja je sadržavala vitamin E, i dokazali su značajno sniženje kolesterola u serumu nakon dijetetskoga protokola (119). Iako su animalne studije pokazale da dodaci vitaminom E ublažavaju aterosklerotske lezije i smanjuju razinu slobodnih kisikovih radikala, kod ljudi dosadašnjim randomiziranim ili prospektivnim studijama nije pokazan atero-zaštitni učinak. Međutim, s obzirom na to da mediteranska prehrana koja sadržava antioksidanse ima povoljan učinak na prevenciju kardiovaskularnih bolesti, očigledno su potrebne dodatne studije koje će biti provedene na ljudima i ispitati učinak vitamina E na prevenciju KV bolesti (120).

### **1.6.2. Izvor vitamina E u hrani i preporučeni dnevni unos**

Prehrambeni izvori vitamina E su razne namirnice, uključujući orašaste plodove (bademi, orasi), biljna ulja, žitarice, meso, žumanjak jajeta i lisnato zeleno povrće (110). Odbor za hranu i prehranu Nacionalne akademije znanosti Sjedinjenih Američkih Država definirao je da je preporučeni dnevni unos vitamina E ( $\alpha$ -tokoferol) 15 mg za adolescente i odrasle osobe (121). Što se tiče toksičnosti vitamina E u vidu ometanja iskorištavanja drugih vitamina topljivih u mastima, ona je rijetka, ali je moguća. Potrebno je naglasiti da se visoke, terapijske doze vitamina E (iznad 100 I.U.) ne mogu nadoknaditi hranom (122).

## **1.7. Selen**

### **1.7.1. Oblici selena, metabolizam i učinci**

Selen je mikroelement koji se u prirodi javlja kao kombinacija organskog (selenometionin ili selenocistein) ili anorganskog (selenid, selenat, selenit) oblika (123). Anorganski oblici se koriste za dodavanje u prehrambene dodatke (124). Glavna biološka uloga selena je uključivanje u proteine (nazvane selenoproteini) u organizmu (123, 125). Poznato je da se selenometionin apsorbira u tankom crijevu putem apsorpcijskoga puta metionina, dok se

anorganski oblici pasivno apsorbiraju u dvanaesniku. Glavni put izlučivanja selena je urin (126). Zbog svoje sposobnosti da se ugradi u antioksidativne enzime, selen igra važnu ulogu u oksidativnoj obrani domaćina (66, 127) Poznato je više od 25 vrsta selenoproteina, a najvažniji predstavnici enzima koji sadrže selen u ljudi su glutathion-peroksidaza (GPx) i tioredoksin-reduktaza (128). Glutathion-peroksidaza je enzim koji smanjuje  $H_2O_2$  i druge molekule s oksidativnim potencijalom (126). Kako selen i enzimi koji sadrže selen mogu biti izravno uključeni u regulaciju vaskularnih upalnih procesa i aterogeneze (129), unos selena hranom može utjecati na razvoj raznih kardiovaskularnih bolesti (130–132). Najproučavanija skupina među selenoproteinima je glutathion-peroksidaza, koja osigurava neutralizaciju aktivnih oblika kisika i dušika, čime se ograničava oštećenje miokarda nakon ishemije/reperfuzije (I/ R).

Činjenicu da nedostatak selena dovodi do povećanja peroksidacije lipida potvrdili su Tanguy i suradnici koji su proveli studiju na animalnim modelima, i pokazali su da nedostatak selena kod štakora dovodi do značajnijega oštećenja miokarda i odgađa oporavak srčane funkcije nakon ishemije (133).

Brojne studije istražuju moguću ulogu selena u razvoju i napredovanju kardiovaskularnih bolesti (113, 134) Poznato je da unos selena doprinosi zaštiti stanica vaskularnog endotela od oksidativnog oštećenja (135). Jedan od glavnih čimbenika u razvoju i napredovanju različitih patoloških stanja povezanih s KVB-om je povećanje razine oksidativnog stresa (136, 137). Studija Lorenzona dos Santosa i suradnika (2020.) pokazuje važnu ulogu biomarkera oksidativnog stresa u razvoju ateroskleroze i akutnog koronarnog sindroma (138). Endotelna disfunkcija se smatra ključnim ranim događajem u razvoju KVB-a (139, 140). Endotelne stanice posebno su osjetljive na oksidativni stres kroz dva mehanizma - staničnu smrt posredovanu reaktivnim kisikovim radikalima (ROS) i smanjenu bioraspoloživost NO-a kao zaštitnoga medijatora (139, 140). Osim antioksidativne uloge selena, postoji i dalje potreba za dodatnim istraživanjima i proučavanjima drugih učinaka selena na funkcioniranje kardiovaskularnoga sustava.

Istraživanjima je dokazano da su kardioprotektivna svojstva selena povezana s njegovom sposobnošću suzbijanja kaskade nuklearnoga faktora kapa B (NF-B). Povećana aktivacija transkripcije faktora NF-B obično je povezana sa signalima preživljavanja u kardiomiocitima. Međutim, prekomjerno stvaranje ROS-a može dovesti do aktivacije proupalnih i proapoptotskih puteva kroz neravnotežu između tirozin-kinaze i tirozin-fosfataze, koje reguliraju translokaciju NF-B-a. Stoga, pretjerana stimulacija NF-B-a u miokardu tijekom ishemijskih epizoda dovodi do povećane proizvodnje citokina i faktora nekroze tumora  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ). Selen djeluje tako da

smanjuje nuklearnu translokaciju NF-B-a tijekom infarkta miokarda i inhibira postishemijsku proizvodnju TNF- $\alpha$  (141, 142).

Jedno od kardioprotektivnih svojstava selen je da ima sposobnost smanjenja defosforilacije koneksina-43 (Cx-43) koji je odgovoran za međustaničnu komunikaciju između kardiomiocita.

Usljed pretjeranoga stvaranja ROS-a i naknadne aktivacije tirozin-kinaze može doći do defosforilacije Cx-43 koji utječe na postinfarktenu remodelaciju lijeve klijetke. Stoga odgovarajuća suplementacija selenom potiskuje defosforilaciju Cx-43, smanjuje incidenciju postreperfuzijskih aritmija i inhibira remodeliranje srca (143). Također, postoji o selenu ovisna jodotironin-dejodinaza koja služi kao katalizator te ima ulogu u metabolizmu štitnjače. Stoga se važnost selen ističe i u autoimunim bolestima štitnjače, ali i malignim, upalnim i neurološkim bolestima (npr. Parkinsonova, Alzheimerova bolest ili epilepsija) (123, 125, 144).

Preostali selenoproteini su Selenoprotein P i Selenoprotein sintetaza. Selenoprotein P se nalazi u plazmi i većinom se proizvodi u jetri, bubrezima, srcu i plućima. On je izvanstanični glikoprotein koji povezuje stanice vaskularnog endotela i smatra se skladištem selen. Djeluje kao antioksidans i štiti stanice endotela od štetnih učinaka reaktivnih vrsta dušikovih spojeva te uklanja peroksinitrit. Ukoliko nije deaktiviran, peroksinitrit može uzrokovati oštećenje DNA i lipidne peroksidacije (126).

### **1.7.2. Izvori selen u hrani i preporučeni dnevni unos**

Prehrambeni izvori selen su meso, riba, žitarice i brazilski oraščići. Dnevni preporučeni unos za odrasle je 55  $\mu\text{g}/\text{dan}$ , a za djecu 20  $\mu\text{g}/\text{dan}$  (145–147). Organski oblici selen smatraju se sigurniji od anorganskih.

Potrebno je dozirati selen u skladu s njegovim učincima, a povećane količine mogu biti štetne za zdravlje. Trovanje selenom najčešće se javlja kod korištenja dodataka prehrani. Prekomjerna konzumacija (više od 400  $\mu\text{g}$  dnevno) može dovesti do mučnine, povraćanja, gubitka kose i noktiju, karijesa i dermatoloških lezija. (148, 149).

### **1.8. Funkcionalna hrana**

Funkcionalna hrana je hrana koja je posebno razvijena ili modificirana kako bi pružila zdravstvene prednosti osim osnovnih hranjivih tvari koje pruža. Funkcionalna hrana pomaže u prevenciji kroničnih bolesti. "Funkcionalna hrana" se kao pojam počela koristiti u Japanu 1980-

ih i označavala je hranu obogaćenu nutrijentima koja posjeduje korisna fiziološka svojstva (150–152). Ministarstvo zdravstva Japana je 1991. godine objavilo pravila za odobrenje specifične kategorije zdravstvene hrane. Međutim, funkcionalna hrana ne mora nužno biti od koristi svima u populaciji, a povezivanje individualnih potreba za hranjivim tvarima s određenim komponentama hrane može doprinijeti napretku u razumijevanju interakcija između genetike i prehrane. Važno je razlikovati hranu od lijeka. Ako proizvod sadrži indikacije za liječenje ili prevenciju određene bolesti, smatra se lijekom i podložan je određenim toksičnim učincima ako se ne koristi prema propisanim dozama. Ako proizvod ne sadrži indikacije za liječenje ili prevenciju određene bolesti, smatra se hranom i u normalnim količinama za unos ne bi trebao izazvati toksične učinke.

DeFelice je korištenjem termina "nutraceutik" opisao proizvode koje su dio hrane ili se koriste kao hrana, a koji pružaju medicinske i zdravstvene koristi, uključujući prevenciju i liječenje bolesti. Ovi proizvodi dolaze u različitim oblicima, uključujući pročišćene nutrijente, dodatke prehrani, biljne proizvode, prirodne sastojke biljaka i procesiranu hranu kao što su žitarice, juhe i napitci. Iako su definirani njihovi fiziološki učinci, nutraceutici se ne mogu smatrati ni hranom ni lijekovima i zauzimaju "sivu zonu" između ta dva koncepta (153). Lijekovi se klasificiraju prema zakonu o lijekovima i većinu njih ne može se kupiti bez liječničkog recepta, dok biljni lijekovi mogu biti klasificirani kao lijekovi u slučajevima prevencije bolesti. Funkcionalna hrana se često povezuje s nutraceuticima jer često sadrži nutraceutike ili im dodaje probiotike i/ili prebiotike. Vitamini se također mogu smatrati lijekovima, ali se često mogu kupiti bez recepta.

Razlika između nutraceutika i vitamina nije uvijek jasna, kao što je na primjer  $\beta$ -karoten, koji je prekursor vitamina A (154). Pravna kategorizacija nutraceutika u EU temelji se na njihovom utjecaju na ljudsko tijelo. Ako proizvod samo pridonosi zdravlju, smatra se hranom, dok ako pokazuje sposobnost mijenjanja funkcija tijela, sudjelujući u prevenciji i liječenju, smatra se lijekom (153).

Sve veći interes proizvođača i potrošača za funkcionalne prehrambene i zdravstvene tvrdnje potaknuo je Europsku uniju na formiranje programa "Funkcionalna znanost o hrani u Europi" (engl. Functional Food Science in Europe, FUFOSE) čiji je cilj, prema izvorima iz FUFOSE-a, dokazivanje zdravstvenih tvrdnji te podržati razvoj prehrambenih proizvoda koji povoljno utječu na određene fiziološke funkcije u tijelu i smanjuju rizik od bolesti pojedinca (155).

### 1.8.1. Kokošja jaja obogaćena funkcionalnim sastojcima

Sastav jajeta čine ljuska, bjelanjak i žumanjak, a prosječna učestalost ovih dijelova kreće se od 60% bjelanjka, 30% žumanjka, 10% ljuske (156).

Pravilnikom o kakvoći jaja (Narodne novine, br. 115/2006) uređena je kakvoća jaja koja se stavljaju u promet, razvrstavajući ih u kategoriju razreda "A" (svježa jaja) i razred "B" (jaja namijenjena industrijskoj preradi). Jaja klase "A" dalje se razvrstavaju prema težini u četiri klase: XL (vrlo velika jaja od 73 g ili više), L (velika jaja od 63 do 73 g), M (srednja jaja od 53 do 63 g) i S ( mala jaja manja od 53 g). Cilj je postići korištenje jaja mase 55-60 g, s obzirom na jednostavniji transport i visoku cijenu na tržištu (156).

Na ambalaži moraju biti jasno vidljive i čitljive oznake o klasi, težinskoj kategoriji, zemlji podrijetla, broju proizvođača, načinu uzgoja i broju ovlaštenog pakirnog centra. Kvaliteta jaja izravno je povezana s kvalitetom hrane kojom se nesilice hrane, što utječe na debljinu i čvrstoću ljuske, boju i miris žumanjka, visinu bjelanjka, pH žumanjka. i bijelog, HJ, kao i sadržaj hranjivih tvari, minerala i vitamina u jajima. Ukupna masa jaja također ovisi o količini energije u obroku, sadržaju masti, bjelančevina itd. Ako je energetska vrijednost ispod optimalne, dio proteina se koristi za zadovoljenje energetske potrebe, što dovodi do smanjenja mase jaja. Kako bi se postigli željeni učinci na kvalitetu jaja, potrebno je u obroku nesilica primijeniti precizne doze funkcionalnih sastojaka (156). Stoga se proizvođačima jaja preporučuje da razmotre primjenu funkcionalnih sastojaka u svom proizvodnom procesu kako bi osigurali visoku kvalitetu proizvoda koje stavljaju na tržište (156, 157).

Obogaćivanje namirnica, poput jaja, funkcionalnim sastojcima, kao što su selen, cink, omega-3 masne kiseline, vitamin E, vitamin A, lutein i slično, sve je češća pojava u razvoju funkcionalne hrane (156, 158). Cilj ovog trenda je poboljšati zdravlje srca i smanjiti prekomjernu tjelesnu težinu, koji se smatraju ključnim zdravstvenim problemima suvremenog načina života. Istraživanja pokazuju da uporaba obogaćenih žitarica, uključujući kalcij, fosfor i vitamin D3, utječe na kvalitetu jaja i sadržaj mikroelemenata u njima (156).

Istraživanje uključuje utjecaj pšenice obogaćene selenom u krmnoj smjesi za kokoši nesilice na kvalitetu jaja i sadržaj selena u jajetu. Obogaćivanje jaja luteinom i zeaksantinom, kao i vitaminima poput vitamina E ( $\alpha$ -tokoferol), također se smatra važnim za poboljšanje kvalitete jaja. Krmna smjesa koja se koristi za hranidbu nesilica može utjecati na kvalitetu jaja, uključujući debljinu i čvrstoću ljuske, boju i miris žumanjka te sadržaj određenih tvari u jajetu (156, 158, 159).



Obogaćena kokošja jaja su vrsta funkcionalne hrane koja je obogaćena dodatnim nutrijentima kao što su vitamini, minerali i omega-3 masne kiseline. Ova funkcionalna namirnica može biti posebno korisna onima koji teško unose dovoljno hranjivih tvari redovnom prehranom.

Omega-3 PUFA su esencijalne masne kiseline koje se unose prehranom i imaju pozitivan učinak na zdravlje srca, rad mozga i zdravlje zglobova. Selen je mineral u tragovima koji podržava rad štitnjače i imunološkog sustava te ima antioksidativna svojstva. Vitamin E je antioksidans koji štiti stanice od oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom i podržava zdrav imunološki sustav. Lutein je karotenoid koji je važan za zdravlje očiju i sprječava makularnu degeneraciju. Cilj obogaćenih kokošnjih jaja je pružiti potrošačima izvor hranjivih tvari koje pridonose zdravom načinu života. Nutri 4 jaja, su kokošja jaja koja su dodatno obogaćena nutrijentima, uključujući n-3 PUFA, selen, vitamin E i lutein.

Ovim istraživanjem istražiti će se učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima, n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA), luteinom, vitaminom E, i selenom na mikrovaskularnu reaktivnost, lipidni profil i biomarkere upale i oksidativnog stresa u bolesnika nakon akutnoga koronarnog sindroma (AKS).

**2. HIPOTEZA**

Prehrana koja uključuje kokošja jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom („funkcionalno obogaćena kokošja jaja“) poboljšat će funkciju endotela, što će se očitovati promjenom mikrocirkulacijskoga protoka mjenoga Laser Doppler Flowmetrom u odnosu na isto mjerenje prije protokola studije u ispitanika oba spola, starijih od 18 godina, koji boluju od akutnoga koronarnog sindroma. Osim toga, uzrokovat će poboljšanje lipidnoga profila i lipidograma, te pozitivno utjecati na smanjenje oksidativnoga stresa i upalnoga odgovora kod osoba s akutnim koronarnim sindromom.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja bili su:

1) utvrditi utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama (n-3 PUFA), luteinom, vitaminom E i selenom („funkcionalno obogaćena kokošja jaja“) tijekom trotjednoga dijetetskog protokola na mikrovaskularnu reaktivnost kože laserskom Doppler metodom (engl. *laser Doppler flowmetry*, LDF) kod ispitanika oba spola starijih od 18 godina oboljelih od akutnoga koronarnog sindroma.

2) utvrditi utjecaj konzumacije "funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja" tijekom trotjednoga dijetetskog protokola na serumski profil lipida i slobodnih masnih kiselina, arterijski tlak, pro- i protuupalne citokine, te na oksidativni stres kod ispitanika oba spola starijih od 18 godina oboljelih od akutnoga koronarnog sindroma.

3) ultrazvučnim kolor Dopplerom odrediti debljinu kompleksa intime medije vaskularne stijenke karotidne arterije kao dobrog prognostičkog čimbenika za razvoj restenoze u ispitanika oba spola starijih od 18 godina oboljelih od akutnoga koronarnog sindroma.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je dizajnirano kao prospektivno, intervencijsko, kontrolirano, dvostruko slijepo, randomizirano istraživanje, a provedeno je na Medicinskom fakultetu u Osijeku i u Kliničkom bolničkom centru Osijek, u razdoblju od rujna 2021. do ožujka 2022. Mjerenja su provedena prije i poslije dijetetskoga protokola. U istraživanje su uključeni bolesnici oboljeli od akutnoga koronarnog sindroma, liječeni u KBC-u Osijek. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskoga fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/22-08/02, URBROJ: 2158-61-46-22-38) i Etičko povjerenstvo Kliničkoga bolničkog centra Osijek (Broj odobrenja: R2-8262/2020.).

Istraživanje je prijavljeno na Clinical trail pod naslovom: "*Effect of Enriched QUARTET® Hen Eggs on Cardiovascular Function in Cardiovascular Patients and Healthy Individuals*". ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04564690.

Početni odabir ispitanika obavljen je u Zavodu za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Osijek. Ostale analize provedene su u Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Ispitanici su pozvani na sudjelovanje u istraživanju od strane istraživača. Svi ispitanici uključeni u ovo istraživanje bili su detaljno upoznati sa svrhom i ciljevima istraživanja i očekivanim znanstvenim doprinosom, a oni koji su pristali sudjelovati u njemu potpisali su informirani pristanak. Podaci o ispitanicima su šifrirani i nisu dostupni ni za jednu drugu svrhu osim za potrebe ovoga istraživanja. Nakon prikupljanja podataka izvršena je njihova statistička obrada.

Kriteriji za uključivanje u studiju:

- bolesnici oboljeli od akutnoga koronarnog sindroma u što se ubrajaju bolesnici oboljeli od infarkta miokarda sa ST-elevacijom (STEMI), infarkta miokarda bez ST-elevacije (NSTEMI) i nestabilne angine pektoris.

Kriteriji za isključivanje iz studije:

- nepristajanje na istraživanje;
- poznata maligna bolest;
- nasljedne metaboličke bolesti i druge nasljedne sistemske bolesti;
- autoimune bolesti ili sistemske bolesti s imunopatologijom;

- neregulirana hipertenzija;
- nedavni kirurški zahvati (3 mjeseca);
- nedavne značajne traume (6 mjeseci);
- renalna insuficijencija (osim kod dijabetičnih bolesnika, ako KEK nije  $> 60$  ml/min);
- aktivno krvarenje (hematurija, GI trakt, menoragija);
- svježi ICV (6 tjedana);
- neurodegenerativne bolesti i epilepsija;
- značajna anemija (Hg  $< 110$  (muškarci),  $< 100$  (žene));
- stanje nakon reanimacije (3 mjeseca);
- terapija koja značajno utječe na vaskularnu ili imunološku funkciju (monoklonska protutijela, imunosupresivi, sustavni kortikosteroidi, ...);
- kronična respiratorna insuficijencija i stanja kronične hipoksemije;
- sepsa i kronične aktivne infekcije sa sustavnim upalnim odgovorom (aktivna tuberkuloza itd.);
- neliječena bolest štitnjače;
- aktivna zlouporaba alkohola i droga;
- jetrena insuficijencija (uznapredovala bolest jetre uz poremećenu sintetsku i metaboličku funkciju).

#### 4.2. Ispitanici

Ispitanici su bili bolesnici oboljeli od akutnoga koronarnog sindroma, oba spola, stariji od 18 godina koji su liječeni na Zavodu za bolesti srca i krvnih žila u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Po završetku hospitalizacije ispitanici su dobrovoljno uključeni u protokol istraživanja i regrutirani od strane glavnoga istraživača, uz prethodno potpisan informirani pristanak (potpisan u dva primjerka) i detaljan pregled medicinske dokumentacije, čime je osigurano poštivanje kriterije uključivanja i isključivanja studije. Ispitanik je prije ulaska u istraživanje obaviješten o istraživanju, uz potpisivanje informiranoga pristanka. Ispitanik je imao pravo odustati od istraživanja u bilo kojem trenutku zbog osobnih razloga. Nakon regrutacije provedena je procedura jednostavne randomizacije ispitanika i prikriivanja klasifikacije ispitanika.

Ispitanici su podijeljeni u dvije usporedne pokusne skupine, Nutri 4 i kontrolnu, s ciljem objektivne provjere učinka funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja:

1. Nutri 4 skupinu činili su ispitanici oboljeli od akutnoga koronarnog sindroma (AKS) koji zadovoljavaju kriterije za dijagnozu AKS-a koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom);
2. kontrolnu skupinu činili su ispitanici oboljeli od akutnoga koronarnog sindroma koji zadovoljavaju kriterije za dijagnozu AKS, a konzumirali su obična kokošja jaja.

U obje skupine ispitanika (kontrolnoj i Nutri 4) tijekom hospitalizacije je započeta terapija maksimalnim dozama statina, uz ACE inhibitore,  $\beta$ -blokatore i antiagregacijsku terapiju.

S obzirom na postavljenu razinu značajnosti 0,05 te snagu 0,8, pomoću programa G\*Power (inačica 3.1.9.2., Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Njemačka) utvrđeno je da je 13 ispitanika po skupinama bio zadovoljavajući broj za sve metode koje su korištene u ovom istraživanju (160), a u istraživanje je uključeno 28 ispitanika.

### 4.3. Protokol istraživanja

Postupak randomizacije i prikrivanje razvrstavanja ispitanika

U ovoj su studiji ispitanici i procjenitelj ishoda (istraživač) bili potpuno zaslijepljeni. Podaci svih ispitanika kodirani su na način da im je istraživač koji nije imao kontakta s ispitanicima dodijelio jedinstvenu šifru ispitanika neposredno nakon regrutacije, te su pod tim brojem vođeni tijekom provedbe istraživanja.

Kako bi se postiglo objektivno (nepriistrano) razvrstavanje u različite pokusne skupine, postupak jednostavne randomizacije provodi se pomoću novčića od strane nepriistranoga istraživača (161). Ovisno o strani novčića (glava - 1, pismo - 2) ispitanik pripada skupini 1 (kontrolna skupina) ili 2 (Nutri 4 skupina). Nitko od sudionika ove studije (ni ispitanici ni istraživači) nisu znali kojoj skupini ispitanici pripadaju sve do završetka protokola.

Postupak randomizacije i prikrivanje razvrstavanja ispitanika osiguran je na sljedeći način:

- Istraživač 1 – generira redoslijed dodijele, tj. za svakoga ispitanika baca novčić i ovisno o strani novčića dodjeljuje broj skupine;
- Istraživač 2 – upisuje ispitanike uključene u studiju;
- Istraživač 3 – doprema i numerira kokošja jaja;
- Istraživač 4 – raspodjeljuje sudionike na intervenciju te dijeli kokošja jaja.

Ulazna mjerenja ispitanika dogovorena su unaprijed kako ne bi došlo do preklapanja termina. Kokošja jaja dostavljana su jednom tjedno glavnom istraživaču, ovisno o proizvodnji farme, te su sukladno tome raspoređena na ispitanike koji su taj tjedan ušli u istraživanje.

Pojašnjenje jedinstvene šifre ispitanika:

- „ZCI-Q“ - označava naziv projekta u sklopu kojeg se studija izvodi („Znanstveni centar izvrsnosti“), u kojemu se ispituju kokošja jaja obogaćena s četiri nutrijenta: n-3 PUFA, lutein, vitamin E i selen;
- Broj „1“ ili broj „2“ će označavati pokusnu skupinu ovisno o jajima koje će konzumirati
  - Broj 1 – kontrolna skupina ispitanika;
  - Broj 2 – Nutri 4 skupina ispitanika;
- No - je redni broj ispitanika (1, 2, 3, ...).

Rezultat takve randomizacije razlika je u broju ispitanika koja postoji između kontrolne i Nutri 4 skupine, ali će broj ispitanika u obje skupine zadovoljiti veličinu uzorka potrebnu za odgovarajuću statističku analizu.

Dijetetski protokol istraživanja trajao je tri tjedna, tijekom kojih su ispitanici imali dvije studijske posjete:

- I. posjeta - prilikom ulaska u protokol svaki ispitanik dobio je obrasce dnevnika prehrane za praćenje konzumacije namirnica, tada su napravljena početna mjerenja;
- II. posjeta - nakon tri tjedna konzumacije određene vrste kokošnjih jaja (funkcionalno obogaćenih ili običnih kokošnjih jaja) kada su ponovljena mjerenja te je predan dnevnik prehrane.

Tijekom trajanja dijetetskoga protokola ispitanici su svakoga jutra konzumirali tri tvrdo kuhana kokošja jaja odjednom. Funkcionalno obogaćena kokošja jaja, „Nutri 4 jaja“ (obogaćena n-3 PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom), bila su iste veličine kao i obična kokošja jaja (L komercijalna veličina), kako se ne bi uočila razlika među njima. Jaja su proizvedena na

peradarskoj farmi Marijančanka d.o.o. Marijanci (u suradnji s partnerima ZCI-a s FAZOS-a). Sastav jestivoga dijela kokošnjih jaja korištenih u ovom istraživanju prikazan je Tablicom 1.

Tablica 1. Rezultati određivanja profila masnih kiselina i udjela luteina, vitamina E i selen u kokošnjim jajima

Sastav (mg/60 g jaja (jestivoga dijela))	Obična jaja	Nutri 4 jaja
Lutein	0,110	<b>0,616</b>
Vitamin E	0,595	<b>1,098</b>
Selen	0,018	<b>0,023</b>
<i>Masne kiseline*</i>		
$\Sigma$ SFA	1566 (346)	1442 (185)
$\Sigma$ MUFA	1976 (189)	2419 (139)
$\Sigma$ n-3 PUFA	146 (20)	<b>342 (25)</b>
ALA	71 (11)	<b>189 (16)</b>
EPA <sup>†</sup>	n.d. <sup>†</sup>	<b>19 (2)</b>
DHA	75 (11)	<b>135 (11)</b>
$\Sigma$ n-6 PUFA	1263 (148)	<b>747 (46)</b>
LA	1165 (140)	702 (43)
AA	89 (9)	<b>44 (4)</b>
$\Sigma$ n-6 / $\Sigma$ n-3 PUFA	8,71	<b>2,18</b>

\*SFA - zasićene masne kiseline, MUFA - mononezasićene masne kiseline, PUFA - polinezasićene masne kiseline, ALA -  $\alpha$ -linolenska kiselina, EPA - eikosapentaenska kiselina, DHA - dokosaheksaenska kiselina, LA - linolna kiselina, AA - arahidonska kiselina.

<sup>†</sup>nije detektirano.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (standardna devijacija). *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Svaki ispitanik je na prvom mjerenju dobio obrasce dnevnika prehrane za praćenje konzumacije namirnica tijekom zadanoga dijetetskog protokola, a ispunjene obrasce je predao istraživaču na zadnjem mjerenju. Prethodno je ispitaniku naglašeno da tijekom trajanja dijetetskoga protokola od tri tjedna ne konzumira hranu bogatu omega-3 masnim kiselinama (orašasti plodovi, maslinovo ulje, riba i sl.) niti dodatke prehrane koji bi imali utjecaj na rezultate. Osim toga, bolesnici tijekom dijetetskoga protokola neće uzimati Duality tablete s obzirom na to da sadržavaju omega-3 masne kiseline. Tijekom dijetetskoga protokola od tri tjedna glavni



istraživač je kontaktirao ispitanike u više navrata radi provjere o pridržavanju uputa konzumacije jaja te pravovaljanoga ispunjavanja obrazaca prehrane.

Dnevnik prehrane je svojevrsan korektiv za praćenje prehrambenih navika ispitanika oboljelih od AKS-a, te služi kao određeni mehanizam kontrole nad time što su i kako ispitanici jeli tijekom istraživanja i je li bilo značajnoga odstupanja od dijetetski preporučenoga režima prehrane.

Dnevnici prehrane temeljeni su na istraživanju Kolobarić i sur. (2020.) (162). Unos nutrijenata i potrošnja energije analizirani su pomoću specijaliziranoga programskog paketa za nutricioniste i dijetetičare Nutri Prog na Klinici za endokrinologiju Kliničkoga bolničkog centra Osijek. Dnevnik prehrane napisan je u obliku tablice radi jednostavnosti i transparentnosti. Tablica je podijeljena 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. U obzir je uzet način pripreme i veličina porcija (ovisno o vrsti hrane). Ispitanik popunjava tablicu stavljajući znak plus/kvačica na predviđena mjesta, prema potrošnji i pripremi hrane toga dana. Ispod svakoga obroka postoji dio pod nazivom "Komentari" gdje ispitanik navodi je li konzumirao neki dodatak prehrani koji bi mogao značajno utjecati ili promijeniti unos nutrijenata toga dana. Veličine porcija pojedinoga obroka opisane su kao: male (1/2 šalice/kriške/komada); srednja/normalna porcija (šalica /kriška /komad); veliki (2 šalice/kriške/komadi).

U navedenom se istraživanju ne očekuje štetan učinak konzumacije kokošnjih jaja na zdravstveno stanje ispitanika, što se može potkrijepiti učinjenim analizama (npr. biokemijskom). Svi prikupljeni podaci dostupni su samo glavnom istraživačima i niti u jednom javnom dokumentu, radu ili na bilo koji drugi način neće biti otkriven identitet ispitanika. Istraživanje je financirano iz sredstava Hrvatskoga nacionalnoga znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek #KK.01.1.1.01.0010.

### 4.3. Preliminarno istraživanje s jajima obogaćenim samo polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA)

Preliminarno istraživanje (engl. *Proof of Concept*, PoC) provedeno je korištenjem kokošnjih jaja koja su obogaćena s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA) (98). Dizajn i protokol PoC istraživanja su bili identični onima iz glavnoga istraživanja (s nutri-4 jajima), osim što je korištena druga vrsta jaja (jaja obogaćena samo s n-3 PUFA) u skupini pacijenata koja uključuje one s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom. Svi ostali kriteriji za uključivanje i isključivanje iz PoC istraživanja bili su isti kao i u glavnom istraživanju.

Cilj PoC istraživanja bio je utvrditi imaju li jaja obogaćena n-3 PUFA-om slične ili različite učinke na zdravstvene ishode kod bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću u usporedbi s glavnom studijom koja je koristila Nutri 4 jaja (obogaćena n-3 PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom). PoC studija opisana u odlomku ima za cilj istražiti učinak konzumiranja kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om na mikrovaskularnu reaktivnost kože kod pacijenata s KVB-om, tj. mogu li n-3 PUFA smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti, barem djelomično, poboljšanjem vaskularne funkcije.

Mikrovaskularna funkcija kože u PoC studiji procijenjena je mjerenjem PORH-a (perfuzijsko-reaktivna hiperemija), koja se smatra reprezentativnim vaskularnim slojem za ispitivanje mikrovaskularne funkcije kod raznih KVB-a.

Nadalje, cilj PoC istraživanja bio je ispitati učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih samo n-3 PUFA-om na profile lipida i slobodnih masnih kiselina u serumu, biomarkere upalnoga i oksidativnoga stresa te mikrovaskularnu reaktivnost kože kod pacijenata s KVB-om.

Ovo istraživanje jasno je pokazalo da konzumacija i običnih i jaja bogatih n-3 PUFA-om nema negativan utjecaj na bilo koji od mjerenih bioloških i funkcionalnih vaskularnih parametara kod pacijenata s KVB-om, što ukazuje na to da se jaja mogu sigurno konzumirati u svakodnevnoj prehrani pacijenata s KVB-om. Zbog ograničenoga broja pacijenata s KVB-om uključenih u ovom istraživanju, potrebno je buduće veće istraživanje kako bi se potvrdili opaženi učinci.

Na temelju rezultata dobivenih PoC istraživanjem stvoreni su temelji za izradu i interpretaciju glavnoga istraživanja (s Nutri 4 jajima) kao potpora daljnjim istraživanjima u ovom području.

#### **4.4. Određivanje antropometrijskih mjera, sastav tijela i tjelesnih tekućina bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Tijekom istraživanja ispitanicima je prilikom prve posjete izmjeren krvni tlak automatskim oscilometrom (OMRON, Osaka, Japan) u tri navrata, te je izračunata srednja vrijednost krvnoga tlaka (radi bolje procjene krvnoga tlaka). Isto je učinjeno nakon tri tjedna (u drugoj posjeti).

U prvoj studijskoj posjeti, prije dijetetskoga protokola, ispitanicima su izmjerene visina i težina te je na temelju navedenih stavki izračunat BMI (engl. *body mass index*). U drugoj studijskoj posjeti (nakon proteka tri tjedna dijetetskoga protokola) iznova su izmjerena visina i težina, te je na temelju toga izračunat BMI. Sveukupno je BMI procijenjen u dva navrata, u svrhu potpune kontrole mogućega odstupanja u mjerenju. BMI se izračunava iz omjera mase u kilogramima i visine u metrima na kvadrat.

U prvoj studijskoj posjeti određen je omjer struka i bokova (engl. *waist to hip ratio*, WHR). Isto mjerenje ponovljeno je pri drugoj studijskoj posjeti. WHR se izračunava iz omjera opsega struka i bokova (88).

Određivan je sastav tijela i tjelesnih tekućina pomoću četverokanalnoga prijenosnog mjerača impedancije (Maltron Bioscan 920-II) tijekom prve i druge studijske posjete. Pomoću programa za analizu izvršeno je mjerenje idućih stavki: BMI (indeks tjelesne mase), udio nemasnoga tkiva (%) (engl. *fat free mass %*, FFM %), masno tkivo (%) (engl. *fat mass %*, FM %), gustoća tijela (engl. *body density*, BD), volumen plazme (engl. *plasma fluid*, PF), volumen intersticijske tekućine (engl. *interstitial fluid*, IF), udio svih tjelesnih tekućina (engl. *total body water %*, TBW %), udio izvanstanične tekućine (engl. *extracellular water %*, ECW %), udio unutarstanične tekućine (engl. *intracellular water %*, ICW %) i omjer ECW / ICW.

#### **4.5. Određivanje hemodinamskih parametara (promjene arterijskoga krvnoga tlaka) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Nepravilnosti u otkucaju srca često se zanemaruju pri izračunu srednje vrijednosti, ali se lako uočavaju prema razmaku između dva otkucaja. Ti promjeni u srčanom ritmu rezultat su interakcija između srca i drugih fizioloških sustava. Varijabilnost srčanoga ritma (HRV) se smatra mjera neurokardijalne funkcije za procjenu interakcije srca i mozga i aktivnosti autonomnoga živčanog sustava. Detaljna analiza HRV-a sastoji se od vremenske, frekvencijske i nelinearne analize. Vremenska analiza daje podatke o prosječnim vrijednostima varijacija u različitim vremenskim razdobljima. Glavni parametri su SDNN (*standard deviation of NN*

*interval*) i RMS-SD (*root mean square successive differences*). SDNN pokazuje ukupnu aktivnost autonomnoga živčanog sustava, dok RMSSD odražava aktivnost parasimpatikusa. Za mjerenje HRV-a korišten je uređaj Heart Rhythm Scanner (Biocom 4000) koji bilježi EKG signale u ležećem položaju tijekom 5 minuta. Mjerenje se obavlja u prostoriji s konstantnom temperaturom od 23,5 °C sa standardnom devijacijom od 0,5 °C, između 8:30 i 12:00 h. Ispitanici su zamoljeni da izbjegavaju alkohol, kavu, čaj, kolu i pušenje prije mjerenja, te da mire 10 minuta prije mjerenja.

#### **4.6. Određivanje slobodnih masnih kiselina, lipidograma i biokemijskih parametara u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Profil slobodnih masnih kiselina određen je u serumu ispitanika pri čemu su uzeti uzorci venske krvi u obje studijske posjete, te pohranjeni na -80 °C sve do provođenja analize. Koncentracija slobodnih masnih kiselina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom određena je u Bioanalitičkom laboratoriju BIOcentra Zagreb metodom plinske kromatografije-tandem masene spektrometrije (GC-MS/MS) prema Stupin i sur. (2020.) te Wang i sur. (2013.) (88, 153).

Analize su provedene pomoću masenoga spektrometra (Thermo Fisher GC Trace 1300 u sprezi s TSQ 9000 Triple Quadrupole) i standardne mješavine metilnih estera masnih kiselina (FAME MIX) otopljenih u metilen-kloridu (Supelco Inc., Bellefonte, PA, SAD) korištenoj u koncentraciji od 30 mg/mL.

U obje studijske posjete ispitanicima je uzet uzorak venske krvi pomoću braunile nakon pola sata mirovanja u mirnoj i tihoj prostoriji. Određivane su vrijednosti leukocita (LKC), eritrocita (ERC), hemoglobina (HB), hematokrita (HCT), eritrocitnih konstanti (MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, MBV) trombocita (TRC), aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), gama glutamil transpeptidaze (GGT), alkalne fosfataze (ALP), triglicerida, kolesterola, lipoproteina male gustoće (LDL), lipoproteina velike gustoće (HDL), C-reaktivni protein (CRP) te koncentraciju glukoze u krvi natašte (GUK), ureje, kreatinina, urata, natrija, kalija, kalcija, ukupnoga željeza, feritina, transferina.

Navedene biokemijske analize učinjene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, standardnim laboratorijskim metodama. Krvna slika određivana je pomoću hematološkoga brojača Sysmex XN-1000 (164), a biokemijski parametri na uređaju Olympus AU680, Beckman Coulter (165).

#### 4.7. Određivanje koncentracije luteina, vitamina E, selena u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Koncentracije **luteina** u uzorcima seruma određene su prema protokolu Tzenga i sur. (2004.). (156, 157). Uzorcima seruma dodana je deionizirana voda i 0,01 % askorbinska kiselina (Grammol, GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska) otopljena u apsolutnom etanolu (Gram-mol GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska) i temeljito promiješana. Heksan (Carlo Erba, CARLO ERBA Reagents GmbH, Milano, Italija) je dodan u smjesu, miješan i centrifugiran na 2500 okretaja/20 min. Supernatant je odvojen i uparen, nakon čega je uslijedilo određivanje koncentracije luteina pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). Kupljena je end-caped HPLC kolona visoke rezolucije (Hypersil; veličina čestica 5 µm; 4,6 × 250 mm) i C18 analitička kolona (Shim-pack GIST; veličina čestica 5 µm; 250 × 4,6 mm). Za određivanje koncentracija korišten je HPLC LC-30 NEXERA (Shimadzu, Japan, 2018.). Svi uzorci su analizirani u tri ponavljanja.

Koncentracija **vitamina E** određivana je prema protokolu Jagar i suradnici (2012.) (168). Postupak počinje pripremom smjese seruma subjekta kojoj su dodani apsolutni etanol (za denaturaciju serumskih proteina) i ksilen (za odvajanje supernatanta od proteina). Nakon pripreme smjese slijedi centrifugiranje (3000 okretaja/10 min). Dobiveni supernatant se pomiješa s 2,2-bipiridilom i FeCl<sub>3</sub>, što rezultira ružičastom bojom smjese. Smjesa se inkubira 2 minute. Nakon inkubacije apsorbancija je izmjerena spektrofotometrom (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California, USA) na 492 nm. Očitane vrijednosti apsorbancije odgovaraju koncentraciji vitamina E. Svi uzorci su analizirani u tri ponavljanja.

Koncentracije **selena** u uzorcima seruma određene su spektrometrijom masa induktivno spregnute plazme (ICP-MS) (ICP-MS, Agilent 7500a, Agilent Technologies Inc., Kalifornija, SAD) nakon odgovarajuće pripreme uzorka. Svaki uzorak seruma na ICP-u analiziran je internom kontrolom objedinjene plazme, a za kontrolu analitičke metode korišten je referentni materijal NIST 1567b (pšenično brašno, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, Gaithersburg, MD, SAD) (169). Svi uzorci su analizirani u tri ponavljanja.

#### 4.8. Mjerenje oksidativnoga stresa i pokazatelja antioksidativnoga kapaciteta u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Razine oksidativnoga stresa i antioksidativnoga kapaciteta u serumu ispitanika oboljelih od akutnoga koronarnog sindroma određivane su prije i nakon dijetetskoga protokola pomoću standardiziranih protokola spektrofotometrijskom metodom (170).

Mjerenje oksidativnoga stresa u serumu provedeno je mjerenjem markera lipidne peroksidacije koji uključuju reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS, engl. *thiobarbituric acid reactive substances*) i malondialdehid (MDA). Ti markeri mjere razinu oštećenja lipida (masti) u tijelu uslijed oksidativnoga stresa. Budući da je metoda nespecifična, zbog drugih tvari koje se vežu na tiobarbiturnu kiselinu (uključujući proteine), u uzorak je dodana trikloroctena kiselina za taloženje proteina, a potom je supernatant korišten za analizu.

Apsorbancija uzoraka mjerena je nanofotometrom (P300 UV/VIS, IMPLLEN) na valnim duljinama 572 - 532 nm s malondialdehidom (MDA) kao standardom, i izraženi su kao mikromolarni MDA ekvivalenti ( $\mu\text{M}$  MDA) (171).

Antioksidativni kapacitet mjeran je FRAP testom (engl. *ferric reducing ability of plasma*), određivanjem antioksidativnoga kapaciteta plazme u uzorcima seruma ispitanika prema standardnom protokolu (172). FRAP test mjeri sposobnost antioksidanasa u uzorku da reduciraju ione željeza iz  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Redukcija  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  praćena je prijenosom elektrona, a količina prenesenih elektrona proporcionalna je koncentraciji antioksidanasa u uzorku.

Za provođenje FRAP testa priprema se FRAP reagens, tj. otopina željezovoga klorida i miješa se s uzorkom (2,25 ml reagensa dodaje se u 75  $\mu\text{l}$  plazme).

FRAP reagens sastoji se od 388 mM acetatnoga pufera (pH vrijednost 3,6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) otopljenoga u 40 mM HCl i 20 mM  $\text{FeCl}_3$  (željezov(III) klorid) otopljenoga u vodi. Smjesa se zatim inkubira 4 min, nakon čega se mjeri apsorbancija otopine na valnoj duljini od 593 nm pomoću nanofotometra (P300 UV/VIS, IMPLLEN) s Troloxom (TE) kao standardom.

Rezultati su uspoređeni sa standardnom krivuljom dobivenom pomoću Troloxa i izraženi su kao mikromolarni TE ekvivalenti ( $\mu\text{M/L}$  TE). Apsorbancija se koristi za izračunavanje koncentracije antioksidansa u uzorku, pomoću standardne krivulje.

#### **4.9. Mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Aktivnost antioksidativnih enzima: glutation-peroksidaze (GPx), superoksid-dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) iz seruma ispitanika mjerena je spektrofotometrijski prije i nakon dijetetskoga protokola, tj. tijekom prve i druge studijske posjete. Mjerenja su izvršena pomoću spektrofotometra Lambda 25 UV/Vis uz programsku podršku UV WinLab 6.0 (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD) i izražena kao U (mg proteina)<sup>-1</sup> (160, 163, 164). Za određivanje aktivnosti katalaze (CAT) korištena je spektrofotometrijska metoda (175). Aktivnost glutation-peroksidaze (GPx) mjerena je spektrofotometrijski na 340 nm metodom po Wendelu (1981.) (176), a aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) mjerena je metodom Flohe i Ottinga (1984.) (177).

#### **4.10. Mjerenje proteinskoga izražaja enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, i nNOS) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Određivanje proteinskoga izražaja enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti tj. koncentracija enzima nNOS, eNOS i iNOS, određena je iz seruma ispitanika metodom imunoenzimskoga testa (ELISA) u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju. Enzimi nNOS, eNOS, i iNOS uključeni su u proizvodnju dušikovoga oksida, signalne molekule koja ima ključnu ulogu u raznim fiziološkim procesima, uključujući kardiovaskularnu funkciju.

Kvantifikacija nNOS-a, eNOS-a i iNOS-a provedena je s tvorničkim kompletom humanoga nNOS-a (CSB-E13872h, CUSABIO, Wuhan, provincija Hubel, Kina), eNOS-a (CSB-E08322h, CUSABIO, Wuhan, provincija Hubel, Kina) i iNOS-a (CSB-E08148h, CUSABIO, Wuhan, Hubel Province, Kina) prema uputama proizvođača. Kompleti koji se služe isključivo u istraživačke svrhe, a ne za dijagnostičku kvantifikaciju. Intenzitet bojenja, ili apsorbancija, mjerena je spektrofotometrom pomoću standardne krivulje (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornija) na 490 nm, a pomoću kalibracijske krivulje u pet točaka izračunata je koncentracija analita. Konačni intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji analiziranoga analita u uzorku (170).

#### **4.11. Određivanje koncentracije proteina pro- i protuupalnih citokina i kemokina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

U uzorcima venske krvi ispitanika određivana je serumska koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina, i to mjerenjem koncentracije transformirajućega faktora rasta- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), faktora tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), komponente komplementa (C3a), interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukina 6 (IL-6), interleukina 10 (IL-10), interleukina 17A (IL-17A), interleukina 23 (IL-23) i kemokina monocitnoga kemoatraktantnog proteina-1 (MCP-1). Za analizu su korišteni ProcartaPlex Multiplex Immunoassay testovi (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i metode temeljene na LuminexMAP tehnologiji (Luminex Corp., Austin, TX, SAD). Invitrogen ProcartaPlex Multiplex imunitestovi temelje se na LuminexMAP tehnologiji koja omogućuje istodobnu kvantifikaciju i detekciju velikoga broja proteina u jednom uzorku seruma. Karakteristika navedene metode kombinacija je učinkovitosti višestruke kvantifikacije i preciznosti, osjetljivosti, ponovljivosti i jednostavnosti ELISA testa (engl. *the enzyme-linked immunosorbent assay*). Kvantifikacija je provedena korištenjem besplatnoga programa ProcartaPlex Analyst (eBioscience, Affymetrix tvrtke Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i izražena kao koncentracija u pikogramima po mililitru. Mjerenja su obavljena u Laboratoriju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta u Osijeku.

#### **4.12. Mjerenje protoka krvi i vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Ispitivanje endotelne funkcije u mikrocirkulaciji kože provedeno je neinvazivnom metodom LDF-a (engl. *laser Doppler flowmetry*) (MoorVMS-LDF, Axminster, UK) (178). LDF je mjereno u dva navrata: prilikom prve posjete, tj. prije provođenja dijete, i tijekom druge posjete, odnosno 3 tjedna nakon provedenoga dijetetskog protokola. Mjerenje tkivnoga protoka LDF-om počinje nakon što je pacijent prethodno proveo 30 minuta u toploj prostoriji ( $23,5 \pm 0,5$  °C) kako bi se izbjegao utjecaj temperature na protok krvi. Pritom su pacijenti prethodno odmarali u ležećem položaju s laserskom sondom pričvršćenom na prikladno mjesto na koži volarne strane podlaktice, 13 - 15 cm od zapešća, kako bi se izbjegli artefakti. Protokol započinje induciranjem post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH). Nakon 5 minuta mjerenja bazalnoga protoka krvi izaziva se okluzija pomoću manšete tlakomjera postavljene oko nadlaktice mjerene ruke. Okluziju uzrokuje tlak koji je 20 - 30 mmHg viši od sistoličkoga tlaka ispitanika. Okluzija traje 1 minutu, nakon čega se otpušta manšeta i izaziva reaktivna



hiperemija, a mjerenje se nastavlja još 1 - 2 minute. Nekoliko medijatora posreduje tome mikrovaskularnom odgovoru, a to su senzorni živci i vazodilatatori ovisni o endotelu, uključujući čimbenike hiperpolarizacije endotelna podrijetla i prostaglandine, što sugerira da je PORH koristan alat za procjenu ukupnih promjena u mikrovaskularnoj funkciji i njegovom endotelu. Na kraju, rezultati su predstavljeni kao razlika u postotku promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u usporedbi s bazalnim vrijednostima (R-O %) (168, 169). Nakon PORH-a slijedi mjerenje mikrovaskularnoga protoka kože kao odgovor na iontoforezu s acetilkolinom (ACh), koji se smatra vazodilatatorom ovisnim o endotelu. Treći protokol je mjerenje mikrovaskularnoga protoka kroz kožu kao odgovor na iontoforezu s natrijevim nitroprusidom (SNP), koji se smatra vazodilatatorom neovisnim o endotelu. Iontoforeza je neinvazivna metoda za transdermalnu primjenu acetilkolina i natrijeva nitroprusida pomoću vanjske električne struje. Acetilkolin i natrijev nitroprusid stavljaju se u iontoforetsku elektrodu koja je pričvršćena na isto mjesto gdje je bila laserska sonda. Acetilkolin se primjenjuje iontoforezom kroz sedam intervala primjene od 0,1 mA u trajanju od 30 s pauzom od 30 s između pojedinih intervala primjene; i natrijev nitroprusid kroz tri intervala primjene 0,1 mA u trajanju od 30 s i 4 intervala primjene 0,2 mA u trajanju od 30 s s pauzom od 90 s između pojedinih intervala primjene. Mikrocirkulacijski protok krvi izražen je u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama i opisan kao površina ispod krivulje tijekom početnoga protoka i tijekom primjene ACh-a ili SNP-a. Konačni rezultat izražava se povećanjem protoka krvi nakon primjene ACh-a ili SNP-a u usporedbi s početnim protokom. Rezultati su izraženi kao postotak promjene između razdoblja okluzije i bazalnoga protoka te između reaktivne hiperemije i bazalnoga protoka. Određuje se i vrijeme do najviše točke perfuzije (engl. *time to peak*, TtP) kao i vrijeme latencije (engl. *time of latency*, TL), odnosno vrijeme od najviše točke perfuzije do trenutaka kada se protok vraća na bazalne uvjete. Opisana mjerenja provedena su u skladu s istraživanjima autora Čavka i suradnika (2013, 2015) (170, 171).

#### **4.13. Mjerenje debljine kompleksa intime medije karotidne arterije u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Ultrazvučna dijagnostika ili ultrasonografija (UZV) za mjerenje debljine intime medije karotidne arterije radiološka je metoda oslikavanja koja koristi ultrazvučne valove visoke frekvencije za dobivanje slike unutrašnjih struktura tijela (172, 173). Mjerenje debljine intime medije karotidne arterije je neinvazivna i ponovljiva tehnika za identifikaciju i kvantificiranje subkliničke vaskularne bolesti i za procjenu rizika od kardiovaskularnih bolesti. Mjerenje

debljine intime medije ima svoj značaj u procjeni aterosklerotskoga rizika (184). Korištenje ove metode u kliničkim ispitivanjima i praksi uključuje primjenu ultrazvuka, tehničke principe i principe povezane s bolešću, kao i najbolju praksu u provođenju, tumačenju i dokumentiranju rezultata studija (185). Prednosti ove metode su u tome što je neinvazivna, relativno jeftina i može se ponavljati bez štetnih učinaka za bolesnika (186). Debljina intime medije karotidne arterije izmjerena je od strane jednoga sonografa pomoću linearne vaskularne ultrazvučne sonde (GE Vivid E9 ultrazvuk) za vizualizaciju zajedničke karotidne arterije na bifurkaciji. S uređajem je korištena EKG detekcija. Softver uređaja upotrijebljen je za objektivno mjerenje određenih segmenata stražnje i prednje stijenke zajedničke karotidne arterije proksimalno od karotidne bifurkacije, kao što je prethodno opisano standardnim protokolima (177, 178) Prikupljeni su podaci o maksimalnoj, prosječnoj i minimalnoj intimi mediji kompleksa na lijevoj i desnoj strani vrata, na dijelovima stijenke duljine približno 10 mm (184).

#### **4.14. Statistička analiza**

Izmjerene numeričke varijable prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ili medijanom i interkvartilnim rasponom, ovisno o normalnosti distribucije. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli ispitana je Shapiro - Wilks testom. Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika unutar kontrolne i Nutri 4 skupine prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke u slučajnu kada su podaci pratili normalnu distribuciju; odnosno Wilcoxonovim testom rangova s predznakom (engl. *Wilcoxon signed-rank test*) u slučaju kada podaci nisu pratili normalnu distribuciju. Usporedbom apsolutnih promjena ispitane su eventualne razlike utjecaja dijetalnoga protokola za kontrolnu i Nutri 4 skupinu. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke (u slučaju kada su podaci pratili normalnu distribuciju), odnosno Mann-Witney U testom (u slučaju kada podaci nisu pratili normalnu distribuciju). Sve P vrijednosti bile su dvostrane uz razinu značajnosti  $\alpha = 0,05$  i statističku snagu 80 %. Statistička analiza podataka provedena je pomoću programa XLSTAT inačica 2019.2.2. (Addinsoft, New York, NY, USA).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Rezultati preliminarnoga istraživanja - uloga jaja obogaćenih n-3 PUFA-om na lipidni profil, razinu upalnih medijatora i mikrovaskularnu funkciju bolesnika s koronarnom bolešću srca

Potencijalno, kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om mogu promijeniti profil slobodnih masnih kiselina u povoljniji omjer n-6/n-3, te povećati koncentraciju n-3 PUFA u serumu (Tablica 2).

Kod pacijenata s akutnim koronarnim sindromom u kontrolnoj skupini vrijednosti ukupnog kolesterola i triglicerida, značajno su smanjene (Tablica 3), kao i vrijednosti TNF- $\alpha$  ali ne statistički značajno (Tablica 4). Nadalje, kod iste skupine pacijenata ali u n-3 PUFA skupini vrijednosti ukupnog kolesterola i LDL kolesterola značajno su smanjene (Tablica 3), kao i vrijednosti IL-1a i TNF- $\alpha$ , ali ne statistički značajno (Tablica 4).

Kod pacijenata s kroničnim koronarnim sindromom u n-3 PUFA skupini vrijednosti ukupnog kolesterola su značajno smanjene (Tablica 3), a vrijednosti IL-1a su smanjene, ali ne statistički značajno (Tablica 4).

Uspoređujući vrijednosti post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (Ac - CAD), one se nisu statistički značajno mijenjale između ispitivanih skupina (kontrolnoj i n-3 PUFA). Nakon dijetetskog protokola vrijednosti PORH-a su se smanjile u kontrolnoj skupini (sa 132,7 % na 107,6 %), ali ne statistički značajno. U n-3 PUFA skupini došli je porasta vrijednosti PORH-a nakon dijetetskog protokola (sa 105,7 % na 117,7 %), ali taj porast nije bio statistički značajan (Tablica 5). Uspoređujući vrijednosti post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) u bolesnika s kroničnim koronarnim sindromom (Ch - CAD), one se nisu statistički značajno mijenjale između ispitivanih skupina (kontrolnoj i n-3 PUFA). Nakon dijetetskog protokola vrijednosti PORH-a su se smanjile u kontrolnoj skupini (sa 109,3 % na 108,4 %), kao i u n-3 PUFA skupini (sa 138,5 % na 136,1 %), ali ne statistički značajno (Tablica 5).

Uspoređujući promjene TBARS-a u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (Ac - CAD), prije i nakon dijetetskog protokola, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika. U obje skupine vidljivo je smanjenje TBARS-a (u kontrolnoj skupini sa 2,603 na 2,558  $\mu\text{mol MDA/L}$ , a u n3-PUFA sa 0,790 na 0,626  $\mu\text{mol MDA/L}$ ) nakon dijetetskog protokola, ali ne statistički značajno (Tablica 5). Uspoređujući promjene TBARS-a u bolesnika s kroničnim

koronarnim sindromom (Ch - CAD), prije i nakon dijetetskog protokola, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini vidljivo je blago povećanje TBARS-a (sa 0,222 na 0,268  $\mu\text{mol MDA/L}$ ), u odnosu na n-3 PUFA skupinu gdje je zabilježeno smanjenje TBARS-a (sa 0,291 na 0,277  $\mu\text{mol MDA/L}$ ) nakon dijetetskog protokola, ali ne statistički značajno (Tablica 5).

Uspoređujući promjene FRAP u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (Ac - CAD), prije i nakon dijetetskog protokola, u kontrolnoj skupini došlo je do statistički značajnog smanjenja FRAP-a (sa 0,628 na 0,554  $\text{mmol Trolox/L}$ ). U n-3PUFA skupini zabilježeno je smanjenje FRAP vrijednosti nakon dijetetskog protokola, ali ne statistički značajno (sa 0,608  $\text{mmol Trolox/L}$  na 0,594  $\text{mmol Trolox/L}$ ). Uspoređujući promjene FRAP-a u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskog protokola, vidljivo je da među njima nema statistički značajne razlike (Tablica 5). Uspoređujući promjene FRAP u bolesnika s kroničnim koronarnim sindromom (Ch - CAD), prije i nakon dijetetskog protokola, u kontrolnoj skupini došlo je do porasta FRAP-a ali ne statistički značajno (sa 0,465 na 0,490  $\text{mmol Trolox/L}$ ). U n-3PUFA skupini zabilježeno je smanjenje FRAP vrijednosti nakon dijetetskog protokola, ali ne statistički značajno (sa 0,536 na 0,482  $\text{mmol Trolox/L}$ ). Uspoređujući promjene FRAP-a u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskog protokola, vidljivo je da među njima nema statistički značajne razlike (Tablica 5).

Izmjerene aktivnost enzima glutathion-peroksidaze (GPx) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (Ac - CAD) smanjivala se statistički značajno nakon provedbe dijetetskog protokola (u kontrolnoj skupini sa 0,029 na 0,006  $\text{U/mg proteina}$ , a u n-3PUFA skupini sa 0,029 na 0,006  $\text{U/mg proteina}$ ). Uspoređujući promjene aktivnosti glutathion-peroksidaze između ispitivanih skupina, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika (Tablica 5). Izmjerene aktivnost enzima glutathion-peroksidaze (GPx) u bolesnika s kroničnim koronarnim sindromom (Ch - CAD) blago se povećavala nakon provedbe dijetetskog protokola u kontrolnoj skupini (sa 0,008 na 0,009  $\text{U/mg proteina}$ ), ali ne statistički značajno. U n-3PUFA skupini, aktivnost enzima glutathion-peroksidaze smanjivala se statistički značajno nakon provedbe dijetetskog protokola (sa 0,014 na 0,009  $\text{U/mg proteina}$ ). Uspoređujući promjene aktivnosti glutathion-peroksidaze između ispitivanih skupina, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika (Tablica 5).

Tablica 2. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA (n-3 PUFA) na profil slobodnih masnih kiselina u serumu kardiovaskularnih bolesnika

Masna kiselina*	Kontrola		$p^a$	n-3 PUFA		$p^a$	Učinak između skupina
	Prije	Poslije		Prije	Poslije		$p^b$
<b>SFA (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>							
C14:0 Miristinska kiselina	31,2 (10,5)	26,9	N/D	29,0 (3,3)	28,0 (1,0)	0,982	N/D
C16:0 Palmitinska kiselina	369 (156)	250 (43)	0,268	348 (49)	262 (59)	<b>0,003</b>	0,058
C18:0 Stearinska kiselina	111 (52)	75 (7)	0,281	95 (11)	91 (13)	0,421	0,087
<b>PUFA (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>							
n-7 C16:1 [cis-9] Palmitoleinska kiselina	39,4 (19,2)	26,1 (11,1)	0,305	48,7 (13,4)	33,4 (11,8)	<b>&lt;0,001</b>	0,173
n-9 C18:1 [cis-9] Oleinska kiselina	381 (279)	225 (44)	0,374	250 (75)	194 (55)	0,012	0,045
n-6 C18:2[cis-9,12] Linolna kiselina	416 (252)	297 (30)	0,388	371 (83)	309 (91)	0,191	0,251
C18:3[cis-6,9,12] $\gamma$ -linolenska kiselina	11,6 (1,9)	11,6 (2,5)	0,944	13,4 (1,4)	11,7 (0,2)	0,195	0,417
C20:3[cis-8,11,14] dihomo- $\gamma$ -linolenska kiselina	24,1 (10,1)	15,0 (1,6)	0,165	29,9 (7,8)	21,2 (3,3)	0,034	0,059
C20:4 [cis-5,8,11,14] Arahidonska kiselina	138 (17)	123 (11)	0,333	168 (44)	118 (17)	0,050	0,066
n-3 C18:3[cis-9,12,15] $\alpha$ -linolenska kiselina	35,9	<LOQ	N/D	<LOQ	15,3	N/D	N/D
C20:4[cis-5,8,11,14] Eicosa-5,8,11,14,17-pentaenska kiselina	<LOQ	<LOQ	N/D	11,7 (3,0)	14,4 (3,0)		N/D
C22:6[cis-4,7,10,13,16,19] cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenska kiselina	24,9 (16,2)	19,9 (3,9)	0,537	22,2 (5,3)	29,7 (9,6)	0,148	0,324
<b>n-6/n-3 PUFAs</b>	<b>5,8</b>	<b>6,3</b>		<b>8,3</b>	<b>5,5</b>		

\*SFA – zasićene masne kiseline. PUFA – polinezasićene masne kiseline. n-3PUFA – kokošja jaja obogaćena s n-3 PUFA. <LOQ - ispod granice kvantifikacije, N/D – nije detektirano (engl. *Not Found*).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija).  $p$  vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine (t-testa za zavisne uzorke);  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke).

Tablica 3. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na lipidni profil u serumu bolesnika oboljelih od akutnog (Ac - CAD) i kroničnog koronarnog sindroma (Ch - CAD)

	Kontrola		$p^a$	n-3 PUFA		$p^a$	Učinak između skupina
	Prije	Poslije		Prije	Poslije		$p^b$
Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom (Ac - CAD)							
Kolesterol (mmol/L)	4,6 (1,1)	3,7 (0,6)	<b>0,037</b>	4,9 (0,9)	3,9 (0,6)	<b>&lt;0,001</b>	0,613
Trigliceridi (mmol/L)	2,1 (0,9)	1,5 (0,5)	<b>0,048</b>	2,0 [1,4-2,7]	1,6 [1,1-2,5]	0,557	0,455
HDL kolesterol (mmol/L)	0,9 (0,29)	0,9 (0,2)	0,875	0,9 (0,1)	0,9 (0,2)	0,491	0,613
LDL kolesterol (mmol/L)	2,8 [2,4-3,7]	2,2 [2,0-2,6]	0,129	3,1 (0,8)	2,3 (0,4)	<b>0,002</b>	0,335
Bolesnici s kroničnim koronarnim sindromom (Ch - CAD)							
Kolesterol (mmol/L)	3,9 (1,1)	4,0 (1,1)	0,471	4,2 (0,6)	4,4 (0,9)	0,415	0,217
Trigliceridi (mmol/L)	1,6 (0,8)	1,4 (0,7)	0,510	1,3 [0,9-2,0]	1,2 [1,0-1,7]	1,000	0,428
HDL kolesterol (mmol/L)	1,1 (0,3)	1,1 (0,3)	0,688	1,3 [1,1-1,4]	1,3 [1,1-1,6]	0,240	0,557
LDL kolesterol (mmol/L)	2,3 (0,7)	2,4 (0,7)	0,521	2,5 (0,6)	2,4 (0,7)	0,641	0,821

n-3PUFA – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju.  $p$  vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom);  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).

Tablica 4. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA (n-3 PUFA) na koncentraciju proteina pro- i protuupalnih citokina i kemokina u serumu bolesnika oboljelih od akutnog (Ac - CAD) i kroničnog koronarnog sindroma (Ch - CAD)

	Kontrola		<i>p</i> <sup>a</sup>	n-3 PUFA		<i>p</i> <sup>a</sup>	Učinak između skupina	
	Prije	Poslije		Prije	Poslije		<i>p</i> <sup>b</sup>	
Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom (Ac - CAD)								
IL-1a	0,35 (0,07)	0,38 (0,07)	0,111	0,41 (0,10)	0,28 (0,22)	0,122	0,966	
TNF- $\alpha$	1,80 (1,00)	1,51 (1,07)	0,490	1,98 (0,86)	1,69 (1,07)	0,544	0,700	
IL-6	2,48 (1,09)	2,57 (0,59)	0,835	3,00 [2,75-4,00]	3,00 [2,50-3,00]	0,047	0,132	
IL-10	5,20 (11,20)	5,59 (11,10)	0,332	2,09 (1,30)	2,28 (1,36)	0,543	0,576	
MCP-1	0,33 (0,36)	0,57 (0,44)	0,285	0,60 (0,81)	0,73 (1,13)	0,585	0,052	
Bolesnici s kroničnim koronarnim sindromom (Ch - CAD)								
IL-1a	0,37 (0,10)	0,41 (0,13)	0,111	0,33 (0,13)	0,29 (0,13)	0,121	0,291	
TNF- $\alpha$	2,08 (1,05)	2,59 (2,10)	0,476	1,56 (0,60)	2,00 (0,61)	0,176	0,418	
IL-6	2,47 (1,04)	2,72 (1,40)	0,727	2,75 [0,90-3,00]	2,50 [1,88-2,50]	0,844	0,707	
IL-10	1,9 [0,6-2,2]	1,9 [0,0-2,5]	1,000	1,31 (0,87)	1,97 (1,65)	0,256	0,291	
MCP-1	0,18[0,06-0,82]	0,18 [0,09-0,559]	0,547	0,43 (0,52)	0,92 (0,85)	0,083	0,298	

n-3PUFA – kokošja jaja obogaćena s n-3 PUFA. TNF- $\alpha$  (faktor tumorske nekroze  $\alpha$ ), IL-6 (interleukin 6), IL-10 (interleukin 10), IL1a (interleukin 1a), MCP-1(monocitni kemoatraktantni protein 1). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju. *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu *p*<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom); *p*<sup>b</sup> - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).

## 5. REZULTATI

Tablica 5. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i n-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja (n-3 PUFA) na mikrovaskularni odgovor kože na vaskularnu okluziju (postokluzivna reaktivna hiperemija, PORH), razinu oksidativnog stresa (TBARS), antioksidativni kapacitet (FRAP) i aktivnost antioksidativnog enzima (GPx) u serumu bolesnika oboljelih od akutnog (Ac - CAD) i kroničnog koronarnog sindroma (Ch - CAD)

	Kontrola		$p^a$	n-3 PUFA		$p^a$	Učinak između skupina
	Prije	Poslije		Prije	Poslije		$p^b$
Bolesnici s akutnim koronarnim sindromom (Ac - CAD)							
PORH R-O (%)	132,7 (42,3)	107,6 (66,2)	0,703	105,7 (23,5)	117,7 (25,2)	0,652	0,423
TBARS (uM MDA)	2,603 (2,171)	2,558 (1,609)	0,963	0,790 [0,370-2,615]	0,626 [0,370-3,3062]	1,000	0,167
FRAP (mM/L Trolox)	0,628 (0,103)	0,554 (0,083)	<b>0,034</b>	0,608 (0,135)	0,594 (0,157)	0,842	0,366
GPx (U/mg protein)	0,029 (0,004)	0,006 (0,003)	<b>&lt;0,001</b>	0,029 [0,028-0,032]	0,006 [0,004-0,012]	<b>0,016</b>	0,351
Bolesnici s kroničnim koronarnim sindromom (Ch - CAD)							
PORH R-O (%)	109,3 (31,8)	108,4 (51,2)	0,663	138,5 (98,2)	136,1 (71,6)	0,723	0,324
TBARS (uM MDA)	0,222 (0,128)	0,268 (0,130)	0,436	0,291 (0,118)	0,277 (0,091)	0,399	0,280
FRAP (mM/L Trolox)	0,465 (0,139)	0,490 (0,171)	0,727	0,536 (0,116)	0,482 (0,166)	0,185	0,258
GPx (U/mg protein)	0,008 (0,004)	0,009 (0,003)	0,858	0,014 (0,004)	0,009 (0,006)	<b>0,030</b>	0,561

n-3PUFA – kokošja jaja obogaćena s n-3 PUFA.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju.  $p$  vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom);  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Witney U test).



## 5.2. Karakteristike ispitanika

U istraživanju su sudjelovali bolesnici oba spola, stariji od 18 godina, koji su liječeni na Zavodu za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Osijek, a koji su nakon hospitalizacije dobrovoljno uključeni u protokol istraživanja. Ispitanici uključeni u istraživanje su bolesnici s akutnim koronarnim sindromom, što uključuje bolesnike s infarktom miokarda s ST-elevacijom (STEMI), infarktom miokarda bez ST-elevacije (NSTEMI) i nestabilnom anginom pektoris.

Kako bi se objektivno provjerila učinkovitost funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja, ispitanici su podijeljeni u dvije usporedne ispitne skupine, kontrolnu i Nutri 4 skupinu.

Kontrolnu skupinu činili su bolesnici u dobi  $56,8 \pm 9,6$  godina, koji su udovoljavali kriterijima za dijagnozu AKS-a; a tijekom dijetetskoga protokola konzumirali su obična kokošja jaja. Nutri 4 skupinu činili su bolesnici u dobi  $57,2 \pm 9,2$  godina, koji su udovoljavali kriterijima za dijagnozu AKS-a, a tijekom dijetetskoga protokola konzumirali su nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, vitaminom E, luteinom i selenom). Među ispitanicima uključenim u studiju nije bilo razlike u dobi između kontrolne i Nutri 4 skupine.

### 5.3. Antropometrijskih parametri, sastav tijela i tjelesnih tekućina bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Antropometrijski parametri i sastav tjelesnih tekućina, kao i tjelesni sastav ispitanika, opisani su u Tablici 6. Ispitanici objiju ispitivanih skupina imali su slične antropometrijske mjere i sastav tijela, bez značajnih razlika u BMI-u, WHR-u, FFM%, FAT%, TBW%, ECW% i ICW% (Tablica 6).

Tablica 6. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošjih jaja na antropometrijske parametre, sastav tijela i tjelesnih tekućina bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola	Nutri 4	<i>p</i>
Dob (godine)	56,8 (9,6)	57,2 (9,2)	0,924
Visina (cm)	173,3 (7,9)	173,7 (6,0)	0,896
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,0 (5,7)	28,3 (3,6)	0,377
WHR	0,97 (0,07)	0,98 (0,06)	0,947
FFM%	67,7 (10,6)	68,3 (9,0)	0,887
FAT%	32,3 (10,6)	31,7 (9,0)	0,887
TBW%	50,3 (7,9)	50,1 (7,5)	0,936
ECW%	43,7 (2,7)	43,4 (1,8)	0,740
ICW%	56,3 (2,7)	56,6 (1,8)	0,740

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom.

BMI - indeks tjelesne mase; WHR - omjer struk-bokovi; FFM% - udio masnoga tkiva; TBW% - udio ukupne tjelesne tekućine; ECW% - udio izvanstanične tekućine; ICW% - udio unutarstanične tekućine. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (standardna devijacija). *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) prema Mann-Whitney U testu.

#### 5.4. Debljina intime medije vaskularne stijenke karotidne arterije bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Nakon provedenoga mjerenja debljine intime medije vaskularne stijenke karotidne arterije ispitanika, iz dobivenih rezultata može se zaključiti da nije bilo statističkih značajnih razlika između kontrolne i Nutri 4 skupine u mjerenjima kompleksa intime medije karotidnih arterija (Tablica 7).

Tablica 7. Mjerenje debljine intime medije karotidnih arterija bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola	Nutri 4	<i>p</i>
IMT - prosječna (desno posteriorno, mm)	0,66 (0,09)	0,63 (0,12)	0,379
IMT - prosječna (desno anteriorno, mm)	1,02 (0,15)	0,92 (0,17)	0,115
interadventicijski promjer CCA (desno anteriorno, mm)	1,05 (0,13)	1,02 (0,18)	0,555
intraluminalni promjer CCA (desno anteriorno, mm)	0,55 [0,52-0,64]	0,58 [0,54-0,66]	0,883
IMT - prosječna (lijevo posteriorno, mm)	0,83 (0,08)	0,75 (0,17)	0,136
IMT - prosječna (lijevo anteriorno, mm)	0,96 (0,21)	0,82 (0,15)	0,062
interadventicijski promjer CCA (lijevo anteriorno, mm)	1,13 [1,03-1,23]	1,03 [1,00-1,19]	0,221
intraluminalni promjer CCA (lijevo anteriorno, mm)	0,59 (0,11)	0,59 (0,09)	0,936

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. .IMT, *intima-media thickness*); CCA- zajednička karotidna arterija (engl. CCA; *common carotid artery*).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju. *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) prema t-testu za nezavisne uzorke ili Mann-Witney U testu.

### 5.5. Krvna slika, biokemijski parametri te udio slobodnih masnih kiselina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Parametri **krvne slike** (leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, trombociti, MPV) ispitani u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom prikazani su u Tablici 8. Dobivene vrijednosti parametara krvne slike u obje ispitivane skupine bolesnika s akutnim koronarnim sindromom bile su unutar referentnih vrijednosti. Nakon dijetetskoga protokola nije bilo statistički značajne razlike unutar ispitivanih skupina u izmjenjenim parametrima krvne slike, osim u vrijednostima prosječna količina hemoglobina u eritrocitu te prosječne koncentracije hemoglobina na litru eritrocita (koje su se značajno smanjile u Nutri4 skupini). Apsolutne promjene vrijednosti hemoglobina između ispitivanih skupina nakon provedenog dijetetskog protokola značajno se razlikuju (smanjile su se u Nutri 4 skupini, a povećale u kontrolnoj skupini). Unatoč tome, vrijednosti hemoglobina u obje skupine su i dalje unutar referentnih vrijednosti nakon dijetetskoga protokola (Tablica 8).

Nije bilo statistički značajne razlike između vrijednosti **biokemijskih parametara** (urea, kreatinin, kalij, glukoza, kalcij) u kontrolnoj i Nutri 4 skupini nakon dijetetskoga protokola. Koncentracija natrija porasla je u obje ispitivane skupine, pri čemu je taj porast statistički značajan u Nutri 4 skupini. Koncentracija željeza također je porasla u obje ispitivane skupine, međutim statistički značajan porast izmjeren je u Nutri 4 skupini nakon dijetetskoga protokola. Vrijednosti transferina rastle su u kontrolnoj skupini statistički značajno, te je izmjerena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina (kontrolne i Nutri 4) nakon provedbe dijetetskog protokola. Vrijednosti koncentracije feritina smanjile su se u obje ispitivane skupine, pri čemu značajno u kontrolnoj skupini nakon dijetetskoga protokola. Vrijednosti koncentracije fibrinogena smanjile su se u obje ispitivane skupine, pri čemu značajno u Nutri 4 skupini nakon dijetetskoga protokola. Vrijednost hsCRP-a se statistički značajno smanjila u obje ispitivane skupine nakon provedenoga dijetetskog protokola (Tablica 9).

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na **ukupni kolesterol, trigliceride, LDL i HDL-kolesterol** u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom prikazan je na Slikama 4 - 7.

Vrijednosti ukupnoga kolesterola snižene su u obje ispitivane skupine nakon dijetetskoga protokola, ali nisu utvrđene statistički značajne razlike u razinama kolesterola ni unutar ni između skupina (Slika 4). Vrijednosti triglicerida ostale su gotovo nepromijenjene u kontrolnoj skupini, dok su u Nutri 4 skupini blago porasle, ali navedeni porast nije bio statistički značajan.

Također, nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina nakon primijenjenoga dijetetskog protokola (Slika 5).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u razini HDL-kolesterola unutar Nutri 4 skupine nakon dijetetskog protokola, dok je u kontrolnoj skupini došlo je do statistički značajnog povećanja HDL kolesterola nakon dijetetskog protokola (Slika 6). Razina LDL-kolesterola statistički se značajno smanjila u skupini Nutri 4 nakon dijetetskoga protokola (s 2,7 mmol/L prije na 2,1 mmol/L). Razina LDL-kolesterola također se smanjila u kontrolnoj skupini, ali ne statistički značajno (Slika 7).

Prema rezultatima može se reći da se **koncentracija jetrenih enzima** (AST, ALT, GGT) smanjila u obje skupine nakon dijetetskoga protokola, ali je značajan pad utvrđen za AST i GGT u kontrolnoj skupini (Tablica 10).

**Profil masnih kiselina** u serumu u bolesnika s AKS-om, s obzirom na prehrambene protokole, prikazan je u tablici 11. Koncentracija izmjerenih masnih kiselina u serumu bila je slična prije i nakon dijetetskog protokola s jajima obogaćenim n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom (Nutri 4 jaja). Serumska koncentracija C17:1 [cis-10] cis-10-heptadecenske kiseline značajno se smanjila u kontrolnoj skupini nakon dijetetskog protokola (sa 17,4 na 5,4  $\mu\text{mol/L}$ ) u usporedbi s Nutri 4 skupinom gdje je njena koncentracija porasla ali ne značajno (sa 10,9 na 20,6  $\mu\text{mol/L}$ ) (Tablica 11).

Kao rezultat konzumacije Nutri 4 kokošnjih jaja, omjer n-6 / n-3 u serumu se značajno smanjio u Nutri 4 skupini (sa 17,8 na 11,5). Profil masnih kiselina u serumu AKS-bolesnika nakon dijetetskog protokola s običnim jajima u usporedbi s osnovnim mjerenjem u kontrolnoj skupini nije se značajno promijenio, a omjer n-6/n-3 se smanjio, ali ne značajno (sa 17,1 na 15,7).

Tablica 8. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na parametre krvne slike bolesnika oboljelih od akutnoga koronarnog sindroma

	Kontrola		$p^a$	Nutri 4		$p^a$	Apsolutna promjena nakon dijetetskoga protokola		
	Prije	Poslije		Prije	Poslije		Kontrola	Nutri 4	$p^b$
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	9,4 (2,7)	8,5 (1,8)	0,050	8,2 [7,6-10,7]	8,5 (2,3)	0,459	-0,9 (1,4)	-0,5 (1,8)	0,534
Eeritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )	4,6 (0,5)	4,8 (0,4)	0,140	4,9 (0,3)	4,9 (0,3)	0,370	0,2 (0,3)	-0,1 (0,2)	0,070
Hemoglobin (g/L)	139,7 (13,3)	142,5 (8,7)	0,263	145,5 (8,2)	141,9 (11,1)	0,069	2,8 (8,4)	-3,6 (6,8)	<b>0,041</b>
Hematokrit (%)	0,4 (0,0)	0,4 (0,0)	0,121	0,4 (0,0)	0,4 (0,0)	0,312	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,055
MCV (fL)	87,5 (5,6)	87,4 (4,7)	0,849	87,0 (4,9)	86,7 (5,0)	0,405	-0,2 [-0,4-1,3]	-0,3 (1,2)	0,258
MCH (pg)	30,2 (1,8)	29,9 (1,8)	0,065	29,8 (2,0)	29,3 (2,0)	<b>0,003</b>	-0,3 (0,6)	-0,5 (0,5)	0,614
MCHC (g/L)	346,0 [344,0-348,0]	342,1 (6,7)	0,069	342,1 (9,5)	338,0 (9,0)	<b>0,022</b>	-3,5 (5,7)	-4,1 (5,9)	0,793
RDW-CV (%)	13,1 (0,6)	13,1 (0,7)	0,809	13,1 (0,3)	13,3 (0,5)	0,213	0,0 (0,5)	0,2 (0,5)	0,501
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )	255,0 (57,0)	232,2 (53,7)	0,125	253,1 (56,9)	246,0 (57,6)	0,720	-22,8 (47,9)	-26,0 [-52,5-13,0]	0,955
MPV (fL)	8,5 (1,4)	8,9 (1,9)	0,537	10,3 (1,6)	9,4 (1,9)	0,160	0,4 (2,3)	-0,9 (2,3)	0,152

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. MCV – prosječni volumen eritrocita; MCH – prosječna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC – prosječna koncentracija hemoglobina na litru eritrocita; RDW-CV – mjera varijabilnosti veličine eritrocita; MPV – prosječni volumen trombocita u krvi.

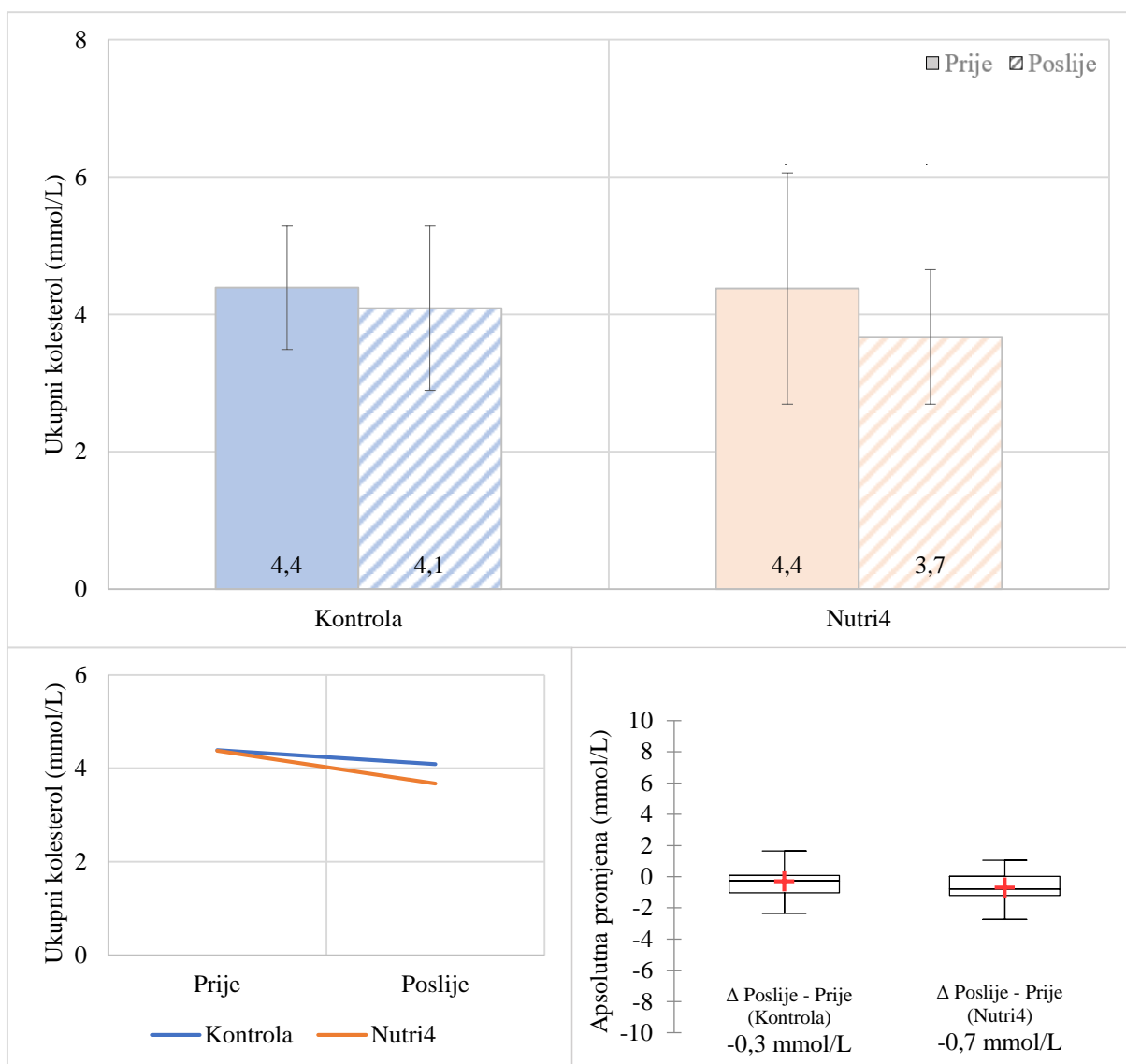
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju.  $p$  vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom);  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).

Tablica 9. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na biokemijske parametre u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola			Nutri 4			Apsolutna promjena nakon dijetetskoga protokola		
	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Kontrola	Nutri 4	<i>p</i> <sup>b</sup>
Urea (mmol/L)	5,7 (2,7)	6,1 (1,8)	0,499	6,0 (1,6)	5,4 (1,3)	0,139	0,4 (2,3)	-0,5 (1,3)	0,168
Kreatinin (μmol/l)	84,6 (18,1)	85,1 (16,5)	0,851	77,7 (14,1)	80,0 (15,7)	0,302	0,5 (8,7)	2,3 (8,4)	0,568
Natrij (mmol/l)	138,7 (4,7)	141,0 (2,9)	0,060	139,2 (2,6)	141,1 (1,8)	<b>0,017</b>	2,3 (4,0)	1,9 (2,8)	0,773
Kalij (mmol/l)	4,1 (0,3)	4,3 (0,3)	0,120	4,0 (0,3)	4,1 (0,2)	0,761	0,1 (0,3)	0,0 (0,4)	0,432
Glukoza (mmol/L)	6,6 (2,1)	5,7 (0,8)	0,094	6,0 (1,0)	5,6 (1,0)	0,192	-0,9 (1,8)	-0,3 (1,0)	0,307
hsCRP (mg/L)	14,6 (13,0)	4,0 (4,6)	<b>0,017</b>	18,3 (18,5)	5,6 (5,9)	<b>0,023</b>	-10,6 (13,8)	-12,7 (19,2)	0,752
Kalcij (mmol/L)	2,5 (0,5)	2,4 (0,1)	0,713	2,3 (0,1)	2,4 (0,1)	0,166	-0,1 (0,5)	0,0 (0,1)	0,510
Željezo (mmol/L)	10,3 (4,4)	12,6 (3,0)	0,183	11,0 (5,7)	14,8 (5,8)	<b>0,035</b>	2,3 (5,9)	3,8 (6,3)	0,530
Transferin (g/L)	2,2 (0,4)	2,4 (0,4)	<b>0,015</b>	2,4 (0,4)	2,4 (0,4)	0,691	0,1 (0,2)	0,0 (0,2)	<b>0,049</b>
Feritin (μg/l)	236,1 (106,2)	200,6 (118,2)	<b>0,039</b>	238,5 (269,7)	204,4 (195,7)	0,265	-35,5 (55,4)	-34,1 (113,8)	0,967
Fibrinogen (g/L)	4,0 (0,7)	3,6 [3,3-3,6]	0,129	4,2 (1,0)	3,5 [3,4-3,8]	<b>0,049</b>	-0,3 (0,5)	-0,1 [-0,9-0,1]	0,900

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. hsCRP - visoko osjetljiv C-reaktivni protein.

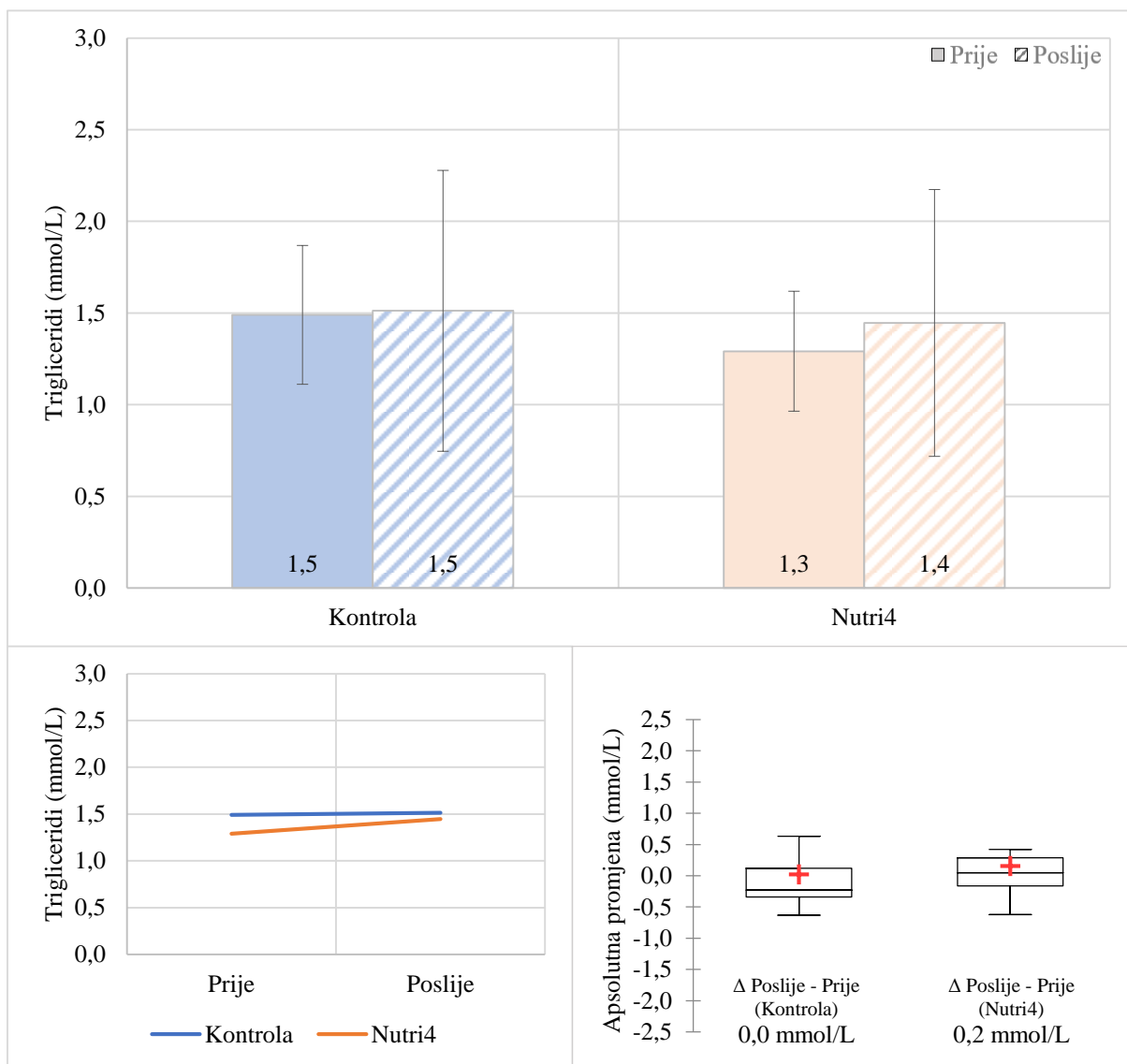
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju. *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu *p*<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom); *p*<sup>b</sup> - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).



Slika 4. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na ukupni kolesterol u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

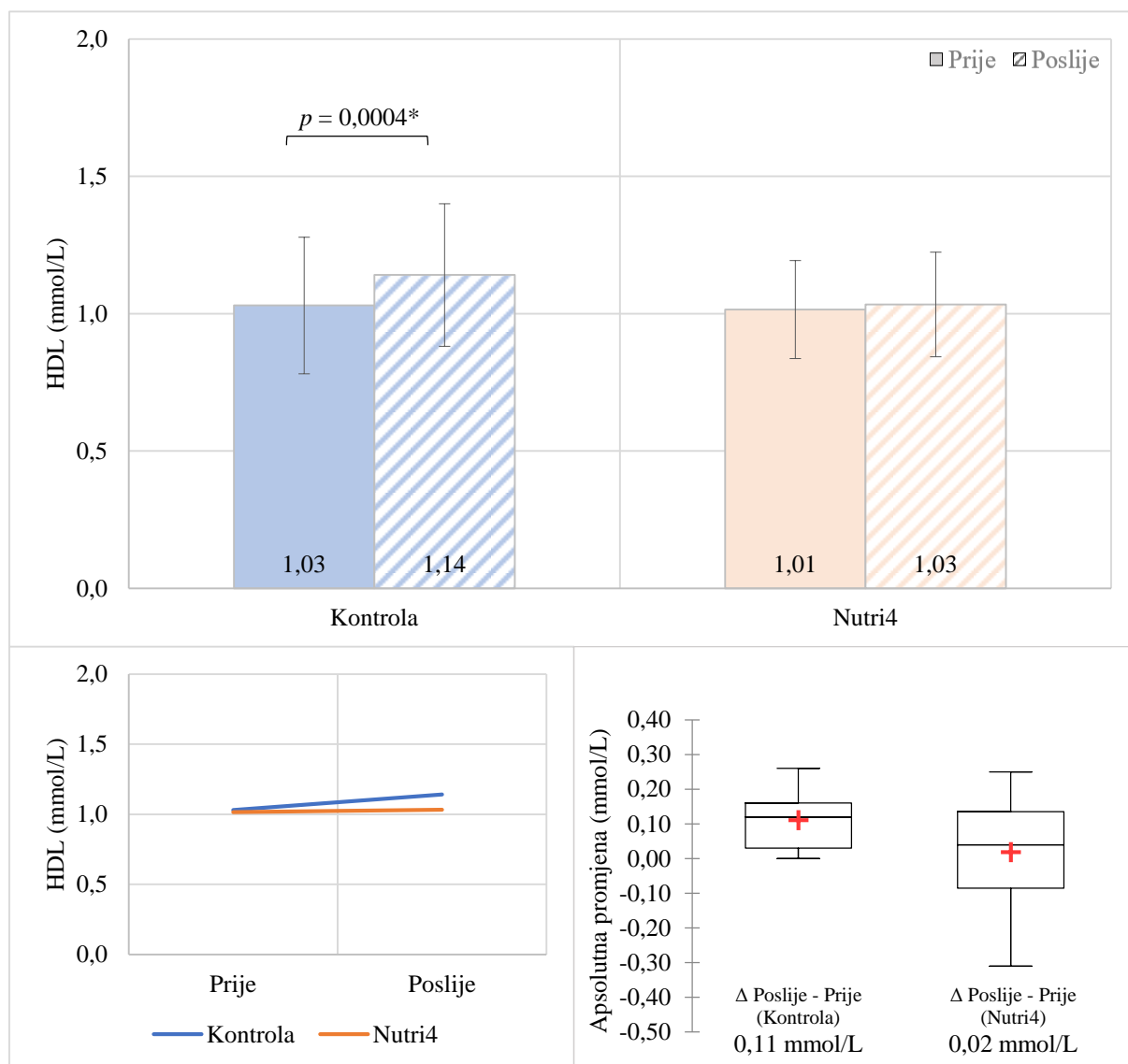
(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja Wilcoxonovim testom rangova s predznakom unutar kontrolne i Nutri 4 skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).





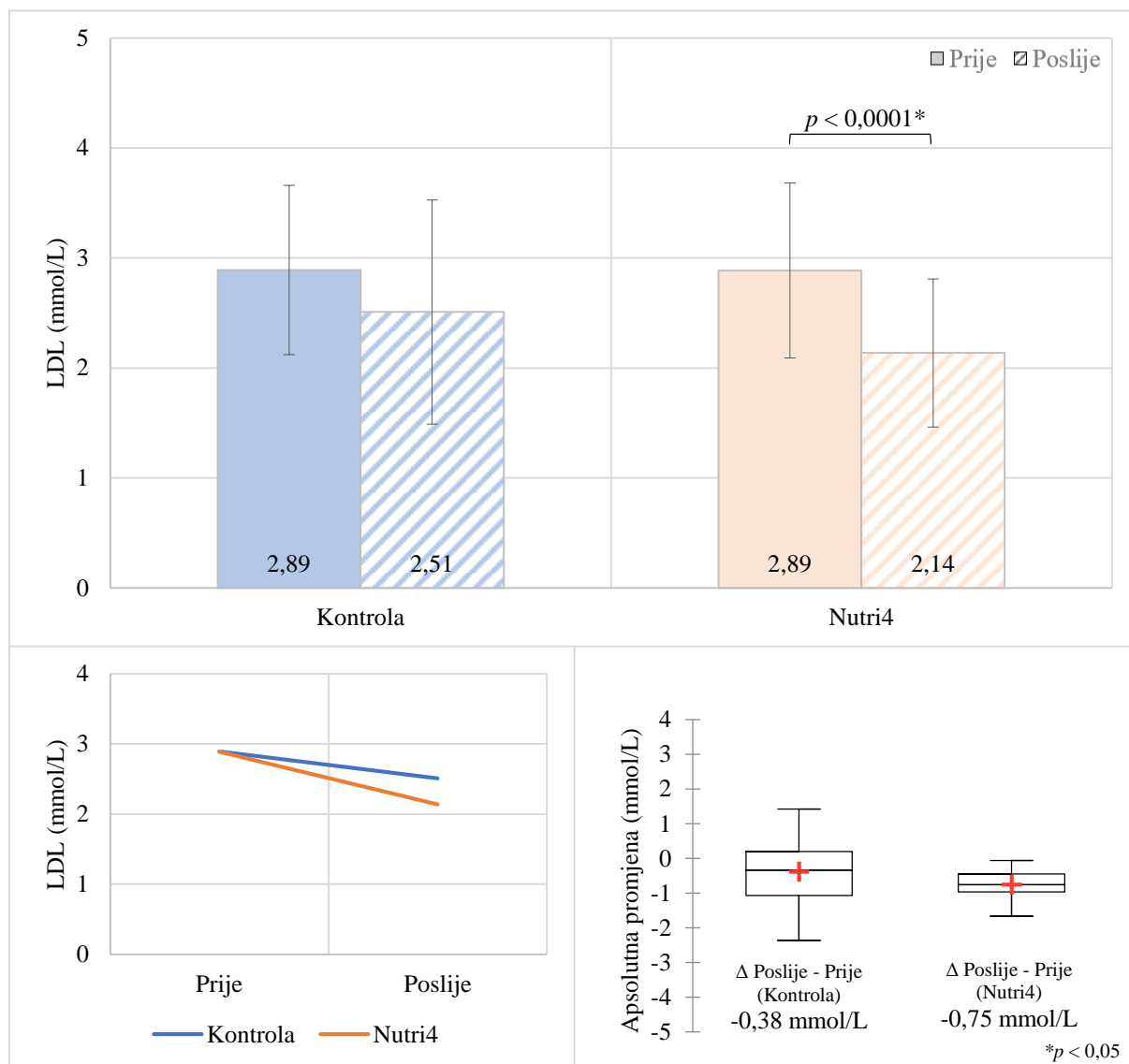
Slika 5. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošjih jaja na vrijednost triglicerida u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar kontrolne skupine, odnosno Wilcoxonovim testom rangova s predznakom unutar Nutri 4 skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su Mann-Whitney U testom.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).



Slika 6. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednost HDL-kolesterola (kolesterol lipoprotein velike gustoće) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom) Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).



Slika 7. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednost LDL-kolesterola (kolesterol lipoprotein male gustoće) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja Wilcoxonovim testom rangova s predznakom unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Tablica 10. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na jetrene enzime u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola			Nutri 4			Apsolutna promjena nakon dijetetskoga protokola		
	Prije	Poslije	$p^a$	Prije	Poslije	$p^a$	Kontrola	Nutri 4	$p^b$
AST (U/L)	40,0 [22,0-70,0]	29,3 (9,4)	<b>0,027</b>	29,0 [23,0-91,0]	27,0 [22,5-32,0]	0,108	-28,2 (40,8)	-1,0 [-53,0-2,0]	0,518
ALT (U/L)	50,9 (27,8)	40,8 (24,1)	0,338	35,0 [24,0-50,5]	31,0 [27,5-44,0]	0,470	-10,1 (29,3)	-4,2 (15,4)	0,504
GGT (U/L)	33,0 [23,0-55,0]	32,0 [21,0-44,0]	0,037	32,0 [24,0-43,0]	32,0 [25,0-43,0]	0,850	-3,0 [-0,8-0,00]	0,0 [-5,5-5,0]	0,212

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin-aminotransferaza; GGT –  $\gamma$ -glutamilttransferaza.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju.  $p$  vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom);  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).

## 5. REZULTATI

Tablica 11. Učinak konzumacije običnih (kontrolna skupina) i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri 4) na profil slobodnih masnih kiselina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Parametar	Kontrola			Nutri4			Apsolutna promjena nakon dijetetskoga protokola		
	Prije	Poslije	<i>p</i>	Prije	Poslije	<i>p</i>	Prije	Poslije	<i>p</i>
<b>SFA (μmol/L)</b>									
C4:0 Maslačna kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C6:0 Kapronska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C8:0 Kaprilna kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C10:0 Dekanska kiselina	8,3 (18,6)	11,8 (26,3)	0,374	0,317 [0,00-]	18,7 (28,1)	0,788	3,5 (7,8)	2,4 (18,3)	0,903
C11:0 Undecilenska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C12:0 Laurinska kiselina	37,1 [0,0-38,4]	17,5 (27,8)	0,625	17,9 (25,6)	27,1 (39,4)	0,556	-18,9 (65,3)	9,2 (32,1)	0,412
C13:0 Tridecilna kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C14:0 Miristinska kiselina	101,1 (73,0)	73,9 (11,5)	0,454	118,9 (85,9)	114,9 (84,2)	0,904	-27,2 (73,3)	-4,0 (70,0)	0,624
C15:0 Pentadecilna kiselina	21,4 (7,7)	17,9 (5,1)	0,141	23,5 (11,3)	20,5 (9,3)	0,167	-3,5 (4,3)	-3,0 (4,0)	0,857
C16:0 Palmitinska kiselina	2069,4 (297,5)	1780,2 (277,7)	0,274	2087,0 (346,2)	1888,6 (313,1)	0,123	-289,2 (510,6)	-198,4 (227,3)	0,726
C17:0 Margarinska kiselina	26,0 (7,2)	21,7 (5,0)	0,081	26,5 (9,2)	24,0 (6,6)	0,172	-4,3 (4,2)	-2,5 (3,4)	0,472
C18:0 Stearinska kiselina	813,0 (155,3)	764,0 (59,0)	0,456	767,8 (98,9)	757,3 (72,2)	0,767	-48,9 (132,9)	-10,5 (74,0)	0,587
C20:0 Arahidonska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C21:0 Henekozanska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C22:0 Behenska kiselina	6,7 (9,2)	3,2 (7,2)	0,384	6,6 (9,1)	6,4 (8,8)	0,582	-3,5 (7,9)	-0,2 (0,7)	0,385
C23:0 Trikozanska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
C24:0 Kerotinska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. SFA – zasićene masne kiseline. PUFA – polinezasićene masne kiseline. < LOQ – ispod limita kvantifikacije; N/D – nije detektirano (engl. *Not Found*). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom);  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Witney U test).

## 5. REZULTATI

Nastavak tablice 11

Parametar	Kontrola			Nutri 4			Apsolutna promjena nakon dijetetskoga protokola			
	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>b</sup>	
<b>PUFA (μmol/L)</b>										
n-5	C14:1[cis-9] Miristoleinska kiselina	5,6 (8,2)	0,0 (0,0)	0,199	5,4 (12,1)	8,3 (11,5)	0,504	-5,6 (8,2)	2,8 (8,7)	0,151
	C15:1 [cis-10] cis-10-pentadecenska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
n-7	C16:1[cis-9] Palmitoleinska kiselina	224,0 (121,1)	97,8 (21,6)	0,084	230,4 (76,2)	168,5 (59,1)	0,121	-126,1 (123,1)	-61,8 (70,5)	0,340
	C17:1 [cis-10] cis-10-heptadecenska kiselina	17,4 (1,0)	5,4 (7,5)	<b>0,022</b>	10,9 (11,8)	17,2 [11,5-18,8]	0,313	-12,0 (7,4)	15 [-1,5-17,2]	<b>0,008</b>
n-9	C18:1 [trans-9] Elaidinska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
	C18:1[cis-9] Oleinska kiselina	1452,0 (444,8)	1066,7 (194,2)	0,091	1280,9 (278,2)	1158,5 (131,1)	0,181	-385,3 (388,2)	-122,4 (169,1)	0,202
	C20:1[cis-11]11-eikosenska kiselina	16,7 (4,3)	13,8 (2,4)	0,158	14,3 (4,4)	14,7 (3,7)	0,654	-2,9 (3,8)	0,4 (1,8)	0,114
	C22:1[cis-13] Eruična kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
	C24:1 [cis-15] Nervonska kiselina	7,0 [6,7-7,0]	5,8 (5,6)	0,813	7,8 (4,9)	6,7 (4,6)	0,106	-2,0 (4,4)	-0,6 [-2,1- -0,2]	0,690
n-6	C18:2[trans-9,12] Linoelaidna kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
	C18:2[cis-9,12] Linolna kiselina	1848,7 (541,4)	1669,5 (356,8)	0,620	1601,3 [1568,8-2123,4]	1722,8 (653,9)	0,188	-179,2 (747,8)	-436,5 (536,8)	0,549
	C18:3[cis-6,9,12] γ-linolenska kiselina	65,4 (48,9)	34,1 (3,5)	0,209	62,0 (32,1)	47,6 (17,8)	0,448	-31,3 (46,8)	-14,4 (38,3)	0,550
	C21:2 [cis-11,14] Eikosadienska kiselina	18,2 (2,7)	17,5 (1,1)	0,502	21,3 (8,6)	19,6 (5,1)	0,353	-0,7 (2,2)	-0,3 [-0,4-0,2]	1,000
	C20:3[cis-8,11,14] dihomo-γ-linolenska kiselina	166,6 (87,9)	149,1 (82,1)	0,289	187,1 (76,9)	142,5 (56,4)	0,198	-17,6 (32,1)	-19,7 [-35,2- -15,5]	1,000
	C20:4[cis-5,8,11,14] Arahidonska kiselina	645,7 (151,1)	605,8 (139,3)	0,510	579,1 [548,5-6252]	521,2 [511,9-594,0]	0,063	-76,5 [-93,9- -69,7]	-36,6 [-79,2- -31,2]	0,841
	C22:2[cis-13,16] 13,16-dokozadienska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
n-3	C18:3[cis-9,12,15]α-linolenska kiselina	21,0 (5,9)	22,8 (5,0)	0,706	21,9 (5,5)	31,9 (15,8)	0,160	1,8 (9,9)	10,0 (12,9)	0,294
	C20:3[cis-11,14,17] 11,14,17-eikosatrienska kiselina	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-	N/D	N/D	-
	C20:4[cis-5,8,11,14] Eicosa-5,8,11,14,17-pentaenska kiselina	21,9 (4,1)	22,5 (9,8)	0,867	24,4 [18,2-27,6]	31,6 (12,4)	0,813	0,6 (7,8)	-0,5 (14,5)	0,884
	C22:6[cis-4,7,10,13,16,19] cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksenska kiselina	105,1 [104,7-123,8]	135,9 (84,4)	0,813	136,2 (67,4)	188,9 (77,5)	0,180	3,0 (26,8)	52,7 (72,7)	0,189
	<b>n-6 / n-3 PUFAs</b>	17,1 (6,61)	15,7 (6,61)	0,692	17,8 (7,638)	11,5 (5,93)	<b>0,032</b>	-1,4 (6,5)	-6,3 (3,9)	0,230

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. SFA – zasićene masne kiseline. PUFA – polinezasićene masne kiseline. < LOQ – ispod limita kvantifikacije; N/D – nije pronađeno (engl. *Not Found*). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju. *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku (*p*<0,05), pri čemu *p*<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom); *p*<sup>b</sup> - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).

### **5.6. Hemodinamski parametri i procjena varijabilnosti srčanoga ritma bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na **hemodinamske** parametre bolesnika s akutnim koronarnim sindromom opisan je u Tablici 12. Svi su ispitanici bili normotenzivni u mjerenjima prije provedbe dijetetskoga protokola. Hemodinamske vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka (SBP), dijastoličkoga arterijskog tlaka (DBP), te srednjega arterijskog tlaka (MAP) nisu se statistički značajno mijenjale niti u Nutri 4 niti u kontrolnoj skupini nakon provedenoga dijetetskog protokola.

Vrijednosti pulsa (HR) bile su više prije provođenja dijetetskoga protokola u ispitanika obje ispitivane skupine, ali se nisu statistički značajno promijenile nakon provedenoga dijetetskog protokola u Nutri 4 skupini, dok je ta promjena statistički značajna u kontrolnoj skupini (Tablica 12).

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na procjenu **varijabilnosti srčanoga ritma** (HRV) bolesnika s akutnim koronarnim sindromom opisan je u Tablici 13. Vrijednosti varijabilnosti parametara srčanoga ritma (Mean RR, SDNN, RMS-SD, pNN50, TI, LF norm, HF norm, LF/HF) nisu se statistički značajno mijenjale niti u Nutri 4 niti u kontrolnoj skupini nakon provedenoga dijetetskog protokola (Tablica 13).

Tablica 12. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na hemodinamske parametre bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola			Nutri 4			Apsolutna promjena nakon dijetetskog protokola		
	Prije	Poslije	$p^a$	Prije	Poslije	$p^a$	Kontrola	Nutri 4	$p^b$
SBP (mmHg)	117,3 (14,4)	114,5 (11,5)	0,283	126,5 (16,2)	126,0 (17,2)	0,920	-4,0 [-0,8-1,0]	-0,5 (17,7)	0,368
DBP (mmHg)	76,5 (11,6)	75,5 (11,8)	0,666	78,9 (9,9)	81,1 (8,4)	0,538	-1,0 [-5,0-2,0]	2,2 (13,5)	0,337
MAP (mmHg)	90,1 (11,8)	88,5 (11,2)	0,462	94,8 (10,8)	96,1 (10,5)	0,715	-1,7 [-5,7- -0,3]	1,3 (13,6)	0,345
HR (/min)	76,5 (13,6)	68,7 (10,2)	<b>0,048</b>	71,2 (10,7)	69,1 (8,3)	0,373	-7,8 (12,9)	-2,1 (8,7)	0,171

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. SBP- sistolički arterijski tlak; DBP- dijastolički arterijski tlak; MAP- srednji arterijski tlak; HR- broj otkucaja srca. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju.  $p$  vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine prema t-testu za zavisne uzorke;  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).



Tablica 13. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na procjenu varijabilnosti srčanog ritma (HRV) bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola			Nutri 4			Apsolutna promjena nakon dijetetskog protokola		
	Prije	Poslije	$p^a$	Prije	Poslije	$p^a$	Kontrola	Nutri 4	$p^b$
Mean RR (ms)	926,3 (103,5)	911,5 [876,8-987,1]	0,839	853,5 (124,6)	861,2 (202,9)	0,900	-16,9 [-55,7-59,1]	58,0 [-29,1-145,8]	0,542
SDNN (ms)	51,9 [34,7-85,7]	71,7 [44,2-228,3]	0,685	33,1 [22,4-102,6]	94,3 [51,25-142,6]	0,277	23,3 (149,9)	34,1 (145,9)	0,855
RMS-SD (ms)	32,3 [23,5-94,5]	51,0 [31,6-298,1]	0,685	28,6 [21,75-75,2]	88,6 [39,75-150,0]	0,330	20,9 (196,7)	47,4 (183,7)	0,726
pNN50 (n.u.)	9,4 [4,1-37,0]	17,1 [6,4-59,1]	0,532	7,9 [2,85-30,6]	21,8 [13,7-62,1]	0,303	5,5 (29,6)	15,2 (36,4)	0,469
TI (n.u.)	102,2 [61,2-217,5]	79,4 [22,5-140,2]	0,244	251,3 [42,05-356,3]	79,2 [27,55-256,1]	0,524	-48,6 [33,3-15,3]	-2,2 [-256,6-77,4]	0,751
LF norm (n.u.)	63,1 (17,3)	61,5 (20,6)	0,743	58,7 (20,3)	55,9 (17,2)	0,691	-1,7 (17,2)	-2,9 (26,4)	0,893
HF norm (n.u.)	36,9 (17,3)	38,5 (20,6)	0,560	41,3 (20,3)	44,1 (17,2)	0,779	1,7 (17,2)	2,9 (26,4)	0,893
LF/HF	1,8 [1,0-2,2]	1,0 [0,7-2,1]	0,756	1,6 [0,6-2,1]	1,4 [0,7-1,6]	0,637	0,4 (3,4)	-1,2 (4,2)	0,277

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. Mean RR – prosječna vrijednost udaljenosti dva uzastopna R vala; SDNN – standardna devijacija NN intervala (engl. *standard deviation of normalto-normal interbeat interval*); RMS-SD – srednja vrijednost kvadrata uzastopnih otkucaja srca (engl. *root mean square of successive RR interval difference*); pNN50 – postotak RR intervala koji su međusobno različiti više od 50 ms; LF – „Low frequency“ ili NF kao niska frekvencija; HF – „High Frequency“ ili VF kao visoka frekvencija; LF/HF – omjer između snage niskih frekvencija i snage visokih frekvencija.

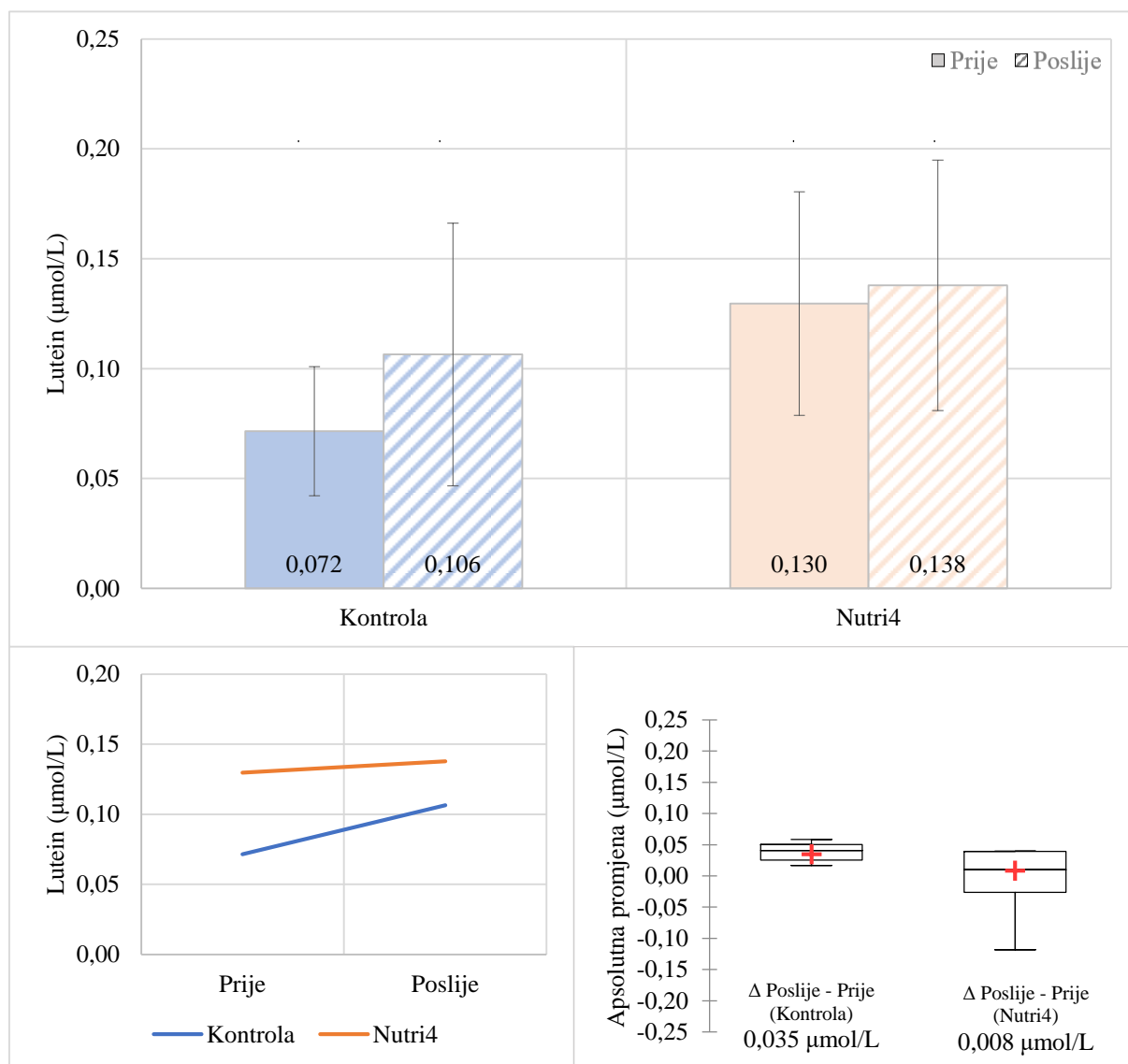
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju.  $p$  vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu  $p^a$  predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom);  $p^b$  - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Witney U test).

### **5.7. Vrijednosti koncentracije luteina, vitamina E i seleno u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na koncentraciju **luteina, vitamina E i seleno** u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom prikazani su na slikama 8 - 10.

Izmjerene vrijednosti koncentracije **luteina** povećale su se nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj (s 0,07 na 0,11  $\mu\text{mol/L}$ ) i Nutri 4 skupini (s 0,13 na 0,14  $\mu\text{mol/L}$ ). Međutim, konzumacija kokošnjih jaja nije imala statistički značajan utjecaj na porast koncentracije luteina u serumu ispitanika.

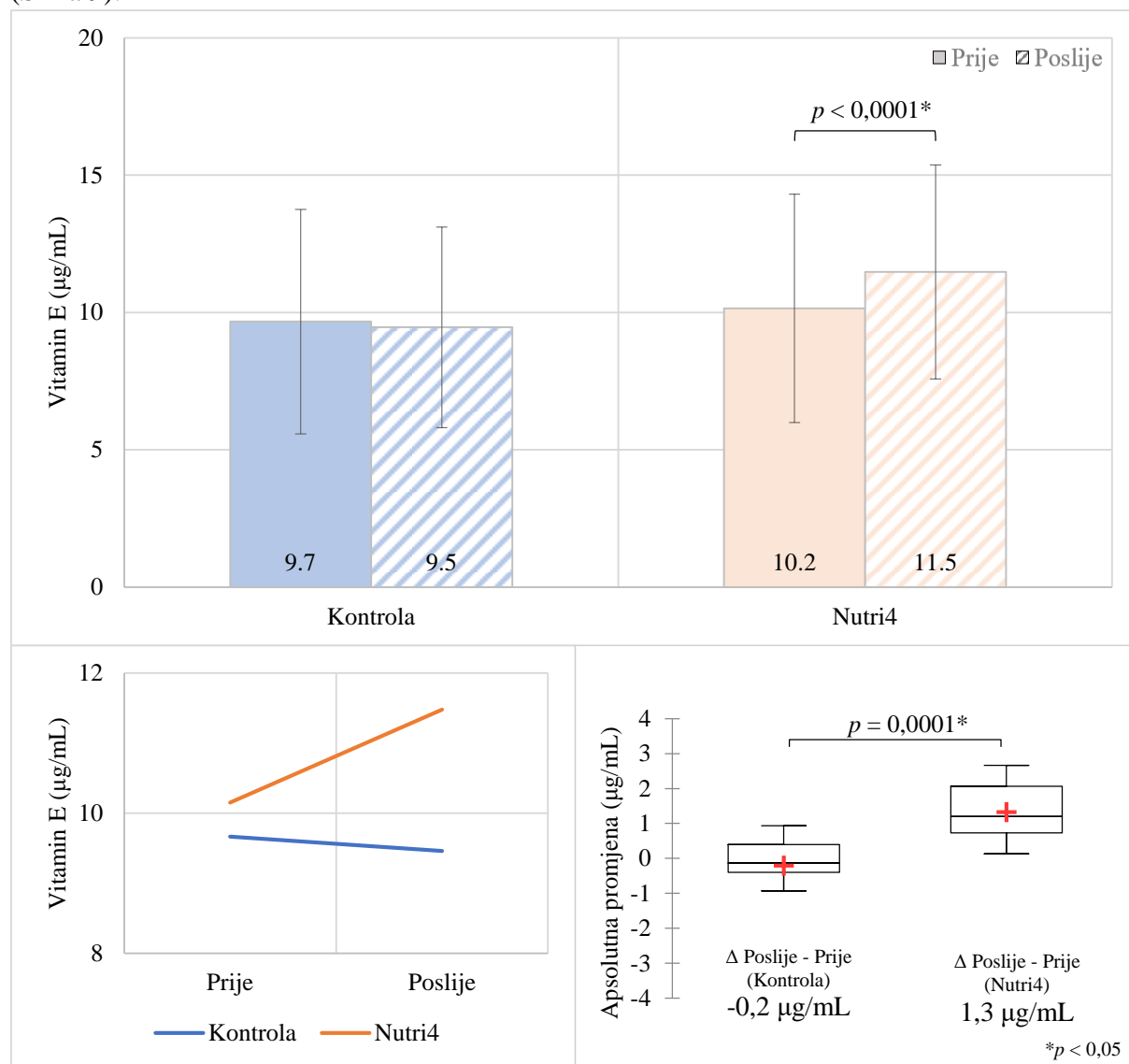
Uspoređujući apsolutne promjene koncentracije luteina u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika. U obje ispitivane skupine vidljivo je povećanje koncentracije luteina, pri čemu je veće povećanje koncentracije luteina izmjereno je u kontrolnoj skupini (0,035  $\mu\text{mol/L}$ ), a manje u Nutri 4 skupini (0,008,1  $\mu\text{mol/L}$ ) nakon dijetetskoga protokola (Slika 8).



Slika 8. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na koncentraciju luteina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

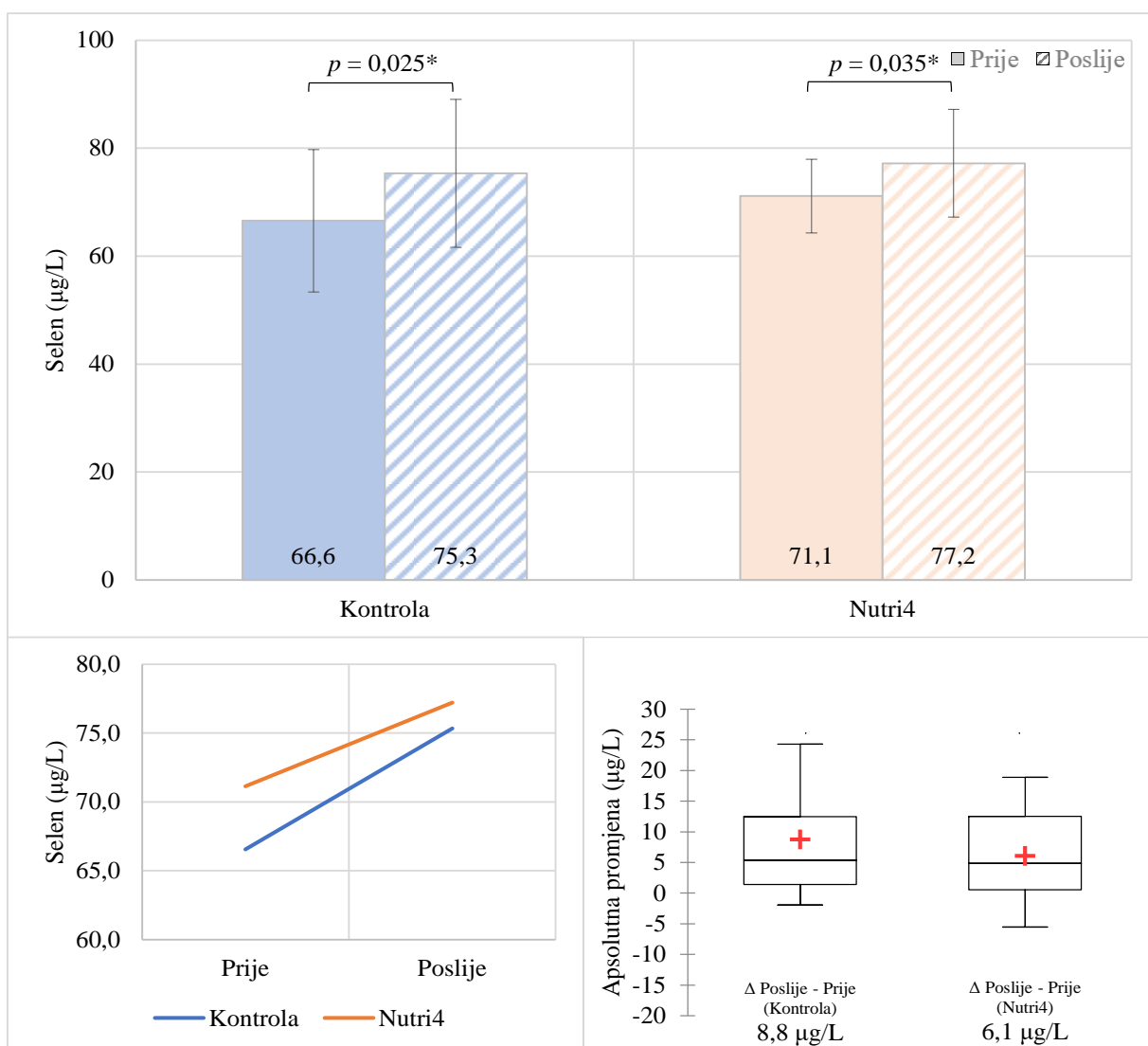
Izmjerene vrijednosti koncentracije **vitamina E** povećale su se nakon provedbe dijetetskoga protokola i to statistički značajno u Nutri 4 skupini (s 10,2 na 11,5  $\mu\text{g/mL}$ ), dok su se kod kontrolne skupine blago smanjile (s 9,7 na 9,5  $\mu\text{g/mL}$ ), ali ne značajno (Slika 9). Uspoređujući apsolutne promjene koncentracije vitamina E u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima postoji statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini vidljivo je smanjenje koncentracije vitamina E (-0,1  $\mu\text{g/mL}$ ), dok je u Nutri 4 skupini vidljivo povećanje koncentracije vitamina E (1,2  $\mu\text{g/mL}$ ) nakon dijetetskoga protokola (Slika 9).



Slika 9. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na koncentraciju vitamina E u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su Mann-Whitney U testom.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Izmjerene vrijednosti koncentracije **selena** u serumu ispitanika su se povećale statistički značajno nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj (sa 66,6 na 75,3  $\mu\text{g/L}$  uz) i Nutri 4 skupini (s 71,2 na 77,2  $\mu\text{g/L}$ ) (Slika 10). Uspoređujući apsolutne promjene koncentracije selena u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika. U obje ispitivane skupine vidljivo je povećanje koncentracije selena u serumu ispitanika, pri čemu je veće povećanje izmjereno u kontrolnoj skupini (8,8  $\mu\text{g/L}$ ), a manje u Nutri 4 skupini (6,1  $\mu\text{g/L}$ ) nakon dijetetskoga protokola, ali ne statistički značajno (Slika 10).



Slika 10. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošjih jaja na koncentraciju selena u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

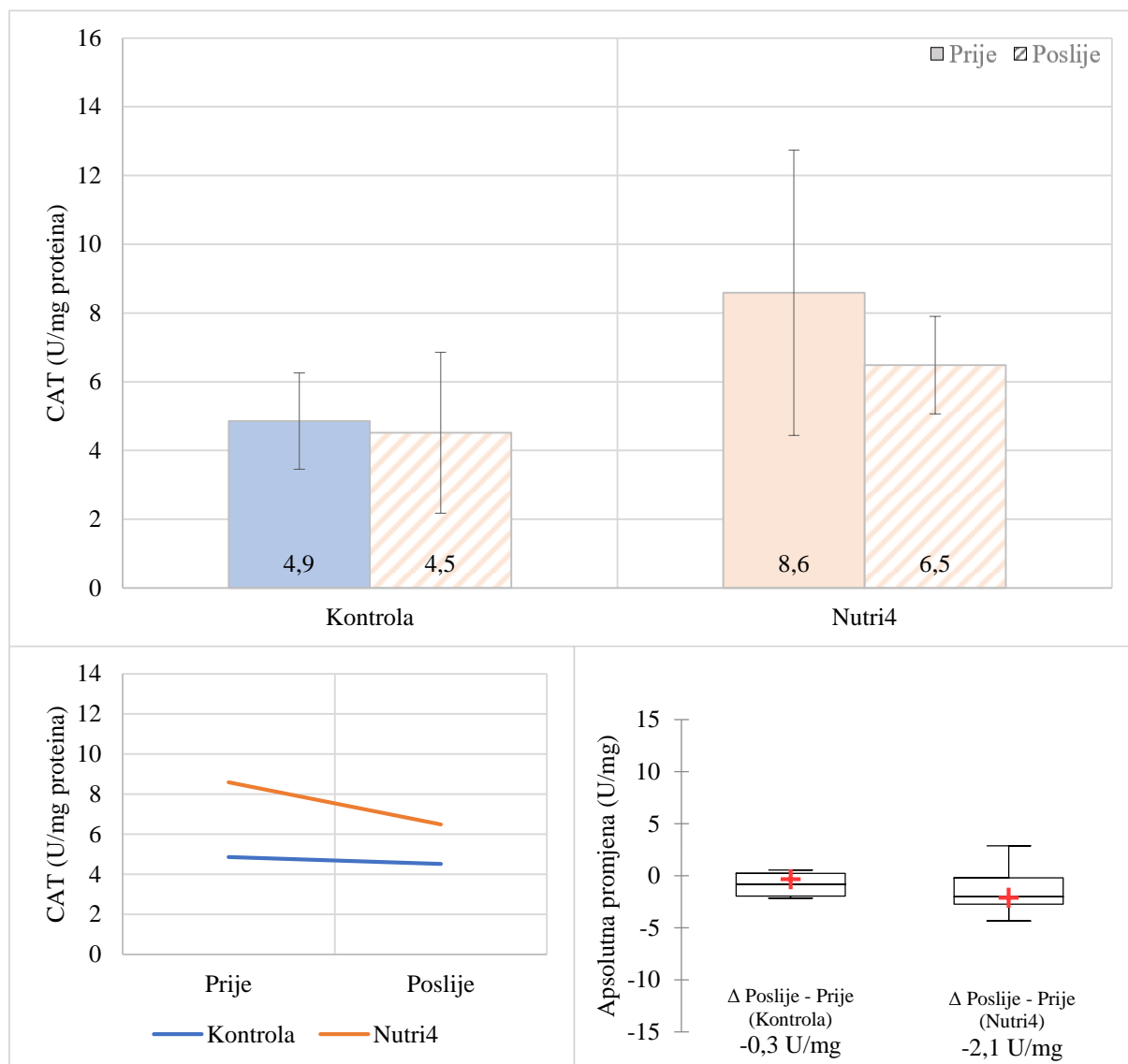
(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

### 5.8. Aktivnosti antioksidativnih enzima u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na **aktivnost antioksidativnih enzima** katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GPx) i superoksid-dismutaze (SOD) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom prikazan je na slikama 11 - 13.

Izmjerene vrijednosti aktivnosti enzima **katalaze** smanjivale su se nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj skupini (s 4,7 na 3,7 U/mg proteina) i u Nutri 4 skupini (s 7,5 na 6,7 U/mg proteina), ali ne statistički značajno (Slika 11).

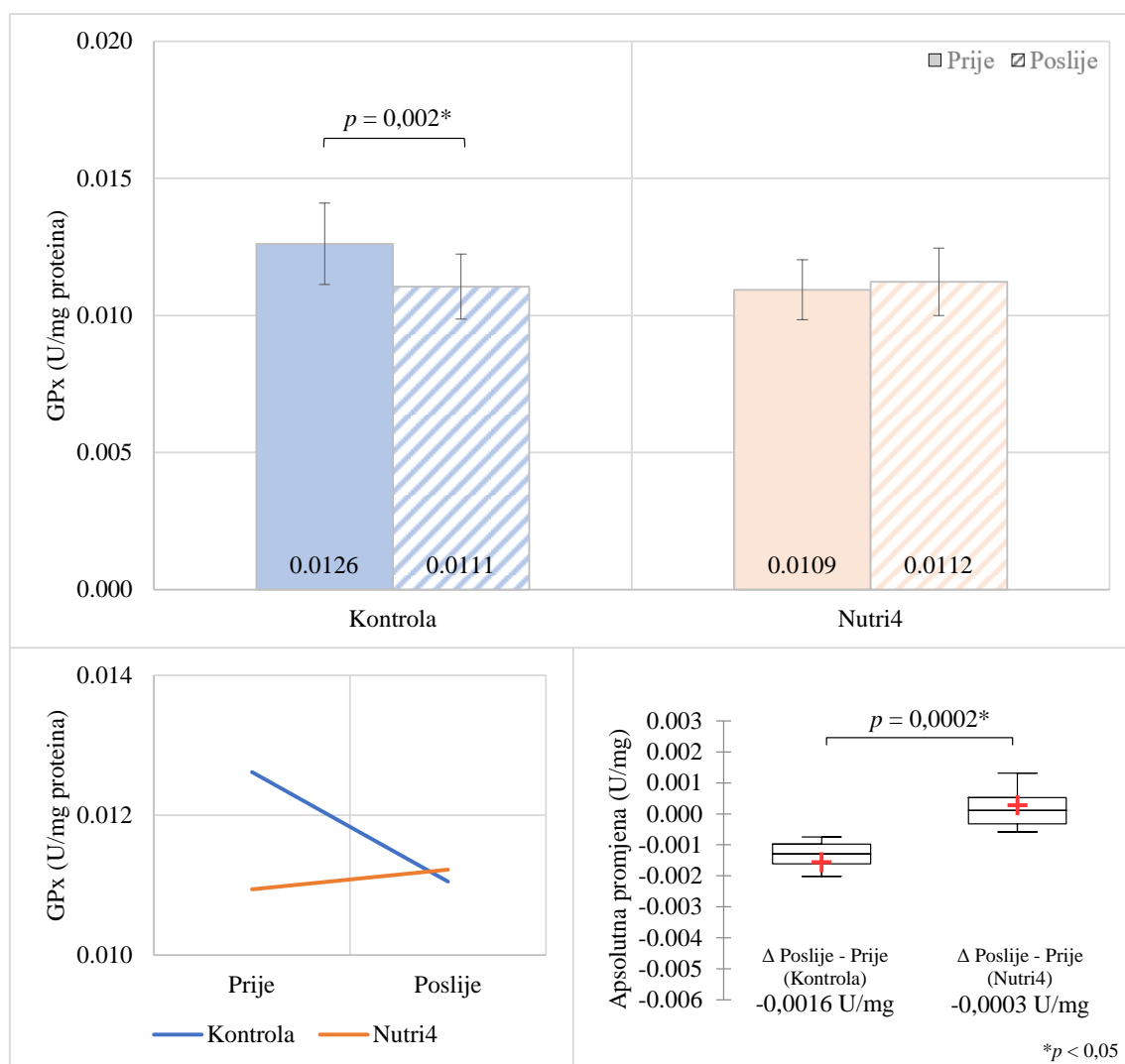
Uspoređujući apsolutne promjene aktivnosti katalaze u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika, tj. u obje ispitivane skupine vidljivo je smanjenje aktivnosti katalaze. Veće smanjenje aktivnosti katalaze izmjereno je u kontrolnoj skupini (-0,8 U/mg proteina), a manje u Nutri 4 skupini (-2,0 U/mg proteina) nakon dijetetskoga protokola (Slika 11).



Slika 11. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na aktivnost enzima katalaze (CAT) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja Wilcoxonovim testom rangova s predznakom unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću Mann-Whitney U testom.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Izmjerena aktivnost enzima **glutation-peroksidaze** smanjivala se statistički značajno nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj skupini (s 0,0121 na 0,0110 U/mg proteina). U Nutri 4 skupini, aktivnost enzima glutacion-peroksidaze povećavala se nakon provedbe dijetetskoga protokola (s 0,0109 na 0,0112 U/mg proteina), ali ne statistički značajno (Slika 12). Uspoređujući apsolutne promjene aktivnosti glutacion-peroksidaze u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima postoji statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini vidljivo je značajno smanjenje aktivnosti glutacion-peroksidaze, a značajan porast u Nutri 4 skupini (Slika 12).

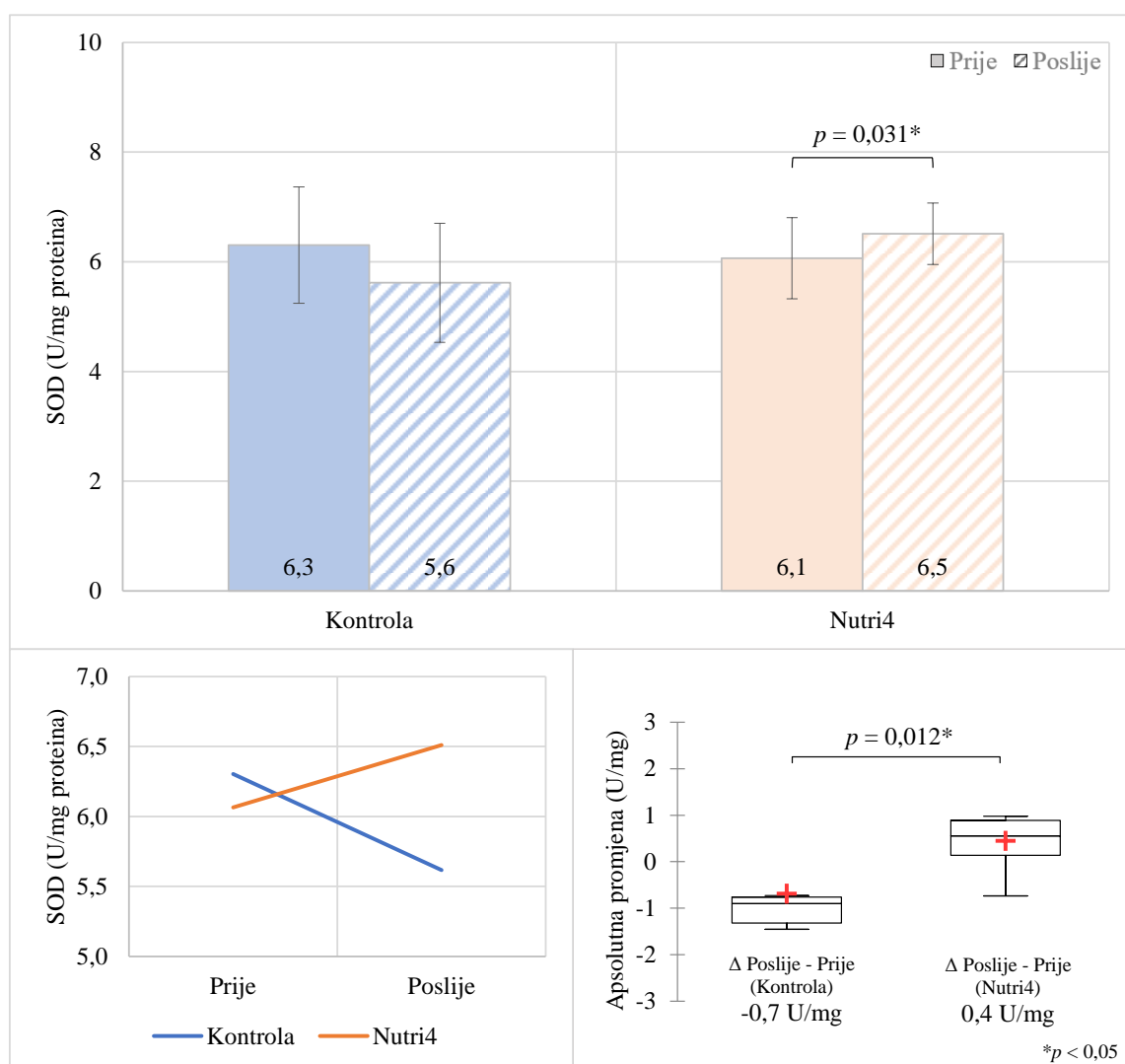


Slika 12. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na aktivnost enzima glutacion-peroksidaze (GPx) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar kontrolne skupine, odnosno Wilcoxonovim testom rangova s predznakom unutar Nutri 4 skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su Mann-Whitney U testom.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).



Izmjerena aktivnost enzima **superoksid-dismutaze** smanjivala se nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj skupini (sa 6,3 na 5,6 U/mg proteina), ali ne statistički značajno. U Nutri 4 skupini, aktivnost enzima superoksid-dismutaze značajno je rasla nakon provedbe dijetetskoga protokola (sa 6,1 na 6,5 U/mg proteina). Uspoređujući apsolutne promjene aktivnosti superoksid-dismutaze u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima postoji statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini vidljivo je smanjenje aktivnosti superoksid-dismutaze (-0,7 U/mg proteina), u odnosu na Nutri 4 skupini gdje je zabilježeno povećanje njezine aktivnosti (0,4 U/mg proteina) nakon dijetetskoga protokola (Slika 13).



Slika 13. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

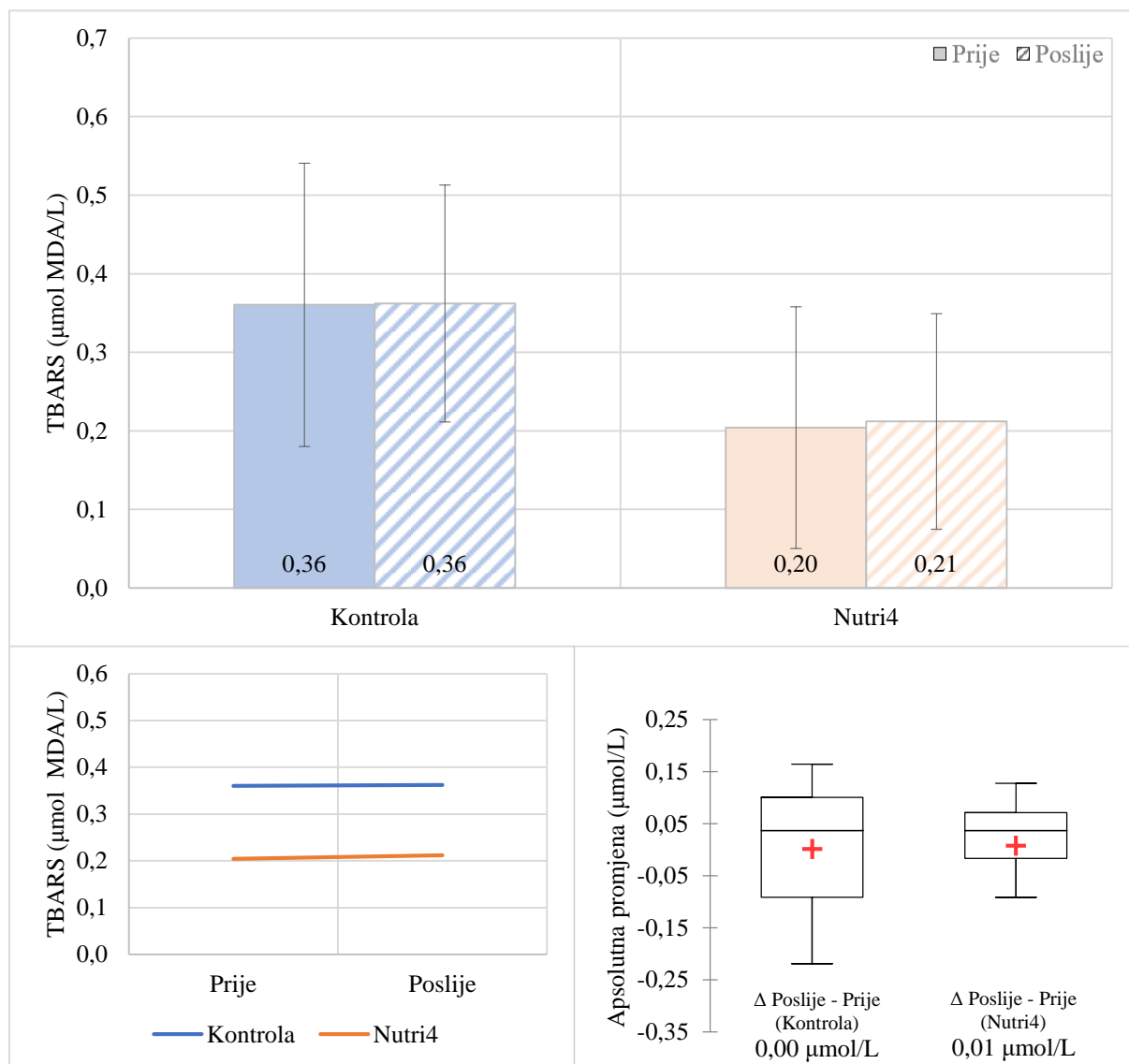
(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

### **5.9. Promjena biomarkera oksidativnoga stresa (TBARS) i antioksidativnoga kapaciteta (FRAP) u pacijenata s akutnim koronarnim sindromom**

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na promjena biomarkera **oksidativnoga stresa (TBARS) i antioksidativnoga kapaciteta (FRAP)** u pacijenata s akutnim koronarnim sindromom prikazane su slikama 14 - 15. Nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj skupini nije uočena statistički značajna razlika u mjerenju vrijednosti TBARS-a, tj. vrijednosti **TBARS**-a ostale nepromijenjene (0,36  $\mu\text{mol MDA/L}$ ) (Slika 14).

U Nutri 4 skupini zabilježeno je blago povećanje TBARS vrijednosti nakon provedbe dijetetskoga protokola, ali to povećanje nije bilo statistički značajno (s 0,20  $\mu\text{mol MDA/L}$  na 0,21  $\mu\text{mol MDA/L}$ ) (Slika 14).

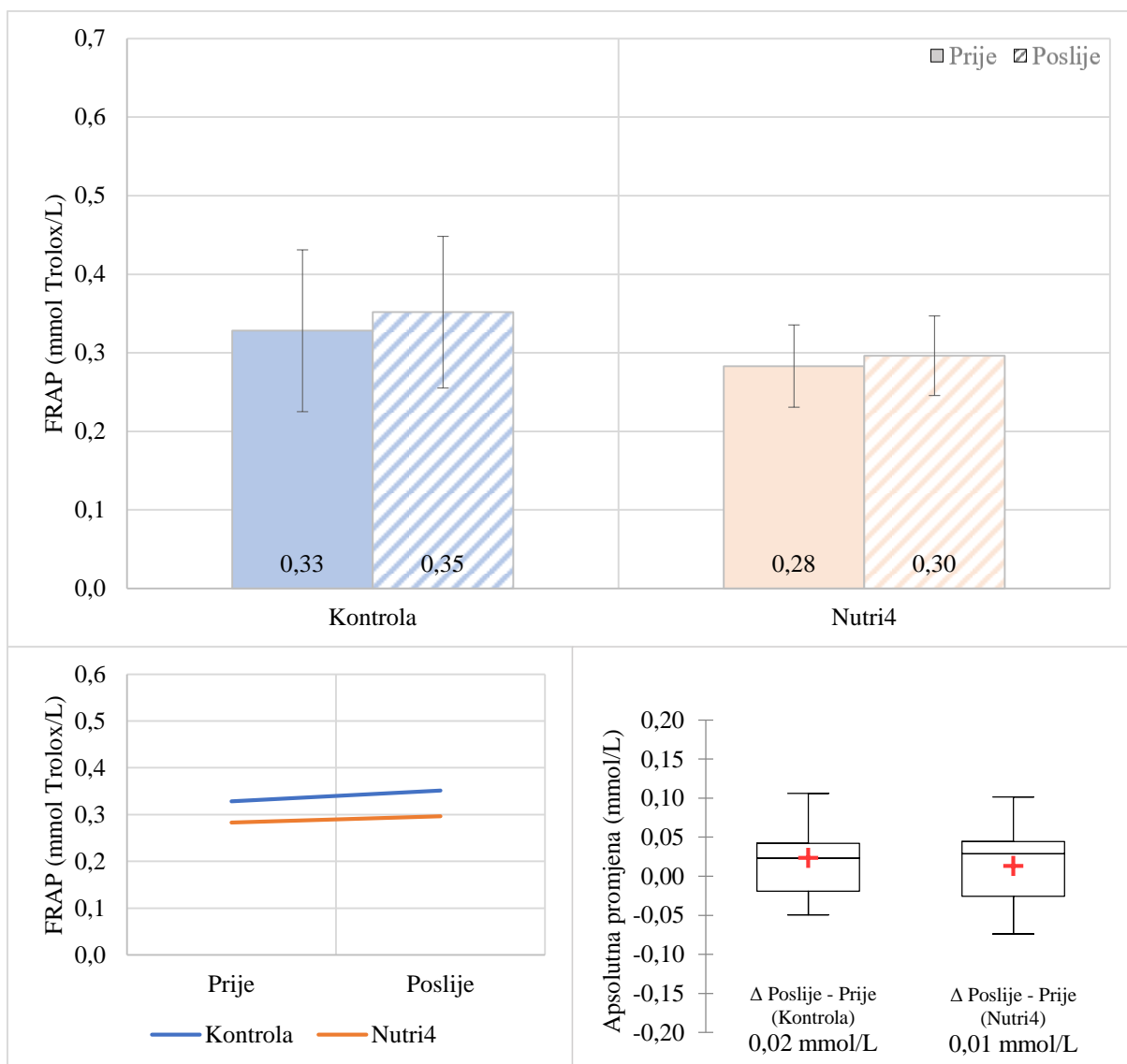
Uspoređujući apsolutne promjene TBARS-a u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima ne postoji statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini vidljivo je da nema promjene TBARS-a (0,00  $\mu\text{mol MDA/L}$ ), u odnosu na Nutri 4 skupini gdje je zabilježeno blago povećanje TBARS-a (0,01  $\mu\text{mol MDA/L}$ ) nakon dijetetskoga protokola (Slika 14).



Slika 14. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na biomarkere oksidativnoga stresa (TBARS) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj skupini došlo je do porasta **FRAP**-a, ali ne statistički značajno (sa 0,33 na 0,35 mmol Trolox/L). U Nutri 4 skupini zabilježen je porast FRAP vrijednosti nakon dijetetskoga protokola, ali taj porast nije bio statistički značajan (s 0,28 na 0,30 mmol Trolox/L) (Slika 15). Uspoređujući apsolutne promjene FRAP-a u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima nema statistički značajne razlike. U kontrolnoj skupini vidljivo je povećanje FRAP- a (0,02 mmol Trolox/L), u odnosu na Nutri 4 skupini (0,01 mmol Trolox/L) nakon dijetetskoga protokola (Slika 15).



Slika 15. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na antioksidativni kapacitet (FRAP) u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

### **5.10. Promjena pro- i protuupalnih citokina i kemokina u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na pro- i protuupalne citokine i kemokine u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom prikazan je u Tablici 14.

Ispitani su sljedeći citokini i kemokini: TNF-alpha (faktor tumorske nekroze alpha), TGF-1 $\beta$  (transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  1), C3a (C3 a komponenta komplementa), IFN-gamma (interferon  $\gamma$ ), IL-6 (interleukin 6), IL-10 (interleukin 10), IL-17A (interleukin 17A), IL-23 (interleukin 23) te MCP-1(monocitni kemoatraktantni protein 1).

Nije bilo značajnih promjena u TNF-alpha, TGF-1 $\beta$ , C3a, IFN-gamma, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 te MCP-1 uočenih ni u jednoj eksperimentalnoj skupini nakon odgovarajućih protokola prehrane (Tablica 14).

U kontrolnoj skupini nakon provedbe dijetetskoga protokola vrijednosti TNF-alpha, C3a, IFN-gamma, IL-10 i IL-23 rastu, ali ne statistički značajno, dok vrijednosti TGF-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, te MCP-1 padaju, ali ne statistički značajno (Tablica 14).

U Nutri 4 skupini nakon provedbe dijetetskoga protokola vrijednosti, IFN-gamma, IL-17A, MCP-1 padaju, ali ne statistički značajno, dok vrijednosti TGF-1 $\beta$ , C3a, IL-6, i IL-23 rastu, ali ne statistički značajno (Tablica 14).

Uspoređujući apsolutne promjene citokina i kemokina u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima nema statistički značajne razlike. Apsolutne vrijednosti TGF-1 $\beta$  i IL-6 i MCP-1 smanjuju se u kontrolnoj skupini. U Nutri 4 skupini vrijednosti TNF-alpha, IL-6 i IL-17A smanjuju se međutim ne statistički značajno (Tablica 14).

Tablica 14. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na pro- i protuupalne citokine i kemokine u serumu bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola			Nutri 4			Apsolutna promjena nakon dijetetskog protokola		
	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Kontrola	Nutri 4	<i>p</i> <sup>b</sup>
TNF-alpha (pg/mL)	3,4 (0,4)	4,0 (0,8)	0,108	3,6 [3,1-3,8]	3,6 [3,0-3,6]	0,442	0,6 (0,9)	-0,1 (0,5)	0,067
TGF-1β (pg/mL)	2146,8 (828,0)	2077,5 (936,5)	0,896	2274,4 (888,9)	2405,7 (473,8)	0,779	-69,2 (1121,7)	131,3 (993,5)	0,771
C3a (pg/mL)	3078,9 (1643,3)	3497,0 (1689,1)	0,232	4245,8 (969,7)	4941,9 (1931,6)	0,150	418,0 (769,3)	696,1 (1139,1)	0,620
IFN-gamma (pg/mL)	9,12 [9,12-11,24]	11,24 (9,12)	0,168	11,24 [9,39-11,24]	9,12 [9,12-11,24]	0,753	1,06 [0,00-2,12]	0,00 [-1,59-0,80]	0,211
IL-6 (pg/mL)	20,32 (2,39)	19,52 (1,84)	0,534	18,32 [17,80-19,86]	18,83 [17,80-19,86]	0,482	-0,80 (3,58)	-0,62 (2,49)	0,903
IL-10 (pg/mL)	0,85 [0,85-0,85]	0,87 (0,23)	1,000	0,78 [0,71-0,96]	0,78 [0,71-1,08]	0,399	0,02 (0,24)	0,07 (0,25)	0,695
IL-17A (pg/mL)	9,14 (0,18)	9,10 (0,15)	0,665	9,15 (0,25)	9,14 [9,00-9,26]	0,541	0,12 [-0,27-0,15]	-0,10 [-0,28-0,22]	0,888
IL-23 (pg/mL)	10,22 (0,75)	10,49 [9,99-10,49]	0,396	9,50 [9,50-10,49]	10,49 [9,50-11,24]	0,107	0,50 [0,00-0,99]	0,50 [0,00-1,99]	0,887
MCP-1 (pg/mL)	21,25 [14,52-27,82]	16,67 [11,37-24,80]	0,734	22,66 (11,74)	21,64 [17,78-25,97]	0,557	-2,73 (15,02)	3,48 (20,18)	0,485

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. TNF-alpha - faktor tumorske nekroze alpha; TGF-1β – transformirajući čimbenik rasta β 1; C3a – C3 a komponenta komplemanta; IFN-gamma – interferon γ; IL-6 – interleukin 6; IL-10 – interleukin 10; IL-17A – interleukin 17A; IL-23 – interleukin 23; MCP-1 - monocitni kemoatraktantni protein 1.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju. *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu *p*<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom); *p*<sup>b</sup> - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).

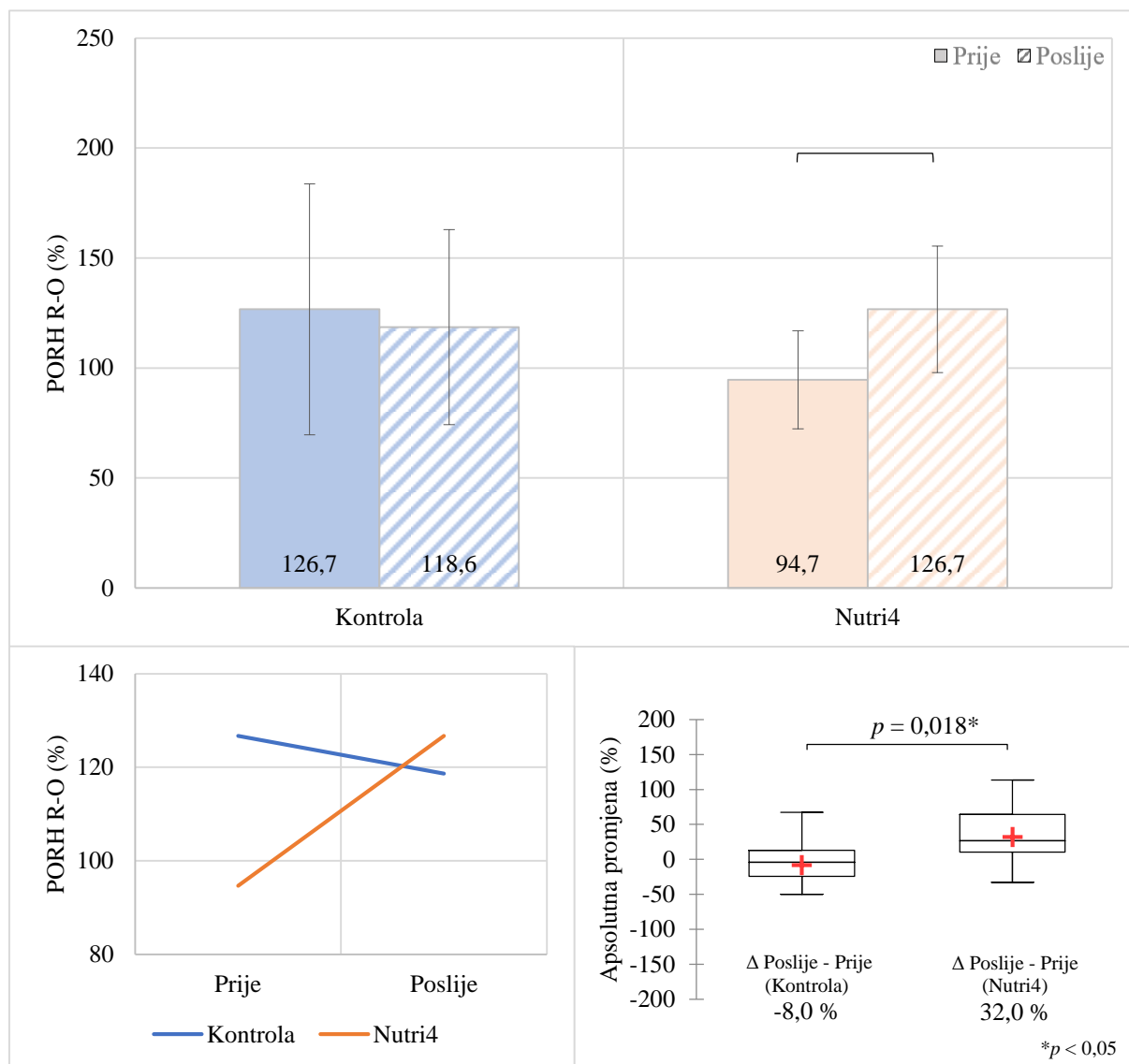
### **5.11. Mjerenja krvnoga protoka i vaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože pacijenata s AKS-om**

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na promjene vrijednosti post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH), acetilkolin inducirane dilatacije (Ach ID) i natrijevim nitroprusidom inducirane dilatacije (SNP ID) bolesnika s AKS-om prikazan je na slikama 16 - 18.

Vrijednosti **post-okluzivne reaktivne hiperemije** (PORH) nisu se statistički značajno mijenjale unutar kontrolne skupine, ali su one značajno promijenjene u Nutri 4 skupini.

Nakon dijetetskoga protokola vrijednosti PORH-a su se smanjile u kontrolnoj skupini (sa 122,3 % na 100,0 %), ali ne statistički značajno (Slika 16). U Nutri 4 skupini došlo je značajnog porasta vrijednosti PORH-a nakon dijetetskoga protokola (s 94,7 % na 126,7 %) (Slika 16).

Uspoređujući apsolutne promjene PORH-a u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima postoji statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini vidljivo je smanjenje PORH-a (-0,8 %), u odnosu na Nutri 4 skupinu gdje se PORH povećao (32,0 %) nakon dijetetskoga protokola (Slika 16).

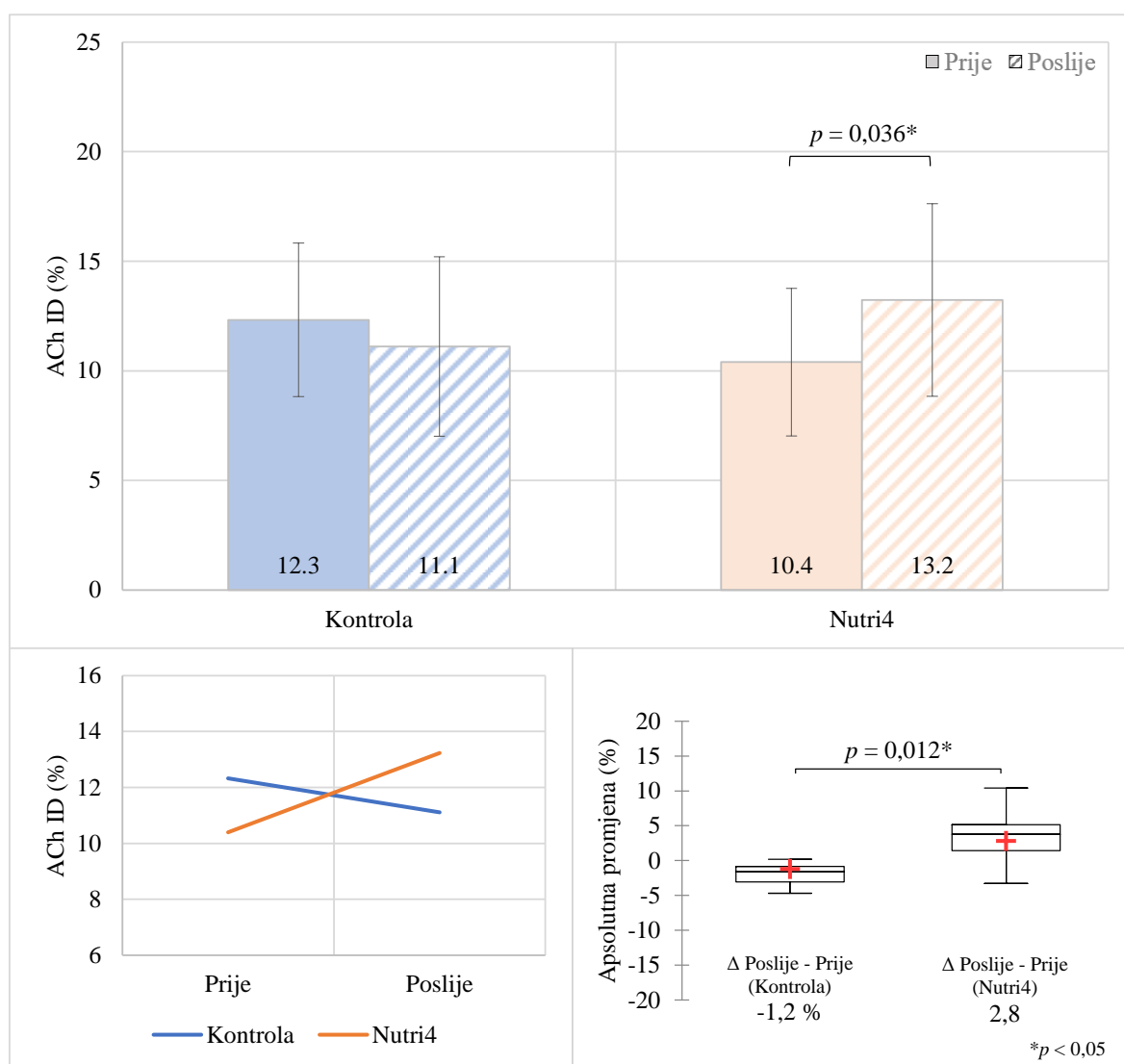


Slika 16. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na vrijednosti post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar Nutri 4 skupine, odnosno Wilcoxonovim testom rangova s predznakom unutar kontrolne skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).



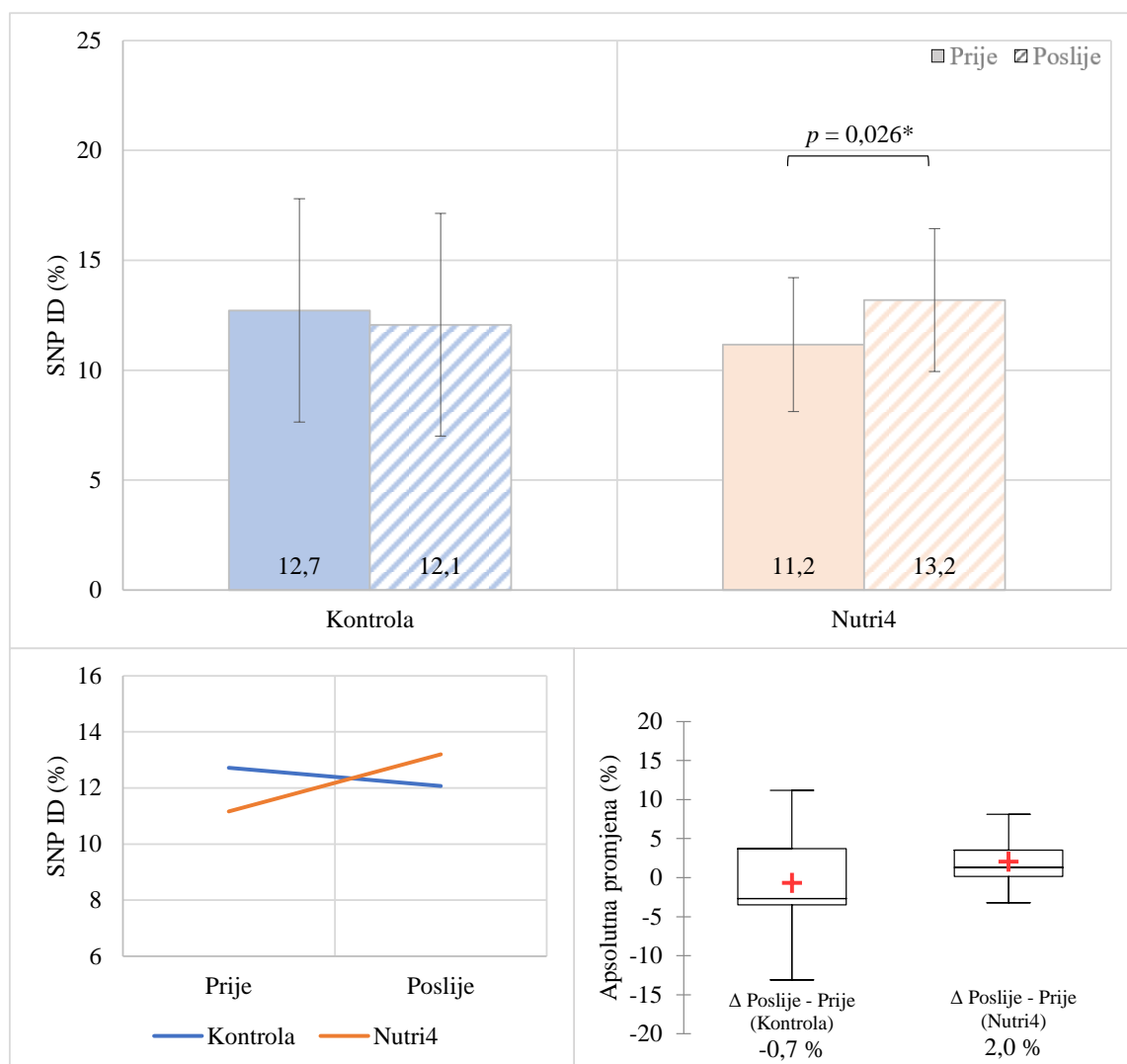
Vrijednosti **acetilkolinom inducirane dilatacije** (Ach ID) su se značajno mijenjale unutar Nutri 4 skupine, međutim ta promjena nije bila značajna unutar kontrolne skupine. Nakon dijetetskoga protokola vrijednosti ACh ID-a su se smanjile u kontrolnoj skupini (sa 12,3 % na 11,1 %) (Slika 17). U Nutri 4 skupini došlo je do porasta vrijednosti ACh ID-a nakon dijetetskoga protokola (s 10,4 % na 13,2 %), te je taj porast bio statistički značajan (Slika 17). Uspoređujući apsolutne promjene ACh ID-a u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima ima statistički značajne razlike. U kontrolnoj skupini vidljivo je smanjenje ACh ID-a (-1,6 %), u odnosu na Nutri 4 skupinu gdje se ACh ID povećao (3,8 %) nakon dijetetskoga protokola (Slika 17).



Slika 17. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošjih jaja na vrijednosti acetilkolinom inducirane dilatacije (Ach ID) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su Mann-Whitney U testom.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Vrijednosti **natrijevim nitroprusidom inducirane dilatacije** (SNP ID) su se statistički značajno mijenjale unutar Nutri 4 skupine, ali ne i unutar kontrolne skupine, nakon provedenog dijetetskog protokola. Nakon dijetetskoga protokola vrijednosti SNP ID-a su se smanjile u kontrolnoj skupini (s 12,7 % na 12,1 %), ali ne statistički značajno (Slika 18). U Nutri 4 skupini došlo je do statistički značajnog porasta vrijednosti SNP ID-a nakon dijetetskoga protokola (s 11,2 % na 13,2 %) (Slika 18). Uspoređivanjem apsolutne promjene SNP ID-a u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima nema statistički značajne razlike. U kontrolnoj skupini vidljivo je smanjenje SNP ID-a (-0,7 %), u odnosu na Nutri 4 skupinu gdje se SNP ID povećao (2,0 %) nakon dijetetskoga protokola (Slika 18).



Slika 18. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošjih jaja na vrijednosti natrijevim nitroprusidom inducirane dilatacije (SNP ID) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

(Nutri 4-označava skupinu ispitanika oboljeli od akutnog koronarnog sindroma koji su konzumirali nutritivno obogaćena kokošja jaja (jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija). Procjena utjecaja dijetalnoga protokola provedena je utvrđivanjem eventualnih razlika prije i nakon konzumacije jaja primjenom t-testa za zavisne uzorke unutar obje skupine. Razlike u apsolutnim promjenama između ispitivanih skupina analizirane su pomoću t-testa za nezavisne uzorke.  $p^*$  vrijednosti označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

### **5.12. Mjerenje proteinskoga izražaja enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, i nNOS) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom**

Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na **proteinski izražaj enzima** (eNOS, iNOS, i nNOS) važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom prikazani su u Tablici 15.

Vrijednosti proteinskoga izražaja enzima (eNOS, iNOS, i nNOS) važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom nisu se statistički značajno razlikovale među ispitivanim skupinama (Tablica 15).

Nakon provedbe dijetetskoga protokola u kontrolnoj skupini došlo je do smanjenja vrijednosti nNOS-a (s 0,38 IU/ml na 0,37 IU/ml), iNOS (s 3,79 IU/ml na 3,15 IU/ml) i eNOS (s 22,53 IU/ml na 22,4 IU/ml), ali ne statistički značajno.

Nakon provedbe dijetetskoga protokola u Nutri 4 skupini došlo je do smanjenja vrijednosti nNOS-a (s 0,37 IU/ml na 0,32 IU/ml) i iNOS-a (s 3,91 IU/ml na 3,76 IU/ml), dok su se vrijednosti eNOS-a povećale (s 22,57 IU/ml na 23,08 IU/ml), ali ne statistički značajno. Uspoređujući apsolutne promjene proteinskoga izražaja enzima (eNOS, iNOS, i nNOS) u obje ispitivane skupine prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima nema statistički značajne razlike.

U kontrolnoj skupini vidljivo je smanjenje vrijednosti iNOS-a (-0,42 IU/ml) i eNOS-a (-0,12 IU/ml), dok su vrijednosti nNOS-a ostale nepromijenjene. U Nutri 4 skupini vidljivo je smanjenje vrijednosti nNOS-a (-0,02 IU/ml) i iNOS-a (-0,05 IU/ml), dok su vrijednosti eNOS-a rasle (0,51 IU/ml) (Tablica 15).

Tablica 15. Utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na proteinski izražaj enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, i nNOS) u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom

	Kontrola			Nutri 4			Apsolutna promjena nakon dijetetskog protokola		
	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Prije	Poslije	<i>p</i> <sup>a</sup>	Kontrola	Nutri 4	<i>p</i> <sup>b</sup>
nNOS (IU/ml)	0,38 (0,18)	0,37 (0,14)	0,885	0,37 (0,16)	0,32 [0,21-0,40]	0,421	0,00 (0,12)	-0,02 (0,18)	0,791
iNOS (IU/ml)	3,79 [3,69-4,17]	3,15 [3,00-3,79]	0,168	3,91 [3,72-4,58]	3,76 [3,36-5,37]	0,808	-0,42 [-0,76-0,01]	-0,05 (1,42)	0,519
eNOS (IU/ml)	22,53 (13,20)	22,40 (13,64)	0,975	22,57 (14,93)	23,08 (10,48)	0,913	-0,12 (14,53)	0,51 (15,78)	0,916

Nutri 4 – kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, selenom, vitaminom E i luteinom. nNOS – neuronalna dušik-oxid sintetaza; iNOS – inducibilna dušik-oxid sintetaza; eNOS – endotelna dušik-oxid sintetaza.

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i (standardna devijacija) normalno raspodijeljeni podaci ili kao medijan i [interkvartilni raspon] podaci koji ne prate normalnu distribuciju. *p* vrijednosti istaknute masno (bold) označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ), pri čemu *p*<sup>a</sup> predstavlja razliku unutar skupine (t-test za zavisne uzorke ili Wilcoxonov test rangova s predznakom); *p*<sup>b</sup> - razlika između skupina (t-testa za nezavisne uzorke ili Mann-Whitney U test).

## 6. RASPRAVA

Prije samog istraživanja provedeno je preliminarno istraživanje (PoC studija) koja je koristila kontroliran, randomiziran dizajn.

Rezultati PoC istraživanja pokazali su protuupalni potencijal konzumacije jaja bogatih n-3 PUFA-om kod pacijenata s KVB-om. Potencijalno, kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om mogu promijeniti profil slobodnih masnih kiselina u povoljniji omjer n-6/n-3, te povećati koncentraciju n-3 PUFA u serumu. Nadalje, rezultati su pokazali da konzumacija 1053 mg PUFA dnevno u obliku obogaćenih kokošnjih jaja tijekom tri tjedna nije izazvala značajne promjene u PORH-u kožne mikrocirkulacije pacijenata s KVB-om, bez obzira na trajanje bolesti. Rezultati upućuju na nedovoljno visoku dozu ili relativno kratko razdoblje suplementacije PUFA-om u ovoj studiji, što je vjerojatno nedovoljno za induciranje funkcionalnih vaskularnih učinaka u promijenjenoj mikrocirkulaciji bolesnika s KVB-om. Stoga su zaključci provedene PoC studije da je potrebno nastaviti istraživanje suplementacije s n-3 PUFA-om (doza, trajanje, dodatni suplementi poput selena, luteina i vitamina E) kako bi se postigli jasniji rezultati o učinku konzumacije n-3 PUFA-e, posebno u obliku funkcionalne hrane, u bolesnika s KVB-om.

U ovoj prospektivnoj, randomiziranoj, intervencijskoj, dvostruko slijepoj studiji, istraživani su korisni učinci prehrane obogaćene n-3 PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom na mikrovaskularnu funkciju u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom.

U istraživanju su sudjelovali bolesnici oba spola, stariji od 18 godina, koji su liječeni na Zavodu za bolesti srca i krvnih žila KBC-a Osijek, a koji su nakon hospitalizacije dobrovoljno uključeni u protokol istraživanja. Ispitanici uključeni u istraživanje su bolesnici s akutnim koronarnim sindromom, što uključuje bolesnike s infarktom miokarda s ST-elevacijom (STEMI), infarktom miokarda bez ST-elevacije (NSTEMI) i nestabilnom anginom pektoris. Kako bi se objektivno provjerila učinkovitost funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja, ispitanici su podijeljeni u dvije usporedne ispitne skupine, kontrolnu i Nutri 4 skupinu.

U ovom istraživanju praćene su prehrambene navike ispitanika tijekom dijetetskog protokola pomoću dnevnika prehrane. Dnevnik prehrane pomaže ispitanicima da se sjetno sjećaju što su konzumirali tijekom dana i omogućuje istraživaču da provjeri jesu li se ispitanici u potpunosti pridržavali dijetetskih uputa i time omogućiti istraživačima da pruže individualne preporuke za izmjenu prehrane. Dnevnik prehrane igra ključnu ulogu u praćenju uspješnosti dijetetskog protokola i u dobivanju preciznih rezultata istraživanja. Osim toga, može biti koristan i u

individualnom kontekstu, omogućujući ispitanicima da shvate svoje prehrambene navike i razviju zdrave prehrambene navike u budućnosti.

Na početku protokola, tj. prilikom prvog mjerenja, svaki je ispitanik dobio obrasce dnevnika prehrane za praćenje konzumirane hrane. Radi kontrole, glavni istraživač je redovito kontaktirao ispitanike da provjeri da li se pridržavaju uputa i da li vode ispravan dnevnik prehrane. Ovaj dnevnik služi kao način za korekciju prehrambenih navika ispitanika te za kontrolu njihove prehrane tijekom istraživanja. Ispitanici iz kontrolne skupine su tijekom trojtjednoga dijetetskog protokola konzumirali obična kokošja jaja. Ispitanici iz skupine Nutri 4 konzumirali su funkcionalno obogaćena kokošja jaja (obogaćena n-3 PUFA-om, vitaminom E, selenom i luteinom).

Prosječna dob ispitanika koji su bili dio kontrolne skupine bila je 56,8 godina, dok je prosječna dob ispitanika Nutri 4 skupine bila 57,2 godine. Među ispitanicima uključenim u studiju nije bilo razlike u dobi između kontrolne i Nutri 4 skupine.

U ovome istraživanju ispitan je utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na antropometrijske i parametre i sastav tjelesnih tekućina, tjelesni sastav ispitanika (BMI, WHR, FFM%, FAT%, TBW%, ECW% i ICW%), hemodinamske parametre, debljinu intime medije (IMT), parametre krvne slike (leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, trombociti, MPV), biokemijske parametre (urea, kreatinin, natrij, kalij, glukoza, hsCRP, kalcij, željezo, transferin, feritin, fibrinogen), promjena koncentracije luteina, vitamina E i selena kao i profil masnih kiselina u serumu bolesnika s AKS-om.

Nadalje, određen je utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na ukupni kolesterol, trigliceride, LDL i HDL-kolesterol, kao i koncentraciju jetrenih enzima (AST, ALT, GGT) bolesnika s AKS-om.

Utvrđen je utjecaj konzumacije običnih i funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na procjenu varijabilnosti srčanoga ritma (HRV), utjecaj na aktivnost antioksidativnih enzima katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GPx) i superoksid-dismutaze (SOD), promjena biomarkera oksidativnoga stresa (TBARS) i antioksidativnoga kapaciteta (FRAP), pro- i protuupalne citokine i kemokine, promjene vrijednosti post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH), acetilkolinom inducirane dilatacije (Ach ID) i natrijevim nitroprusidom inducirane dilatacije (SNP ID) te proteinski izražaj enzima (eNOS, iNOS, i nNOS) važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti u bolesnika s AKS-om.

### **6.1. Promjena antropometrijskih i hemodinamskih parametara u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom**

Antropometrijski parametri odnose se na mjerenja tijela, kao što su visina, težina i indeks tjelesne mase (BMI), opseg struka i bokova. Promjene tih parametara mogu biti povezane s promjenama u sastavu tijela ili cjelokupnom zdravlju.

Hemodinamski parametri odnose se na mjerenje protoka krvi i tlaka unutar tijela. Na te parametre mogu utjecati čimbenici kao što su stanje krvnih žila, učinkovitost srca i prisutnost bilo kakvih prepreka ili abnormalnosti. Primjeri hemodinamskih parametara uključuju krvni tlak, broj otkucaja srca, minutni volumen srca i udarni volumen. AKS je vrsta srčane bolesti koju karakterizira naglo smanjenje dotoka krvi u srce. Neki mogući tretmani AKS-a uključuju lijekove, promjene načina života i operaciju. Moguće je da konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih određenim hranjivim tvarima kao što su n-3 polinezasićene masne kiseline (n-3PUFA), lutein, vitamin E i selen može imati neke učinke na antropometrijske i hemodinamske parametre u bolesnika s AKS-om.

Ispitanici obje ispitivanih skupina imali su slične antropometrijske mjere i sastav tijela, bez značajnih razlika u BMI-u, WHR-u, FFM%, FAT%, TBW%, ECW% i ICW%. Nisu otkrivene značajne razlike u antropometrijskim parametrima između ispitivanih skupina nakon provedenoga dijetetskog protokola.

Svi su ispitanici bili normotenzivni u mjerenjima prije provedbe dijetetskoga protokola. Hemodinamske vrijednosti sistoličkoga arterijskog tlaka (SBP), dijastoličkoga arterijskog tlaka (DBP) i srednjega arterijskog tlaka (MAP) nisu se statistički značajno mijenjale niti u Nutri 4 niti u kontrolnoj skupini nakon provedenoga dijetetskog protokola. Vrijednosti pulsa (HR) bile su više prije provođenja dijetetskoga protokola u ispitanika iz obje ispitivane skupine, ali se nisu statistički značajno promijenile nakon provedenoga dijetetskog protokola u Nutri 4 skupini, dok je ta promjena statistički značajna u kontrolnoj skupini.

Varijabilnost srčanoga ritma (HRV) fiziološki je fenomen koji odražava utjecaj autonomnoga živčanog sustava na funkciju srca. U kliničkoj praksi uglavnom se koristi kao prediktor postinfarktne aritmične smrtnosti. Do danas nije utvrđeno studija objavljena u relevantnoj literaturi koja bi utvrdila razlike u parametrima HRV-a nakon infarkta miokarda (IM) ovisno o načinu liječenja u akutnoj fazi.

Vrijednosti varijabilnosti parametara srčanoga ritma (Mean RR, SDNN, RMS-SD, pNN50, TI, LF norm, HF norm, LF/HF) nisu se statistički značajno mijenjale niti u Nutri 4 niti u kontrolnoj skupini nakon provedenoga dijetetskog protokola.

Također, studije koje su uključivale konzumaciju samo n-3 PUFA-e nisu rezultirale značajnim smanjenjem SBP-a, DBP-a i MAP-a u Nutri 4 skupini nakon konzumacije jaja, iako su ispitanici konzumirali približno istu količinu n-3 PUFA-e tijekom studije (189). Istraživanje od Bucher i sur. (2002) daje pregled literature o učincima n-3 PUFA-e na bolest koronarnih arterija, te su utvrdili da n-3 PUFA može poboljšati krvni tlak, otkucaje srca i profile lipida te smanjiti rizik od bolesti koronarnih arterija.

Saremi i sur. (2010) bave se učincima vitamina E na zdravlje kardiovaskularnoga sustava i utvrđuju da vitamin E može imati blagotvorne učinke na krvni tlak, broj otkucaja srca i profile lipida i može smanjiti rizik od bolesti koronarnih arterija i moždanoga udara (190). Studija Oster i sur. (1990) pokazala je da suplementacija vitaminom E značajno smanjuje rizik od srčanoga udara kod muških pušača, ali nije imala značajan učinak na ukupnu smrtnost ili učestalost moždanoga udara. Autori su zaključili da vitamin E može imati zaštitni učinak protiv srčanoga udara kod muških pušača, ali potrebno je više istraživanja kako bi se potvrdili ti nalazi i odredila optimalna doza i trajanje suplementacije vitaminom E za prevenciju kardiovaskularnih bolesti (191). Gammone i sur. (2015) analiziraju potencijalne zdravstvene dobrobiti karotenoida, uključujući lutein, likopen i  $\beta$ -karoten, za zdravlje kardiovaskularnoga sustava. Autori napominju da karotenoidi mogu imati korisne učinke na krvni tlak, broj otkucaja srca i profile lipida te mogu smanjiti rizik od bolesti koronarnih arterija i moždanoga udara (105).

## **6.2. Krvna slika i promjena biokemijskih parametara seruma u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom**

Dobivene vrijednosti parametara **krvne slike** (leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, trombociti, MPV) u obje ispitivane skupine bolesnika s akutnim koronarnim sindromom bile su unutar referentnih vrijednosti. Nakon dijetetskoga protokola nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u izmjeranim parametrima krvne slike. Osim toga, vrijednosti hemoglobina su se smanjile u Nutri 4 skupini,



a povećale u kontrolnoj skupini. Unatoč tome, vrijednosti hemoglobina u obje skupine su i dalje unutar referentnih vrijednosti nakon dijetetskoga protokola.

Nije bilo statistički značajne razlike između vrijednosti biokemijskih parametara (urea, kreatinin, kalij, glukoza, kalcij, fibrinogen) u kontrolnoj i Nutri 4 skupini nakon dijetetskoga protokola. Međutim, uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji natrija koja je porasla u obje ispitivane skupine i to statistički značajno u Nutri 4 skupini. Koncentracija željeza također je porasla u obje ispitivane skupine, međutim statistički značajan porast izmjeren je u Nutri 4 skupini nakon dijetetskoga protokola. Vrijednosti transferina rasle su u kontrolnoj skupini statistički značajno, te je izmjerena statistički značajna razlika između ispitivanih skupina (kontrolne i Nutri 4) nakon provedbe dijetetskog protokola. Vrijednosti koncentracije feritina smanjile su se u obje ispitivane skupine, pri čemu značajno u kontrolnoj skupini nakon dijetetskoga protokola. Vrijednost hsCRP-a se statistički značajno smanjila u obje ispitivane skupine nakon provedenoga dijetetskog protokola.

AKS je vrsta srčane bolesti koju karakterizira naglo smanjenje dotoka krvi u srce. Može biti uzrokovano začepljenjem jedne ili više koronarnih arterija koje opskrbljuju srce krvlju bogatom kisikom. AKS može uzrokovati simptome kao što su bol u prsima, otežano disanje i mučnina. Profil masnih kiselina u serumu bolesnika s AKS-om nakon provedbe dijetetskog protokola nije se značajno promijenio.

Kao rezultat konzumacije Nutri 4 kokošnjih jaja, omjer n-6/n-3 u serumu bolesnika s AKS-om se značajno smanjio u Nutri 4 skupini (sa 17,8 na 11,5), kao i u kontrolnoj skupini (sa 17,1 na 15,7), ali to smanjenje nije značajno.

Postoje neki dokazi koji ukazuju na to da konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA), vitaminom E, selenom i luteinom može imati pozitivan učinak na biokemijske parametre seruma u pacijenata s AKS-om. n-3 PUFA su vrsta zdrave masti za koju se pokazalo da smanjuje upalu i smanjuje rizik od srčanih bolesti. Vitamin E je antioksidans koji može pomoći u zaštiti srca i smanjiti rizik od AKS-a. Selen je mineral u tragovima koji može pomoći u zaštiti srca i poboljšati protok krvi. Lutein je pigment koji se nalazi u voću i povrću, a može pomoći u poboljšanju zdravlja očiju i smanjiti rizik od određenih vrsta raka.

### **6.3. Promjene u lipidnom profilu seruma i koncentracije jetrenih enzima u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom**

Vrijednosti ukupnoga kolesterola snižene su u obje ispitivane skupine nakon dijetetskoga protokola, ali nisu utvrđene statistički značajne razlike u razinama kolesterola ni unutar ni između skupina. Vrijednosti triglicerida ostale su gotovo nepromijenjene u kontrolnoj skupini, dok su u Nutri 4 skupini blago porasle, ali navedeni porast nije bio statistički značajan. Također, nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima ukupnog kolesterola između ispitivanih skupina nakon dijetetskoga protokola.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u razini HDL-kolesterola unutar Nutri 4 skupine nakon dijetetskog protokola, dok je u kontrolnoj skupini došlo je do statistički značajnog povećanja HDL kolesterola nakon dijetetskog protokola. Razina LDL-kolesterola statistički se značajno smanjila u skupini Nutri 4 nakon dijetetskoga protokola kao i u kontrolnoj skupini, ali ne statistički značajno.

Razine ukupnoga kolesterola i triglicerida ostale su unutar referentnih vrijednosti u obje skupine ispitivanih pacijenata s AKS-om. Važan nalaz ove studije je da konzumacija Nutri 4 jaja ima pozitivan učinak na lipidni profil.

Suplementacija n-3 PUFA-e ima potencijal za smanjenje serumskih lipida (osobito triglicerida) kod osoba s hiperlipidemijom (182,183) i poboljšanja endotelne funkcije i krutosti arterija kod hipertenzivnih bolesnika s hipertrigliceridemijom i visokim kardiovaskularnim rizikom (194). Međutim, doze potrebne za postizanje promatranih učinaka su visoke; tj. unos > 4 g/dan izvora hrane obogaćenih EPA-om i/ili DHA-om smanjio je trigliceride u serumu (za 9 – 26 %) kod normolipidemičnih do graničnih hiperlipidemičnih, ali inače zdravih ispitanika (195).

Nedavno kliničko ispitivanje Stupin i sur. (2020) pokazalo je da konzumacija 1053 g n-3 PUFA/dan tijekom tri tjedna u obogaćenim kokošnjim jajima nije uzrokovala značajne promjene u profilu lipida u serumu u usporedbi s osnovnim mjerenjima kod zdravih pojedinaca (npr. smanjene su razine triglicerida za približno 8 %,.) (88). Ova je studija pokazala da su kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om značajno smanjila ukupni i LDL-kolesterol svih bolesnika s AKS-om. To se pripisuje značajnom smanjenju razine ukupnoga i LDL-kolesterola nakon konzumacije n-3 PUFA-e samo u pacijenata s AKS-om.

Studija Ćurić i sur. (2021) pokazala je da su kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om značajno smanjila ukupni i LDL-kolesterol svih bolesnika s kardiovaskularnim bolestima. To se pripisuje

značajnom smanjenju razine ukupnoga i LDL-kolesterola nakon konzumacije n-3 PUFA-e samo kod pacijenata s AKS-om. Međutim, u podskupini s AKS-om razine ukupnoga kolesterola i triglicerida značajno su se smanjile, slično kao kod pacijenata koji su konzumirali obična kokošja jaja (kontrolne skupine). Važno je naglasiti da su razine ukupnoga kolesterola, triglicerida i LDL-kolesterola svih bolesnika s AKS-om bile unutar referentnih vrijednosti, osobito u podpopulaciji bolesnika s kroničnim kardiovaskularnim sindromom (KKS), najvjerojatnije zato što su uzimali statine prije i tijekom uključivanja u sadašnja studija. Statini su inicirani *de novo* bolesnicima s AKS-om (98). Prema tome, moguće je da se snižavanje razine ukupnoga i LDL-kolesterola u pacijenata s AKS-om i kod n-3 PUFA-e i kod kontrolne skupine može pripisati terapiji statinima, a ne specifičnom prehranbenom protokolu kojem su bili podvrgnuti. Stoga ovi rezultati pokazuju da konzumacija n-3 PUFA nije izazvala značajno dodatno smanjenje razine ukupnoga kolesterola, triglicerida i LDL-kolesterola u pacijenata s KKS-om. Međutim, važan nalaz ove studije je da konzumacija kokošnjih jaja nije imala negativan učinak na lipidni profil i pokazalo se da je potpuno sigurna u populaciji pacijenata s kardiovaskularnim bolestima.

Koncentracija **jetrenih enzima** (AST, ALT, GGT) smanjila se u obje skupine nakon dijetetskoga protokola, ali je značajan pad utvrđen samo za AST i GGT u kontrolnoj skupini. Specifični učinci konzumacije n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), vitamina E, selena i kokošnjih jaja obogaćenih luteinom na razine jetrenih enzima kod osoba s akutnim koronarnim sindromom, nedovoljno su istraženi.

Međutim, neke su studije pokazale da te hranjive tvari mogu imati pozitivan učinak na zdravlje jetre. Pokazalo se da n-3 PUFA, koja se nalazi u određenim vrstama masne ribe, ima protuupalna svojstva i može biti korisna za zdravlje jetre (196).

Vitamin E je antioksidans koji može pomoći u zaštiti jetre od oštećenja, a selen je element u tragovima koji je važan za pravilan rad jetre. Pokazalo se da lutein, pigment koji se nalazi u određenom voću i povrću, ima antioksidativna svojstva i također može biti koristan za zdravlje jetre. Važno je napomenuti da se ove hranjive tvari trebaju konzumirati kao dio zdrave, uravnotežene prehrane i da se osobe s akutnim koronarnim sindromom trebaju posavjetovati sa zdravstvenim djelatnikom prije bilo kakvih promjena u svojoj prehrani.

#### **6.4. Promjena koncentracije luteina, vitamina E i seleno u serumu bolesnika s AKS-om nakon dijetetskoga protokola**

Ispitivanjem sastava običnih i obogaćenih jaja u okviru ovoga istraživanja utvrđeni su značajno viši udjeli n-3 PUFA-e (134,2 %), vitamina E (84,5 %), seleno (27,8 %) i luteina (460 %) u obogaćenim jajima u odnosu na obična jaja (Tablica 1).

Vitamin E poznat je po svojim značajnim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima te je proučavan u odnosu na prevenciju kardiovaskularnih bolesti. To je potkrijepljeno nalazima da je nedostatak vitamina E povezan s povećanim rizikom od kardiovaskularnih događaja. Bolesnici koji boluju od upalnih bolesti često imaju smanjenu razinu antioksidanasa, bilo zbog neodgovarajućega unosa hranom bilo zbog povećane potrebe za antioksidansima (197). Studija dos Santosa i sur. (2020) pokazala je da uključivanje orašastih plodova i srodnih prehrambenih antioksidanasa (poput polifenola i vitamina E) u prehranu pomaže u prevenciji primarnih kardiovaskularnih bolesti.

U našem je istraživanju nakon trotjednoga dijetetskog protokola koncentracija vitamina E u serumu ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja statistički značajno porasla prosječno za 12,7 %, dok se u kontrolnoj skupini čak i neznatno smanjila, ali ne statistički značajno (2 %) nakon konzumacije običnih jaja. S obzirom na značajnu razliku između skupina, može se zaključiti da se konzumacijom jaja obogaćenih vitaminom E može uspješno povisiti njegova razina u serumu. Ovi rezultati bili su očekivani, s obzirom na to da je udio vitamina E u Nutri 4 jajima bio gotovo dvostruko veći nego u običnim jajima. Konzumacijom običnih jaja ispitanici u kontrolnoj skupini pokrili su 11,9 % dnevnih potreba, dok su ispitanici Nutri 4 skupine unosili 22,9 % dnevnih potreba organizma za vitaminom E. Statistički značajno povećanje koncentracije vitamina E u serumu ispitanika koji su također tri tjedna konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA-om, vitaminom E, selenom i luteinom utvrđeno je i u istraživanju Šušnjare i sur. (2022.), s tim da su u njihovom ispitivanju sudjelovali mladi zdravi ispitanici (198). Povećanje koncentracije vitamina E u serumu ispitanika koji su konzumirali hranu bogatom vitaminom E ili suplemente s vitaminom E utvrđeno je i u istraživanjima Zhao i sur. (2014.) i Hodisa i sur. (2002.) (189, 190). Trenutna istraživanja potvrđuju obećavajuće pretkliničke učinke vitamina E na veličinu infarkta i očuvanje srčane funkcije, ali u uvjetima u kojima su razine vitamina E u plazmi niske (akutni srčani ishemijski događaj i tijekom reperfuzije). Uspjeh terapije vitaminom E potencijalno bi se mogao značajno poboljšati liječenjem bolesnika u akutnoj situaciji s nedostatakom vitamina E (197).

Selen je važan nutritivni element koji modulira ekspresiju adhezijskih molekula na endotelnim stanicama izazvanu citokinima. Stoga nedostatak selena povećava adheziju neutrofila na endotelne stanice i potiče razvoj upalnoga procesa (191, 192). Također pokazuje zaštitne učinke protiv ishemije, tj. reperfuzijske ozljede (193–196), smanjenjem razine slobodnih radikala kisika (206). U studiji Bayira i sur. (2013.), koncentracije selena bile su niže u bolesnika s AKS-om nego u zdravih ispitanika, što ukazuje na to da niske razine selena mogu biti jedan od čimbenika rizika za razvoj AKS-a (207). S obzirom na preporučeni dnevni unos selena od 55 µg za odrasle osobe, konzumacijom tri obična jaja dnevno u našem istraživanju pokriveno je 98,2 %, a konzumacijom Nutri 4 obogaćenih jaja 125,5 % dnevnih potreba.

Budući da se dijetetski protokol provodio kroz samo tri tjedna, smatra se da tako kratkotrajni unos povećanih količina selena putem obogaćenih jaja nije mogao negativno utjecati na zdravlje ispitanika. Konzumacija jaja, bilo običnih bilo obogaćenih, je statistički značajno utjecala na koncentraciju selena u serumu ispitanika, iako je primjetan određeni porast nakon dijetetskoga protokola u obje skupine. Izmjereno je povećanje koncentracije selena u kontrolnoj skupini (sa 66,6 na 75,3 µg/L uz), kao i u Nutri 4 skupini (s 71,2 na 77,2 µg/L). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se konzumacijom hrane bogatom selenom može povećati njegova koncentracija u serumu. Slične rezultate u svom istraživanju dobili su Šušnjara i sur. (2022.) kod kojih se koncentracija selena u serumu ispitanika koji su konzumirali selenom obogaćena jaja također povećala nakon tri tjedna dijetetskoga protokola, ali to povećanje nije bilo statistički značajno i iznosilo je približno 6,2 % i u kontrolnoj i u Nutri 4 skupini (198). Također, Hustad i sur. (2022.) ispitivali su utjecaj konzumacije selenom obogaćenih proteina lososa u kapsulama i utvrdili 10 %-tno povećanje koncentracije selena u serumu ispitanika, s tom razlikom da je dnevni unos selena u njihovom istraživanju iznosio 29 % dnevnih potreba, ali je dijetetski protokol proveden kroz osam tjedana (208).

Nije bilo statistički značajne promjene u koncentraciji luteina u serumu ispitanika obje skupine nakon konzumacije jaja, iako je primjetno njegovo povećanje koje je čak bilo veće u kontrolnoj skupini u odnosu na Nutri 4 skupinu, bez obzira na činjenicu da je udio luteina u obogaćenim jajima bio gotovo šest puta veći nego u običnim jajima. Izostanak značajnijega povećanja može se objasniti relativno malim dnevnim unosom luteina u našem istraživanju, u kojemu je dnevni unos luteina putem konzumacije obogaćenih jaja bio 1,8 mg. Naime, prema nekim podacima prosječan dnevni unos luteina u odraslih osoba iznosi približno 1 - 2 mg, a pozitivan utjecaj može se očekivati tek pri unosima većim od 5 mg (199, 200).

### **6.5. Promjena aktivnosti antioksidativnih enzima, oksidativnoga stresa i antioksidativnoga kapaciteta bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom**

Glavni antioksidativni enzimi uključuju katalazu (CAT), glutation-peroksidazu (GxP) i superoksid-dismutazu (SOD). Antioksidansi su tvari koje usporavaju ili sprečavaju oksidaciju supstrata. Za zaštitu od oksidativnoga stresa, dobro organiziran sustav antioksidanasa djeluje koordinirano kako bi se odupro redoks-poremećajima u stanici (211).

SOD, GPx i CAT redom su enzimi koji igraju ulogu u neutralizaciji reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u tijelu. ROS su visoko reaktivne molekule koje mogu oštetiti stanice i tkiva, a proizvode se kao nusprodukt normalnoga staničnog metabolizma.

Aktivnost ovih antioksidativnih enzima važna je za održavanje ravnoteže ROS-a u tijelu. Kada su razine ROS-a previsoke, to može dovesti do oksidativnoga stresa, koji može oštetiti stanice i tkiva. S druge strane, kada su razine ROS-a preniske, to može utjecati na normalne stanične procese. Također je vrijedno napomenuti da, iako antioksidativni enzimi igraju važnu ulogu u neutralizaciji ROS-a, oni nisu jedini obrambeni mehanizam koji tijelo ima protiv oksidativnoga stresa. Tijelo također ima neenzimske antioksidanse, poput vitamina C i E, koji mogu pomoći neutralizirati ROS. Osim toga, stanice imaju mehanizme popravka koji mogu popraviti štetu uzrokovanu ROS-om.

Aktivnost sva tri ispitivana antioksidativna enzima u našem se istraživanju smanjila u kontrolnoj skupini nakon tri tjedna konzumacije običnih kokošnjih jaja, iako je jedino statistički značajno smanjenje utvrđeno za GPx. Opadanje razina enzima povezano je s pojačanim oksidativnim stresom uzrokovanim AKS-om. Aladaž i sur. (2021.) objasnili su smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima utjecajem akutne ishemije koja bi mogla biti povezana s povećanjem proizvodnje slobodnih radikala i odgovarajućim smanjenjem količine antioksidanasa (212). Nadalje, djelomična ili potpuna obnova protoka krvi tijekom reperfuzije dovodi do iznenadnoga masivnog povećanja koncentracije kisika što rezultira neravnotežom oksidativnih/antioksidativnih procesa s pretjeranom proizvodnjom ROS-a uzrokujući opsežna oštećenja koja mogu rezultirati čak i gubitkom kontraktilne funkcije srca i ozbiljnim oštećenjem stanica miokarda i krvarenjem miokarda (203–205). Tijekom ishemijsko-reperfuzijske ozljede endogena aktivnost SOD-a, GPx-a i CAT-e može biti nedostatna za neutralizaciju prekomjerne proizvodnje ROS-a. Smanjenje aktivnosti SOD-a može biti posljedica inhibicije enzima viškom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, smanjene proizvodnje SOD-a ili oštećenja samoga enzima, čineći bolesnika ranjivijim

od oksidativnih oštećenja zbog nakupljanja slobodnih radikala i njihovoga potencijala za pokretanje lančane reakcije. Smanjena aktivnost tih enzima može biti rezultat oštećenja nastalih tijekom stanja ishemije i reperfuzije, što pridonosi smanjenju ukupnoga antioksidativnoga obrambenog sustava (213). Pretpostavka je da se isto objašnjenje može primijeniti i na rezultate našeg istraživanja, tj. da bi akutna ishemija mogla biti povezana s povećanjem proizvodnje slobodnih radikala i odgovarajućim smanjenjem antioksidativne obrane kod ispitanika u kontrolnoj skupini, odnosno da bi smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima mogla biti posljedica njihovoga povećanog trošenja pri neutralizaciji slobodnih radikala. Također je važno napomenuti da je smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima u prethodno navedenim istraživanjima uglavnom utvrđeno u razdoblju od nekoliko sati nakon prijema pacijenta s AKS-om ili nakon provedene angiografije. Szewczyk-Golec i sur. (2017.) su utvrdili povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima dva tjedna nakon provedene angiografije bolesnika s ishemijom miokarda, a to povećanje su pripisali kompenzacijskim mehanizmima odgovora na oksidativni stres (216).

U našem istraživanju, nasuprot rezultatima ispitivanja u kontrolnoj skupini, aktivnost GPx-a i SOD-a u Nutri 4 skupini nije značajno pala nakon tri tjedna konzumacije obogaćenih nego se čak statistički značajno povećala te su utvrđene statistički značajne razlike između skupina ispitanika. Aktivnost CAT-a u Nutri 4 skupini smanjila se nakon dijetetskoga protokola, ali ne statistički značajno. Značajno veća aktivnost GPx-a i SOD-a u Nutri 4 skupini može se pripisati povećanim koncentracijama vitamina E, selena i luteina u Nutri 4 jajima, dok n-3 PUFA vjerojatno nemaju direktan utjecaj na aktivnost antioksidativnih enzima, što je potvrđeno i u istraživanju Tooranga i sur. (2016.) u kojemu se utvrdilo da se nakon konzumacije 2.7 g omega-3 kiselina dnevno kroz dva mjeseca aktivnost CAT-a, GPx-a i SOD-a nije promijenila kod ispitanika s dijagnozom dijabetesa tipa 2 (217). S druge strane, poznat je sinergijski učinak vitamina E i selena u eliminaciji lipidnih peroksida koji nastaju kao rezultat interakcije prekomjernoga ROS-a s PUFA-om. Vitamin E djeluje izravno kao antioksidans, dok je selen kofaktor enzima GPx (218). Stoga se može zaključiti da vitamin E i selen ne samo da mogu djelovati kao egzogeni antioksidansi za sprečavanje oksidativnoga oštećenja uklanjanjem slobodnih radikala i superoksida, već također mogu djelovati kao genski regulatori ekspresije endogenih antioksidativnih enzima (219).

Lutein se u različitim istraživanjima također pokazao kao dobar regulator oksidativnoga stresa jer, osim što ima antioksidativno djelovanje, povećava i ekspresiju mRNA i aktivnost SOD-a i

GPx-a, što sugerira da lutein može poboljšati aktivnost antioksidativnih enzima na razini gena (210–212).

Oksidativni stres odnosi se na neravnotežu između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i sposobnosti tijela da detoksificira te molekule ili popravi štetu koju uzrokuju. U bolesnika s AKS-om postoje dokazi koji ukazuju na promjene u oksidativnom stresu.

Pacijenti s AKS-om imaju tendenciju imati povišene razine ROS-a i markera oksidativnoga stresa, kao što su produkti lipidne peroksidacije i oštećenje DNA. Smatra se da taj povećani oksidativni stres igra ulogu u razvoju arterijskoga plaka i napredovanju AKS-a. Smanjenje oksidativnoga stresa može biti potencijalna strategija za upravljanje AKS-om i smanjenje rizika od daljnjih srčanih događaja. To se može postići intervencijama u načinu života, kao što su zdrava prehrana i redovita tjelovježba, kao i korištenjem antioksidansa i drugih lijekova.

TBARS (oksidativni stres) i FRAP (antioksidativni kapacitet) dva su biomarkera koji se obično koriste za mjerenje oksidativnoga stresa u bolesnika s AKS-om. Mjerenje razina TBARS-a i FRAP-a u pacijenata s AKS-om može biti korisno za procjenu razine oksidativnoga stresa i usmjeravanje odluka o liječenju. Smanjenje oksidativnoga stresa kroz intervencije u načinu života i korištenje antioksidansa i drugih lijekova može biti potencijalna strategija za upravljanje AKS-om i smanjenje rizika od daljnjih srčanih događaja.

TBARS su skupina spojeva koji nastaju kada u tijelu dođe do peroksidacije lipida. Peroksidacija lipida je proces u kojem reaktivne kisikove vrste (ROS) napadaju i oštećuju molekule lipida, što dovodi do stvaranja ovih spojeva. Razina TBARS-a u tijelu koristi se kao pokazatelj stupnja peroksidacije lipida i oksidativnoga stresa. FRAP je mjera sposobnosti plazme (tekućega dijela krvi) da reducira feri željezo ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u fero željezo ( $\text{Fe}^{2+}$ ). To smanjenje posredovano je antioksidansima u plazmi, a FRAP vrijednost odražava ukupan antioksidativni kapacitet plazme. Niža vrijednost FRAP-a ukazuje na manji antioksidativni kapacitet i višu razinu oksidativnoga stresa. Bolesnici s AKS-om imaju tendenciju imati povišene razine TBARS-a i snižene vrijednosti FRAP-a, što ukazuje na povećanje oksidativnoga stresa. Smatra se da to povećanje oksidativnoga stresa igra ulogu u razvoju arterijskoga plaka i napredovanju AKS-a.

Suprotno očekivanju, rezultati našega istraživanja pokazali su da nije bilo statistički značajnih razlika niti unutar, niti između skupina ispitanika u pogledu TBARS-a (mjera oksidativnoga stresa) i FRAP-a (mjera antioksidativnoga kapaciteta) u bolesnika s AKS-om. Međutim, iako nije bilo statistički značajnih promjena u kontrolnoj skupini vidljivo je povećanje FRAP-a (0,02 mmol Trolox/L), u odnosu na Nutri 4 skupini (0,01 mmol Trolox/L) nakon dijetetskoga



protokola. Povećanje oksidativnoga stresa pogoduje progresiji ateroskleroze i pozitivno je povezano s AKS-om. Smatra se da konzumacija antioksidativnih dodataka doprinosi prevenciji i liječenju bolesti putem već poznatih mehanizama. Učinci konzumacije funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja na parametre oksidativnoga stresa u primarnoj i sekundarnoj kardiovaskularnoj prevenciji su obećavajući, ali ostaju nejasni, posebice u sekundarnoj prevenciji. Rezultati dobiveni u ovoj studiji bili su u skladu s istraživanjem Šušnjare i sur. (2022.) u kojem također nije bilo promjena u parametrima TBAR-a i FRAP-a niti u kontrolnoj, niti u skupini koja je konzumirala jaja obogaćena n-3 PUFA-om, vitaminom E, selenom i luteinom (198). Ovi rezultati upućuju na potrebu daljnjih istraživanja u kojima bi se trebao ispitati utjecaj koncentracije antioksidanasa u obogaćenim jajima, korištene doze, trajanja intervencije i karakteristika ispitivane populacije.

#### **6.6. Promjene citokina i kemokina u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom**

Studije su pokazale da pacijenti s AKS-om imaju tendenciju imati povišene razine proupalnih citokina i smanjene razine protuupalnih citokina u serumu. Smatra se da ta neravnoteža između pro- i protuupalnih citokina doprinosi upali i oksidativnom stresu koji se javlja tijekom AKS-a i može igrati ulogu u razvoju arterijskoga plaka i progresiji AKS-a. Usmjeravanje te neravnoteže korištenjem lijekova koji moduliraju razine citokina ili intervencijama u načinu života poput tjelovježbe i zdrave prehrane može biti potencijalna strategija za upravljanje AKS-om i smanjenje rizika od daljnjih srčanih događaja. Neki primjeri proupalnih citokina uključuju interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Ti citokini pomažu regrutirati imunološke stanice na mjesto upale i stimuliraju proizvodnju drugih imunoloških molekula, poput enzima i oksidativnih radikala. S druge strane, protuupalni citokini su molekule koje pomažu u inhibiciji ili smanjenju upale. Neki primjeri protuupalnih citokina uključuju interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) i interleukin-13 (IL-13). Ti citokini pomažu u smanjenju imunološkoga odgovora i potiču rješavanje upale. I proupalni i protuupalni citokini važni su za održavanje imunološke homeostaze i zaštitu tijela od infekcija i drugih prijetnji. Međutim, neravnoteža između pro- i protuupalnih citokina može pridonijeti razvoju kronične upale i drugih bolesti.

Nije bilo značajne razlike u izmjeranim koncentracijama citokina i kemokina u bolesnika s AKS-om nakon konzumiranja obogaćenih kokošnjih jaja (obogaćenih n3-PUFA-om, vitaminom

E, selenom i luteinom), u usporedbi s početnim mjerenjima. Koncentracije citokina i kemokina nisu se značajno razlikovale između kontrolne i Nutri 4 skupine nakon tri tjedna dijetetskoga protokola.

S obzirom na dobivene rezultate, može se smatrati da konzumacija funkcionalne hrane (kao što su kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om, vitaminom E, selenom i luteinom u ovoj studiji) u bolesnika s AKS-om nije prikladna kao zamjena za farmakološku terapiju, ali može imati dodatan povoljan utjecaj na kardiovaskularni sustav. Povoljan utjecaj n-3 PUFA-e na smanjenje proupalnih citokina potvrdilo je istraživanje Breškić-Ćurić i sur. (2021.) koje je ispitivalo učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om na pro- i protuupalne citokine u bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću, tj. u bolesnika s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom. Istraživanjem je dokazano da se koncentracija IL-6 u serumu značajno smanjila u podskupini bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, dok u podskupini ispitanika s kroničnom koronarnom bolešću nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama pro- niti protuupalnih citokina nakon dijetetskoga protokola. Gledajući ukupnu ispitivanu populaciju (ispitanici s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom), koncentracija IL-1a u serumu značajno se smanjila nakon konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA-om u usporedbi s početnim mjerenjima (98).

Ujedno, prema studiji Stupin i sur. (2020.) koja je istraživala utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om na upalni odgovor kod mladih zdravih osoba, pokazalo se da se koncentracija interferona- $\gamma$  (proupalni citokin) značajno smanjila, a koncentracija interleukina-10 (protuupalni citokin) značajno porasla nakon dijetetskoga protokola u n-3 PUFA skupini (88).

Prema Šušnjara i sur. (2022.) provedena su daljnja istraživanja koja su uključivala, osim n-3 PUFA-e, dodatno i selen, vitamin E i lutein u kokošnjim jajima i ispitivan je njihovoj utjecaj na upalni odgovor kod mladih zdravih ispitanika, koji nisu imali prateće komorbiditete. Istraživanjem je dokazano da ispitanici koji su konzumirali jaja obogaćena s navedena četiri mikronutrijenta imaju snižene razine proupalnoga interleukina 17A (IL-17A) u serumu nakon 3. tjedna konzumacije navedenih funkcionalno obogaćenih jaja, dok takve promjene nisu pokazane u kontrolnoj skupini (198).

Nekoliko je studija pokazalo da suplementacija omega-3 masnim kiselinama može smanjiti upalu i proizvodnju citokina u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Na primjer, sustavni pregled i meta-analiza 17 randomiziranih kontroliranih ispitivanja otkrili su da je

Dodatak omega-3 masnih kiselina povezan sa značajnim smanjenjem razina nekoliko proupalnih citokina, uključujući interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 i tumor faktor nekroze (TNF)- $\alpha$ , u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Druge studije su također otkrile da dodatak omega-3 može poboljšati kliničke ishode kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom, uključujući smanjenje rizika od ponovnoga infarkta miokarda i smrti.

Iako su istraživanja pokazala značajan učinak n-3 PUFA-e na smanjenje upalnoga odgovora i promjenu protuupalnih citokina, razlog tomu je što su istraživanja trajala puno duže u odnosu na tri tjedna i konzumiran je veći udio n-3 PUFA-e u odnosu na naše istraživanje (223).

Važno je napomenuti da iako se pokazalo da n-3PUFA-e imaju protuupalne učinke, one možda neće biti učinkovite kod svih pojedinaca i ne smiju se koristiti kao zamjena za druge tretmane koje je propisao liječnik. S obzirom na to, dosadašnja su istraživanja pokazala da je liječenje atorvastatinom u usporedbi sa samom preporukom prehrane rezultiralo značajnim smanjenjem TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 i CRP-a bolesnika s hiperkolesterolemijom (224). Stoga, bilo koja dobrobit od prehrane, uključujući unos funkcionalne hrane (npr. kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om, vitaminom E, selenom i luteinom u ovoj studiji), nije zamišljena kao zamjena za farmakološku terapiju, već kao sredstvo izazivanja dodatnoga blagotvornog učinka na kardiovaskularni sustav.

Dodatno, brojnim istraživanjima pokazano je da n-3 PUFA smanjuju upalni odgovor i u autoimunim bolestima, kao što je reumatoidni artritis, ali naravno sama prehrana obogaćena n-3 PUFA-om nije dovoljna za liječenje navedene bolesti te ne može zamijeniti ulogu biološke terapije u liječenju autoimunih bolesti (215–217).

Vitamin E je vrsta vitamina topljivih u mastima koji imaju antioksidativna svojstva i mogu pomoći u zaštiti stanica od oksidativnoga stresa. Neka su istraživanja pokazala da vitamin E može imati protuupalne učinke i smanjiti proizvodnju proupalnih citokina. Na primjer, studija objavljena u časopisu *Journal of Research in Medical Sciences* otkrila je da je suplementacija vitaminom E smanjila proizvodnju faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) i interleukina-6 (IL-6) izazvanu intervalnim treningom visokoga intenziteta (HIIT) (228).

Međutim, učinci vitamina E na proizvodnju citokina mogu varirati ovisno o nizu čimbenika, uključujući specifičnu vrstu i dozu vitamina E koja se koristi, specifične citokine koji se mjere te cjelokupno zdravlje i prehranu sudionika studije. Potrebno je više istraživanja kako bi se u potpunosti razumjeli potencijalni učinci vitamina E na proizvodnju citokina.

Ono što je posebno važno istaknuti, i što je potkrijepila studija Meydani i sur. (1994.), to je da kratkoročna primjena prehrane obogaćene vitaminom E (800 mg/dan) nema neželjene nuspojave na zdravlje kod starijih osoba (229). Slično tome, Hodis i sur. (2002.) pokazali su da dodatak  $\alpha$ -tokoferola značajno povećava razinu vitamina E u plazmi u zdravih odraslih osoba s umjereno povišenim razinama LDL-kolesterola (200).

Prema rezultatima ovog istraživanja, nije pokazan štetan učinak vitamina E na zdravlje bolesnika koji su preboljeli akutni koronarni sindrom.

Selen je element u tragovima koji je neophodan za pravilno funkcioniranje imunološkoga sustava. Potreban je za sintezu selenoproteina, koji imaju niz važnih uloga u tijelu, uključujući njihovo djelovanje kao antioksidansa i pomoć u regulaciji imunološkoga odgovora. Neka su istraživanja pokazala da selen može utjecati na proizvodnju citokina, signalnih molekula koje igraju ključnu ulogu u imunološkom odgovoru (230). Na primjer, jedna je studija istraživala utjecaj koncentracije selena u serumu u bolesnika sa stabilnom anginom pektoris i akutnim koronarnim sindromom. Istraživanjem je potvrđeno da suplementacija selenom ima zaštitnu ulogu u borbi protiv kardiovaskularnih bolesti (KVB) (207).

Druge su studije otkrile da populacije s niskim unosom selena imaju 2 - 3 puta veći rizik od ishemijske srčane bolesti. Istraživanjem se određivala cirkulirajuća razina IL-6, TNF- $\alpha$  i selena u bolesnika s kroničnom koronarnom arterijskom bolešću (CCAD), akutnim infarktom miokarda (AMI) i kod zdravih osoba. Zaključak studije je da bolesnici koji boluju od AMI-a pokazuju niže koncentracije selena u plazmi i više koncentracije proupalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 (231). Međutim, potrebno je više istraživanja kako bi se u potpunosti razumio odnos između selena i citokina.

Prema studiji Xu i sur. (2013.) dokazano je da povećanje luteina u serumu nakon suplementacije može smanjiti upalne citokine i regulirati serumske lipide, koji mogu igrati važnu ulogu u ranoj aterosklerozi (232).

### **6.7. Promjene u proteinskom izražaju enzima važnih u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti (eNOS, iNOS, nNOS) u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom**

n-3 PUFA masne kiseline imaju antioksidativna svojstva koja sprečavaju endotelnu disfunkciju, tj. smanjenje sposobnosti krvnih žila da se šire zbog nedostatka dušikovoga oksida (NO). NO nije samo vazodilatator, već ima i inhibitorne učinke na agregaciju trombocita, adheziju

leukocita i proliferaciju/migraciju glatkih mišićnih stanica. Ta ga svojstva čine važnim u patofiziologiji kardiovaskularnih poremećaja. NO proizvodi enzim dušikov oksid sintaza (NOS) iz metabolizma L-arginina. Postoje tri izoforme NOS-a: neuronski NOS (nNOS), inducibilni NOS (iNOS) i endotelni NOS (eNOS). eNOS se nalazi isključivo u endotelu, dok se iNOS može eksprimirati u različitim stanicama, uključujući stanice glatkih mišića, kada je stimuliran citokinima kao što je interleukin-1 (233).

Usljed endotelne disfunkcije dolazi do povećanoga rizika od kardiovaskularnih bolesti. Jedan od ključnih mehanizama kojima endotel regulira protok krvi je proizvodnja dušikovoga oksida (NO) pomoću enzima eNOS (endotelna sintaza dušikovoga oksida). U AKS-u i drugim kardiovaskularnim bolestima, sposobnost endotela za proizvodnju NO-a je smanjena, što rezultira smanjenim protokom krvi i povećanom agregacijom trombocita, adhezijom leukocita i proliferacijom glatkih mišićnih stanica. Ova disfunkcija eNOS-a jedan je od glavnih razloga za AKS, koji može dovesti do infarkta miokarda i smrti. Studije su pokazale da suplementacija n-3 PUFA može poboljšati funkciju eNOS-a i ublažiti endotelnu disfunkciju, što može smanjiti rizik od AKS-a (234).

NO je ključna molekula za širenje krvnih žila i sprečavanje upale i nakupljanja plaka u arterijama. n-3 PUFA mogu povećati proizvodnju NO-a reguliranjem sastava kaveola u endotelnim stanicama, koje su uključene u signalne putove koji kontroliraju dilataciju krvnih žila. Točnije, omega-3 masne kiseline EPA (eikosapentaenoična kiselina) i DHA (dokosaheksaenoična kiselina) mogu aktivirati enzime, kao što je eNOS, koji proizvode NO, a DHA također može aktivirati signalne putove koji dovode do povećane aktivnosti eNOS-a i proizvodnje NO-a. Sve u svemu, n-3 PUFA imaju blagotvorne učinke na zdravlje krvnih žila povećavajući dostupnost NO-a (235).

Nije bilo značajne razlike u izmjeranim koncentracijama enzima (eNOS, iNOS, nNOS) u bolesnika s AKS-om nakon konzumiranja obogaćenih kokošnjih jaja (obogaćenih n-3 PUFA-om, vitaminom E, selenom i luteinom), u usporedbi s početnim mjerenjima. Koncentracije enzima nisu se značajno razlikovale između kontrolne i Nutri 4 skupine nakon tri tjedna dijetetskoga protokola. S obzirom na dobivene rezultate, može se smatrati da konzumacija funkcionalne hrane (kao što su kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om, vitaminom E, selenom i luteinom u ovoj studiji) u bolesnika s AKS-om nije namijenjena biti zamjena za farmakološku terapiju, ali može imati dodatni povoljan utjecaj na kardiovaskularni sustav.

Prema istraživanjima dokazano je da n-3 PUFA mogu utjecati na organizam djelujući na aktivnost enzima endotelne sintaze dušikovoga oksida (eNOS). eNOS je odgovoran za sintezu dušikovoga oksida (NO), koji ima ključnu ulogu u regulaciji krvnoga tlaka i krvožilnoga sustava. Neka su istraživanja pokazala da n-3 PUFA mogu povećati aktivnost eNOS-a, što dovodi do povećane proizvodnje NO-a i poboljšane vaskularne funkcije, s obzirom na to da je NO glavni čimbenik endotela odgovoran za vazodilataciju krvnih žila. Na primjer, studija Zanetti i suradnika otkrila je da suplementacija n-3 PUFA-e povećava aktivnost eNOS-a i poboljšava funkciju endotela kod ljudi s hipertenzijom i kroničnom bubrežnom bolesti (236). Međutim, potrebno je više istraživanja kako bi se u potpunosti razumio odnos između n-3 PUFA-e i eNOS-a.

Neka su istraživanja pokazala da n-3 polinezasićene masne kiseline (PUFA), također poznate kao omega-3 masne kiseline, mogu utjecati na aktivnost inducibilne sintaze dušikovoga oksida (iNOS). iNOS je enzim koji sintetizira dušikov oksid (NO), koji ima niz važnih uloga u tijelu, uključujući djelovanje kao signalne molekule uz pomoć u regulaciji krvnoga tlaka i imunološke funkcije. Neka su istraživanja pokazala da n-3 PUFA mogu povećati aktivnost iNOS-a i proizvodnju NO-a, dok druge studije nisu otkrile nikakav učinak. Na primjer, studija Barger i sur. (2003.) sugerira da suplementacija n-3 PUFA povećava aktivnost iNOS-a i proizvodnju NO-a u aorti štakora (237). Studija Karatas i sur. (2011.) sugerira da n-3 PUFA povećavaju ekspresiju iNOS-a i proizvodnju NO-a u endotelnim stanicama ljudske aorte (228, 229).

Postoje neki dokazi koji upućuju na to da n-3 PUFA može utjecati na aktivnost neuronske sintaze dušikovoga oksida (nNOS). nNOS je enzim koji sintetizira dušikov oksid (NO), koji ima niz važnih uloga u tijelu, uključujući njegovo djelovanje kao signalne molekule i pomoć u regulaciji krvnoga tlaka i imunološke funkcije. Duan i sur. (2006.) studija otkrila je da suplementacija n-3 PUFA-e povećava aktivnost nNOS-a i proizvodnju NO-a u mozgu miševa (240). Studija Chirumbolo i Bjelaković (2008.) otkrila je da n-3 PUFA-e povećavaju ekspresiju nNOS-a i proizvodnju NO-a u uzgojenim neuronima hipokampusa štakora (241).

#### **6.8. Promjene u PORH-u, ACh-u i SNP-u u bolesnika s AKS-om nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3PUFA-om, luteinom, vitaminom E i selenom**

U bolesnika s AKS-om mikrovaskularna reaktivnost odnosi se na sposobnost malih krvnih žila unutar srčanoga mišića (mikrožila) da se prošire ili suze kao odgovor na promjene u protoku krvi. To je važan aspekt održavanja pravilnoga protoka krvi u srčanom mišiću i osiguravanja

odgovarajuće opskrbe kisikom i hranjivim tvarima. Postoji nekoliko čimbenika koji mogu utjecati na mikrovaskularnu reaktivnost u bolesnika s AKS-om, uključujući prisutnost upale, oksidativni stres i oštećenje samih mikrožila. U nekim slučajevima mikrovaskularna disfunkcija može pridonijeti razvoju AKS-a, jer može dovesti do smanjenoga protoka krvi u srčani mišić i potencijalno potaknuti stvaranje krvnoga ugruška. Postoje različite mogućnosti liječenja koje se mogu koristiti za poboljšanje mikrovaskularne reaktivnosti u bolesnika s AKS-om, uključujući lijekove koji pomažu smanjiti upalu, pospješiti protok krvi i zaštititi mikrožile. Osim toga, modifikacije načina života, kao što su prestanak pušenja, redovito vježbanje i održavanje zdrave prehrane također mogu pomoći u poboljšanju mikrovaskularne funkcije i smanjiti rizik od AKS-a.

LDF je neinvazivna tehnika koja se koristi za mjerenje protoka krvi u malim žilama kao što su mikrožile. Parametri PORH, ACh ID, i SNP ID često se koriste u studijama LDF-a za procjenu mikrovaskularne funkcije (179). PORH je mjera povećanja protoka krvi do kojega dolazi nakon privremene okluzije protoka krvi, ACh je kemikalija koja uzrokuje vazodilataciju (širenje krvnih žila) i koristi se za stimulaciju protoka krvi u studijama LDF-a, a SNP je lijek koji se koristi u LDF studijama za stimulaciju vazodilatacije i povećanje protoka krvi.

Budući da je mikrovaskularna funkcija kože oštećena kod većine bolesnika s AKS-om, ispitivanjem post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) i lokalne toplinske hiperemije mogu se dobiti reprezentativni podaci o stanju mikrovaskularne funkcije u bolesnika s AKS-om (242). Stoga je LDF koristan alat za procjenu mikrovaskularne reaktivnosti kada se istražuju nove strategije liječenja koje bi mogle utjecati na vaskularnu funkciju u bolesnika nakon akutnoga koronarnog sindroma.

Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da konzumacija funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja značajno poboljšava vazodilataciju kao odgovor na PORH, ACh ID i SNP ID između prvoga i drugog mjerenja u bolesnika s AKS-om, te je učinak n-3 PUFA-e, selena, vitamina E i luteina na mikrocirkulaciju ispitanika vidljiv u Nutri 4 skupini.

Nakon dijetetskoga protokola vrijednosti okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) su se smanjile u kontrolnoj skupini, ali ne statistički značajno. Dok je u Nutri 4 skupini došlo je značajnog porasta vrijednosti PORH-a nakon dijetetskoga protokola. Međutim postoji statistički značajna razlika u trendu PORH vrijednosti među ispitivanim skupinama. Dijetetski protokol smanjio je vrijednosti PORH-a u kontrolnoj skupini, a povećao Nutri 4 skupini. Uspoređujući apsolutne promjene PORH-a ispitivanih skupina prije i nakon dijetetskoga

protokola, vidljivo je da među njima ima statistički značajne razlike. U kontrolnoj skupini vrijednosti PORH-a padaju, a u Nutri 4 skupini rastu nakon dijetetskoga protokola.

Vrijednosti acetilkolinom inducirane dilatacije (ACh ID) su se statistički značajno mijenjale unutar Nutri 4 skupine, ali ne i unutar kontrolne skupine. Također postoji razlika u trendu ACh ID vrijednosti među skupinama. Dijetetski protokol smanjio je vrijednosti ACh ID-a u kontrolnoj skupini, a povećao ih u Nutri 4 skupini. Uspoređujući apsolutne promjene ACh ID-a ispitivanih skupina prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima postoji statistički značajna razlika. U kontrolnoj skupini vrijednosti ACh ID-a padaju, a u Nutri 4 skupini rastu nakon dijetetskoga protokola.

Vrijednosti natrijevim nitroprusidom inducirane dilatacije (SNP ID) nisu se statistički značajno mijenjale unutar kontrolne skupine, ali jesu unutar Nutri4 skupine. Postoji razlika u trendu SNP ID vrijednosti među skupinama, pri čemu je dijetetski protokol smanjio vrijednosti SNP ID-a u kontrolnoj skupini, a povećao u Nutri 4 skupini. Uspoređujući apsolutne promjene SNP ID-a ispitivanih skupina prije i nakon dijetetskoga protokola, vidljivo je da među njima nema statistički značajne razlike.

Poboljšanje mikrovaskularne funkcije u Nutri 4 skupini može se pripisati konzumaciji obogaćenih Nutri 4 jaja. Jedno od mogućih objašnjenja temelji se na značajno većoj aktivnosti SOD-a i GPx-a u skupini koja je konzumirala obogaćena jaja u odnosu na kontrolnu skupinu jer je poznat njihov pozitivan učinak na oksidativni stres, ali i na ublažavanje posljedica uzrokovanih akutnim koronarnim sindromom. Nadalje, moguć je i direktan utjecaj antioksidanasa vitamina E i luteina. Tako je u istraživanju Barić i sur. (2020.) utvrđeno da unos suplemenata vitamina E može spriječiti negativan utjecaj dijetetskoga protokola s povećanim unosom soli na mikrovaskularnu funkciju koji se očitovao u nepromijenjenim vrijednostima PORH-a i ACh-om inducirane dilatacije kod ispitanika koji su uz povećanu količinu soli konzumirali i supleme vitamina E i C, dok su se u kontrolnoj ispitanika, koji su bili samo na dijeti s povećanom količinom soli, izmjerene vrijednosti PORH-a i ACh-om inducirane dilatacije značajno smanjile nakon dijetalnoga protokola (243). Poboljšanje mikrovaskularne funkcije u ispitanika koji su konzumirali obogaćena kokošja jaja može se objasniti i povećanom koncentracijom n-3 PUFA u Nutri 4 jajima. Stupin i sur. (2018. i 2020.) su u svojim istraživanjima dobili slične rezultate, gdje su izmjerene vrijednosti PORH-a i ACh-om inducirane dilatacije kod mladih zdravih pojedinaca bile značajno povećane nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA (88, 234). Istraživanje Stirban i sur. (2010.) pokazalo je da povećan unos suplemenata n-3 PUFA (eikosapentaenske kiseline (EPA) i dokozaheksaenske



kiseline (DHA)) poboljšava postprandijalnu reaktivnu hiperemiju u mikrocirkulaciji šake kod osoba s dijabetesom tipa 2 (245), a istraživanje Vasileva i sur. (2009.) pokazalo je da se dnevnom konzumacijom 1,5 mg n-3 PUFA tijekom jednoga mjeseca poboljšava endotelna funkcija i mikrocirkulacija (mjereno LDF-om) (246).

S obzirom na rezultate dobivene u ovom istraživanju može se zaključiti da konzumacija obogaćenih kokošnjih Nutri 4 jaja značajno poboljšava vazodilataciju kao odgovor na PORH, natrijevim nitroprusidom induciranu dilataciju i ACh-om induciranu dilataciju u bolesnika s AKS-om, odnosno da unos n-3 PUFA, selena i luteina i vitamina E putem obogaćenih kokošnjih jaja ima značajan utjecaj na poboljšanje mikrocirkulacije ispitanika.

## 7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja moguće je zaključiti sljedeće:

- ✓ Dijeta koja uključuje konzumaciju kokošnjih jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama (n-3 PUFA), luteinom, vitaminom E i selenom tijekom trojednog dijetetskog protokola povećava koncentraciju vitamina E i seleno u serumu ispitanika za 12,7 % odnosno 8,6 %.
- ✓ Nije zabilježen negativan utjecaj ove dijetete na biokemijske vrijednosti u krvi, uključujući jetrene enzime, glukozu, ureu, kreatinin, kalij, kalcij i fibrinogen.
- ✓ Ova dijeta ima pozitivan učinak na mikrovaskularnu reaktivnost (endotelnu funkciju) kroz poboljšanje post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) i dilatacije izazvane acetilkolinom (Ach ID).
- ✓ Učinak ove dijetete također uključuje poboljšanje lipidnog profila, bez negativnog učinka na oksidativni stres te upalni odgovor u bolesnika s AKS-om.
- ✓ Ovakav način prehrane također pozitivno utječe na vrijednosti nNOS i iNOS kod bolesnika s AKS-om (smanjujući ih).

## 8. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Ispitati utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom na pokazatelje mikrovaskularne funkcije, oksidativnog stresa i razinu upalnih medijatora u bolesnika nakon akutnog koronarnog sindroma (AKS) – randomizirani kontrolirani pokus.

**ISPITANICI I METODE:** Odrasli ispitanici oba spola s AKS-om randomizirani su u kontrolnu skupinu (obična kokošja jaja) i Nutri4 skupinu (funkcionalno obogaćena jaja) i podvrgnuti trojtjednom nadziranom dijetetskom protokolu. Prije i nakon provedene dijeta, pomoću laser doppler metode mjerenja krvnog protoka u mikrocirkulaciji kože određene su promjene vrijednosti post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH), acetilkolinom inducirane dilatacije (Ach ID) i natrijevim nitroprusidom inducirane dilatacije (SNP ID), što su pokazatelji mikrovaskularne funkcije. Nadalje, utvrđena je aktivnost antioksidativnih enzima CAT, GPx i SOD, promjena biomarkera oksidativnoga stresa i antioksidativnoga kapaciteta, razina pro- i protuupalnih citokina i kemokina, lipidni profil te proteinski izražaj enzima eNOS, iNOS, i nNOS, koji su važni u mehanizmima mikrovaskularne reaktivnosti u bolesnika s AKS-om.

**REZULTATI:** Nakon protokola konzumacije Nutri 4 jaja zabilježene su značajno niže razine LDL kolesterola u krvi i povišene razine triglicerida, dok su razine ukupnog kolesterola ostale unutar referentnih vrijednosti. Dijetetski protokol također je povećao razinu vitamina E u serumu za 12,7 % i razinu selena za 8,6 %, te je imao pozitivan učinak na mikrovaskularnu reaktivnost (endotelnu funkciju), što je prikazano značajno poboljšanom post-okluzivnom reaktivnom hiperemijom i dilatacijom izazvanom acetilkolinom, uz značajno niže razine arterijskog tlaka i pulsa. Dijetetski protokol nije značajno utjecao na aktivnost CAT-a, GPx-a i SOD-a, niti je povećao vrijednosti TBARS-a ili FRAP-a. Također, nije značajno utjecao na razine TNF- $\alpha$ , TGF-1 $\beta$ , C3a, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 ili MCP-1. Međutim, konzumacija Nutri 4 jaja dovela je do smanjenja razina nNOS-a i iNOS-a, dok su se razine eNOS-a povećale, iako ne značajno, u bolesnika s AKS-om.

**ZAKLJUČAK:** Prehrambeni protokol koji uključuje konzumaciju Nutri 4 jaja obogaćenih n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom imao je pozitivan učinak na mikrovaskularnu funkciju, bez negativnog utjecaja na oksidativni stres i neznajno sniženje razine proupalnih medijatora u bolesnika s AKS-om.

**Ključne riječi:** akutni koronarni sindrom (AKS), mikrovaskularna funkcija, Nutri 4 kokošja jaja (obogaćena s n-3 PUFA, luteinom, vitaminom E i selenom).

## 9. SUMMARY

**OBJECTIVE OF THE RESEARCH:** To examine the influence of hen eggs consumption, enriched with omega-3 fatty acids, lutein, vitamin E and selenium on indicators of microvascular function, oxidative stress and the level of inflammatory mediators in patients after acute coronary syndrome (ACS) - a randomized controlled trial.

**SUBJECTS AND METHODS:** Adult subjects of both sexes with ACS were randomized into a control group (regular hen eggs) and a Nutri4 group (functionally enriched eggs) and underwent a three-week supervised dietary protocol. Before and after the diet, changes in the values of post-occlusive reactive hyperemia (PORH), acetylcholine-induced dilation (Ach ID) and sodium nitroprusside-induced dilation (SNP ID) were determined using the laser doppler blood flow measurement method in the skin microcirculation, which are indicators of microvascular functions. Furthermore, the activity of the antioxidant enzymes CAT, GPx and SOD, changes in biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity, levels of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines, lipid profile and protein expression of the enzymes eNOS, iNOS, and nNOS were assessed, which are important in the mechanisms of microvascular reactivity in patients with ACS.

**RESULTS:** After the Nutri4 consumption protocol, significantly lower blood cholesterol and higher triglyceride levels were recorded, while the levels of total cholesterol remained within the reference values. The dietary protocol also increased serum vitamin E levels by 12.7% and selenium levels by 8.6%, and had a positive effect on microvascular reactivity, as shown by significantly PORH and Ach ID, with significantly lower levels of arterial pressure and heart rate. The dietary protocol did not significantly affect the activity of CAT, GPx and SOD, nor did it increase the values of TBARS or FRAP. Also, it did not significantly affect the levels of TNF-alpha, TGF-1 $\beta$ , C3a, IFN-gamma, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 or MCP-1. However, Nutri4 eggs consumption led to a decrease in the levels of nNOS and iNOS, while the levels of eNOS increased, although not significantly, in patients with ACS.

**CONCLUSION:** In patients with ACS, consuming Nutri 4 eggs enriched with n-3 PUFA, lutein, vitamin E, and selenium as part of their dietary protocol had a positive impact on microvascular function while not causing any negative effects on oxidative stress. Additionally, there was a non-significant reduction in the level of pro-inflammatory mediators.

**Keywords:** acute coronary syndrome (ACS), microvascular function, Nutri 4 chicken eggs (enriched with n-3 PUFA, lutein, vitamin E, and selenium).

**10. LITERATURA**

1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70:1–25.
2. Guedeney P, Aboyans V, Dalon F, Oksen D, Belhassen M, Nolin M et al. Epidemiology, treatment patterns and outcomes in patients with coronary or lower extremity artery disease in France. *Arch Cardiovasc Dis.* 2019;112:670–9.
3. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Bauersachs J, Dendale P, Edvardsen T et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J.* 2021;42:1289–367.
4. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2020;41:407–77.
5. Vogel B, Claessen BE, Arnold S V., Chan D, Cohen DJ, Giannitsis E et al. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5:39.
6. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet; 2021. Dostupno na: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Pristupljeno: 22.11.2022. [Internet].
7. Kralj V, Čukelj P. Kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj u 2019. godini. Kralj V, editor. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2022.
8. Mozaffarian D, Wilson PWF, Kannel WB. Beyond Established and Novel Risk Factors. *Circulation.* 2008;117:3031–8.
9. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:27–32.
10. Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial dysfunction, inflammation and coronary artery disease: Potential biomarkers and promising therapeutical approaches. *Int J Mol Sci.* 2021;22:3850.
11. Ma X, Liu S, Li T, Yuan H. Intensive statin treatment ameliorate the Th17/Treg functional imbalance in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome underwent percutaneous coronary intervention. *Clin Cardiol.* 2020;43:379–85.
12. Gager GM, Biesinger B, Hofer F, Winter MP, Hengstenberg C, Jilma B et al. Interleukin-6 level is a powerful predictor of long-term cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome. *Vascul Pharmacol.* 2020;135:106806.
13. Piccioni A, Valletta F, Zanza C, Esperide A, Franceschi F. Novel biomarkers to assess the risk for acute coronary syndrome: beyond troponins. *Intern Emerg Med.* 2020;15:1193–9.
14. Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction: Clinical Significance and Preventive Non-Pharmacological Therapeutic Strategies. *Curr Pharm Des.* 2005;9:2385–402.
15. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M et al. Endotelna

- funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn.* 2012;44:135–46.
16. Reriani MK, Lerman LO, Lerman A. Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. *Biomark Med.* 2010;4:351–60.
  17. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:168–75.
  18. Santos-Gallego CG, Picatoste B, Badimón JJ. Pathophysiology of acute coronary syndrome. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16.
  19. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:969–79.
  20. Ferreira VL, Borba HH, de Bonetti AF, Leonart LP, Pontarolo R. Cytokines and Interferons: Types and Functions. In: Khan WA, editor. *Autoantibodies and Cytokines.* London: IntechOpen; 2019.
  21. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45:27–37.
  22. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: A comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008;79:360–76.
  23. Afsar B, Kuwabara M, Ortiz A, Yerlikaya A, Siritopol D, Covic A et al. Salt intake and immunity. *Hypertension.* 2018;72:19–23.
  24. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system.* Elsevier; 2019.
  25. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018;9:7204.
  26. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013;63:149–64.
  27. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26:673–85.
  28. McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res.* 2011;50:331–47.
  29. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:803–15.
  30. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:709–21.
  31. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:678–89.
  32. Soehnlein O, Drechsler M, Döring Y, Lievens D, Hartwig H, Kemmerich K et al. Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med.* 2013;5:471–81.
  33. Colder PC. n-3 Polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann Nutr Metab.* 1997;41:203–34.
  34. Li N, Salter RC, Ramji DP. Molecular mechanisms underlying the inhibition of IFN- $\gamma$ -

- induced, STAT1-mediated gene transcription in human macrophages by simvastatin and agonists of PPARs and LXRs. *J Cell Biochem.* 2011;112:675–83.
35. Bäck M, Hansson GK. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:199–211.
  36. Han X, Kitamoto S, Wang H, Boisvert WA. Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *FASEB J.* 2010;24:2869–80.
  37. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17:1410–22.
  38. Witztum JL, Lichtman AH. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2014;9:73–102.
  39. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive (T and B Cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114:1640–60.
  40. Cochain C, Zerneck A. Noncoding RNAs in vascular inflammation and atherosclerosis: Recent advances toward therapeutic applications. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25:380–6.
  41. Wei Y, Nazari-Jahantigh M, Chan L, Zhu M, Heyll K, Corbalán-Campos J et al. The microRNA-342-5p fosters inflammatory macrophage activation through an Akt1- and microRNA-155-dependent pathway during atherosclerosis. *Circulation.* 2013;127:1609–19.
  42. Du F, Yu F, Wang Y, Hui Y, Carnevale K, Fu M et al. MicroRNA-155 deficiency results in decreased macrophage inflammation and attenuated atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:759–67.
  43. Merriam-Webster.com Medical Dictionary, s.v. “oxidative stress”; 2022., Dostupno na: <https://www.merriam-webster.com/medical/oxidative%20stress>. Pristupljeno: 23.11.2022.
  44. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000;49:3–8.
  45. Yoshikawa T, Naito Y. What Is Oxidative Stress? *JMAJ.* 2002;45:271–6.
  46. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5:9–19.
  47. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - Uzroci i posljedice. *Medicina (B Aires).* 2007;43:84–93.
  48. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30:11–26.
  49. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–13.
  50. Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M, Ishaqat A, ALSalamat HA, Bashatwah RM. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *Eurasian J Med.* 2018;50:193–201.
  51. Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard SS, Stehlik C, Wang L et al. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. *Biochem Pharmacol.*

- 2012;83:1643–54.
52. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr.* 2003;133.
  53. Remacle J, Michiels C, Raes M. The importance of antioxidant enzymes in cellular aging and degeneration. *EXS.* 1992;62:99–108.
  54. Kedar N, Prasad Che K. Protiv raka vitaminima i dodacima prehrani. Zagreb: Cid-Nova; 2004.
  55. Watson RR. Handbook of Fertility: Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health. *Handbook of Fertility: Nutrition, Diet, Lifestyle and Reproductive Health.* Cambridge, Massachusetts: Academic Press; 2015. 1–435 p.
  56. Rimoin D, Pyeritz R, Korf B. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 6. Los Angeles: Academic Press; 2013.
  57. Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2009;65:S3–9.
  58. Allen RG. Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. *Age (Omaha).* 1998;21:47–76.
  59. Mates JM. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 1999;4:d339.
  60. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:192–208.
  61. Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: Bioinspired synthetic antioxidants. *Acc Chem Res.* 2010;43:1408–19.
  62. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830:3289–303.
  63. Hatfield DL, Gladyshev VN. How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3565–76.
  64. Davis CD, Uthus EO. Dietary folate and selenium affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation, global DNA methylation and one-carbon metabolism in rats. *J Nutr.* 2003;133:2907–14.
  65. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88:756–62.
  66. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an Integral Part of Factor 3 Against Dietary Necrotic Liver Degeneration. *J Am Chem Soc.* 1957;79:3292–3.
  67. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine [Internet]. 5th edn. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Oxford Academic; 2015.
  68. Gimbrone Jr. MA, García-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis,"*Cardiovascular. Pathology.* 22:9–15,.
  69. Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 1999;85:753–66.
  70. Madamanchi NR, Moon SK, Hakim ZS, Clark S, Mehrizi A, Patterson C et al. Differential activation of mitogenic signaling pathways in aortic smooth muscle cells deficient in superoxide dismutase isoforms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*



- 2005;25:950–6.
71. Shrivastava AK, Singh HV, Raizada A, Singh SK. C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *Egypt Hear J.* 2015;67:89–97.
  72. Wronska-Nofer T, Nofer JR, Stetkiewicz J, Wierzbicka M, Bolinska H, Fobker M et al. Evidence for oxidative stress at elevated plasma thiol levels in chronic exposure to carbon disulfide (CS<sub>2</sub>) and coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17:546–53.
  73. Yang X, Hve T, Han S, Zhang X, Sun Y, Xing Y et al. The role of traditional Chinese medicine in the regulation of oxidative stress in treating coronary heart disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:13,2019.
  74. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:1673–706.
  75. Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res.* 2013;10:472–82.
  76. Bastani A, Rajabi S, Daliran A, Saadat H, Karimi-Busheri F. Oxidant and antioxidant status in coronary artery disease. *Biomed Reports.* 2018;9:327–32.
  77. El-Benna J, Dang PMC, Gougerot-Pocidallo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: Role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol.* 2008;30:279–89.
  78. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:438–63.
  79. Pereira SL, Leonard AE, Mukerji P. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2003;68:97–106.
  80. Dommels YEM, Alink GM, Van Bladeren PJ, Van Ommen B. Erratum: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: Results from cultured colon cells, animal models and human studies (*Environmental Toxicology and Pharmacology* (2002) 11 (297-308) PII: S1382668902000066). *Environ Toxicol Pharmacol.* 2002;12:231–44.
  81. Mayes C, Burdge GC, Bingham A, Murphy JL, Tubman R, Wootton SA. Variation in [U-13C]  $\alpha$  linolenic acid absorption,  $\beta$ -oxidation and conversion to docosahexaenoic acid in the pre-term infant fed a DHA-enriched formula. *Pediatr Res.* 2006;59:271–5.
  82. Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA. Effect of altered dietary n -3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [ 13 C] $\alpha$ -linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards  $\beta$ -oxidation in older men . *Br J Nutr.* 2003;90:311–21.
  83. Carlson SE, Colombo J. Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid Nutrition in Early Development. *Adv Pediatr.* 2016;63:453–71.
  84. Colombo J, Jill Shaddy D, Kerling EH, Gustafson KM, Carlson SE. Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) balance in developmental outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2017;121:52–6.
  85. Endo J, Arita M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Cardiol.* 2016;67:22–7.

86. Colussi G, Catena C, Novello M, Bertin N, Sechi LA. Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2017;27:191–200.
87. Maki KC, Van Elswyk ME, McCarthy D, Seeley MA, Veith PE, Hess SP et al. Lipid Responses in Mildly Hypertriglyceridemic Men and Women to Consumption of Docosahexaenoic Acid-Enriched Eggs. *Int J Vitam Nutr Res.* 2003;73:357–68.
88. 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;21:1–20.
89. Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr.* 1999;70.
90. Needleman P, Raz A, Minkes MS, Ferrendelli JA, Sprecher H. Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1979. p. 944–8.
91. Holub BJ. Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *C Can Med Assoc J.* 2002;166:608–15.
92. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest.* 2001;108:15–23.
93. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1751–6.
94. Shahidi F. Functional foods: Their role in health promotion and disease prevention. *J Food Sci.* 2004;69:146–149.
95. Cheng D, Lin L, Du R, Lu JL. Omega-3 fatty acids and cardiovascular diseases. *J Shanghai Jiaotong Univ (Medical Sci).* 2016;36:1231–6.
96. Mihalj M, Stupin A, Kolobarić N, Bujak IT, 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;12:1–21.
97. Shakoor H, Khan MI, Sahar A, Khan MKI, Faiz F, Basheer Ahmad H. Development of omega-3 rich eggs through dietary flaxseed and bio-evaluation in metabolic syndrome. *Food Sci Nutr.* 2020;8:2619–26.
98. 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;10:774.
99. An P, Wan S, Luo Y, Luo J, Zhang X, Zhou S et al. Micronutrient Supplementation to Reduce Cardiovascular Risk. *J Am Coll Cardiol.* 2022;80:2269–85.
100. Van Dael P. Role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in human nutrition and health: review of recent studies and recommendations. *Nutr Res Pract.* 2021;15:137.
101. Hasler CM. Functional foods: Benefits, concerns and challenges - A position paper

- from the American Council on Science and Health. *J Nutr*. 2002;132:3772–81.
102. Ahmad A, Riaz S, Shahzaib Nadeem M, Mubeen U, Maham K. Role of Carotenoids in Cardiovascular Disease. In: Martínez-Espinosa RM, editor. *Carotenoids-New Perspectives and Application* IntechOpen. London: IntechOpen; 2022.
  103. Armoza A, Haim Y, Basiri A, Wolak T, Paran E. Tomato extract and the carotenoids lycopene and lutein improve endothelial function and attenuate inflammatory NF- $\kappa$ B signaling in endothelial cells. *J Hypertens*. 2013;31:521–9.
  104. Alves-Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett*. 2004;150:57–83.
  105. Gammone MA, Riccioni G, D’Orazio N. Carotenoids: Potential allies of cardiovascular health? Vol. 59, *Food and Nutrition Research*. 2015.
  106. Lo HM, Tsai YJ, Du WY, Tsou CJ, Wu W Bin. A naturally occurring carotenoid, lutein, reduces PDGF and H 2O2 signaling and compromised migration in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biomed Sci*. 2012;19.
  107. Jin XH, Ohgami K, Shiratori K, Suzuki Y, Hirano T, Koyama Y et al. Inhibitory effects of lutein on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2562–8.
  108. Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1265–71.
  109. Chung HJ, Shin DH, Lim ST. In vitro starch digestibility and estimated glycemic index of chemically modified corn starches. *Food Res Int*. 2008;41:579–85.
  110. Lee GY, Han SN. The role of vitamin E in immunity. *Nutrients*. 2018;10:1614.
  111. Traber MG. Vitamin {E} regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:347–62.
  112. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:4–15.
  113. Benstoem C, Goetzenich A, Kraemer S, Borosch S, Manzanares W, Hardy G et al. Selenium and its supplementation in cardiovascular disease—what do we know? *Nutrients*. 2015;7:3094–118.
  114. Tepper D, Greenberg SM. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *Cardiovasc Rev Reports*. 1993;14:55.
  115. Ciccone MM, Cortese F, Gesualdo M, Carbonara S, Zito A, Ricci G et al. Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
  116. Diplock AT. Safety of antioxidant vitamins and  $\beta$ -carotene. *Am J Clin Nutr*. 1995;62:1510–1516.
  117. Spencer AP, Carson DS, Crouch MA. Vitamin E and coronary artery disease. *Arch Intern Med*. 1999;159:1313–20.
  118. Browne D, McGuinness B, Woodside J V., McKay GJ. Vitamin E and Alzheimer’s disease: What do we know so far? *Clin Interv Aging*. 2019;14:1303–17.
  119. Haeri SMJ, Dashti GR, Mardani M, Rashidi B, Nikgoftar Fathi A, Haeri N. Effect of vitamin E and iron on apoptosis of the endothelial cells of the carotid arteries in hypercholesteremic male rabbits. *ARYA Atheroscler J*.
  120. Petrucci G, Rizzi A, Hatem D, Tosti G, Rocca B, Pitocco D. Role of Oxidative Stress

- in the Pathogenesis of Atherothrombotic Diseases. *Antioxidants*. 2022;11.
121. Frei B, Traber MG. The new US dietary reference intakes for vitamins C and E. *Redox Rep*. 2001;6:5–9.
  122. Ciarcia G, Bianchi S, Tomasello B, Acquaviva R, Malfa GA, Naletova I et al. Vitamin E and Non-Communicable Diseases: A Review. *Biomedicines*. 2022;10:2473.
  123. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*. 2012;379:1256–68.
  124. Kieliszek M. Selenium—fascinating microelement, properties and sources in food. *Molecules*. 2019;24:1298.
  125. Zhang S, Rocourt C, Cheng WH. Selenoproteins and the aging brain. *Mech Ageing Dev*. 2010;131:253–60.
  126. Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*. 2013;18:3292–311.
  127. Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J*. 1993;12:3315–22.
  128. Combs GF. Selenium in global food systems. *Br J Nutr*. 2001;85:517–47.
  129. Brigelius-Flohé R, Banning A, Schnurr K. Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxidants Redox Signal*. 2003;5:205–15.
  130. 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. *Obstet Gynecol Surv*. 2004;59:268–9.
  131. Moghadaszadeh B, Beggs AH. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology*. 2006;21:307–15.
  132. Zhou X, Ji WJ, Zhu Y, He B, Li H, Huang TG et al. Enhancement of endogenous defenses against ROS by supra-nutritional level of selenium is more safe and effective than antioxidant supplementation in reducing hypertensive target organ damage. *Med Hypotheses*. 2007;68:952–6.
  133. Tanguy S, Toufektsian MC, Besse S, Ducros V, De Leiris J, Boucher F. Dietary selenium intake affects cardiac susceptibility to ischaemia/reperfusion in male senescent rats. *Age Ageing*. 2003;32:273–8.
  134. 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;14:591.
  135. Wu Q, Huang K, Xu H. Effects of long-term selenium deficiency on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities and expressions in rat aorta. *J Inorg Biochem*. 2003;94:301–6.
  136. Brocq M Le, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: From molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal*. 2008;10:1631–73.
  137. Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope? *Front Cardiovasc Med*. 2015;2:29.
  138. Dos Santos JL, de Quadros AS, Weschenfelder C, Garofallo SB, Marcadenti A.

- Oxidative stress biomarkers, nut-related antioxidants, and cardiovascular disease. *Nutrients*. 2020;12:682.
139. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840–4.
140. Harrison DG. Endothelial Function and Oxidant Stress. *Clin Cardiol*. 1997;20:11–17.
141. Jung KJ, Lee EK, Yu BP, Chung HY. Significance of protein tyrosine kinase/protein tyrosine phosphatase balance in the regulation of NF- $\kappa$ B signaling in the inflammatory process and aging. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:983–91.
142. Moro C, Jouan MG, Rakotovo A, Toufektsian MC, Ormezzano O, Nagy N et al. Delayed expression of cytokines after reperfused myocardial infarction: Possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. Vol. 293, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2007.
143. Tanguy S, Rakotovo A, Jouan MG, Ghezzi C, de Leiris J, Boucher F. Dietary selenium intake influences Cx43 dephosphorylation, TNF- $\alpha$  expression and cardiac remodeling after reperfused infarction. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55:522–9.
144. Wimmer I, Hartmann T, Brustbauer R, Minear G, Dam K. Selenium levels in patients with autoimmune thyroiditis and controls in Lower Austria. *Horm Metab Res*. 2014;46:707–9.
145. Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ*. 2008;400:115–41.
146. Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2006;385:1304–23.
147. Whanger PD. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr*. 2004;91:11–28.
148. Yang G, Wang S, Zhou R, Sun S. Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr*. 1983;37:872–81.
149. MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin A, Martin C et al. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med*. 2010;170:256–61.
150. Hardy G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition*. 2000;16:688–9.
151. Kwak N-S, Jukes DJ. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*. 2001;12:99–107.
152. Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Sinderen D Van. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin Biotechnol*. 2005;16:198–203.
153. Gulati OP, Berry Ottaway P. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. *Toxicology*. 2006;221:75–87.
154. Lockwood B. *Nutraceuticals - A guide for healthcare professionals* [Internet]. Manchester: Pharmaceutical Press.; 2007.
155. Contor L. Functional Food Science in Europe. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001;11:20–3.

156. Kralik, G.; Kralik, Z.; Grčević, M.; Škrčić Z. Obogaćivanje peradarskih proizvoda funkcionalnim sastojcima. *Poljoprivreda*. 2012;18:52–9.
157. Mohiti-Asli M, Shariatmadari F, Lotfollahian H, Mazuji MT. Effects of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. *Can J Anim Sci*. 2008;88:475–83.
158. Leeson S, Caston L. Enrichment of Eggs with Lutein. *Poult Sci*. 2004;83:1709–12.
159. Kralik, Z.; Grčević, M.; Radišić, Ž.; Kralik, I.; Lončarić, Z.; Škrčić Z. Effect of selenium-fortified wheat in feed for laying hens on table eggs quality. *Bulg J Agric Sci*. 2016;22:297–302.
160. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39:175–91.
161. Stupin M, Kibel A, Stupin A, Selthofer-Relatić K, Matić A, Mihalj M et al. The physiological effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (N-3 pufas) intake and exercise on hemorheology, microvascular function, and physical performance in health and cardiovascular diseases; is there an interaction of exercise and dietary n-3 pufa i. *Front Physiol*. 2019;10:1129.
162. Kolobarić N, Centner MG, 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. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17:1–14.
163. Wang LY, Summerhill K, Rodriguez-Canas C, Mather I, Patel P, Eiden M et al. Development and validation of a robust automated analysis of plasma phospholipid fatty acids for metabolic phenotyping of large epidemiological studies. *Genome Med*. 2013;5:39.
164. Sysmex. Regional IFU Amendment (RIAm) for Instructions For Use (IFU) of Sysmex XN series: additional performance characteristics. Kobe, Japan; 2017. p. 1–7, 10–18.
165. Čepelak I, Čvorišćec. D. Štrausova Medicinska Biokemija. Medicinska naklada Zagreb. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
166. Tzeng MS, Yang F Lo, Wang-Hsu GS, Chen BH. Determination of major carotenoids in human serum by liquid chromatography. *J Food Drug Anal*. 2004;12:79–83.
167. Leeson S, Caston L. Enrichment of eggs with lutein. *Poult Sci*. 2004;83:1709–12.
168. Jargar JG, Hattiwale SH, Das S, Dhundasi SA, Das KK. A modified simple method for determination of serum  $\alpha$ -tocopherol (Vitamin E). *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2012;23:45–8.
169. 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 spectrometry. Developing of a method with a desolvating system nebulizer. *Anal Chim Acta*. 2006;573–574:432–8.
170. 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;594:4917–31.
171. Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol*. 2003;63:447–63.

172. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239:70–6.
173. Mihaljević Z, Matic A, Stupin A, Rašić 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. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1–15.
174. 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;55:218–27.
175. H A. Catalase in vitro. *Methods.* Vol. 105, *Enzymol.* Academic Press; 1974. 121–26 p.
176. Wendel A. Glutathione Peroxidase. Vol. 77, *Methods in Enzymology.* 1981. p. 325–33.
177. Flohé L, Ötting F. Superoxide Dismutase Assays. *Methods Enzymol.* 1984;105:93–104.
178. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:503–8.
179. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive Assessment of Skin Microvascular Function in Humans: An Insight Into Methods. *Microcirculation.* 2012;19:47–64.
180. Cavka A, Cosic A, Grizelj I, Koller A, Jelaković B, Lombard JH et al. Effects of AT1 receptor blockade on plasma thromboxane A2 (TXA2) level and skin microcirculation in young healthy women on low salt diet. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37:432–42.
181. 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;593:5313–24.
182. Iglesias Del Sol A, Bots ML, Grobbee DE, Hofman A, Witteman JCM. Carotid intima-media thickness at different sites: Relation to incident myocardial infarction - The Rotterdam Study. *Eur Heart J.* 2002;23:934–40.
183. Steinke W, Kloetzsch C, Hennerici M. Carotid artery disease assessed by color Doppler flow imaging: Correlation with standard Doppler sonography and angiography. *Am J Roentgenol.* 1990;154:1061–8.
184. Stein JH, Korcarz CE, Post WS. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: Summary and discussion of the american society of echocardiography consensus statement. *Prev Cardiol.* 2009;12:34–8.
185. Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N et al. Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus (2004–2006). *Cerebrovasc Dis.* 2007;23:75–80.
186. Baldassarre D, Amato M, Bondioli A, Sirtori CR, Tremoli E. Carotid artery intima-media thickness measured by ultrasonography in normal clinical practice correlates well with atherosclerosis risk factors. Vol. 31, *Stroke.* 2000. p. 2426–30.
187. Casella IB, Presti C, Porta RMP, Sabbag CRD, Bosch MA, Yamazaki Y. A practical protocol to measure common carotid artery intima-media thickness. Vol. 63, *Clinics.* Sao Paulo; 2008. p. 515–20.

188. Potter K, Green DJ, Reed CJ, Woodman RJ, Watts GF, McQuillan BM et al. Carotid intima-medial thickness measured on multiple ultrasound frames: Evaluation of a DICOM-based software system. *Cardiovasc Ultrasound*. 2007;5.
189. Bucher HC, Hengstler P, Schindler C, Meier G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med*. 2002;112:298–304.
190. Saremi A, Arora R. Vitamin E and cardiovascular disease. *Am J Ther*. 2010;17:56– 65.
191. Oster O, Prellwitz W. Selenium and cardiovascular disease. *Biol Trace Elem Res*. 1990;24:91–103.
192. Jacobson TA, Maki KC, Orringer CE, Jones PH, Kris-Etherton P, Sikand G et al. National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: Part 2. *J Clin Lipidol*. 2015;9:S1-S122.e1.
193. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, et al. Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Arter Thromb Vasc Biol*. 23:2747–2757.
194. Casanova MA, Medeiros F, Trindade M, Cohen C, Oigman W, Neves MF. Omega-3 fatty acids supplementation improves endothelial function and arterial stiffness in hypertensive patients with hypertriglyceridemia and high cardiovascular risk. *J Am Soc Hypertens*. 2017;11:10–9.
195. Leslie MA, Cohen DJA, Liddle DM, Robinson LE, Ma DWL. A review of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood triacylglycerol levels in normolipidemic and borderline hyperlipidemic individuals. *Lipids Health Dis*. 2015;14:53.
196. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56:365–79.
197. Ziegler M, Wallert M, Lorkowski S, Peter K. Cardiovascular and Metabolic Protection by Vitamin E: A Matter of Treatment Strategy? *Antioxidants*. 2020;9:935.
198. 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. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022;27:332.
199. Zhao Y, Monahan FJ, McNulty BA, Gibney MJ, Gibney ER. Effect of vitamin e intake from food and supplement sources on plasma  $\alpha$ - And  $\gamma$ -tocopherol concentrations in a healthy Irish adult population. *Br J Nutr*. 2014;112:1575–85.
200. 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;106:1453–9.
201. Zhang F, Yu W, Hargrove JL, Greenspan P, Dean RG, Taylor EW et al. Inhibition of TNF- $\alpha$  induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis*. 2002;161:381–6.
202. Li Y-B, Han J-Y, Jiang W, Wang J. Selenium inhibits high glucose-induced cyclooxygenase-2 and P-selectin expression in vascular endothelial cells. *Mol Biol Rep*. 2011;38:2301–6.
203. Maddox JF, Aherne KM, Reddy CC, Sordillo LM. Increased neutrophil adherence and adhesion molecule mRNA expression in endothelial cells during selenium deficiency. *J*



- Leukoc Biol. 1999;65:658–64.
204. Özbal S, Erbil G, Koçdor H, Tuğyan K, Pekçetin Ç, Özoğul C. The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neurosci Lett.* 2008;438:265–9.
  205. Ostadalova I, Vobecky M, Chvojkova Z, Mikova D, Hampl V, Wilhelm J et al. Selenium protects the immature rat heart against ischemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem.* 2007;300:259–67.
  206. Guo F, Monsefi N, Moritz A, Beiras-Fernandez A. Selenium and Cardiovascular Surgery: An Overview. *Curr Drug Saf.* 2012;7:321–7.
  207. Lubos E, Sinning CR, Schnabel RB, Wild PS, Zeller T, Rupprecht HJ et al. Serum selenium and prognosis in cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *Atherosclerosis.* 2010;209:271–7.
  208. Hustad KS, Ottestad I, Olsen T, Sæther T, Ulven SM, Holven KB. Salmon fish protein supplement increases serum vitamin B12 and selenium concentrations: secondary analysis of a randomised controlled trial. *Eur J Nutr.* 2022;61:3085–93.
  209. Ranard KM, Jeon S, Mohn ES, Griffiths JC, Johnson EJ, Erdman JW. Dietary guidance for lutein: consideration for intake recommendations is scientifically supported. *Eur J Nutr.* 2017;56:37–42.
  210. Bone RA, Landrum JT. Dose-dependent response of serum lutein and macular pigment optical density to supplementation with lutein esters. *Arch Biochem Biophys.* 2010;504:50–5.
  211. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 2006;141:312–22.
  212. Aladag N, Asoglu R, Ozdemir M, Asoglu E, Atabey RD, Demir C et al. Oxidants and antioxidants in myocardial infarction (mi); investigation of ischemia modified albumin, malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase in individuals diagnosed with st elevated myocardial infarction (STEMI) and non-STEMI (NSTEMI). *J Med Biochem.* 2021;40:286–94.
  213. Bhakuni P, Chandra M, Misra MK. Oxidative stress parameters in erythrocytes of post-reperused patients with myocardial infarction. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2005;20:377–81.
  214. Chen LY, Nichols WW, Hendricks J, Mehta JL. Myocardial neutrophil infiltration, lipid peroxidation, and antioxidant activity after coronary artery thrombosis and thrombolysis. *Am Heart J.* 1995;129:211–8.
  215. Helmuth RA, Wills ER, Aust C, Orr C. Status of the myocardium and infarct-related coronary artery in 19 necropsy patients with acute recanalization using pharmacologic (streptokinase, r-tissue plasminogen activator), mechanical (percutaneous transluminal coronary angioplasty) or combined typ. *J Am Coll Cardiol.* 1987;9:785–801.
  216. Szewczyk-Golec K, Grzelakowski P, Ługowski T, Kędziora J. The effects of percutaneous transluminal coronary intervention on biomarkers of oxidative stress in the erythrocytes of elderly male patients. *Redox Rep.* 2017;22:315–22.
  217. Toorang F, Djazayeri A, Djalali M. Effects of omega-3 fatty acids supplement on antioxidant enzymes activity in type 2 diabetic patients. *Iran J Public Health.* 2016;45:340–5.
  218. Pincemail J, Meziane S. On the Potential Role of the Antioxidant Couple Vitamin

- E/Selenium Taken by the Oral Route in Skin and Hair Health. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2022;11:2270.
219. Elgendey F, Al Wakeel RA, Hemeda SA, Elshwash AM, Fadl SE, Abdelazim AM et al. Selenium and/or vitamin E upregulate the antioxidant gene expression and parameters in broilers. *BMC Vet Res*. 2022;18.
220. He RR, Tsoi B, Lan F, Yao N, Yao XS, Kurihara H. Antioxidant properties of lutein contribute to the protection against lipopolysaccharide-induced uveitis in mice. *Chin Med*. 2011;6.
221. Pap R, Pandur E, Jánosa G, Sipos K, Agócs A, Deli J. Lutein exerts antioxidant and anti-inflammatory effects and influences iron utilization of bv-2 microglia. *Antioxidants*. 2021;10:1–27.
222. Wang S, Wang M, Zhang S, Zhao L. Oxidative stress in rats with hyperhomocysteinemia and intervention effect of lutein. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18:359–64.
223. Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Mesa MD, Gil A. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: A systematic review of randomised clinical trials. *Br J Nutr*. 2012;107:159–170.
224. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC et al. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 2004;177:161–6.
225. Kremer JM, Michalek A V., Lininger L, Huyck C, Bigauoette J, Timchalk MA et al. Effects of Manipulation of Dietary Fatty Acids on Clinical Manifestations of Rheumatoid Arthritis. *Lancet*. 1985;325:184–7.
226. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, Digiacomio R, Rynes R, Bartholomew LE et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with Rheumatoid Arthritis clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum*. 1990;33:810–20.
227. Veselinovic M, Vasiljevic D, Vucic V, Arsic A, Petrovic S, Tomic-Lucic A et al. Clinical benefits of n-3 PUFA and  $\alpha$ -linolenic acid in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrients*. 2017;9.
228. 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;20:1177–81.
229. 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;60:704–9.
230. 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. *Immunity, Inflamm Dis*. 2021;9:792–803.
231. Hassanzadeh M, Faridhosseini R, Mahini M, Faridhosseini F, Ranjbar A. Serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and selenium in patients with acute and chronic coronary artery disease. *Iran J Immunol*. 2006;3:142–5.
232. Xu XR, Zou ZY, Xiao X, Huang YM, Wang X, Lin XM. Effects of lutein supplement on serum inflammatory cytokines, ApoE and lipid profiles in early atherosclerosis population. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20:170–7.

233. Dusting GJ. Nitric Oxide in Cardiovascular Disorders. *J Vasc Res.* 1995;32:143–61.
234. Yagi S, Fukuda D, Aihara K, Akaike M, Shimabukuro M, Sata M. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Promising Nutrients for Preventing Cardiovascular Disease. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24:999–1010.
235. Oppedisano F, Macrì R, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J et al. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection. *Biomedicines.* 2020;8:306.
236. Zanetti M, Cappellari GG, Barbetta D, Semolic A, Barazzoni R. Omega 3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial dysfunction in chronic renal failure: Role of eNOS activation and of oxidative stress. *Nutrients.* 2017;9:895.
237. Barger JL, Cui X, Marcum JL, Sellke FW, Zuo H. Omega-3 fatty acids improve endothelial function and reduce markers of inflammation in hypercholesterolemic rabbits. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 284:480–488.
238. Karatas G, Demirci C, Kavas E. Effects of omega-3 fatty acids on inducible nitric oxide synthase and adhesion molecules in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 214:40–44.
239. Gudbjarnason S, Benediktsdóttir VE, Skúladóttir G. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on coronary heart disease. *Bibl Nutr Dieta.* 1989;87:1–12.
240. Duan L, Wang W, Chen J. Omega-3 fatty acids improve brain function and structure in rats. *Mol Brain Res.* 137:32–41.
241. Chirumbolo S, Bjelaković G. Effect of omega-3 fatty acids on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nutrients.* 1:25–38.
242. Hellmann M, Roustit M, Cracowski JL. Skin microvascular endothelial function as a biomarker in cardiovascular diseases? *Pharmacol Reports.* 2015;67:803–10.
243. 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. *J Clin Med.* 2020;9.
244. 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;43:988–95.
245. Stirban A, Nandreaan S, Götting C, Tamler R, Pop A, Negrean M et al. Effects of n-3 fatty acids on macro- and microvascular function in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:808–13.
246. Vasilev AP, Streltsova NN, Sekisova MA. Effect of omega-3 fatty acids on the serum lipid profile and microcirculation in patients with metabolic syndrome and hypertensive disease. *Klin Med (Mosk).* 2009;87:37–41.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Ana Marija Masle

Zanimanje: liječnik; specijalist alergologije i kliničke imunologije

Adresa: Klinički bolnički centar Osijek, Odjel za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju, Osijek.

Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

e-mail: lukinac28@gmail.com

Datum rođenja: 28.ožujka 1989.

### RADNO ISKUSTVO

2022. specijalist alergologije i kliničke imunologije, na Odjelu za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju KBC Osijek

2016. specijalizant alergologije i kliničke imunologije, na Odjelu za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju KBC Osijek

2015. liječnik opće medicine u DZ Vinkovci, Ambulanta Lipovac

2014. pripravnik na stručnom osposobljavanju, KBC Osijek

### OBRAZOVANJE

2016-2022. specijalizacija iz alergologije i kliničke imunologije

2019/2020. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

2017/2018. Specijalistički poslijediplomski studij iz alergologije i kliničke imunologije, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

2014. diplomirala na Medicinskom fakultetu Osijeku, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

## ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

1. Ž.Kardum, V. Prus, J. Milas Ahic, I.Kovačević, **A.M.Lukinac**, K. S.Kovačević, A. Kovač: "Prikaz bolesnice s cANCA vaskulitisom bez zahvaćanja dišnih puteva" 19. godišnji kongres Hrvatskog reumatološkog društva, listopad 2017.g., Dubrovnik (usmeno priopćenje)
2. **A.M.Lukinac**, Ž.Kardum: "Pagetova bolest kostiju u bolesnika s Ankilozantnim spondilitisom", prikaz slučaja; Domaći simpozij Clinical Observational Program, ožujak 2018.g., Osijek (usmeno priopćenje)
3. **A.M.Lukinac**, J.Milas Ahic: "Prikaz bolesnice s Ankilozantnim spondilitisom, prikaz slučaja; Novartis SpA dan, svibanj 2018.g., Zagreb (usmeno priopćenje)
4. Ž.Kardum, **A.M. Lukinac**, A.Kovac, V.Prus: "Primjena niskomolekularnog heparina u trudnice sa HAE tip 1", prikaz slučaja: simpozij s međunarodnim sudjelovanjem o novostima u HAE, rujna 2018.g., Zagreb (usmeno priopćenje)
5. **A.M.Lukinac**, I.Kovacevic, A.Kovac, Z.Kardum, V.Prus: "Uloga prehrane u bolesnika s reumatoidnim artritisom" Svjetski dan artritisa, listopad 2018.g., Osijek (usmeno priopćenje)
6. Ž.Kardum, V.Prus, **A.M.Lukinac**, A.Kovac: "Prevenција alergijskih bolesti"; III.Simpozij primarna i sekundarna prevencija bolesti suvremenog čovjeka, Rektorat Sveučilišta J.J.Strossmayera, Trg Svetog Trojstva 3, studeni 2018.g., Osijek (usmeno priopćenje)
7. **A.M.Lukinac**, Z.Kardum, I.Kovacevic, J.Milas-Ahic, V.Prus: "The occurrence of paraneoplastic syndromes in patients with polymyalgia rheumatica treated at the University Hospital Center Osijek"; CECR Central European Congress of Rheumatology, 6.-8.12.2018.g., Zagreb (usmeno priopćenje)
8. Ž.Kardum, M.Šola, J.Milas- Ahic, M.Biljan, A.Kovac, **A.M. Lukinac**, I.Kovacevic, K. Stranski Kovačević, V.Prus:" Generalized teleangiectasia misinterpreted as vasculitis-case report"; CECR Central European Congress of Rheumatology, 6.-8.12.2018, Zagreb (poster sekcija)
9. I.Kovacevic, Z.Kardum, V.Prus, K.Kovacevic Stranski, **A.M.Lukinac**, M.Lucic, J.Milas- Ahic: "Prikaz bolesnika s arteritisom divovskih stanica velikih arterija" 21. godišnji kongres hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 17.-20.10.2019., Šibenik (poster sekcija)
10. K.Kovacevic Stranski, Z.Kardum, I.Kovacevic, A.Kovac, **A.M.Lukinac**, D.Cvitkusic, J.Milas Ahic, V.Prus; "Granulomatoza s poliangitisom (GPA) sa zahvaćenošću dišnog sustava i rijetkom zahvaćenošću vagine-prikaz bolesnika" 21. godišnji kongres hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 17.-20.10.2019., Šibenik (poster sekcija)
11. **A.M.Lukinac**, Branimir Anic; " Prikaz bolesnice s Churg- Strauss vaskulitisom" Izazovni klinički slučajevi, 21. godišnji kongres hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 17.-20.10.2019., Šibenik (pozvano predavanje, usmeno priopćenje)
12. Z.Kardum, J.Milas Ahic, **A.M.Lukinac**, V.Prus; "Učestalost tromboembolijskih događaja u sistemskom obliku vaskulitisa i lokaliziranom kožnom vaskulitisu" 21. godišnji kongres hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 17.-20.10.2019., Šibenik (usmeno priopćenje)

13. I.Drenjancevic, M.Mihalj, A.Stupin, A.Matic, Z.Mihaljevic, I.Jukic, N.Kozina, L.Rasic, L.Kolar, N.Kolobaric, P.Susnjara, M.Stupin, A.Kibel, K.Selthofer-Relatic, **A.M.Lukinac**, Ž.Breskic, B.Juranic; "Functional food in cardiovascular protection-effects of n-3 polyunsaturated fatty acids" 12.međunarodni znanstveno-stručni skup HRANOM DO ZDRAVLJA 24.i 25. listopad 2019., Osijek, Hrvatska (usmeno priopćenje)
14. Breškić-Ćurić Ž., Selthofer-Relatić K., Stupin M., Šerić V., Matić A., Kibel A., Mihaljević Z., Šušnjara P., **Lukinac A.M.**, Juranic B., Drenjančević I.: "Effect of n-3 Polysaturated Fatty Acid-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- Osijek, Hrvatska 2019. (predavanje, međunarodna recenzija)
15. Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Selthofer-Relatić, Kristina; Kibel, Aleksandar; Breškić-Ćurić, Željka; **Lukinac, Anamarija**; Kolobarić, Nikolina; Šušnjara, Petar; Drenjančević, Ines:
16. "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 Virtual conference (online), 2020. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
17. Stupin A, Cvetko A, Kralik G, Mihalj M, Šušnjara P, Kolobarić N, Ćurić ŽB, **Lukinac AM**, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Jukić I. 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. Časopis Glycobiology. Lipanj 2021.
18. Kardum Ž, Ahić JM, **Lukinac AM**, Ivelj R, Prus V. Optic neuritis as a presenting feature of Behçet's disease: case-based review. Časopis Rheumatology International. 2020 Aug 29:1-7.
19. Kibel A, **Lukinac AM**, Dambic V, Juric I, Relatic KS. Oxidative Stress in Ischemic Heart Disease. Časopis Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2020 Jan 1; 2020.
20. Jukić M, **Lukinac A.M.**, Požgain I, Talapko J, Jukić M, Filaković P. The Role of Perceived Social Support in Assessing Posttraumatic Stress Disorder and Mental Health-Related Quality of Life in Veterans. InHealthcare 2020 Dec (Vol. 8, No. 4, p. 396). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
21. Čičak P, Thompson S, Popović-Grle S, Fijačko V, Lukinac J, **Lukinac AM**. Palliative and End-of-Life Care Conversations with Older People with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Croatia—A Pilot Study. InHealthcare 2020 Sep (Vol. 8, No. 3, p. 282). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
22. Željka Kardum, Jasminka Milas Ahić, Ana Kovač, **Ana Marija Lukinac**, Višnja Prus. Predictors of poor outcome in small vessel vasculitis. 7. slovenski pulmološko-alergološki kongres, 2020.g.
23. Ana Kovač, Željka Kardum, Jasminka Milas-Ahić, **Ana Marija Masle**, Višnja Prus. One case of amyloidosis misinterpreted as angioedema. 7. slovenski pulmološko-alergološki kongres, 2020.g.

24. **Ana Marija Masle**, Željka Kardum, Ana Kovač, Višnja Prus. Case report of the patient with atypical clinical presentation of eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. 7.slovenski pulmološko-alergološki kongres, 2020.g.
25. **Ana Marija Masle**, Antea Marošičević, Višnja Prus, Željka Kardum, Ivana Kovačević, Kristina Kovačević-Stranski, Ana Kovač, Dora Cvitkušić, Mirna Lucić, Jasminka Milas-Ahić: "Ishodi i čimbenici rizika za seronegativni spondiloartritis". 22.kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem-virtualni kongres, 16-17.10.2020.g. (usmeno priopćenje)
26. **Ana Marija Masle**, Ana Kovač: "Važnost aplikacije myHAE u praćenju bolesnika sa Hereditarnim angioedemom"; HAE skupština, 6.-7.3.2021.g., Rijeka (usmeno priopćenje)
27. Jukić, Ivana ; Kolobarić, Nikolina ; Stupin, Ana ; Matić, Anita ; Kozina, Nataša ; Mihaljević, Zrinka ; Mihalj, Martina ; Šušnjara, Petar ; Stupin, Marko ; Breškić Ćurić, Željka ; Selthofer-Relatić, Kristina ; Kibel, Aleksandar ; **Lukinac, Anamarija** ; Kolar, Luka ; Kralik, Gordana ; Kralik, Zlata ; Szechenyi, Aleksandar ; Jozanović, Marija ; Galović, Olivera ; Medvidović-Kosanović, Martina ; Drenjančević, Ines. Carnosine, small but mighty - prospect of use as functional ingredient for functional food formulation. Časopis Antioxidants (2076-3921) 10 (2021), 7; 1037, 31
28. Željka Breškić Ćurić, **Ana Marija Masle**, Aleksandar Kibel, Kristina Selthofer-Relatić, Ana Stupin, Zrinka Mihaljević, Ivana Jukić, Marko Stupin, Anita Matić, Nataša Kozina, Petar Šušnjara, Brankica Juranić, Nikolina Kolobarić, Vatroslav Šerić and Ines Drenjančević. 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. Časopis Biology, 14.08.2021.
29. Mirna Lucić, Željka Kardum, Dora Cvitkušić, Ana Kovač, Kristina Kovačević-Stranski, **Ana Marija Masle**, Ivana Kovačević, Jasminka Milas-Ahić, Višnja Prus: "Prikaz bolesnice s refraktornim reumatoidnim artritisom" XXIII. kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-17.10.2022. (poster)
30. **Ana Marija Masle**, Željka Kardum, Jasminka Milas-Ahić, Ivana Kovačević, Ana Kovač, Kristina Kovačević-Stranski, Dora Cvitkušić, Mirna Lucić, Višnja Prus: " Melanom u podlozi krioglobulinemičnog vaskulitisa– prikaz bolesnika" XXIII. kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-17.10.2022. (poster)
31. Dora Cvitkušić, Ivana Kovačević, Željka Kardum, Kristina Kovačević Stranski, **Ana Marija Masle**, Ana Kovač, Mirna Lucić, Višnja Prus, Jasminka Milas Ahić: " Terapijski pristup bolesniku sa antisintetaza sindromom– prikaz bolesnika" XXIII. kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-17.10.2022. (poster)
32. Ana Mikulec, Kristina Kovačević Stranski, Mirna Lucić, Ana Kovač, Dora Cvitkušić, **Ana Marija Masle**, Ivana Kovačević, Željka Kardum, Višnja Prus, Jasminka Milas-Ahić: "COVID-19 infekcija u bolesnika s reumatskim bolestima" XXIII. kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 14.-17.10.2022. (usmeno priopćenje)
33. **Ana Marija Masle**: "Angioedemi- klasifikacija i pristup liječenju". 26. dani Internista Slavonije i Baranje, 4.-5.3.2022., Osijek, Hrvatska (usmeno priopćenje)

34. **Ana Marija Masle**, Stefan Mrđenović, Željka Kardum, Ivana Kovačević, Kristina Kovačević-Stranski, Dora Uršić, Ivana Madunović, Antea Marošević, Jasminka Milas-Ahić: "Povezanost Kikuchi-Fujimoto bolesti sa sistemskim eritemskim lupusom- prikaz bolesnice"/ The relationship of Kikuchi-Fujimoto Disease with Systemic Lupus Erythematosus – a case report. XXIV. kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 27.-30.10.2022. (poster)
35. Dora Uršić, Ivana Kovačević, Željka Kardum, **Ana Marija Masle**, Kristina Kovačević Stranski, Ana Šimac, Mirna Lucić, Antea Marošević, Jasminka Milas-Ahić: "Izazovi u liječenju granulomatoze s poliangiitism"-prikaz slučaja. XXIV. kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 27.-30.10.2022. (poster)
36. Hatidže Vejseli, **Ana Marija Masle**, Ivana Madunović Gugić, Ana Šimac, Mirna Lucić, Jasminka Milas-Ahić: "Kliničko značenje autoimunih protutijela u idiopatskim upalnim miopatijama" XXIV. kongres Hrvatskog reumatološkog društva s međunarodnim sudjelovanjem, 27.-30.10.2022. (poster)
37. Kardum, Ž., Milas-Ahić, J., Šahinović, I., **Masle, A. M.**, Uršić, D., & Kos, M. (2022). Serum levels of interleukin 17 and 22 in patients with systemic sclerosis: a single-center cross-sectional study. *Rheumatology International*, 1-10.

#### ČLANSTVO U DRUŠTVIMA

Hrvatsko reumatološko društvo

Hrvatski liječnički zbor

Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju

#### OSTALE AKTIVNOSTI

- sudjelovanja na domaćim i međunarodnim kongresima, simpozijima i radionicama
- sudjelovanja na tečajevima I. kategorije u organizaciji Medicinskog fakulteta u Osijeku kao predavač
- sudjelovanja na javnim tribinama, okruglim stolovima, u medijima, s temama koje promiču brigu o bolesnicima oboljelih od sustavnih autoimunih bolesti
- sudjelovanje na znanstvenom projektu „Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama na kardiovaskularnu funkciju i imunološki sustav kod kardioloških bolesnika“ u sklopu ZCI za personaliziranu brigu o zdravlju na Sveučilištu J.J. Strossmayera u Osijeku