

# Izražaj mRNA enzima COX1, COX2, eNOS i iNOS kod sportaša koji konzumiraju kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E

---

Grinžek, Tajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:707532>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Tajana Grinžek**

**IZRAŽAJ mRNA ENZIMA COX1, COX2,  
eNOS I iNOS KOD SPORTAŠA KOJI  
KONZUMIRAJU KOKOŠJA JAJA  
OBOGAĆENA N-3 POLINEZASIĆENIM  
MASNIM KISELINAMA, LUTEINOM,  
SELENOM I VITAMINOM E**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

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

**Tajana Grinžek**

**IZRAŽAJ mRNA ENZIMA COX1, COX2,  
eNOS I iNOS KOD SPORTAŠA KOJI  
KONZUMIRAJU KOKOŠJA JAJA  
OBOGAĆENA N-3 POLINEZASIĆENIM  
MASNIM KISELINAMA, LUTEINOM,  
SELENOM I VITAMINOM E**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju, Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Katedre za fiziologiju i imunologiju.

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

Neposredni voditelj rada: Petar Šušnjara, mag. med. lab. diagn.

Rad ima 33 stranice, 4 slike i 1 tablicu

.

*Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. na pruženoj prilici za pisanje završnog rada, pomoći i uloženom vremenu za izradu ovog rada. Zahvaljujem na strpljenju, motivaciji, razumijevanju i prenesenom znanju i volji u protekle tri godine.*

*Hvala Petru Šušnjari, mag. med. lab. diagn. na pomoći, uloženom trudu, usmjeravanju, neiscrpnom zalaganju za vrijeme izrade ovog rada. Hvala mu za svaki stručni i prijateljski savjet.*

*Hvala i svim studentima Medicinskog fakulteta Osijek koji su pomogli kod ostvarivanja ovog rada.*

*Hvala svim mojim kolegama koji su mi beskrajno uljepšali studiranje u protekle tri godine.*

*Najviše hvala Nives, Maji i Mariji.*

*Hvala mojoj obitelji što su mi pružali bezuvjetnu podršku i ljubav tijekom ove tri godine studija.*

*Hvala posebnoj osobi u mom životu, Marinku, na strpljenju, ljubavi i svakodnevnoj podršci*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Endotel.....	1
1.2. Vaskularna reaktivnost .....	2
1.3. eNOS, iNOs – mehanizam nastanak i uloga u endotelnoj funkciji .....	3
1.4. COX 1, COX 2 – mehanizam nastanka i uloga u endotelnoj funkciji.....	4
1.5. Funkcionalna hrana.....	4
1.6. Funkcionalni elementi obogaćenih jaja .....	5
2. HIPOTEZA .....	9
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	10
4. MATERIJALI I METODE .....	11
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Ispitanici .....	11
4.3. Metode .....	12
4.3.1. Sastojci funkcionalno obogaćenih jaja.....	12
4.3.2. Izolacija PBMC-ova - mononuklearnih stanica periferne krvi .....	14
4.3.3. Izolacije humane RNA iz PBMC-a.....	14
4.3.4. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu s reverznom transkripcijom.....	15
4.3.5. Statistička analiza.....	17
5. REZULTATI.....	18
5.1. Promjena genskog izražaja odabranih enzima kod mladih, zdravih ispitanika .....	18
5.2. mRNA izražaj enzima COX1, COX2, eNOS, iNOS u kontrolnoj skupini .....	18
5.3. mRNA izražaj enzima u NUTRI4 skupini .....	19
6. RASPRAVA .....	20
7. ZAKLJUČAK .....	23
8. SAŽETAK .....	24
9. SUMMARY.....	25

10. LITERATURA .....	26
11. ŽIVOTOPIS.....	32

## POPIS KRATICA

AA – engl. *arachidonic acid*, arahidonska kiselina

ALA - engl. *alpha-linolenic acid*, alfa-linolenska kiselina

ALFA – TOH – engl. *alpha-tocopherol*, alfa tokoferol

COX – engl. *cyclooxygenase*, ciklooksigenaze

DHA – engl. *docosahexaenoic acid*, dokosaheksaenoična kiselina

DNA - engl. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina

EDCF – engl. *endothelium-derived constricting factors*, endotelni čimbenici kontrakcije

EDHF - engl. *endothelium - derived hyperpolarizing factors*, endotelni hiperpolarizirajući čimbenici

EDRF – engl. *endothelium-derived relaxing factors*, endotelni čimbenici relaksacije

EDTA – engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, etilendiamintetraoctena kiselina

eNOS – engl. *endothelial nitric oxide synthase*, endotelna sintaza dušikovog oksida

EPA – engl. *eicosapentaenoic acid*, eikozapentaenska kiselina

FBS – engl. *fetal bovine serum*, fetalni goveđi serum

GAMMA - TOH engl. *gamma-tocopherol*, gama-tokoferol

GMP - engl. *guanosine monophosphate*, gvanozin -monofosfat

iNOS – engl. *inducible nitric oxide synthase*, inducibilna sintaza dušikovog oksida

KVB - kardiovaskularne bolesti

LA – engl. *linoleic acid*, linolenska kiselina

mRNA – engl. *messenger ribonucleic acid*, glasnička ribonukleinska kiselina

n-3 PUFA – engl. *n – 3 polyunsaturated fatty acids*, n-3 polinezasićene masne kiseline

n-6 PUFA - engl. *n – 6 polyunsaturated fatty acids*, n-6 polinezasićene masne kiseline

NFW – engl. *nuclease-free water*, voda bez nukleaze

nNOS - engl. *neuronal nitric oxide synthase*, neuronska sintaza dušikova oksida



NO – engl. *nitric oxide*, dušikov oksid

NOS – engl. *nitric oxide synthase*, sintaza dušikova oksida

NSAID - engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, nesteroidni protuupalni lijekovi

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

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

PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

PG – prostaglandini

PG H<sub>2</sub> – prostaglandin H<sub>2</sub>

PG I<sub>2</sub> - engl. *prostacyclin I<sub>2</sub>*, prostaciklin I<sub>2</sub>

qPCR - engl. *real-time polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

RCF - engl. *relative centrifugal force*, relativna centrifugalna sila

RNA - engl. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina

ROS – engl. *reactive oxygen species*, slobodne kisikove vrste

Se – engl. *selenium*, selen

SFA – engl. *saturated fatty acids*, zasićene masne kiseline

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

## 1. UVOD

Većina ljudi je svjesna da je uravnotežena prehrana ključan saveznik za opće zdravlje pojedinca i za prevenciju brojnih patoloških stanja. Zdrava prehrana tijekom života omogućava normalan rast i razvoj, starenje, ključna je u održavanju zdrave tjelesne težine i smanjuje rizik od kroničnih bolesti. Jedan od čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) je prehrana bogata zasićenim mastima i kolesterolom koja je povezana s bolestima srca i srodnim stanjima poput ateroskleroze (1). Aterosklerotske promjene mogu izazvati moždane i srčane udare (2, 3). KVB vodeći su uzroci smrti i invaliditeta u svijetu: preko 17,5 milijuna ljudi svake godine umre od kardiovaskularnih bolesti. Ishemijska je bolest srca odgovorna za 7,3 milijuna kardiovaskularnih smrti, a cerebrovaskularne bolesti su odgovorne za 6,2 milijuna smrti (3). KVB su prvi uzrok smrtnosti u Republici Hrvatskoj; samo u 2020. godini umrlo je 22 886 osoba, odnosno 40,1 % ukupno umrlih. Republika Hrvatska u usporedbi s Europom ima srednje visoke stope smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (4). Prisutnost višak kuhinjske soli (natrija) u prehrani može dovesti do nastanka hipertenzije (povišenog krvnog tlaka) (5), a uz nedovoljnu tjelesnu aktivnost, koja je jedan od čimbenika što dovodi do bolesti srca može povećati koincidenciju od moždanog i srčanog udara (6). Najbolja dijeta za prevenciju bolesti srca sastoji se od voća i povrća, cjelovitih žitarica, orašastih plodova, ribe, mesa peradi i biljnih ulja. Alkohol treba konzumirati u umjerenim količinama ili izbjegavati, konzumirati manje crvenog i prerađenog mesa, rafiniranih ugljikohidrata, valja izbjegavati hranu i piće s dodanim šećerom i natrijem, odnosno treba izbjegavati dosoljavanje hrane (6). Osobe koje se drže dijete u skladu s tim obrascem prehrane imaju 31 % manji rizik od srčanih bolesti, 33 % manji rizik od dijabetesa i 20 % manji rizik od moždanog udara (7). Nadalje, postoji velik broj kliničkih podataka koji pokazuju kako je promjenom prehrane i načinom života moguće poboljšati funkciju endotela i elastičnost arterija (8).

### 1.1. Endotel

Endotel je sloj stanica na unutrašnjoj strani krvne žile i u neposrednom je kontaktu s krvlju (9). Endotel je gotovo sveprisutan organ, heterogene strukture i visoke biološke prilagodbe te s brojnim metaboličkim aktivnostima. Prosječna težina mu je otprilike jedan kilogram. Endotel se sastoji od 1 do  $6 \times 10^{13}$  endotelnih stanica, debljine 0,5 do 1  $\mu\text{m}$  te prekriva unutrašnjost stijenki cirkulacijskih šupljina koje su površine od 4000 do 7000  $\text{m}^2$  (9, 10). Danas je o endotelu poznato da mu uloga nije samo obložna već da je to složen i dinamičan organ s raznim funkcijama i metaboličkim aktivnostima (10). Endotelna stanica

ima mnoge fiziološke zadaće koje su određene srčano – žilnim ili limfnim sustavom unutar kojeg se nalazi te iz toga da zaključiti kako endotel ima visoku sposobnost prilagodbe – prepoznaje i prilagođuje se na mehaničke i hemodinamičke podražaje. Najvažnije su funkcije endotela: inhibicija agregacije trombocita, regulacija vaskularnog tonusa, indiciranje migracije leukocita, upravljanje proliferacijom glatkih mišićnih stanica i aktiviranje propusnosti žilnih stijenki (8). Endotel luči brojne kemijske tvari koje ne djeluje samo na srce i krvožilni sustav nego i na druge udaljenije organe, gotovo na cijelu homeostazu organizma (9). U stanicama endotela stvaraju se produkti arahidonske kiseline (AA, prema engl. *arachidonic acid*) te n-3 polinezasićene masne kiseline (n-3 PUFA, prema engl. *n – 3 polyunsaturated fatty acids*) poput eikozapentaenske kiseline (EPA, prema engl. *eicosapentaenoic acid*), dokosaheksaenoične kiseline (DHA, prema engl. *docosahexaenoic acid*), metaboliziraju se čimbenici rasta i agregacijsko-koagulacijskoga puta, sintetiziraju se receptori za inzulin i lipoproteine, aktivnosti angiotenzin-konvertaze i lipoproteinske lipaze održavaju se u endotelu i k tome se još u njemu metaboliziraju serotonin i noradrenalin (11, 12).

## 1.2. Vaskularna reaktivnost

Vaskularna reaktivnost temelji se na vazodilataciji i vazokonstrikciji (10). Vazodilatacija je širenje krvnih žila čime se smanjuje žilni otpor, povećava protok krvi dok je vazokonstrikcija sužavanje krvnih žila čime se povećava žilni otpor i smanjuje protok krvi. U samom tom procesu endotel pretvara mehaničke sile u biološke reakcije čime se potiče kaskada stvaranja i lučenja vazoaktivnih tvari. Endotel opušta mnoge vazoaktivne tvari i tako regulira protok krvi. Endotelnu funkciju potpomažu čimbenici koje dijelimo na endotelne čimbenike kontrakcije (EDCF, prema engl. *endothelial – derived constricting factors*) i endotelne čimbenike relaksacije (EDRF, prema engl. *endothelium – derived relaxing factors*) (9). EDRF su snažni vazodilatatori koji šire krvne žile kao odgovor na niz signala stresa, kao što su hipoksija i nakupljanje adenzina difosfata. EDRF uključuje nestabilne kemijske tvari koje se oslobađaju iz endotelnih stanica, opuštaju vaskularne glatke mišiće (tj. izazivaju vazodilataciju) te inhibiraju nakupljanje trombocita i prijanjanje trombocita i leukocita na površinu endotela (13). Različiti tkivni hormoni sposobni su djelovati s endotelom i izazvati oslobađanje EDRF-a koji zatim u krvne stanice i obližnje glatke mišiće difundira trombocite. Najvažniji predstavnik EDRF-a je dušikov oksid (NO, prema engl. *nitric oxide*), a ostali koje valja spomenuti jesu endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF, prema engl. *endothelial – derived hyperpolarization factors*) i prostaciklin (PGI<sub>2</sub>, prema engl. *prostacyclin*) (11). PGI<sub>2</sub>

drugi je najbitniji EDRF, koji se otpušta kao odgovor na oštećenje endotela (9). PGI<sub>2</sub> sintetizira se pomoću enzima ciklooksigenaze (COX, prema engl. *cyclooxygenase*) čiji će mehanizam biti detaljnije opisan dalje u tekstu. EDHF supstance su i/ili električni signali koji se sintetiziraju i otpuštaju u endotelu te hiperpolariziraju glatke mišićne stanice krvnih žila uzrokujući opuštanje tih stanica i širenje krvne žile u promjeru (9).

### 1.3. eNOS, iNOS – mehanizam nastanak i uloga u endotelnoj funkciji

NO endotelni je vazodilatator glatkih mišića, a prvi su ga identificirali Furchgott i Zawadzki (14). NO široko je rasprostranjena signalna molekula koja sudjeluje u gotovo svakoj staničnoj i organskoj funkciji u tijelu te je i moćan vazodilatator i smatra se da ima veliki učinak na gestacijsku vazodilataciju. NO je vrlo reaktivna molekula i proizvodi se na različitim mjestima u tijelu; proizvodnja NO uključuje različite izoforme enzima i neenzimske putove, što doprinosi različitim ulogama NO u organizmu (15). NO ima glavnu ulogu u upali i oksidativnom stresu, no ima različite i učinke unutar tijela: važan je u agregaciji trombocita, citotoksičnosti, protoku krvi, sinaptičkom prijenosu i neurotransmiterima. NO je lipofilan (tj. topiv u lipidima), brzo difundira kroz stanične membrane, ima biološki poluživot od samo nekoliko sekundi i nestaje u prisutnosti kisika ili određenih slobodnih radikala kisikove vrste (16). NO formira se iz osnovne aminokiseline L-arginina i počinje djelovati aktiviranjem citoplazmatskog enzima gvanilat ciklaze, čime se potiče unutarstanično stvaranje cikličkog gvanozin monofosfata (GMP, prema engl. *guanosine monophosphate*). Ciklički GMP pokreće kaskadu biokemijskih putova što dovodi do smanjenja unutarstanične razine slobodnog kalcija i posljedičnog opuštanja glatkih mišića i smanjene funkcije trombocita. NO ima fiziološku ulogu u lokalnoj regulaciji protoka krvi, krvnog tlaka i stvaranja tromba (17). Hipertenzija, infarkt miokarda, ateroskleroza i moždani udar patološka su stanja koja se barem djelomično pripisuju nedostatku stvaranja NO. Nedostatak NO posljedica je oštećenja endotela (11). Proizvodnja NO katalizira se pretvorbom L-arginina u NO pomoću sintaze dušikova oksida (NOS, prema engl. *nitric oxide synthase*), uključujući neuronsku sintazu dušikova oksida (nNOS prema engl. *neuronal nitric oxide synthase*), endotelnu sintazu dušikova oksida (eNOS, prema engl. *endothelial nitric oxide synthase*) i inducibilnu sintazu dušikova oksida (iNOS, prema engl. *inducible nitric oxide synthase*). U krvnim žilama stvaranje NO ili prostaglandina (PG) normalno se katalizira u endotelu (18).

#### 1.4. COX 1, COX 2 – mehanizam nastanka i uloga u endotelnoj funkciji

Iako je era EDRF-a uistinu započela znanstvenim otkrićem Furchgotta i Zawadzskog (1980.), PG-ovi su zapravo prve identificirane vazoaktivne parakrine tvari iz endotela (19). Arahidonska kiselina, najčešći prekursor PG-ova, oslobađa se iz fosfolipida stanične membrane prvenstveno pomoću fosfolipaze A<sub>2</sub> i može se metabolizirati pomoću nekoliko enzimskih sustava uključujući sintaze prostaglandina H<sub>2</sub>, lipoksigenaze i monooksigenaze citokroma P450 ili se transformirati u izoprostane (20). COX je glavni enzim odgovoran za pretvorbu AA u PG (21). COX prvo oksidira AA u PG G<sub>2</sub>, a zatim je peroksidira u PG H<sub>2</sub>. COX postoji u dvije izoforme: COX1, koji je konstitutivno aktivan i COX2, koji se može inducirati i posreduje u upalnom odgovoru (22). Poznato je da je COX1 prisutan u većini tkiva u našim tijelima. U gastrointestinalnom traktu COX1 održava normalnu sluznicu želuca i crijeva štiteći želudac od probavnih sokova (23). Enzim je također uključen u funkciju bubrega i trombocita. COX2 se prvenstveno nalazi na mjestima upale. I COX1 i COX2 proizvode PG koji doprinose boli, vrućici i upali (24). Prostaglandini jedinstveni su spojevi jer imaju učinke nalik hormonima, odnosno utječu na reakcije u tijelu kada su prisutni u određenim tkivima, ali se ne oslobađaju iz žlijezda. COX1 i COX2 također su izraženi u endotelnim stanicama krvnih žila te njihova aktivnost uvelike sudjeluje u različitim upalnim i protuupalnim odgovorima na različita zbivanja unutar endotelnih stanica (22). Dokazano je da se njihovom inhibicijom, poput korištenja nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID, prema engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*), može inhibirati COX2 te time povećati kardiovaskularni rizik od nastanka hipertenzije, srčanog te moždanog udara (25). Na genskoj razini COX1 i COX2 dijele visoku razinu homologije i mogu funkcionirati neovisno jedno o drugome unutar stanice. Što se tiče svoje aktivacije, oba COX-a ovise o prisutnosti lipidnih peroksida, ali aktivacija COX2 zahtijeva deset puta nižu koncentraciju hidroperoksida nego COX1 (26). U većini tkiva, COX1 se izražava konstitutivno, dok se COX2 inducira na mjestima upale. Međutim COX2 također se konstitutivno izražava u nekoliko organa i tipova stanica uključujući i endotelne stanice. Iako se čini da je COX2 glavni doprinositelj ukupnom sustavnom stvaranju prostaglandina, u endotelnim stanicama COX1 je također važan izvor PG-a (27).

#### 1.5. Funkcionalna hrana

Funkcionalna hrana je prirodno obogaćena hrana, iz koje su uklonjene određene stvari i/ili dodane funkcionalne tvari. Koncept je nastao u Japanu 1980-ih kada su vladine agencije počele odobravati hranu s dokazanim dobrobitima koja premašuje samu nutritivnu vrijednost

hrane u nastojanju da poboljšaju zdravlje opće populacije (28). Primjer funkcionalne hrane jest hrana obogaćena vitaminima, mineralima, probioticima ili vlaknima. Voće, povrće, orašasti plodovi, sjemenke i žitarice sadrže nutrijente koji podižu njihovu vrijednost iznad prehrambene: zob sadrži vrstu vlakana koja se naziva beta glukan i za koju se pokazalo da smanjuje upalu, poboljšava imunološku funkciju i zdravlje srca, voće i povrće sadrži antioksidanse, koji pomažu u zaštiti od bolesti (29, 30). Kokošja jaja, obogaćena n-3 PUFA, selenom (Se, prema engl. *selenium*), vitaminom E i luteinom, su primjer funkcionalne hrane, no ona se još uvijek nalaze u procesu istraživanja. Dokazano je da n-3 PUFA utječu na različite fiziološke procese uključujući kognitivne funkcije i oštrinu vida, djeluju protuupalno i djeluju na metabolizam glukoze i lipida u cijelom tijelu (31). Učinak konzumacije n-3 PUFA obogaćene funkcionalne hrane kod zdravih osoba još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. No, postoji studija čiji je cilj bio utvrditi učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA na mikrovaskularnu reaktivnost, krvni tlak i profil lipida u serumu u mladim zdravim pojedincima. To je prva studija koja je pokazala da se može smanjiti rizik od KVB i spriječiti bolesti konzumacijom n-3 PUFA dobivenih putem obogaćenih jaja. Razlog je tomu što konzumacija izaziva promjene u mikrovaskularnoj reaktivnosti, smanjuje krvni tlak i razinu triglicerida kod zdravih mladih ispitanika (32). U drugoj studiji provedenoj na zdravim, mladim ljudima koja je procjenjivala utjecaj n-3 PUFA na staničnoj i molekularnoj razini, n-3 PUFA djelovale su na metabolizam lipida smanjenjem triglicerida u plazmi, smanjujući dostupnosti slobodnih masnih kiselina hepatocitima, naknadnim promjenama metabolizma lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL prema engl. *very low density lipoprotein*) i snižavanjem aterogenih lipoproteina (32). Dodatno, modulacija lipida uključuje razne biološki aktivne lipidne medijatore i modulaciju vaskularnih upalnih stanja i oksidativnog stresa što također može neizravno poboljšati mikrovaskularnu reaktivnost (33). Što se tiče vaskularnih i srčanih učinaka, postoje razlike između dvaju glavnih predstavnika n-3 PUFA, DHA i EPA. Čini se da je EPA učinkovitija u povoljnom ublažavanju aterosklerotskog procesa zbog svojih molekularnih svojstava koja poboljšavaju oksidativne procese na razini stanične membrane (33). Iako ova istraživanja idu u prilog konzumacije n-3 PUFA u mladim, zdravim ljudi zbog prevencije KVB i očuvanju mikrovaskularne funkcije, potrebna su daljnja istraživanja točnih mehanizama učinaka n-3 PUFA na molekularnoj razini.

### **1.6. Funkcionalni elementi obogaćenih jaja**

U posljednjih nekoliko desetljeća istraživani su potencijalni korisni učinci dijetetskog ili dopunskog dnevnog unosa n-3 PUFA, kao što su DHA, EPA i  $\alpha$ -linolenska masna kiselina

(ALA, prema engl. *alpha-linolenic acid*), na vaskularnu funkciju, imunomodulaciju, upalu te njihov potencijal za poboljšanje mišićne snage (34). Stoga n-3 PUFA dobivaju sve veću pozornost u sportskoj prehrani i smatraju se ergogenim suplementima koji mogu imati ulogu u pripremi za vježbanje, poboljšanju učinkovitosti vježbanja, poboljšanju oporavka i u sprječavanju ozljeda tijekom intenzivnog treninga (35). EPA, DHA, ALA, koje su n-3 masne kiseline, s jedne strane te linolenska (LA, prema engl. *linoleic acid*) i AA, koje su n-6 polinezasićene masne kiseline (n-6 PUFA, prema engl. *n – 6 polyunsaturated fatty acids*) s druge strane dvije su glavne klase PUFA koje se susreću u prehrani, a obje su skupine esencijalne masne kiseline potrebne za normalno ljudsko zdravlje. Podatci iz više eksperimentalnih, epidemioloških i kliničkih studija pokazuju da n-3 PUFA imaju kardiovaskularni zaštitni učinak. Smanjuju razine oksidativnog stresa, povećavaju antioksidativni kapacitet i mogu utjecati na slobodne kisikove vrste (ROS, prema engl. *reactive oxygen species*) (36). Funkcionalna hrana obogaćena n-3 PUFA poboljšava vazodilataciju te povećava mikrovaskularnu reaktivnost u mirovanju kod sportaša što pozitivno utječe na endotelnu funkciju (37).

Omjer n-6/n-3 PUFA u zapadnim kulturama varira između 10 : 1 pa do 30 : 1, dok je idealan omjer 1 : 1 do 1 : 4. Drugim riječima, ne unosi se dovoljno n-3 PUFA. Poznato je da n-3 PUFA imaju niz zdravstvenih prednosti protiv KVB, uključujući dobro utvrđene hipotrigliceridemičke i protuupalne učinke. Također, razne studije ukazuju na obećavajuće antihipertenzivne, antikancerogene, antioksidativne, antidepresivne i protuupalne učinke (38). Ukratko, n-3 PUFA imaju višestruke zdravstvene dobrobiti posredovane barem djelomično njihovim protuupalnim djelovanjem, stoga treba poticati njihovu konzumaciju, osobito iz prehrambenih izvora.

Lutein se ne ubraja u vitamine, ali može ga se opisati kao antioksidant koji pripada skupini karotenoida i suštinski je sastojak u ljudskoj prehrani. Lutein sintetiziraju biljke, zato ga se u najvećim koncentracijama može pronaći u lisnatom, zelenom povrću poput špinata, kelja, kupusa, prokulica. Vjeruje se da lutein funkcionira na dva načina: prvo kao filter plave svjetlosti, a drugo kao antioksidans koji uklanja ROS-ove. Dokazi upućuju na to da je konzumacija luteina povezana s manjom incidencijom stvaranja katarakta i manjom pojavom očnih bolesti kao što je makularna degeneracija povezana sa starenjem (39). Isto tako neka znanstvena otkrića sugeriraju da veći unos hranom i veće koncentracije luteina u krvi su općenito povezani s boljim kardiometaboličkim zdravljem (40). Devet od deset studija pokazalo je pozitivne učinke luteina na endotelnu funkciju smanjenjem krvnog tlaka,

promjenom širine arterije, migracije monocita i migracije vaskularnih glatkih mišićnih stanica (41). Međutim dokazi uglavnom dolaze iz opservacijskih studija u odraslih, dok su velike intervencijske studije i studije o luteinu tijekom trudnoće i djetinjstva rijetke.

Selen je mineral koji se nalazi u tlu, prirodno se pojavljuje u vodi i u nekoj hrani, ali njegova količina u prirodi ovisi o vrsti tla i položaju, što znači da unos Se ovisi o koncentraciji u tlu gdje namirnice rastu. Ljudima je potrebna vrlo mala količina, ali usprkos tome Se igra ključnu ulogu u njihovu metabolizmu. U organizmu se ugrađuje u proteine koje nazivamo selenoproteinima i pohranjuje se u različitim organima (jetri, štitnjači, mišićima, bubrezima i spolnim žlijezdama). Kao sastavni dio selenoproteina, Se ima strukturnu i enzimsku ulogu; najpoznatiji je kao antioksidans i katalizator za proizvodnju aktivnog hormona štitnjače (42). Meso, mesne prerađevine, cjelovite žitarice, jaja, ribe, morski plodovi glavni su izvori Se u hrani, a najveće koncentracije Se možemo naći u brazilskim oraščićima. Budući da povećava antioksidativne sposobnosti i kvalitetu protoka krvi, Se može povećati otpornosti na bolesti i negativne učinke stresa. Klinička ispitivanja dvosmislena su u povezivanju Se s rizikom od kardiovaskularnih bolesti, no postoje čvrsti dokazi u prilog tomu da se oštećenja vaskularnog endotela mogu spriječiti Se, zato što vaskularne endotelne stanice ekspimiraju nekoliko selenoproteina koji imaju važnu ulogu u obrambenom sustavu protiv oksidativnog stresa, a njihov izražaj reguliran je statusom Se (43).

Vitamin E vitamin je topiv u mastima, a u prirodi se sastoji od tokoferola i tokotrienola. Među tokoferolima, alfa-tokoferol (ALFA-TOH prema engl. *alpha-tocopherol*) i gama-tokoferol (GAMMA-TOH, prema engl. *gamma-tocopherol*) nalaze se u serumu i crvenim krvnim stanicama, a ALFA-TOH prisutan je u najvišoj koncentraciji i naše ga tijelo najviše rabi. ALFA-TOH jest antioksidans topiv u lipidima i potreban za očuvanje staničnih membrana. Mnoge su studije istraživale metabolizam, transport i učinkovitost ALFA-TOH-a u prevenciji posljedica povezanih s KVB-om te je dokazano kako poboljšava imunološku funkciju i sprječava stvaranje ugrušaka u arterijama (44). Biljna ulja, sjemenke suncokreta, orašasti plodovi, voće (kivi, avokado, rajčica) i povrće (brokula, šparoge,) puni su vitamina E, no unosi se dovoljno regularnom prehranom pa su deficijencije vitamina E rijetke. Smatra se da nadopuna prehrane vitaminom E pruža zaštitu protiv kardiovaskularnih bolesti kroz svoje antioksidativno djelovanje sprječavanjem oksidacije lipoproteina i inhibicijom agregacije trombocita (45). Na endotel djeluje tako da GAMMA-TOH povećava aktivnosti NOS-a koji proizvodi NO čime se opuštaju krvne žile. Pripisuju mu se i antikancerogena svojstva, a dokazano je da su visoke razine vitamina E u plazmi povezane sa smanjenim



rizikom od Alzhemirove bolesti kod starijih pacijenata. Taj je neuroprotektivni učinak povezan s kombinacijom različitih oblika vitamina E, ne samo s ALFA-TOH-om (46).

## **2. HIPOTEZA**

Konsumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminom E, selenom i luteinom u razdoblju od tri tjedna povećati će izražaj gena enzima COX1, COX2, eNOS, iNOS u populaciji mladih zdravih sportaša u usporedbi sa sportašima koji konzumiraju obična jaja.

#### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Cilj je ovog istraživanja ispitati promjenu / razliku genskog izražaja enzima – COX1, COX2, eNOS, iNOS iz mononuklearnih stanica periferne krvi kod mladih, zdravih ispitanika koji su konzumirali kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselina, luteinom, selenom i vitaminom E i kod mladih, zdravih ispitanika koji su konzumirali obična, placebo kokošja jaja.

## MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je provedena kao slijepa, kontrolirana intervencijska studija; dvostruka, vođena kao klinički pokus (ID:NCT04564690). Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine:

1. eksperimentalnu skupinu ili Nutri4 (N = 8) grupu koja je kroz tri tjedna konzumirala kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenom i luteinom
2. kontrolnu skupinu (N = 6) koja je kroz tri tjedna konzumirala obična kokošja jaja.

Ispitanicima i istraživačima nije bila dostupna informacija tko konzumira obogaćena jaja, a tko obična. Trajanje protokola je iznosilo 21 dan. Tijekom studije svim ispitanicima je dva puta bila izvađena periferna krv: prilikom 1. posjete i ulaska u protokol i prilikom 2. posjete nakon tri tjedna konzumacije kokošnjih jaja tijekom kojih su oni obavljali svoje redovite treninge. Sva mjerenja su se odvijala u jutarnjim satima natašte (7:30 – 10:00 h). Tijekom tri tjedna ispitanici su konzumirali tri tvrdo kuhana (kuhana oko 10 minuta) kokošja jaja dnevno odjednom ujutro. Sva jaja su bila istog proizvođača (Marijančanka d.o.o) te su bila iste veličine L i nije ih bilo moguće razlikovati golim okom. Nakon tri tjedna konzumiranja obogaćenih jaja izmjerili smo genski izražaj glasničke ribonukleinske kiseline (mRNA, prema engl. *messenger ribonucleic acid*) COX1, COX2, eNOS i iNOS enzima u uzorcima leukocita periferne krvi kod sportaša koji su konzumirali obična ili obogaćena kokošja jaja. Studija je podržana od strane Europskih strukturnih i investicijskih fondova, bespovratna sredstva osigurao je Hrvatski nacionalni znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu zdravstvenu skrb Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera Osijek #KK.01.1.1.01.0010. Studiju je odobrilo Etičko povjerenstvo Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet u Osijeku KLASA: 602-04/19-09/7, URBROJ: 383-60-01-19-13.

### 4.2. Ispitanici

Ispitanici su bili 14 sportaša u dobi između 18 i 30 godina koji su se dobrovoljno javili na istraživanje. Svi ispitanici su mladi zdravi sportaši (koji treniraju najmanje 5 treninga tjedno unazad 12 mjeseci). Nijedan ispitanik u anamnezi nije imao bolesti srca, hipertenziju, hiperlipidemiju, bubrežne bolesti ili bolesti perifernih krvnih žila. Svaki ispitanik je bio detaljno obaviješten o svim protokolima i procedurama ovog istraživanja te je morao potpisati informirani pristanak. Podaci koji su prikupljeni istraživanjem su pohranjeni i obrađeni u elektroničkom obliku, dostupni su samo istraživaču te je identitet ispitanika zaštićen.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Sastojci funkcionalno obogaćenih jaja

Kako bismo dobili funkcionalno obogaćena jaja nesilice je bilo potrebno hraniti modificiranom smjesom najmanje 2 tjedna. U smjesu je dodano 5 % mješavine ulja, 0,5 mg/kg organskog selena, 200 mg/kg luteina i 200 mg/kg vitamina (47). ALA, DHA i EPA su najvažnije masne kiseline u njihovim obrocima. Dovoljan unos tih kiselina postiže se hranjenjem repicom, zelenim lisnatim povrćem, orasima za ALA, dok za EPA i DHA potrebno je unositi ribe i riblje ulje. Hranjenjem biljnim i životinjskim krmivom n-3 PUFA kiseline su se koncentrirale u žumanjku. Na taj način smo dobili jeftinu i lako dostupnu funkcionalnu hranu. U tablici 1. prikazani su sastojci funkcionalnih obogaćenih i običnih jaja: obogaćena jaja imaju statistički značajnu veću koncentraciju vitamina E, Se, luteina, zasićenih masnih kiselina (SFA, prema engl. *saturated fatty acids*), ALA, EPA, DHA. Ispitanici u Nutri4 eksperimentalnoj skupini konzumirali su kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, Se i vitaminom E, a ispitanici u kontrolnoj skupini konzumirali su obična kokošja jaja.

**Tablica 1.** Sastojci funkcionalno obogaćenih i običnih jaja.

<b>Jaje L razreda prosječne mase 68 g ima cca 60 g jestivog dijela</b>			
	<b>Kontrola</b>	<b>Nutri4</b>	<b>P vrijednosti</b>
	mg/60 g jaja (jestivi dio)		
Vitamin E (mg)	0,595	1,098 *	< 0,001
Lutein(mg)	0,11	0,616 *	< 0,001
Selen ( mg)	0,0138	0,02305 *	< 0,001
Masne kiseline			
∑SFA	1566 (346)	1442 (185 ) *	<0,001
∑MUFA	1976 (189)	2419 (139)	0,18
∑n-6 PUFA	1263 (148)	747 (46)	0,14
LA	1165 (140)	702 (43)	0,47
AA	89 (9)	44 † (4)*	0,025
∑n-3 PUFA	146 (20)	342 (25)	< 0,001
ALA	71 (11)	189 † (16)*	< 0,001
EPA	n.d.	19 (2)	< 0,001
DHA	75 (11)	135 (11)*	< ,001

∑SFA - zasićene masne kiseline; ∑MUFA - mononezasićene masne kiseline; ∑n-6 PUFA - polinezasićene masne kiseline; LA - linoleinska kiselina; AA - arahidonska kiselina; ∑n-3 PUFA - polinezasićene masne kiseline; ALA - alfa-linoleinska kiselina; EPA - eikopentaenska kiselina; (DHA - dokozaheksaenska kiselina; n.d. nije detektirano.); Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina i standardna devijacija; \* označava  $p < 0,05$ .

## 4.3.2.

**Izolacija PBMC-ova - mononuklearnih stanica periferne krvi**

U vakuumske epruvete koje sadrže etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA, prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) koja služi kao antikoagulans (ljubičasti čep, koriste se za hematološke pretrage i sadrže aditiv K3EDTA) uzrokovano je 20 mL krvi ispitanika iz kubitalne vene. Iz pune periferne krvi bilo je potrebno izolirati mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC, prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*). Izolacija PBMC-a je postignuta pomoću gradijenta gustoće Ficoll-Paque™ PLUS. Otpipetirano je 15 mL Ficoll-Paque otopine u Falcon epruvetu od 50 mL, potom u istu epruvetu je stavljena krv koja je prethodno bila razrijeđena fiziološkom otopinom. Fiziološka otopina je puferirana fosfatom (PBS, prema eng. *phosphate - buffered saline*) pa su otopina i krv pomiješana u omjeru 1:1, ali pažljivo jer je bilo od iznimne važnosti da se tekućine ne pomiješaju. Epruveta je čvrsto zatvorena i stavljena u centrifugu na +4 ° C na 800 relativne centrifugalne sile (RCF, prema engl. *relative centrifugal force*) kroz 25 minuta. Sloj u kojem su se nalazile mononuklearne stanice je pažljivo pipetom prebačen u novu epruvetu od 15 mL. U tu istu epruvetu na stanice je dodan PBS, čvrsto je zatvorena i centrifugirana na 800 RCF tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja, odbačen je supernatant, ostatak u epruveti je resuspendiran, dodan je PBS do vrha epruvete te je centrifugirano na jednakim uvjetima (10 min, 800 RCF). Nakon zadnjeg centrifugiranja, supernatant je odbačen, dodano je 5 ml PBS, a PMBC-evi su pohranjeni na -80 °C. Radi očuvanja vijabilnosti stanica, stanice su se smrznule u medijima fetalnog govedeg seruma (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*) i dimetil sulfoksidu.

**4.3.3. Izolacije humane RNA iz PBMC-a**

Izolacija mRNA iz PBMC je obavljena metodom izolacije s kiselim gvanidintiocijanatom i fenol-kloroform ekstrakcijom prema preporučenoj metodi Chomczynskia i Sacchia (48). Najprije su smrznuti uzorci otopljeni u vrućoj kupelji, ostavljeni malo na sobnoj temperaturi, pipetom resuspendirani i prebačeni u tubice za lančanu reakciju polimeraze (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*). U tubice je dodan RPMI medij nakon čega su centrifugirani u mikrocentrifugi i isprani PBS-om. TRIzol otopina je korištena za izolaciju, koja je najprije vorteksirana, dodan je kloroform te su zajedno vorteksirani dok nisu poprimili ružičasto obojenje. Uzorak u tubici je stavljen u centrifugu tijekom 15 min na 12000 RCF. Po završetku centrifugiranja vidjele su se tri odvojene različite komponente u tubici: proteini, ribonukleinska kiselina (RNA, prema engl. *ribonucleic acid*) i deoksiribonukleinska kiselina (DNA, prema engl. *deoxyribonucleic acid*). Pažljivo je pipetom povučen supernatant (u njemu se nalazi RNA), na RNA dodan isopropanol i stavljen u centrifugu kroz 5 min. U tubicu je

ispipetiran 75 % etanol i stavljen u centrifugu na 7500 RFC, 5 minuta. Kako bismo dobili najčišću moguću RNA taj postupak smo napravili dva puta. Na pročišćeni uzorak dodano je 40  $\mu$ L *Nuclease-Free Water* otopine. Nakon izolacije mRNA, koncentracija je očitana pomoću IMPLENA, nanofotometra i uzorci su spremljeni u hladnjak.



**Slika 1.** Uređaj za mjerenje čistoće koncentracije RNA - spektrofotometar IMPLEN (Izvor: fotografirala autorica rada)

#### 4.3.4. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu s reverznom transkripcijom

Izražaj mRNA enzima COX1, COX2, iNOS i eNOS je određen PCR-om u stvarnom vremenu (qPCR, prema engl. *real-time polymerase chain reaction*) uređajem BioRad, CFX96 Real-Time System. qPCR je metoda za kvantifikaciju specifičnih molekula DNA, razvijena je 90.-ih godina prošlog stoljeća, a od tada je postala vrlo pouzdana, dostupna i precizna metoda. Za reakciju su potrebne vrlo male količine mRNA što omogućava upotrebu ove metode u slučajevima kada na raspolaganju imamo vrlo male količine tkiva (49). Prije samog qPCR-a mRNA molekula se prevodi u komplementarne DNA pomoću reverzne transkriptaze. Razlog tome je što je RNA jednolančana nestabilna molekula. Prema uputama *Sigma-Aldrich* i *Applied Biosystem* uzorak je bio pročišćen i dobivena je komplementarna DNA molekula koja je mnogo prirodnija za rad. Sljedeći korak je bio pripremanje reakcijske smjese koja sadrži



kalup, oligonukleotidne početnice, deoksiribonukleotide, polimerazu, ione magnezija, fluoroscentne obilježene nukleotidne probe za detekciju signala i pufer. Slijed sekvenci gena koji smo koristili:

- eNOS - sekvenca: Forward: 5'-CAACAGCATCTCCTGCTCAGA-3'

Reverse: 5'-CCACTTCCACTCCTCGTAGC-3'

- nNOS - sekvenca: Forward: 5'-ATTTATBCCTTTCCAGCC-3,

Reverse: 5'-AGGATCCAGGCTTCAGGCTA-3'

- iNOS - sekvenca: Forward: 5'-AGAGCCAGAAGCGCTATCAC-3'

Reverse: 5'-TTGAAGTGGTGCCTCAGCA-3'

- COX1 – sekvenca: Forward: 5'-TCTTGCTGTTCCCTGCTCCTG-3'

Reverse: 5'-GTCACACTGGTAGCGGTCAA-3'

- COX2 – sekvenca: Forward: 5'-ATCTACGGTTTGCTGTGGGG-3'

Reverse: 5'-TTCTGTACTGCGGGTGGAAC-3'

- GAPDH - sekvenca: Forward: 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'

Reverse: 5'-AATTTGCCATGGGTGGAAT-3''0.

Rezultati su normalizirani GAPDH housekeeping genom. Sami ciklus je počeo razdvajanjem roditeljske DNA, tj denaturacijom koja se postiže visokom temperaturom od 95 ° C, zatim spuštanjem temperature na 55 – 60 ° C je slijedila hibridizacija, tj. početnice su se “zalijepile” na svoje komplementarne sljedove. Sljedeći korak je bio elongacija; produživanje novonastale DNA. Elongacija se odvijala na temperaturi od 72° C zato što je to idealna temperatura za Taq DNA polimerazu. Polimeraza je termostabilni enzim koji je zaslužan za produljivanje lanaca slaganjem oligonukleotida. U svakom ponovljenom ciklusu broj novonastalih molekula DNA eksponencijalno se udvostručio, a novi lanci su poslužili kao kalupi za vezivanje početnice i amplifikaciju nove DNA. Tako smo iz početne količine DNA dobili veliki broj novonastalih kopija. Razlog zašto smo odabrali qPCR kao metodu je taj što je to brza metoda: u realnom vremenu umnaža veliki broj kopija, rezultati su odmah vidljivi na eksponencijalnoj krivulji i nije ich potrebno razdvajati elektroforezom. PCR je sada već

raširena i uobičajena metoda koja se koristi u svim medicinskim-biološkim laboratorijima, a koristi se za otkrivanje gena, ekspresiju gena ili pomaže identificirati patogen u infekciji.



**Slika 2.** Uređaj lančane reakcije polimeraze - BioRad CFX96 (Izvor: fotografirala autorica rada)

### 4.3.5. Statistička analiza

Za statističku analizu koristila se metoda  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , koja se koristi za izračunavanje izražaja gena uzoraka prilikom izvođenja lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. U slučaju normalne raspodjele podataka rezultati su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele varijabli je testirana Shapiro-Wilk testom normalnosti. Razlike između skupina utvrđene su jednosmjernom analizom varijance. Statistička značajnost je postavljena na  $p < 0,05$ .

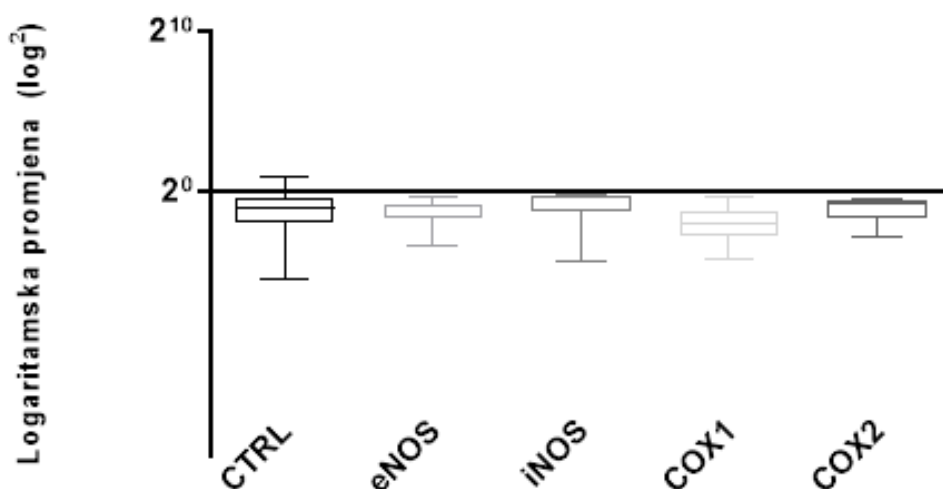
#### 4. REZULTATI

##### 5.1. Promjena genskog izražaja odabranih enzima kod mladih, zdravih ispitanika

Ukupna RNA je izolirana iz perifernih mononuklearnih stanica kod zdravih, mladih ispitanika. I kod kontrolne i kod NUTRI4 skupine (skupine koja je jela n-3 PUFA jaja) provedena su dva vađenje krvi: na samom početku protokola; prije konzumacije jaja i nakon tri tjedna, tj. na kraju konzumacije jaja. Iz tih krvnih stanica RT-PCR-om smo izmjerili gensku ekspresiju enzima: COX1, COX2, iNOS i eNOS. Kod prvog mjerenja koje je odrađeno prije početka protokola u obje skupine kao što je i pretpostavljeno nema značajnih razlika u rezultatima. No i kod drugog mjerenja, nakon protokola i svakodnevne konzumacije jaja ni u jednoj skupini nije utvrđena razlika u izražaju odabranih gena.

##### 5.2. mRNA izražaj enzima COX1, COX2, eNOS, iNOS u kontrolnoj skupini

Kontrolna skupina nije pokazala statistički značajnu promjenu u mRNA izražaju niti jednog enzima nakon trodnevne konzumacije običnih kokošnjih jaja u usporedbi s početnim mjerenjem (Slika 3).

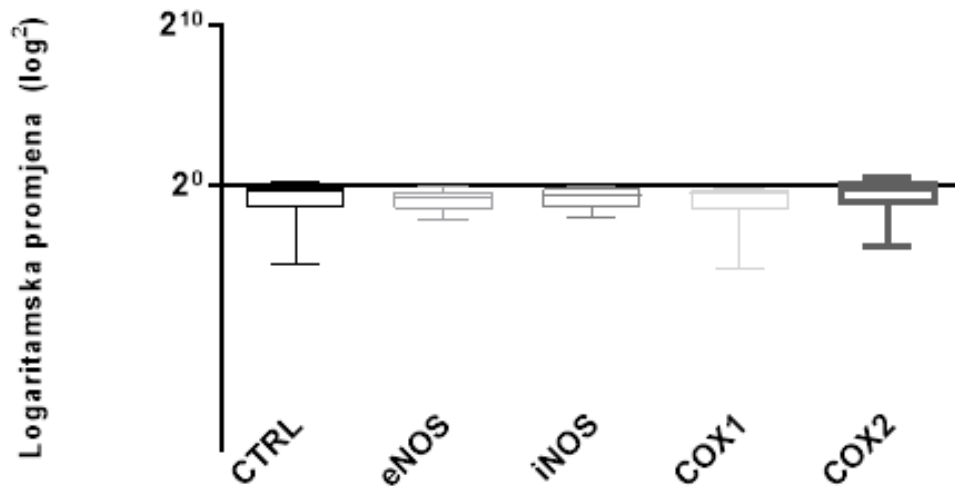


*Slika 3.* mRNA izražaj vazoaktivnih enzima u kontrolnoj skupini

U genskom izražaju endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS), inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS), ciklooksigenaza 1 i 2 (COX1, i COX2) nema statistički značajne promjene u kontrolnoj skupini (CTRL) nakon protokola ( $p > 0,05$ ). Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina prikazana kao kutija i standardna devijacija prikazana kao stupići (engl. *bars*). Središnja linija (os *x*) označava kolika je logaritamska promjena koncentracije referentnog gena normaliziranog na koncentraciju ciljnog gena.

### 5.3. mRNA izražaj enzima u NUTRI4 skupini

Eksperimentalna ili NUTRI4 skupina konzumirala je obogaćena kokošja jaja. Nakon trojtjedne dijeta genski izražaj vazoaktivnih metabolita nije pokazao statističku značajnu promjenu u mRNA izražaju niti jednog enzima (Slika 4).



*Slika 4.* mRNA izražaj enzima u NUTRI4 skupini

U genskom izražaju endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS), inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS), ciklooksigenaza 1 i 2 (COX1, i COX2) nema statistički značajne promjene u skupini koja je konzumirala obogaćena jaja (NUTRI4) nakon trojtjednog protokola ( $p > 0,05$ ). Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina prikazana kao kutija i standardna devijacija prikazana kao barovi. Središnja linija (os x) označava kolika je logaritamska promjena koncentracije referentnog gena normaliziranog na koncentraciju ciljnog gena.

## 5. RASPRAVA

U istraživanju je sudjelovalo 14 mladih zdravih sportaša, od kojih je njih osmero bilo dijelom Nutri4 skupine, koja je konzumirala obogaćena jaja s n-3 PUFA, luteinom, selenom, vitaminom E, dok je njih šestero bilo dijelom kontrolne skupine koja je konzumirala obična jaja. Ispitanici su tijekom tri tjedna svakoga jutra konzumirali tri tvrdo kuhana jaja.

Cilj istraživanja je bio utvrditi genski izražaj enzima COX1, COX2, eNOS i iNOS prije i poslije dijetalnog protokola u objema skupinama. Enzimi COX1, COX2 i NOS sudjeluju u mikrovaskularnoj reaktivnosti. Dosad provedene studije daju različite zaključke što se tiče mikrovaskularne funkcije: jedenje n-3 PUFA jaja nije pokazalo nikakve promjene mikrovaskularne funkcije u pacijenata s koronarnim sindromom (50), ali nadomjestak n-3 PUFA povećava oslobađanje NO, što može igrati središnju ulogu u kardiovaskularnim mehanizmima (51).

Jedan od nutrijenata obogaćenih jaja jesu n-3 PUFA. Ove masne kiseline prisutne su u različitim količinama u staničnoj membrani sisavaca, a njihova količina utječe na različite stanične funkcije. Dokazi dobiveni u studijama na životinjama i ljudima pokazuju da n-3 PUFA utječu na aterosklerotski proces. U krvnim žilama n-3 PUFA poboljšavaju funkciju endotela, potiču vazodilataciju opuštanjem glatkih mišićnih stanica, imaju antioksidativno, protuupalno i antitrombotičko djelovanje te mogu odgoditi razvoj plakova, povećati njihovu stabilnost i smanjiti krutost žila (52). Iako nam je poznata korist n-3 PUFA, one nisu u dovoljnim količinama uvrštene u našu prehranu. Idealna prehrana bi bila mediteranska prehrana ili uzimanje suplemenata koje sadrže n-3 PUFA. Nadalje, dokazano je da su vitamin E, selen i n-3 PUFA kao dodaci prehrani sposobni značajno modulirati imunološku funkciju i smanjiti upalu (53). Klinički nalazi pokazali su povezanost između luteina i interleukina-6 u pacijenata s bolešću koronarnih arterija: rezultati pokazuju da lutein ima potencijalnu ulogu u rješavanju kronične upale u bolesnika (54). Riblje ulje koje je glavni izvor n-3 PUFA sadrži prirodni inhibitor COX, što rezultira time da se smanjuje ovisnost o NSAID i smanjuje rizik od nastanka KVB. Klinička istraživanja pokazuju da visoke razine EPA, DHA, AA i drugih masnih kiselina uzrokuju otpuštanje NO i povećavaju njihove razine u endotelnim stanicama (55). Stoga bi veća količina n-3 PUFA u krvi djelovala na proizvodnju PG-a i NO-a, što bi za posljedicu imalo pozitivno djelovanje na endotel: vazodilatacija, uklanjanje ugrušaka, širenje glatkih mišića, moguće sprječavanje upale krvnih žila što je od iznimne važnosti, jer se upala smatra početkom svih kardiovaskularnih bolesti. Funkcionalna hrana uz odgovarajuće

nutritivne učinke povoljno djeluje na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu, poboljšava zdravlje i dobrobit ili smanjuje rizik od bolesti. Istraživanja dokazuju da konzumacija nutritivno obogaćenih kokošnjih jaja utječe na fiziološke procese povezane s oksidativnom ravnotežom, mikrovaskularnu reaktivnost (31). Kod sportaša koji konzumiraju n-3 PUFA jaja dokazana je bolja vazodilatacija (34). Prehrambeni unos n-3 PUFA uglavnom se odvija preko suplemenata, a vrlo rijetko postoje studije o uključenoj funkcionalnoj (obogaćenoj) hrani. Unatoč tome rezultati sugeriraju da postoji otvoren prostor za procjenu utjecaja konzumacije n-3 PUFA i tjelovježbe na karakteristike sastava krvi, antitrombotičke učinke i mikrovaskularnu funkciju.

Nadalje, nedavna istraživanja unutar Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu zdravstvenu brigu o zdravlju pokazala su da je funkcionalna hrana obogaćena četirima tvarima (n-3 PUFA, lutein, vitamin E i selen) poboljšala vazodilataciju u zdravih mladih ispitanika (56). Mikrovaskularni protok kože mjereno je laserski Dopplerom prije i poslije dijetetskih protokola (56). Uočene su promjene pripisane promijenjenoj proizvodnji metabolita putem enzima COX, što je temelj našeg istraživanja jer n-3 PUFA predstavljaju supstrat za enzime koje smo određivali.

Također, postoje dokazi koji podupiru oblik povezanosti između NO i luteina. Lutein je vrlo učinkovit antioksidans protiv  $N_2O_3$  i peroksinitrita (56). Osim toga sugerirano je da lutein značajno smanjuje upalu povezanu s proizvodnjom NO izazvanom lipopolisaharidom (56). Lutein može smanjiti proizvodnju NO i značajno inhibirati iNOS gen i ekspresiju proteina (56). Dokazano je da se protuupalna svojstva luteina pokazuju smanjenjem ekspresije iNOS-a na razini mRNA i proteina u stanicama makrofaga miša (57). Čini se da lutein može djelovati kao značajan modulator oksidativnih proizvoda na bazi NO, a može i prekinuti lanac upalnog puta, putem promjena ekspresije gena i proteina (57). Druga studija istraživala je zaštitni učinak luteina na retinalnu ishemiju i inhibicijski učinak ekspresije nNOS-a i COX-2 (58).

Što se tiče vitamina E, u miševa je dokazano da je smanjenje proizvodnje  $PGE_2$  izazvano vitaminom E uzrokovano smanjenom aktivnošću COX-a. Međutim, vitamin E nije imao učinka na COX mRNA i razine proteina, što ukazuje na posttranslacijsku regulaciju COX-a pomoću vitamina E (58). Daljnji su eksperimenti pokazali da vitamin E smanjuje aktivnost COX-a smanjenjem stvaranja peroksinitrita, hidroperoksida za koji se pokazalo da je uključen u aktivaciju COX2 (59). Inhibicija aktivnosti COX-a izazvana vitaminom E može doprinijeti njegovom učinku smanjenja rizika od KVB-a. Kod drugog pokusa s miševima

dodatak vitamina E je značajno smanjio ekspresiju eNOS-a i iNOS-a u krvožilnom, ali ne i bubrežnom tkivu (60).

Stoga je naša hipoteza potekla od toga da veći unos n-3 PUFA, luteina i vitamina E i selen funkcionálnom hranom će utjecati na genski izražaj enzima koji kataliziraju nastanak vazoaktivnih metabolita. Budući da je jedini cilj bio izmjeriti mRNA, ne može se govoriti o tome koliko je imao utjecaja na ostale biokemijske parametre. Može se pretpostaviti da genska ekspresija nije izrazila zbog nekoliko ograničenja samog ovog istraživanja. S obzirom na prije spomenute pozitivne učinke konzumacije obogaćenih jaja u funkcionalnim pokusima, nedostatak razlika genskog izražaja promatranih enzima može biti posljedica dizajna istraživanja koje je presječno, odnosno ne prati dinamičku evoluciju gensko-proteinske ekspresije i posljedične proizvodnje metabolita. Tako je moguće da su geni već deaktivirani, a da se učinci enzima vide u funkcionalnom odgovoru.

Iako naše istraživanje nije potvrdilo hipotezu, konzumacija prehrane s više n-3 PUFA i istraživanje preglednih studija podsjetilo je ispitanike i ispitivače koliko je važno unositi omega kiseline u organizam, implantirati više ribe i riblja ulja u prehranu ili barem veću pozornost posvetiti funkcionalnoj hrani i suplementima prehrane, zato što ispravan unos n-3 PUFA i n-6 PUFA ima preventivan, a na kraju i terapijski učinak.

**6. ZAKLJUČAK**

Konsumacija obogaćenih jaja nije dovela do povećanog izražaja gena enzima COX1, COX2, eNOS, iNOS.



## 7. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Cilj je bio ispitati učinke konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, luteinom, selenom i vitaminom E na enzime uključene u proizvodnju vazoaktivnih metabolita (COX1, COX2, eNOS, iNOS)

**NACRT STUDIJE:** Istraživanje je ustrojeno kao randomizirano, dvostruko slijepo i placebo kontrolirano.

**ISPITANICI I METODE:** Kontrolirana, intervencijska studija (Clinical Trials ID: NCT04564690) provedena je na zdravim mladim sportašima (N = 14) koji su konzumirali 3 kokošja jaja dnevno tijekom 3 tjedna. Nutri4 skupina (N = 8) konzumirala je obogaćena jaja (n3-PUFA: 1026 mg/dan, lutein: 616 mg/dan, selen: 0,02305 mg/dan i vitamin E: 1098 mg/dan), a kontrolna skupina (N = 6) konzumirala je obična jaja (n-3 PUFA: 438 mg/dan, lutein: 110 mg/dan, selen: 0,0138 mg/dan, vitamin E: 595 mg/dan). Uzorci krvi su prikupljeni prije i nakon konzumiranja jaja. Ekspresija mRNA COX1, COX2, eNOS i iNOS enzima u leukocitima periferne krvi mjerena je qPCR metodom (BioRAD, CFX96 Real-Time System), normalizirana na GAPDH housekeeping gen. ANOVA je provedena za statističku analizu s Tukeyjevim post hoc testom;  $p < 0,05$  smatra se statistički značajnim.

**REZULTATI:** Konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja nije dovela do značajnog povećanja genskog izražaja enzima u kontrolnoj,eksperimentalnoj niti između dvije skupine.

**ZAKLJUČAK:** Konzumacija kokošnjih jaja nije utjecala na izražaj gena enzima kod sportaša.

**KLJUČNE RIJEČI:** Endotelna funkcija; RNA; Messenger; Sportaši; Funkcionalna hrana

## 8. SUMMARY

### **mRNA expression of enzymes COX1, COX2, eNOS and iNOS in athletes consuming enriched hen eggs in n-3 polyunsaturated fatty acids, lutein, selenium and vitamin E**

**STUDY AIM:** This research aimed to examine the effects of consumption of chicken eggs enriched with n-3 PUFA, lutein, selenium and vitamin E on enzymes involved in the production of vasoactive metabolites (COX1, COX2, eNOS, iNOS).

**STRUCTURE OF THE STUDY:** The study was organized as randomized, double-blind, and placebo-controlled.

**PARTICIPANTS AND METHODS:** Controlled, interventional study (Clinical Trials ID: NCT04564690) was conducted in healthy young athletes (N = 14) who consumed 3 hen eggs per day for 3 weeks. Nutri4 group (N = 8) consumed enriched eggs (n-3 PUFAs:1026 mg/day, lutein:616 mg/day, selenium:0,0138 mg/day and vitamin E:1098 mg/day), and control subjects (N = 6) consumed ordinary eggs (n-3 PUFAs:438 mg/day, lutein:110 mg/day, selenium:0,02035 mg/day, vitamin E: 595 mg/day). Blood samples were collected before and after eggs consumption. mRNA of COX1, COX2, eNOS and iNOS enzymes expression in peripheral blood leukocyte was measured by qPCR method (BioRAD, CFX96 Real- Time System), normalized to GAPDH housekeeping gene. ANOVA was conducted for statistical analysis with Tukey's post hoc test;  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

**RESULTS:** The consumption of enriched chicken eggs did not cause a significant change in the gene expression of the enzyme in the control, experimental or between the two groups.

**CONCLUSION:** Consumption of hen eggs did not affect gene expression of those enzymes in athletes.

**KEY WORDS:** Endothelial function ; RNA; Messenger; Athletes; Functional food

**9. LITERATURA**

1. Briggs MA, Petersen KS, Kris-Etherton PM. Saturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Replacements for Saturated Fat to Reduce Cardiovascular Risk. *Healthcare (Basel)*. 2017;21;5(2):29. doi: 10.3390/healthcare5020029.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. *Kardiovaskularne bolesti 2017*. Dostupno na adresi: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/kardiovaskularne-bolesti>. Datum pristupa: 15.05.2022.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Odjel za srčano-žilne bolesti 2019. Dostupno na: adresi <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevencija-nezaraznih-bolesti/odjel-za-srcano-zilne-bolesti/>. Datum pristupa: 15.05.2022.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. *Kardiovaskularne bolesti 2020*. Dostupno na <https://www.plivazdravlje.hr/vijesti/clanak/35594/Kardiovaskularne-bolesti-u-RH-su-uzrok-40-smrti.html>. Datum pristupa: 15.05.2022.
5. Gabrić I.D., "Prehrana i kardiovaskularno zdravlje", *Medicus*, vol.25, br. 2 *Kardiologija danas*, str. 227-234, 2016.
6. Lucarini M, Durazzo A, Sette S, Lombardi-Boccia G, Santini A, Strazzullo P. Sodium Intake and Related Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;16;22(14):7608. doi: 10.3390/ijms22147608.
7. Chiuve SE, Fung TT, Rimm EB. Alternative dietary indices both strongly predict risk of chronic disease. *The Journal of nutrition*. 2012;142:1009-18. doi: 10.3945/jn.111.157222.
8. Oikonomou E, Siasos G, Tsigkou V, Bletsas E, Panoilia ME, Oikonomou IN, i sur. Coronary Artery Disease and Endothelial Dysfunction: Novel Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Curr Med Chem*. 2020;27(7):1052-1080. doi: 10.2174/0929867326666190830103219. PMID: 31470773.
9. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Medicinski vjesnik*, 2012;135-146.
10. Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities*. Stuttgart: Schattauer 2006; 5:4 doi:10.1186/1475-2840-5-4,.

11. Ruzic A, Miletic B, Nola A, Persic V, Razov Radas M, i sur. Endotelna disfunkcija u “enigmatskoj slagalici” kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas.*, 2009;6,1: 2-15.
12. Karolyi D. Polinezasićene masne kiseline u prehrani i zdravlju ljudi. *Meso: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 2007; Vol. IX No. 3 60, 1827–1833.
13. Vane J, Anggard E, Botting R. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.*, 1990; 323: 27-36.  
doi:0.1056/NEJM199007053230106.
14. Furchgott, R., Zawadzki, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.1980; 288, 373–376. doi:10.1038/288373a0.
15. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999 Dec;34(6):879-86. doi: 10.1097/00005344-199912000-00016. PMID: 10598133.
16. Rubanyi G, Romero J, Vanhoutte P. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 1986; 250:H1145-9.
17. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(1):97-104. doi: 10.1097/MCO.0b013e328332f99d. PMID: 19841582; PMCID: PMC2953417.
18. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1(Suppl 1):S193-201. doi: 10.1038/sj.bjp.0706458. PMID: 16402104; PMCID: PMC1760731.
19. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(3):894-912. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.0127.
20. Sandoo A, Van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010; 4:302-12. doi: 10.2174/1874192401004010302.
21. Koller A, Kaley G. Prostaglandins mediate arteriolar dilation to increased blood flow velocity in skeletal muscle microcirculation. *Circ Res.* 1990 Aug;67(2):529-34. doi: 10.1161/01.res.67.2.529. PMID: 2115825.
22. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that

- inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976 Oct 21;263(5579):663-5. doi: 10.1038/263663a0. PMID: 802670.
23. Jackson LM, Wu KC, Mahida YR, Jenkins D, Hawkey CJ. Cyclooxygenase (COX) 1 and 2 in normal, inflamed, and ulcerated human gastric mucosa. *Gut*. 2000 Dec;47(6):762-70. doi: 10.1136/gut.47.6.762. PMID: 11076873; PMCID: PMC1728133.
24. Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Apr 24;1083(1):1-17. doi: 10.1016/0005-2760(91)90119-3. PMID: 1903304.
25. FitzGerald GA. COX-2 in play at the AHA and the FDA. *Trends Pharmacol Sci*. 2007; 28:303–307.
26. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002 Aug;68-69:165-75. doi: 10.1016/s0090-6980(02)00029-1. PMID: 12432916.
27. Shimizu T. Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison. *Nutr Res Rev*. 2003; 16(2):241-52. doi: 10.1079/NRR200363.
28. Bashir KMI, Choi JS. Clinical and Physiological Perspectives of  $\beta$ -Glucans: The Past, Present, and Future. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(9):1906. doi: 10.3390/ijms18091906.
29. Pem D, Jeewon R. Fruit and Vegetable Intake: Benefits and Progress of Nutrition Education Interventions- Narrative Review Article. *Iran J Public Health*. 2015; (10):1309-21.
30. Mihalj M, Stupin A, Kolobarić N, Bujak I, Matic A, Kralik Z, i sur. 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(10):3122. doi: 10.3390/nu12103122.
31. Stupin A, Rasic L, Matic A, Stupin M, Kralik Z, Kralik G, i sur. Omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs consumption enhances microvascular reactivity in young healthy individuals. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018; 43(10):988-995. doi: 10.1139/apnm-2017-0735.
32. Stupin M, Kibel A, Stupin A, Selthofer-Relatić K, Matic A, Mihalj M, i sur.. 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 Intake? *Front Physiol.* 2019; 30;10:1129. doi: 10.3389/fphys.2019.01129.
33. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Matic A, i sur. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Prev Nutr Food Sci.* 2021; 26(4):388-399. doi: 10.3746/pnf.2021.26.4.388.
34. Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2002; 15;277(11):8755-8. doi: 10.1074/jbc.R100062200.
35. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Food Nutr Res.* 2012; 65:211-22. doi: 10.1016/B978-0-12-416003-3.00013-5.
36. Münzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Jul 11;70(2):212-229. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.035. PMID: 28683969; PMCID: PMC5663297.
37. Mollace, V Muscoli, C.; Masini, E.; Cuzzocrea, S.; Salvemini, D. Modulation of prostaglandin synthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol. Rev.* 2005, 57; 217–252.
38. Alves-Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett.* 2004; 15;150(1):57-83. doi: 10.1016/j.toxlet.2003.10.031.
39. Leermakers ET, Darweesh SK, Baena CP, Moreira EM, Melo van Lent D, Tielemans MJ i sur. The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2016; 103(2):481-94. doi: 10.3945/ajcn.115.120931
40. Hajizadeh-Sharafabad F, Ghoreishi Z, Maleki V, Tarighat-Esfanjani A. Mechanistic insights into the effect of lutein on atherosclerosis, vascular dysfunction, and related risk factors: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies. *Pharmacological Research.* 2019; 149:104477. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104477.
41. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000; 356(9225):233-41. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02490-9.

42. Hara S, Shoji Y, Sakurai A, Yuasa K, Himeno S, Imura N. Effects of selenium deficiency on expression of selenoproteins in bovine arterial endothelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24(7):754-9. doi: 10.1248/bpb.24.754.
43. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.*2008; 45(5):417-50. doi: 10.1080/10408360802118625.
44. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2014 May;14(2):e157-65. Epub 2014 Apr 7. PMID: 24790736; PMCID: PMC3997530.
45. Meydani M. Vitamin E. *Lancet.* 1995; 345:170–5.
46. Kralik G, Kralik Z, Grčević M, Kralik I, Gantner V. Enrichment of table eggs with functional ingredients. *Journal of Central European Agriculture.* 2018;19(1):72-82.
47. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9. doi: 10.1006/abio.1987.9999. PMID: 2440339.
48. Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, i sur. *Metode u molekularnoj biologiji.* Zagreb. Institut Ruđer Bošković, 2007. str. 361-366 2007; 361-366
49. Ćurić ŽB, Masle AM, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Stupin A, Mihaljević Z, i sur. 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. *Biology (Basel).*2021; 14;10(8):774. doi: 10.3390/biology10080774.
50. A Żebrowska, K Mizia-Stec, M Mizia, Z Gąsior, S Poprzęcki: Omega-3 fatty acids supplementation improves endothelial function and maximal oxygen uptake in endurance-trained athletes, 2015; 15(4):305-14. doi: 10.1080/17461391.2014.949310.
51. 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(3):191-200. doi: 10.1016/j.numecd.2016.07.011.

52. Poles J, Karhu E, McGill M, McDaniel HR, Lewis JE. The effects of twenty-four nutrients and phytonutrients on immune system function and inflammation: A narrative review. *J Clin Transl Res.* 2021; 27;7(3):333-376.
53. Chung RWS, Leanderson P, Lundberg AK, Jonasson L. Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2017 Jul;262:87-93. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.008. Epub 2017 May 6. PMID: 28527371.
54. Sherratt SCR, Dawoud H, Bhatt DL, Malinski T, Mason RP. Omega-3 and omega-6 fatty acids have distinct effects on endothelial fatty acid content and nitric oxide bioavailability. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2021; 173:102337. doi: 10.1016/j.plefa.2021.102337.
55. Šušnjara P, Mihaljević Z, Stupin A, Kolobarić N, Drenjančević I. Influence of consumption of eggs enriched with functional compounds on endothelial function in healthy young subjects. U: XXVII Međunarodno savjetovanje, KRMIVA 2022.
56. Stringham, J.M.; Stringham, N.T. Nitric Oxide and Lutein: Function, Performance, and Protection of Neural Tissue. *Foods* 2015; 4:4, 678-689. <https://doi.org/10.3390/foods4040678>
57. Rafi MM, Shafaie Y. Dietary lutein modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene and protein expression in mouse macrophage cells. *Mol Nutr Food Res.*2007; 51(3):333-40. doi: 10.1002/mnfr.200600170.
58. Choi JS, Kim D, Hong YM, Mizuno S, Joo CK. Inhibition of nNOS and COX-2 expression by lutein in acute retinal ischemia. *Nutrition.*2006; 22(6):668-71. doi: 10.1016/j.nut.2005.08.011.
59. Wu D, Hayek MG, Meydani S. Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. *J Nutr.* 2001; 131(2):382S-8S. doi: 10.1093/jn/131.2.382S.
60. N D. Vaziri, Y Ding ,Zhenmin Ni. Nitric Oxide Synthase Expression in the Course of Lead-Induced Hypertension.1999; 34:558–562



## 10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Tajana Grinžek

Datum rođenja: 28. srpnja 1996.

Adresa stanovanja: Donje Jesenje 19 B, Gornje Jesenje 49233

Kontakt: +385953982162

E-mail: tgrinzek@gmail.com

Obrazovanje:

2011. – 2015.:

Gimnazija u Krapini

Smjer: jezična gimnazija

Osobne vještine i kompetencije:

Materinji jezik: hrvatski jezik

Strani jezici: engleski jezik B2, njemački jezik C1

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

Članstva

2020.-

Hrvatska udruga studenata medicinsko laboratorijske dijagnostike (CMLDSA)

2021.-

Studentska sekcija za fiziologiju i imunologiju Osijek (FiziOS)

2021.-

Hrvatsko društvo za hipertenziju (HDH)

Znanstvene publikacije

Sažetci sa skupova (sažetci u zbornicima i časopisima)

1. **Grinžek T**, Kolobarić N, Šušnjara P; Haršanji Drenjančević I. COVID-19 i hipertenzija. U : Svjetski dan hipertenzije, Osijek,2021.

2. **Grinžek T**, Šušnjara P, Kolobarić N, Drenjančević I. mRNA Expression of Enzymes COX1, COX2, eNOS AND iNOS in Athletes Consuming Enriched Hen Eggs .U: 4th RECOOP International Student and 17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences - Book of Abstracts, Prag, Češka