

UTJECAJ UNOSA FUNKCIONALNE HRANE OBOGAĆENE NUTRIJENTIMA NA MIKROVASKULARNU ENDOTELNU FUNKCIJU U POPULACIJI SPORTAŠA - RANDOMIZIRANA KONTROLIRANA STUDIJA

Kolar, Luka

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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:152:588109>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA SROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Luka Kolar

**UTJECAJ UNOSA FUNKCIONALNE HRANE OBOGAĆENE NUTRIJENTIMA NA
MIKROVASKULARNU ENDOTELNU FUNKCIJU U POPULACIJI SPORTAŠA –
RANDOMIZIRANA KONTROLIRANA STUDIJA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA SROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Luka Kolar

**UTJECAJ UNOSA FUNKCIONALNE HRANE OBOGAĆENE NUTRIJENTIMA NA
MIKROVASKULARNU ENDOTELNU FUNKCIJU U POPULACIJI SPORTAŠA –
RANDOMIZIRANA KONTROLIRANA STUDIJA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Stupin, dr. med.

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

Rad ima 103 stranica.

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

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



Operativni program
**KONKURENTNOST
I KOHEZIJA**

**EUROPSKI STRUKTURNI
I INVESTICIJSKI FONDOVI**


Europska unija
Zajedno do fondova EU

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

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

Zahvala:

Prvenstveno se želim zahvaliti predsjednici Zavoda za fiziologiju i imunologiju te voditeljice projekta u okviru kojeg je studija rađena, prof. dr.sc. Ines Drenjančević, ujedno i komentorici rada na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju bez koje izrada ove disertacije ne bi bila moguća. Osim na ukazanoj prilici želim se zahvaliti na usmjeravanju, poticanju i pomoći koja je nerijetko prelazila ulogu komentora.

Isto tako velika hvala mentoru rada, doc. dr. sc. Marku Stupinu, dr. med. na ukazanom povjerenju i što me je od studentskih dana uputio u svijet znanosti te me vodio cijelim putem izrade ove doktorske disertacije uz poticanje, praćenje i pomoć kad god mi je ona bila potrebna. U potpunosti je ispunio uloge mentora, a nerijetko i više od toga.

Također se želim iznimno zahvaliti izv. prof. dr. sc. Ani Stupin, koja je, iako službeno nije mentor rada, često pružala pomoć u svakom segmentu izrade ove disertacije i svojim savjetima uvelike doprinijela kvaliteti, ali i lakoći izrade iste.

Nadalje, želim se zahvaliti svim kolegama sa Katedre za fiziologiju i imunologiju koji su uvijek bili spremni udijeliti koristan savjet i pomoći, a posebno želim izdvojiti dr. sc. Petra Šušnjaru koji je uvijek nesebično pomagao kada mi je pomoć bila potrebna.

Na kraju se posebno želim zahvaliti svojoj supruzi koja me je od studentskih dana poticala u znanstvenom radu i svojom nesebičnošću i potporom uvelike doprinijela izradi ove disertacije, te svojoj obitelji koja me je potaknula i podržavala u svakom koraku.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Fizička aktivnost i kardiovaskularno zdravlje.....	1
1.2. Redovita fizička aktivnost.....	1
1.3. Akutna fizička aktivnost	5
1.4. Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija.....	7
1.5. Utjecaj fizičke aktivnosti na mikrocirkulaciju	12
1.5.1. Utjecaj redovite fizičke aktivnosti na mikrocirkulaciju	12
1.5.2. Utjecaj akutne fizičke aktivnosti na mikrocirkulaciju.....	13
1.6. Prehrambene navike sportaša.....	14
1.7. Funkcionalna hrana	16
1.7.1. Polinezasićene masne kiseline.....	18
1.7.2. Selen	23
1.7.3. Lutein.....	24
1.7.4. Vitamin E.....	26
2. HIPOTEZA	29
3. CILJEVI	30
4. MATERIJALI I METODE.....	31
4.1. Ustroj studije i populacija ispitanika	31
4.2. Proizvodnja jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E.....	32
4.3. Protokol istraživanja.....	33
4.4. Određivanje osnovnih antropometrijskih mjera te mjerenje biokemijskih i kardiovaskularnih parametara	34
4.5. Analiza masnih kiselina u serumu te koncentracije selena, luteina i vitamina E u serumu.....	35
4.6. Mjerenje protoka krvi i vaskularne reaktivnosti mikrocirkulacije kože	36
4.7. Protokol akutnog iscrpljujućeg treninga	38
4.8. Mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima te koncentracija 8-izo prostaglandina F _{2α} (8-izo-PGF _{2α}) i mijeloperoksidaze (MPO) te njene serumske aktivnosti.....	40
4.9. Unutarstanična produkcija reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u mononuklearnim stanicama periferne krvi.....	41
4.10. Statistička analiza.....	42
5. REZULTATI.....	44
5.1. Karakteristike ispitanika.....	44
5.2. Antropometrijske mjere, hemodinamski i biokemijski parametri ispitanika.....	44

5.3. Koncentracija selena, vitamina E i luteina u serumu te serumski profil masnih kiselina	47
5.4 Endotel-ovisna i endotel-neovisna vazodilatacija mikrocirkulacije kože podlaktice	52
5.5 Akutni iscrpljujući trening i raspon mikrovaskularne reakcije (Δ PORH)	54
5.6 Aktivnost antioksidativnih enzima, serumska koncentracija 8-izo prostaglandina F 2 α (8-izo-PGF2 α) i serumska aktivnost i koncentracija mijeloperoksidaze (MPO)	56
5.7. Stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita i superoksida u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC)	58
6. RASPRAVA	61
6.1. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na hemodinamske i biokemijske parametre te lipidni profil sportaša	61
6.2. Promjena koncentracija n-3 PUFA, luteina, selena i vitamina E nakon konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja, suplementi i prehrana sportaša.....	64
6.3. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na mikrovaskularnu i endotelnu funkciju sportaša	67
6.4. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na promjene mikrovaskularne i endotelne funkcije nakon akutnog vježbanja	71
6.5. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na biljege oksidativnog stresa kod sportaša.....	72
7. ZAKLJUČCI.....	77
8. SAŽETAK	78
9. SUMMARY	80
10. LITERATURA.....	82
11. ŽIVOTOPIS	97

Popis kratica korištenih u tekstu

8-iso-PGF2α	8-iso-prostaglandin-2-alfa
ACh	acetilkolin
AChID	acetilkolinom potaknuta vazodilatacija
AEE	akutni iscrpljujući trening (engl. <i>acute exhaustive exercise</i>)
ACS	akutni koronarni sindrom (engl. <i>acute coronary syndrome</i>)
ALA	α -linolenska kiselina
ANSES	Francuska agencija za sigurnost hrane
ARA	arahidonska kiselina
AT II	angiotenzin II
AUC	površina ispod krivulje
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass index</i>)
BP	arterijski tlak
cAMP	ciklični adenzin monofosfat
CAT	katalaza
CO	srčani minutni volumen (engl. <i>cardiac output</i>)
COX-1	ciklooksigenaza-1
COX-2	ciklooksigenaza-2
CR10	category-ratio skala
CRP	C reaktivni protein
CV	kardiovaskularni
DBP	dijastolički krvni tlak
DCF-DA	diklorofluor-rescein diacetatom (engl. <i>dichlorofluo-rescein diacetate</i>)
DHA	dokosaheksanoična kiselina

DHE	dihidroetidijom (engl. <i>dihydroethidium</i>)
DHS	dokozaheksanska kiselina
ED	endotelna disfunkcija
EDCF	endotelni čimbenici kontrakcije (engl. <i>endothelial-derived constricting factors</i>)
EDHF	endotelni hiperpolarizirajući faktor (engl. <i>endothelial-derived hyperpolarization factor</i>)
EDRF	endotelni čimbenik relaksacije (engl. <i>endothelium-derived relaxing factors</i>)
EDV	završni dijastolički volumen (engl. <i>end-diastolic volume</i>)
eNOS	endotelna NO sintetaza
EPA	eikosapentaenoična kiselina
ET-1	endotelin-1
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove
FMD	dilatacija uzrokovana protokom (engl. <i>flow mediated dilation</i>)
GC-MS/MS	plinska kromatografija-tandem masena spektrometrija
GPx	glutation peroksidaza
H₂O₂	vodikov peroksid
HDL	lipoproteini visoke gustoće (engl. <i>high-density lipoprotein</i>)
HNO₃	dušična kiselina
HR	puls (engl. <i>heart rate</i>)
ICP-MS	masena spektrometrija induktivno spregnute plazme
IL	intereukin
kg	kilogram
LA	linolna kiselina
LDF	mjerjenje protoka laser doplerom (engl. <i>laser Doppler flowmetry</i>)
LDL	lipoproteini niske gustoće (engl. <i>low-density lipoprotein</i>)

LTB4	leukotrieni serije 4
m	metar
MAP	srednji arterijski krvni tlak
MPO	mijeloperoksidaza
MUFA	jednostruko nezasićene masne kiseline
n-3 PUFA	omega-3 polinezasićene masne kiseline
NO	dušikov oksid
PBMCs	mononuklearne stanice periferne krvi
PGI₂	prostaglandin I ₂
PGI₃	prostaglandin I ₃
PORH	postokluzivna reaktivna hiperemija
PU	arbitrarne perfuzijske jedinice
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
ROS	slobodni radikali kisika
RPE	samoprocjena napora
RPM	okretaja u minuti (engl. <i>round per minute</i>)
SBP	sistolčki krvni tlak
sCAMs	stanične adhezijske molekule
SD	standardna devijacija
Se	selen
SFA	zasićene masne kiseline
SNP	natrijev nitroprusid
SNPID	natrijevim nitroprusidom inducirana vazodilatacija
SOD	superoksid dismutaza

SV	udarni volumen (engl. <i>stroke volume</i>)
TNF-α	tumor nekrotizirajući faktor- α
TPR	ukupni periferni otpor (engl. <i>total peripheral resistance</i>)
TXA2	tromboksan A2
TXB 3	tromboksani serije 3
TXB2	tromboksani serije 2
VO2 max	maksimalni aerobni kapacitet
WHR	omjer struk-bokovi (engl. <i>waist to hip ratio</i>)

Popis tablica

Tablica 1.1. Čimbenici s vazokonstriksijskim i/ili vazodilatacijskim djelovanjem u krvnim žilama.....	10
Tablica 4.1. Koncentracije mikronutrijenata u običnim i obogaćenim (Nutri4) kokošnjim jajima.....	32
Tablica 5.1. Utjecaj konzumacije običnih (Kontrolna skupina) i n-3 PUFA-om, selenom, luteinom i vitaminom E obogaćenih kokošnjih jaja na antropometrijske, hemodinamski i biokemijske parametre kod profesionalnih sportaša.....	44
Table 5.2. Utjecaj konzumacije običnih (Kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om, selenom, luteinom i vitaminom E na serumski profil masnih kiselina kod profesionalnih sportaša	47
Tablica 5.3. Utjecaj konzumacije normalnih (Kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om, selenom, luteinom i vitaminom E na serumske koncentracije selena, luteina i vitamina E kod profesionalnih sportaša.....	51
Tablica 5.4. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 PUFA, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) na aktivnost antioksidativnih enzima	57

Popis slika

Slika 1.1. Utjecaj redovite fizičke aktivnosti na kardiovaskularni sustav.....	4
Slika 1.2. Shematski prikaz funkcija endotelne stanice i njenih osnovnih funkcija.....	8
Slika 1.3. Kemijske strukture polinezasićenih masnih kiselina.....	19
Slika 1.4. Prikaz metabolizma dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina.....	20
Slika 1.5. Kardioprotektivni učinci n-3 polinezasićenih masnih kiselina.....	22
Slika 1.6. Kemijska struktura molekule Luteina.....	25
Slika 1.7. Kemijska struktura molekule α -tokoferola.....	27
Slika 4.1. Shematski prikaz uključenih i isključenih kriterija studije.....	31
Slika 4.2. Vremenski tijek studije s provedenim mjerenjima u obje točke studije (svakom studijskom posjetu).....	34
Slika 4.3. Prikaz ispitanika priključenog na LDF.....	36
Slika 4.4. Prikaz originalnog zapisa mjerenja mikrovaskularne reaktivnosti pomoću Laser doppler Flowmetra (MoorVMS-LF, Axminster, UK) iz Laboratorija za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.....	37
Slika 4.5. Prikaz ključnih točaka veslačke tehnike na ergometru.....	39
Slika 4.6. Borgova skala subjektivnog osjećaja opterećenja 1-10, engl. <i>Borg Rating of Perceived Exertion</i> (RPE) Scale.....	40
Slika 4.7. Shematski prikaz protokola studije.....	43
Slika 5.1. Utjecaj konzumacije običnih (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom 3 tjedna na mikrovaskularnu reaktivnost kože te endotel ovisnu i endotel neovisnu vazodilataciju kod profesionalnih sportaša.....	53
Slika 5.2. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa)	

tijekom tri tjedna na raspon mikrovaskularne reakcije kože nakon akutnog iscrpljujućeg treninga (AEE) kod profesionalnih sportaša.....	55
Slika 5.3. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih OMEGA-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom tri tjedna na koncentraciju serumskog proteina 8-izo prostaglandina F 2 α (8-izo-PGF2 α) kod profesionalnih sportaša.....	56
Slika 5.4. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom tri tjedna na stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita (DCF-DA) u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC) kod profesionalnih sportaša.....	59
Slika 5.5. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih OMEGA-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom tri tjedna na stvaranje superoksida (DHE) u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC) kod profesionalnih sportaša.....	60

1. UVOD

1.1. Fizička aktivnost i kardiovaskularno zdravlje

O pozitivnom utjecaju fizičke aktivnosti na zdravlje pisali su još antički mislioci, ali sustavna istraživanja na tu temu započela su tek sredinom prošlog stoljeća. Među prvim značajnim studijama o utjecaju fizičke aktivnosti na kardiovaskularni (CV) mortalitet bila je na zaposlenicima londonskog javnog prijevoza 1950-ih godina, kada su Morris i njegovi suradnici demonstrirali znatno niže stope kardiovaskularnih bolesti bile kod kontrolora autobusa koji su tjelesno aktivni nego kod vozača koji su sedentarni. Sljedeća studija iste istraživačke skupine pokazala je slične rezultate između poštara koji su fizički aktivni naspram sedentarnih službenika u državnim službama (1). Veliki napredak u ovome području ostvario je i britanski profesor Ralph Paffenbarger sa svojim studijama na lučkim radnicima te bivšim studentima Harvarda gdje je pokazao veliku korist redovite fizičke aktivnosti u smanjivanju rizika od srčanog udara. Iz tih studija, došao je do zaključka kako bi cilj tjedne fizičke aktivnosti koja ima protektivni učinak na CV bolesti trebao biti oko 2000 kcal (2,3). Nakon početnih studija, velik broj drugih istraživanja također je pokazao da fizička aktivnost vezana uz profesiju ili redovito vježbanje imaju utjecaj na smanjenje CV rizika i do 50 %, a redovita i intenzivna fizička aktivnost mogu smanjiti CV rizik čak za 60 – 70 %. Ukoliko se uz ovakve učinke tjelesne aktivnosti prate smjernice vezane za pušenje, pretilost te prehranu, postiže se snažan učinak na dugovječnost te kvalitetu života pojedinca (4).

1.2. Redovita fizička aktivnost

Nakon provedenih brojnih studija, činjenica koja je danas općeprihvaćena je da redovita tjelesna aktivnost ima blagotvoran učinak na osjetljivost na inzulin, lipidni profil, sastav tijela, ali i krvožilni sustav zdravih pojedinaca, ali i CV-ih bolesnika. Također, dokazano je i da redovita tjelesna aktivnost značajno reducira rizik od razvitka CV-ih bolesti te da je fizička sprema pojedinca barem jednako važna kao i preostali tradicionalni rizični faktori (pušenje, dijabetes, pretilost, arterijska hipertenzija) za kardiovaskularnih bolesti, ali i smanjenje smrtnosti od istih. (5). Navedeno potvrđuje i činjenica da su u svoje smjernice za prevenciju CV-ih bolesti sva kardiološka i kardiovaskularna društva, pa tako i Europsko kardiološko

društvo uključilo i tjelesnu aktivnost odnosno tjelovježbu kao klasa I preporuka. Preporuka je težiti barem 150-300 minuta umjerene tjelesne aktivnosti tjedno ili 75-150 minuta intenzivne aerobne tjelesne aktivnosti tjedno ili kombinacija prethodno navedenih vrsta aktivnosti kako bi se smanjila ukupna smrtnost pa i smrtnost od kardiovaskularnih rizika. Pod umjerenu tjelesnu aktivnost smatra se npr. hodanje brzim tempom (4.1-6.5 km/h), lagana vožnja biciklom, usisavanje, košnja travnjaka, tenis, odnosno održavanje pulsa između 64-76% od maksimalnog. Dok bi se pod intenzivno vježbanje moglo svrstati trčanje, brža vožnja biciklom, kopanje u vrtu, plivanje, odnosno održavanje pulsa između 77-95% od maksimalnog (6).

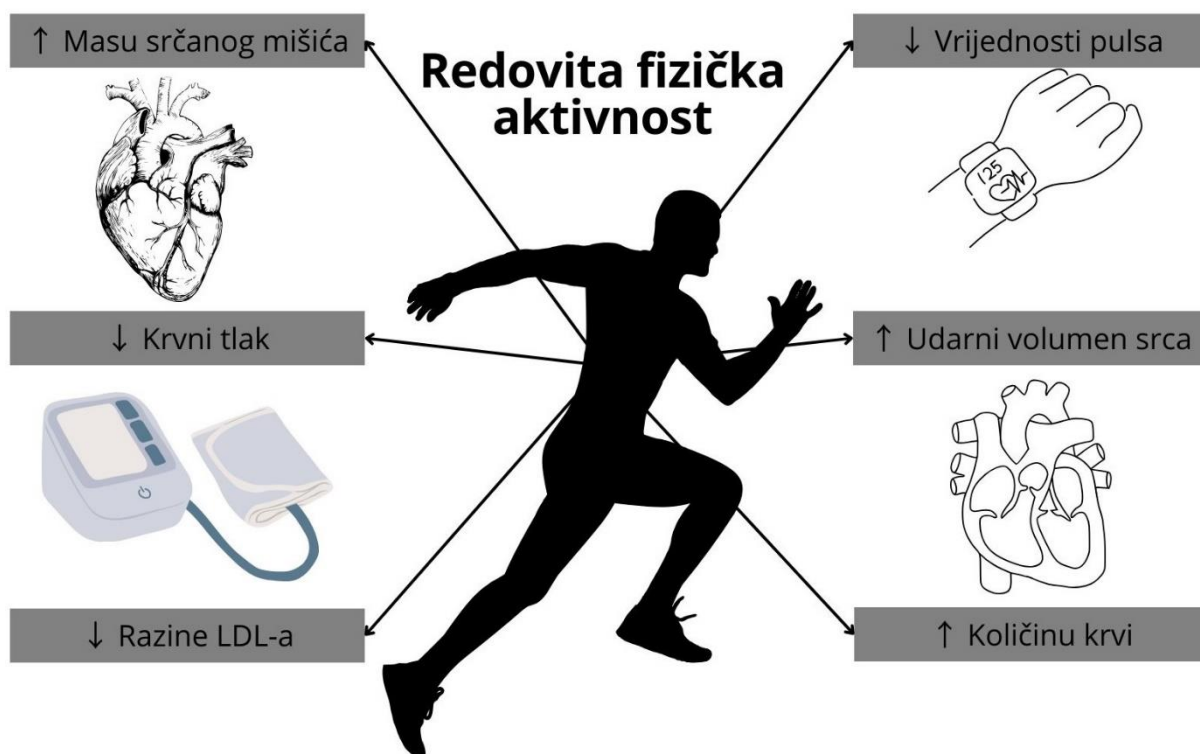
Primarni cilj organizma povećanje je maksimalnog aerobnog kapaciteta ($VO_2 \max$) kao prilagodba na redovitu aerobnu tjelesnu aktivnost. Promjena brojnih drugih fizioloških varijabli podržava i potpomaže ovoj prilagodbi. Učestalost, intenzitet i trajanje vježbanja imaju velik utjecaj na razinu prilagodbe organizma na istu, pa tako redovito izlaganje akutnoj aerobnoj vježbi ima velik utjecaj na hemodinamske parametre organizma.

Masa i dimenzija srčanog mišića, a posljedično tome i srčani udarni volumen (SV, eng. stroke volume) su povećani kod osoba koje redovito vježbaju primarno aerobne treninge (7). Ovakva prilagodba nastaje kroničnim opterećenjem srca povećanim volumenom uzrokovanim također velikim venskim priljevom (velik završni dijastolički volumen, engl. *end-diastolic volume*, EDV) što dovodi do povećanja završnog dijastoličkog promjera lijeve klijetke, a time i konačnim povećanjem mase lijevog ventrikula (8). Scharhag i suradnici su u svojoj studiji uspoređivali veličinu lijeve i desne klijetke kod sportaša i sedentarnih pojedinaca slične dobi i građe. Koristeći magnetnu rezonancu došli su do zaključka kako sportaši imaju balansirano značajno veću masu lijeve, ali i desne klijetke, kao i povećan lijevi i desni EDV usporedno sa sedentarnim ispitanicima (9). Osim povećanja srčanog mišića, u brojnim presječenim ali i longitudinalnim studijama pokazano je da redovita aerobna vježba izaziva i povećanje volumena krvi. Navedene studije su pokazale da sportaši u prosjeku imaju 20 - 25 % veću količinu krvi usporedno sa sedentarnim kontrolama. Takav porast količine krvi prvenstveno je rezultat povećanja volumena plazme, a neovisno je o spolu i dobi (10). Do takve prilagodbe dolazi vrlo brzo, u samo desetak dana redovitog vježbanja, a smatra se poželjnim jer niži hematokrit znači manju viskoznost krvi što ubrzava njen protok pa tako i dopremu kisika i hranjivih tvari u ciljna tkiva (11).

Sportaši u prosjeku dokazano imaju niže vrijednosti pulsa u mirovanju usporedno sa sedentarnim pojedincima, a jedan od najlakše prepoznatljivih indikatora uvježbanosti sportaša

upravo je bradikardija. Srčani minutni volumen (engl. *cardiac output*, CO) kod sportaša jednak je onome kod sedentarnih ispitanika, ali povećan udarni volumen omogućava niži broj otkucaja u mirovanju (12). Povećan SV sportaša doprinosi značajnom povećanju CO-a kod sportaša u maksimalnom naporu, tako je demonstrirano da pojedini sportaši mogu povećati vrijednosti CO-a čak do 35 L/min. Takav povećan SV sportaša objašnjen je putem povećanih srčanih dimenzija, povećanog volumena plazme te povećanog venskog priljeva i posljedično povezane sposobnosti ventrikula za istežanje te prilagodbu povećanom venskom priljevu (13). Kada je u pitanju arterijski tlak (BP) (dijastolički krvni tlak, DBP; sistolički krvni tlak, SBP; srednji arterijski krvni tlak, MAP) usporedno sa sedentarnim pojedincima, sportaši su imali vrlo malu ili nikakvu razliku u vrijednostima istog pri mirovanju, ali i za vrijeme submaksimalne vježbe ili maksimalnog opterećenja (12).

Osim studija o redovitoj fizičkoj aktivnosti te njegovom utjecaju na razvoj kardiovaskularnih bolesti, brojne studije su provedene na drugim čimbenicima rizika za razvoj istih. Pa je tako provedena studija od strane Ridkera i suradnika o utjecaju visokih doza statina na progresiju CV-ih bolesti kod visokorizičnih pacijenata te komplikacija vezanih uz iste. Rezultati studije demonstrirali su da su razine LDL-a (lipoproteina male gustoće, eng. *low-density lipoprotein*) nakon intervencije bile niže 50-ak %, a za razvoj CV-ih incidenata rizik se smanjio za 30 - 50 % (14). Iz navedenog rada možemo vidjeti da je smanjenje CV-og rizika približno onome o kojem su izvijestile studije o efektu fizičke aktivnosti i redovitog vježbanja na CV zdravlje, odnosno moglo bi se zaključiti kako umjerena do intenzivna redovita tjelesna aktivnost reducira CV-i rizik približno jednako kao i veliko smanjenje vrijednosti kolesterola (15). Ali, interesantno je napomenuti kako su provedene studije o utjecaju tjelesne aktivnosti na sniženje vrijednosti LDL-a ili povišenje HDL-a (HDL kolesterol, eng. *high-density lipoprotein*) pokazale skroman učinak (16).



Slika 1.1. Utjecaj redovite fizičke aktivnosti na kardiovaskularni sustav. LDL, lipoprotein niske gustoće (izvor: izradio autor disertacije)

Također, brojne studije istraživale su utjecaj vježbanja na krvni tlak i iako se pokazalo da vježbanje ima značajan utjecaj na prevenciju razvoja hipertenzije, učinak na vrijednosti krvnoga tlaka u odnosu na antihipertenzivne lijekove relativno je skroman (17,18). Nešto bolji učinak vježbanje je imalo na pojavu dijabetesa tipa 2, odnosno neke od studija pokazale su smanjenje relativnog rizika za razvoj dijabetesa tipa 2 za oko 40 % kod ljudi sa pojačanom fizičkom aktivnosti (19). Studija provedena od strane Knowlera i suradnika demonstrirala je da promjene u životnim navikama, odnosno pojačana fizička aktivnost bolje smanjuje incidenciju dijabetesa kod visokorizičnih osoba od metformina, i to za čak 58 %, usporedno sa metforminom koji tu incidenciju smanjuje za 30-ak % (20).

Gore navedeni podatci govore o učinku fizičke aktivnosti na CV-o zdravlje ovisnom o učinku na uobičajene CV-e rizične čimbenike (dijabetes, lipidi u krvi, arterijski tlak), ali osim tog posrednog učinka, fizička aktivnost djeluje na CV zdravlje i drugim mehanizmima. Studija na 27000 žena koju su proveli More i suradnici demonstrirala je 40 % smanjenje CV-og rizika kod ispitanica čija je procijenjena tjedna tjelesna aktivnost >1500 kalorija u usporedbi sa ispitanicama čija tjedna aktivnost nije prelazila 200 kalorija (21). Ukupno gledajući, učincima vježbanja na tradicionalne čimbenike rizika mogli bi se pripisati oko 60 % tog smanjenja rizika

za sve oblike CV-ih bolesti. Preostalih 40 % kardioprotektivnih učinaka redovite tjelesne aktivnosti nije u potpunosti razjašnjen i naziva se razlika u faktorima rizika (engl. *risk factor gap*) (22). Brojna istraživanja posljednjih godina usmjerena je upravo na bolje razumijevanje „*risk factor gap*“, odnosno efekta redovite tjelesne aktivnosti na preostale čimbenike rizika. Jedan od važnijih preostalih čimbenika, prema velikom broju istraživanja, svakako bi bio i izravan učinak vježbanja na vaskularno zdravlje i endotelnu funkciju (22). Tako su DeSouza i suradnici u svojoj studiji pokazali kako su sedentarni mladi ispitanici imali značajno bolju endotelnu funkciju, mjerenu acetilkolin-induciranom dilatacijom na koži podlaktice, od sedentarnih starijih ispitanika. Nasuprot tome, nije bilo razlike u učinku između mladih i starih ispitanika koji su bili fizički aktivni (23).

1.3. Akutna fizička aktivnost

Akutna aerobna fizička aktivnost ima kompleksan učinak na razne sustave u ljudskom organizmu od kojih je najopsežniji onaj na respiratorni, mišićni te kardiovaskularni. Velik učinak na fiziološki odgovor, a time i na izvedbu tijekom aerobnog napora, također imaju dob, spol te genetske predispozicije. Pa tako genetske predispozicije uzrokuju 20 - 40 % varijabilnosti maksimalnog aerobnog kapaciteta, dok dob uzrokuje progresivno opadanje istog, a vrijednosti kod žena su u prosjeku manje za 25 % nego kod muškaraca (24). Iako su svi navedeni sustavi (plućni, respiratorni, mišićni te CV) uključeni u orkestriranje odgovarajućeg odgovora na aerobnu vježbu iznimno važni, najveću ulogu u istom ima CV sustav, posebno sistolička i dijastolička funkcija srca (25).

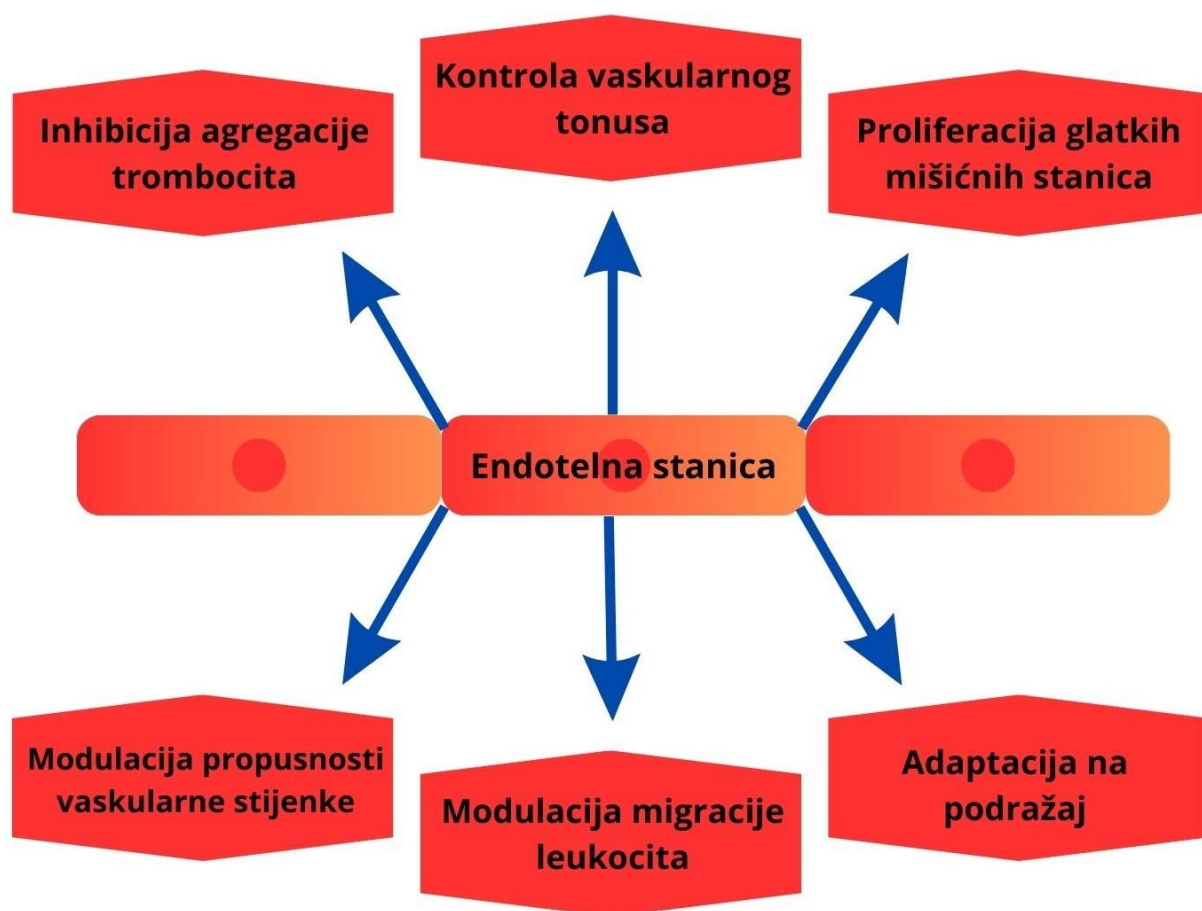
Potrošnja energije i kisika znatno je veća u akutnom aerobnom treningu nego statičkom ili dinamičkom treningu, a točna količina ovisi o trajanju aktivnosti, te o njegovom intenzitetu. Postoji nekoliko vrsta akutnih aerobnih treninga, a kategoriziraju se prema potrošnji kisika i to u slijedeće vrste: dugotrajni (>30 min), submaksimalni trening ili trening s progresivnim povišenjem intenziteta do maksimuma (povećanje od ~30 % do 100 % VO_2 max), umjereni do teški (60 - 85 % VO_2 max) te kratkotrajni (5 - 10 min), lagani (30 - 49 % maksimalne potrošnje kisika, VO_2 max) do umjereni (50 - 74 % VO_2 max) submaksimalni trening (26). Trening s progresivnim povišenjem intenziteta do maksimuma sastoji se od slijeda stadija od nekoliko minuta kako bi se postiglo stabilno stanje (tzv. *steady state*), od koji svaki progresivno postaje teži, a nastavljaju se do postizanja potpune iscrpljenosti. Cilj ovakvih testova je kvantificiranje fiziološke reakcije na rad i iscrpljenje te maksimalno opterećenje organizma koji pojedinac

može obavljati (26). U mirovanju, CO je konstantan te prosječno kod odraslih ljudi iznosi 5 L/min. Nasuprot tome CO tijekom maksimalnog opterećenja u vježbi može narasti višestruke te varira od 20 L/min kod mladih zdravih sedentarnih pojedinaca pa sve do 40 L/min kod elitnih sportaša koji se bave aerobnom vrstom sporta. Porast CO tijekom treninga pod učinkom je porasta SV te pulsa koji oba značajno rastu tijekom aerobne vježbe. CO se tijekom treninga s postupnim povišenjem intenziteta povećava linearno te dostiže plato pri maksimalnom iscrpljenju. Smatra se da se početno povećanje CO kod sedentarnih pojedinaca postiže povećanjem i SV i pulsa, a nakon opterećenja većeg od 50 % VO_2 max, daljnje povećanje CO se postiže jedino na račun povećanja pulsa (27, 28), dok se kod sportaša smatra da SV raste čak i pri maksimalnom opterećenju (29). Točan odgovor SV na trening s postupnim povišenjem intenziteta još uvijek je tema rasprave; neke od studija demonstrirale su da do smanjenja SV-a dolazi pri maksimalnom opterećenju (30). Većina proturječnih podataka vrlo vjerojatno proizlazi iz primjene različitih protokola, tehničke zahtjevnosti mjerenja UV-a tijekom maksimalnog opterećenja, primjene različitih protokola te same varijabilnosti među ispitivanim pojedincima. Puls se za vrijeme najvećeg dijela submaksimalnog povećanja intenziteta povećava linearno, a pri maksimalnoj vježbi se postiže plato. Prema istraživanjima, stanice srčanog mišića se teoretski mogu kontrahirati gotovo 300 puta u minuti, ali toliki broj kontrakcija srca u minuti onemogućilo bi adekvatno punjenje srca, što bi dovelo do smanjenja SV-a i CO-a, tako da maksimalan puls rijetko prelazi 210/min (31,32). SBP se tijekom treninga s postupnim povišenjem intenziteta povećava linearno i u maksimalnom opterećenju postiže plato, često dostižući vrijednosti i do 200 mmHg u treniranih pojedinaca. Unatoč smanjenom ukupnom perifernom otporu (engl. *total peripheral resistance*, TPR), porast SV značajno je veći te uzrokuje takvo povišenje SBP. Za razliku od SBP, DBP ostaje razmjerno konstantan tijekom akutnog treninga jer je u vaskulaturi aktivnog mišića vazodilatacija izbalansirana vazokonstrikcijom u drugim krvnim žilama. Ukoliko kod pojedinaca dođe do pretjeranog ili prebrzog porasta SBP istraživanja su pokazala da isti imaju veći rizik za razvoj moždanog udara, hipertenzije te CV-og mortaliteta općenito naspram pojedinaca s primjerenim porastom SBP-a tijekom ovakvog treninga (33–35). Zbog izražene vazodilatacije u aktivnim tkivima pri intenzivnom treningu kao odgovor na tkivne potrebe TPR se smanjuje po negativno zakrivljenom uzorku. Također, tijekom treninga dolazi do značajne redistribucije krvotoka te je najveći postotak CO-a usmjeren u aktivne mišiće dok je protok kroz bubrege, probavni sustav i kožu smanjen (26).

1.4. Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija

Dinamična priroda endotela, unatoč njegovoj osnovnoj strukturi, čini ga izuzetno kompleksnim organom koji oblaže cijeli vaskularni sustav (36, 37). Vaskularni endotel sastoji se od jednostaničnog sloja endotelnih stanica prekrivenih endotelnim glikokaliskom, slojem koji se sastoji od glikoproteina, proteoglikana te glikozaminoglikanskih lanaca (38). S obzirom na mjesto i organ u kojem se nalaze, endotelne stanice pokazale su značajne različitosti u svom izgledu i površinskim sastojcima. Paracelularna propusnost koja je se također razlikuje ovisno o organskom sustavu u kojem se endotelne stanice nalaze najviše ovisi o među-endotelnim spojevima, strukturama koje posreduju u adheziji između endotelnih stanica. Identificirane su dvije vrste endotelnih spojeva obzirom na propusnost: adhezijski spojevi i čvrsti spojevi. Čvrsti spojevi formiraju se na temelju homofilnih interakcija između okludina, kladina i molekule adhezije spoja između susjednih stanica, dok su adhezijski spojevi uglavnom građeni od VE-kaderina. Osim toga, endotelna obloga povezana je s izvanstraničnim matriksom putem fokalnih adhezija, koje se sastoje od transmembranskih integrina te obitelji proteina koji povezuju aktin. Navedene strukture adhezije održavaju integritet vaskularnog endotelia djelujući protiv kontraktilne sile aktomiozina, a neravnoteža između kontraktilne i adhezivne sile rezultira disfunkcijom barijere. (39, 40). Upravo te varijacije endotelu omogućuju da u provodnim žilama velikog promjera (vene, arterije, venule i arteriole) provode krv od srca do ciljnog organa te natrag bez značajnog gubitka krvne tekućine ili tvari u fiziološkim uvjetima. Za razliku od njih, u kapilarama endotel omogućava izmjenu otopljenih tvari i tekućina između intra- i ekstra- vaskularnih odjeljaka (41). Osim toga, ova varijabilnost endotelnih stanica omogućuje niz funkcija specifično prilagođenih organima u kojima se nalaze (42).

Neke od najvažnijih funkcija endotela su kontrola vaskularnog tonusa, regulacija proliferacije glatkih mišićnih stanica, inhibicija agregacije trombocita, modulacija migracije leukocita te moduliranje propusnosti vaskularne stijenke, a imaju i sposobnost identifikacije te adaptacije na različite mehaničke, humoralne i hemodinamske podražaje, shematski prikazano na Slici 1.2 (43,44).



Slika 1.2. Shematski prikaz funkcija endotelne stanice i njenih osnovnih funkcija. (izvor: izradio autor disertacije)

Ipak, ističe se uloga endotela u održavanju vaskularnog tonusa, gdje je ta uloga ključna, a promjene vaskularnog protoka u složenom su međudjelovanju s endotelom. Zdrav endotel je sposoban izazvati vazodilataciju u odgovoru na nagle promjene u protoku krvi, što se često naziva "žilni stres". Krv utječe na stijenku krvnih žila putem dviju ključnih sila. Prva je sila smicanja (engl. *shear stress*), koja je usko povezana s protokom krvi, usmjerena na jedinicu površine. Druga je sila izravna sila istezanja, koja djeluje okomito na stijenku i jednaka je krvnom tlaku (engl. *cyclic strain*). Značajno svojstvo endotelnih stanica je njihova mogućnost

pretvaranja mehaničkih sila u biološke reakcije. Mehanoreceptori na staničnoj površini bilježe rastezanje stijenke krvnih žila, što pokreće niz molekularnih događaja. Ovi događaji mogu uključivati dugoročne mehanizme, kao što je regulacija gena koja dovodi do restrukturiranja krvnih žila, ali i brze reakcije, uključujući naglu promjenu žilnog tonusa. Ovi međusobno povezani procesi čine dio složenog i nespecifičnog odgovora endotela na različite mehaničke podražaje, što često pokreće niz adaptacijskih odgovora, kako akutnih tako i kroničnih (45).

U posljednjih nekoliko desetljeća otkriveno je i definirano više endotelnih čimbenika relaksacije (engl. *endothelium-derived relaxing factors*, EDRF). Prvim definiranim i najtemeljitiše istraživanim EDRF-om smatra se dušikov oksid (NO), a njega slijede endotelni hiperpolarizirajući faktor (engl. *endothelial-derived hyperpolarization factor*, EDHF) i prostaciklin (prostaglandin I₂; PGI₂). Dušikov oksid prvi je EDRF za koji je potvrđeno da ima sposobnost opuštanja glatkih mišićnih stanica krvnih žila (46,47). U endotelnim stanicama, NO se sintetizira iz L-arginina pomoću enzima poznatog kao endotelna NO sintetaza (eNOS), i oslobađa se iz stanica kao odgovor na žilni stres (engl. *shear stress*) ili različite spojeve poput acetilkolina ili bradikinina. Konačni rezultat oslobađanja NO-a je opuštanje glatko-mišićnih stanica krvnih žila i posljedična vazodilatacija (46,48,49). Drugi bitan EDRF, prostaciklin, koji se jednim dijelom otpušta u odgovoru na žilni stres pripada obitelji vazoaktivnih metabolita enzima ciklooksigenaze (COX-1 i COX-2), a sintetizira se iz arahidonske kiseline (50). PGI₂ prema istraživanjima ne doprinosi održavanju bazalnog vaskularnog tonusa velikih provodnih krvnih žila nego se otpušta na poticaj različitih agonista, za razliku od NO-a (51,52). Molekule koje dovode do hiperpolarizacije glatkih mišićnih stanica krvnih žila te posljedične vazokonstrukcije krvne žile skupno se nazivaju EDHF, a do danas je otkriven velik broj koji svoje djelovanje ostvaruju u različitim tkivima i vrstama. Veći broj njih sa važnijim djelovanjem su prikazani u Tablici 1.1., a dobro istraženi su: K⁺ (53), metaboliti citokroma P450 (kao što je EETs, eng. *epoxyeicosatrienoic acids*) (54–56), produkti lipooksigenaze (57), vodikov peroksid (H₂O₂) (58), ciklični adenzin monofosfat (cAMP) (59), te natriuretski peptid tip C (60). Kao protuteža brojnim vazodilatacijskim čimbenicima, endotel je također mjesto sinteze važnih endotelnih čimbenika kontrakcije (eng. *endothelial-derived constricting factors*, EDCF), dva najznačajnija od njih su tromboksan (TXA₂) i endotelin-1 (ET-1). ET-1 djeluje kao fiziološki antagonist NO-a i podliježe regulaciji različitim čimbenicima, uključujući žilni stres, adrenalin, oksidirani LDL, angiotenzin II, i upalne citokine (61–64). ET-1 može povisiti krvni tlak i izazvati vaskularnu i miokardijalnu hipertrofiju, što predstavlja značajne rizične čimbenike za kardiovaskularne bolesti (65,66). Drugi važan EDCF je TXA₂, koji se sintetizira

putem enzima COX i tromboksan sintetaze iz arahidonske kiseline. Održavanje ravnoteže između proizvodnje PGI₂ i TXA₂ od suštinskog je značaja za homeostazu u zdravim krvnim žilama. Povećana proizvodnja TXA₂ može rezultirati vazokonstrikcijom i agregacijom trombocita, što povećava rizik od kardiovaskularnih incidenata (67,68). Ovaj složeni sustav vazoaktivnih čimbenika koji potječu iz endotela ima ključnu ulogu u održavanju normalne funkcije krvnih žila te fiziološke ravnoteže. Unatoč mnogim neodgovorenim pitanjima o njihovoj preciznoj ulozi u vaskularnom zdravlju i bolesti, njihova važnost je neosporna.

Tablica 1.1. Čimbenici s vazokonstriktorskim i/ili vazodilatacijskim djelovanjem u krvnim žilama

Vazodilatatori	Vazokonstriktori
<u>Lokalni mehanizmi:</u> ↑ NO ↓ pO ₂ Adenozin ↑ K ⁺ , ↑ H ⁺ , ↑ H ₂ S Povišena temperatura	<u>Lokalni mehanizmi:</u> ↑ pO ₂ Adrenalin Noradrenalin Niska temperatura
<u>Sistemske mehanizmi:</u> PGI ₂ PGE ₃ Endotelin B Bradikinin Kalikrein Histamin Serotonin	<u>Sistemske mehanizmi:</u> Angiotenzin II Serotonin Vazopresin Endotelin A Tromboksan A ₂ PGA ₂ , PGF _{2α} Kisikovi radikali

Endotelna disfunkcija (ED) je poremećaj endotela i njegove funkcije koja obuhvaća niz patoloških stanja, a u najužem smislu se podrazumijeva početna lokalizirana mehanička ozljeda žilne intime. Daljnjom progresijom endotelne disfunkcije dolazi do neadekvatne, kontinuirane i ukupne endotelne aktivacije, važne za razvoj brojnih klinički manifestnih patoloških stanja (37). ED se razvija uslijed izloženosti mehaničkim podražajima i djelovanja raznih bioloških medijatora, uključujući endotoksine, histamin, leukotriene, interleukin 1 (IL-1), interleukin 2 (IL-2), tumor-nekrotizirajući faktor-α (TNF-α), prostaglandin I₂ i E₂, PAF, te angiotenzina II (ANG II). Također ED se može razviti kao rezultat izravne reakcije na većinu poznatih

čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti (69). Endotelna stanica u svom „mirnom“ stanju ima antikoagulantni i vazodilatacijski učinak, a osnovu ED čini njegova neprimjerena aktivacija, koja je povezana s istodobnim izražavanjem upalnih, prokoagulatnih i vazokonstriksijskih svojstava (70). Jedno od bitnih obilježja ED-e je nedovoljna raspoloživost NO-a, suprotno od ključnih osobina zdravog endotela, sposobnosti otpuštanja vazoaktivnih tvari te reguliranje krvnog protoka. Potencijalni uzroci reducirane biodostupnosti NO-a mogu biti manjak enzimatskog kofaktora tetrahidrobiopterina s pratećom nekompetentnošću eNOS-a, nedostatak L-arginina, genetske razlike u izražaju, aktivnosti i/ili posttranslacijskim modifikacijama eNOS-a (71) te kemijskim reakcijama uzrokovano blokiranje NO-a, u čemu glavnu ulogu vjerojatno imaju radikali kisika. Ravnoteža između dostupnosti NO i djelovanja vazokonstriksijskih čimbenika ključna je za vazokonstriksijski fenotip endotelne stanice u ED.

Osim smanjenja vazodilatacije krvnih žila ovisne o endotelu, razvoj endotelne disfunkcije (ED) ima niz drugih patofizioloških posljedica: 1) abnormalna reaktivnost krvnih žila i njihova sklonost spazmu (uključujući paradoksalnu vazokonstrikciju na acetilkolin); 2) povećana permeabilnost endotela za velike molekule poput lipoproteina, što dovodi do deformacije endotelne stanice i nastanka patoloških međustaničnih pukotina; 3) povećana ekspresija topljivih staničnih adhezijskih molekula (sCAMs); 4) novačenje i nakupljanje monocita i makrofaga u unutrašnjem sloju krvnih žila, poznatom kao intima; 5) povećana proliferacija i migracija glatkih mišićnih stanica kao i smanjena regeneracija endotelne stanice i 6) poremećaj hemostatske ravnoteže okarakterizirane stvaranjem trombina, ekspresijom prokoagulacijskih molekula, odlaganjem fibrina te agregacijom i adhezijom trombocita (72–74).

Dio patofizioloških čimbenika koji promiču razvoj endotelne disfunkcije i predstavljaju značajne rizične čimbenike za kardiovaskularne bolesti uključuju aktivaciju citokina u upalnim procesima, prisutnost slobodnih radikala kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i oksidativni stres, glikozilaciju metabolita u dijabetesu i procesu starenja, pušenje, hipertenziju, kroničnu hiperkolesterolemiju, povišenu koncentraciju oksidiranog LDL kolesterola u plazmi kao i njegova akumulacija u stijenkama krvnih žila te infekcije uzrokovane virusima, bakterijama ili drugim patogenima (75,76).

1.5. Utjecaj fizičke aktivnosti na mikrocirkulaciju

1.5.1. Utjecaj redovite fizičke aktivnosti na mikrocirkulaciju

Neke od ranije provedenih studija na mikrocirkulaciji pokazale su da do poboljšane vazodilatacije mikrožilja kože može doći već nakon nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci redovite tjelesne aktivnosti. Većina tih studija proučavala je reakciju mikrocirkulacije na izvana primijenjeni o endotelu ovisni (acetilkolin, ACh) i/ili o endotelu neovisni (natrijev nitroprusid, SNP) vazodilatator. Jedna od prvih takvih studija bila je studija koju su proveli Kvernmo i suradnici, a uspoređivali su reakciju mikrovaskularnog protoka u koži podlaktice profesionalnih sportaša i kontrolnih ispitanika sa umjerenom tjelesnom aktivnosti na aplikaciju acetilkolina i natrijevog nitroprusida kroz kožu pomoću perfuzije koristeći LDF. U studiji jesudjelovao ukupno 9 trkača te 9 kontrolnih ispitanika. Prije i nakon odrađenog treninga na pokretnoj traci učinjena su mjerenja. Rezultati studije pokazali su bolji odgovor na aplikaciju ACh-a kod profesionalnih sportaša, dok je razlika izostala u odgovoru na SNP između dvije navedene skupine (77). Osim na sportašima, brojne studije su provedene i na sedentarnim pojedincima, pa su tako Wang i suradnici istraživali vaskularnu reakciju u mikrocirkulaciji kože prije i nakon osam tjedana tjelovježbe u populaciji zdravih sedentarnih pojedinaca. Tjelovježba je izazvala značajno unaprijeđen o endotelu ovisan vaskularni odgovor, ali bez promjena endotel-neovisnog odgovora mikrocirkulacije kože, a nakon dodatnih 8 tjedana bez tjelovježbe, taj poboljšani odgovor je izostao (78). Nadalje, Stupin i suradnici uspoređivali su razliku endotelne funkcije između sportaša i sedentarnih pojedinaca te utjecaj akutnog iscrpljujućeg treninga na istu. Pokazalo se da sportaši imaju značajno bolju endotelnu funkciju u usporedbi sa sedentarnim pojedincima u mirovanju. Dok su rezultati nakon akutnog iscrpljujućeg treninga nešto drugačiji, naime sam trening je narušio reaktivnost mikrocirkulacije sportaša, odnosno izazvao pogoršanje vaskularne reaktivnosti na podražaj, dok je taj učinak narušavanja vaskularne reaktivnosti u populaciji sedentarnih pojedinaca izostao (79). Iz navedenih istraživanja, ali i brojnih drugih, koja proučavaju učinak smanjene ili povećane tjelesne aktivnosti na endotelnu funkciju podupiru ideju da se ovisno o promjeni tjelesne aktivnosti mijenja i kutani mikrovaskularni odgovor, posebno endotel-ovisni. Zbog toga možemo zaključiti da povećana tjelesna aktivnost ima pozitivan učinak i poboljšava endotelnu funkciju u mikrocirkulaciji kože, ali također je i pokazano kako redovita tjelovježba može zaustaviti progresiju mikrocirkulacijske disfunkcije koja se povezuje sa starenjem i bolestima. Upravo taj učinak pokazao je Black sa suradnicima u studiji na mladim sedentarnim, starim sedentarnim i

starim fizički aktivnim pojedincima gdje je endotelna funkcija bila značajno bolja kod starih fizički aktivnih pojedinaca od njihovih sedentarnih pojedinaca (80).

Potencijalni mehanizmi zaslužni za poboljšanje funkcije mikrovaskularnog endotela pod utjecajem redovite tjelesne aktivnosti još nisu do kraja istraženi. Jedan od potencijalnih mehanizama je poboljšanje odnosno veća biodostupnost vazoaktivnih supstanci uključenih u regulaciju vaskularnog tonusa i funkcije. Tako su Beck i suradnici pokazali otprilike 25 % veće bazalne vrijednosti NO-a nakon samo osam tjedana programa vježbanja. Tinker i suradnici su predložili silu smicanja (engl. *shear stress*) koja utječe na krvni žilu, kao odgovornu za poboljšanje endotelne funkcije. Naime, repetitivno povećanje sile smicanja tijekom tjelovježbe mogao bi biti glavni signal za endotelnu prilagodbu (81). Također, poznato je kako kožna mikrocirkulacija ima ključnu ulogu u izdavanju topline nastale tijekom povećane tjelesne aktivnosti kao nusprodukt povećanog metabolizma. Upravo obzirom na kožnu hiperemiju uzrokovanu fizičkom aktivnosti, promjene hemodinamskih sila jedan su od kandidata za mehanizme koji posreduju prilagodbi mikrocirkulacije redovitoj fizičkoj aktivnosti. Green i suradnici su u svojoj studiji pokazali su da kronično zagrijavanje podlaktice, stvarajući slične hiperemičke poticaje kao i tjelovježba, poboljšava funkciju kutane mikrovaskularne vazodilatacije. Kako bi istražili mehanizme prilagodbe, protok krvi je prekinut u jednoj ruci (ali ne i drugoj) postavljanjem manžete na proksimalni dio podlaktice, što je rezultiralo smanjenjem hiperemije tijekom zagrijavanja. Ruka na kojoj je manžetom spriječena hiperemija nije pokazala prilagodbu na dugotrajno zagrijavanje, što sugerira da je upravo ponavljajući porast perfuzije tkiva odgovoran za kožnu vaskularnu prilagodbu u ovim uvjetima (82). Međutim, niti jedan od mehanizama nije u potpunosti razjašnjen te su potrebna dodatna istraživanja kako bi objasnili ulogu hemodinamskih sila u vaskularnoj prilagodbi na tjelesnu aktivnost.

1.5.2. Utjecaj akutne fizičke aktivnosti na mikrocirkulaciju

Provedene su brojne studije o utjecaju akutne vježbe na vaskularnu, ali i endotelnu funkciju u velikim provodnim krvnim žilama, ali njihovi rezultati su nedosljedni (83,84). Vjerojatni uzrok tako nedosljednih rezultata je izrazita heterogenost u ustroju studija (izbor populacije, dob, spol, zdravstveni status, program vježbanja, itd.). Suprotno tome, studije o utjecaju akutne vježbe na mikrocirkulaciju nisu toliko brojne te postoji mali broj podataka i zaključaka o tom utjecaju kod zdravih pojedinaca. Durand i suradnici proučavali su učinak akutnog iscrpljujućeg dizanja utega na mikrovaskularnu endotelnu funkciju u populaciji treniranih pojedinaca sa otprilike

podjednakim VO₂max te sedentarnih zdravih ispitanika. Procjena endotelne funkcije vršena je pomoću LDF-a na dva mjesta, na šaci i na podlaktici istovremeno. Rezultati su pokazali kako akutni iscrpljujući trening nije imao utjecaj na endotelnu funkciju kod sportaša dok je kod sedentarnih ispitanika uzrokovao smanjenje endotelne funkcije (85). Također učinak akutnog treninga na mikrovaskularnu funkciju u koži podlaktice i prsta ruke, ali na bicikl ergometru ispitivali su Potočnik i Lenasi i demonstrirali snižen protok odmah po završetku vježbe u mikrocirkulaciji kože prsta, dok je isti mikrovaskularni protok, ali u koži podlaktice bio povišen po završetku akutne vježbe u odnosu na vrijednost prije početka vježbanja (86). Stupin i suradnici su u svojoj studiji istraživali utjecaj akutnog iscrpljujućeg treninga na veslačkom ergometru na reaktivnost mikrocirkulacije kože kod profesionalnih veslača i sedentarnih pojedinaca. Rezultati su demonstrirali da je akutna vježba smanjila endotelnu funkciju i mikrovaskularnu reaktivnost kod veslača, ali ne i kod sedentarnih ispitanika, što je vjerojatno posljedica razlika u intenzitetu vježbanja, promjenama krvnog tlaka i razini antioksidativnog kapaciteta između ove dvije skupine (79). Iz navedenih studija vidimo da utjecaj akutne fizičke aktivnosti na mikrocirkulaciju također još nije u potpunosti razjašnjen te su potrebne dodatne studije kako bi poboljšali razumijevanje tog utjecaja.

1.6. Prehrambene navike sportaša

Prehrana se smatra jednim od danas nezaobilaznih temelja sportske izvedbe, ali isto tako prehrambene preporuke nakon treninga ključne su za učinkovitost oporavka. Upravo zbog toga, pravilna i učinkovita strategija oporavka između treninga ili natjecanja može poboljšati adaptivni odgovor na različite mehanizme umora te na taj način poboljšati funkciju mišića i povećati toleranciju fizičkog napora. Osim same vrste namirnica odnosno makronutrijenata, sve veća važnost pridaje se vremenu konzumacije pojedinih makronutrijenata tijekom dana kako bi se što povoljnije utjecalo na adaptivni odgovor organizma na akutnu i kroničnu tjelovježbu (mišićnu snagu, sastav tijela, fizičku izvedbu, itd.) te poboljšanje oporavka od iste. Iako velik broj studija o vremenskom rasporedu hranjivih tvari i dalje ne zadovoljava statističke pragove značajnosti, rezultati sugeriraju potencijalnu važnost te se ovisno u praktičnosti preporuka iste sve više inkorporiraju u formiranje prehrane za sportaše. Zbog toga je stav da kada strategija može pridonijeti ili imati neutralan učinak te se uklapa u dnevni raspored sportaša uz veliku mogućnost adherencije istom, strategiju tempiranja obroka vrijedi primijeniti. Razlog tome je da su razlike u sportskim izvedbama ponekad toliko male da čak i

strategije sa minimalnom koristi mogu imati dovoljan benefit za poboljšanje rezultata. Iz navedenih razloga najučinkovitija prehrana sportaša mora obuhvaćati poseban režim prehrane s definiranim vremenima obroka te specifičnom vrstom i količinom hrane kako bi isporuka vitalnih hranjivih tvari u količinama i vrijeme koje će podržati fiziološki odgovor na vježbu bila idealna. (87).

Danas se formiraju novi smjerovi u dijetetici koji se fokusiraju na kreiranje personaliziranih dijetetskih režima za pojedine sportaše. Razvoj personalizirane prehrane uključuje daljnje provođenje genetskih studija koje služe za određivanje predispozicija ljudi za određenu vrstu hrane te stupanj rizika od bolesti povezanih s hranom, kao i studije o raznolikosti ljudske mikroflore, karakteristika probave te stanju crijevne barijere, ali također i studije pojedinačnih odgovora imunološkog sustava na antigene hrane koji mogu uzrokovati promjene u toleranciji na hranu (88).

Osim istraživanja o napretku personaliziranih prehrana sportaša, brojna istraživanja provedena su kako bi se razumjele posljedice relativnog manjka energije u sportu na zdravlje i izvedbu. Stanje relativnog manjka energije često se opaža među sportašima i sportašicama na najvišoj razini (89). Kao glavni uzrok relativnog manjka energije smatra se niska energetska dostupnost, opisana kao neadekvatan unos energije u odnosu na potrošnju energije tijekom tjelovježbe, a među glavnim čimbenicima je koji pokreću nepovoljne zdravstvene i izvedene posljedice (90). Studija na australskim nogometašicama pokazala je da većina njih ima neadekvatan unos ugljikohidrata te kalcija kao i slabo znanje o sportskoj prehrani. Također procjenom putem upitnika zaključeno je kako ih je oko 30 % u riziku za nisku energetska dostupnost (91). Nadalje, intervencijska studija na sportašima koji su bili u opasnosti od relativnog manjka energije istraživala je utjecaj šestomjesečnog programa edukacije o prehrani. Rezultati su se pokazali pozitivnima na zdravlje kostiju i izvedbu na natjecanjima, a oni upućuju na to da obrazovni programi o prehrani, uključujući specifične informacije o niskoj energetska dostupnosti mogu poboljšati zdravlje sportaša i rezultate izvedbe (92).

Zbog sve zahtjevnijih dijetetskih potreba sportaša nerijetko se događa da konvencionalna hrana i namirnice nisu dostatne ili nisu dovoljno dobre za pravilnu prehranu vrhunskih sportaša te se upravo zbog tih razloga sve više u njihovu prehranu uvodi funkcionalna hrana.

1.7. Funkcionalna hrana

Zbog promjena u životnom stilu, najviše u smislu nepravilne prehrane i neadekvatne fizičke aktivnosti epidemija neinfektivnih bolesti poprima sve veće razmjere dovodeći do ozbiljnih oboljenja pa čak i smrti. U svijetu svake godine umire otprilike 41 milijun ljudi od nezaraznih bolesti, što čini preko 70% svih uzroka smrti, od tog broja čak 15 milijuna spada u mlađe dobne skupine od 30 do 69 godina. Prema skupinama, najčešći uzrok smrti su kardiovaskularne bolesti sa preko 17 milijuna smrti, zatim ih slijede karcinomi sa preko 9 milijuna smrti godišnje, a velik broj smrti izazivaju i respiratorne bolesti (3,9 milijuna) i šećerna bolest (1,6 milijuna). Tradicionalno i klasično rješenje sa najboljim dokazima u liječenju bolesti pružaju lijekovi. U zadnje vrijeme pojavljuje se sve više lijekova koji su dostupni potrošačima obzirom da su proizvodi bez recepta te ih se sve više koristi za samoliječenje. Među njih spadaju i brojni dodatci prehrani tj. suplementi koji se danas široko koriste u prevenciji raznih bolesti. Neka od istraživanja pokazala su kako stariji potrošači smatraju kako su dodaci prehrani barem jednako važni kao i lijekovi na recept, a najčešći razlozi uzimanja prehrambenih dodataka zaštita je zdravlja, prevencija bolesti te savjet zdravstvenih stručnjaka. Sukladno tome količina prodanih suplemenata iz godine u godinu raste. Osim konzumacije prehrambenih dodataka, konzumacija funkcionalnih namirnica također može smanjiti rizik od razvoja bolesti. U vidu poboljšanja prehrambenih navika opće populacije funkcionalna hrana sve više pronalazi svoje mjesto na tržištu među općom populacijom (93). Funkcionalna hrana je definirana kao hrana koja izgleda kao tradicionalna hrana koja je uključena u svakodnevnu prehranu opće populacije, ali osim svoje osnovne nutritivne vrijednosti ima dodatnu zdravstvenu korist (94). Prema pravilima Europske unije, ukoliko se dokaže da prehrambeni proizvod pozitivno utječe na minimalno jednu ili više ciljanih funkcija u ljudskom organizmu smatra se da je isti funkcionalna hrana. Brojni su do sada dokazani pozitivni učinci povezani sa zdravljem koje ova vrsta hrane nudi, uključujući smanjenje pretilosti, rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze kao i jačanje imunološkog sustava (95,96).

Kardiovaskularne bolesti su jedan od glavnih uzroka smrti diljem svijeta, pa tako i u Europi gdje su odgovorne za 46 % ukupnih smrti (97,98). Brojni su čimbenici rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti te u sve veći fokus ulaze oni promjenjivi, a to su pušenje, prehrana i tjelovježba (99). Iz navedenog razloga sve je veći broj namirnica koje sadrže fiziološki aktivne komponente iz biljnih ili životinjskih izvora, a koje imaju sposobnost smanjivanja rizika od bolesti srca. Vjeruje se kako se ti kardioprotektivni učinci funkcionalne hrane ispoljavaju kroz antioksidativno djelovanje te snižavanje razine lipida u krvi (100). Biljna i voćna vlakna (s

pektinom), orasi, mahunarke, cjelovite žitarice, kava i čaj, riblje ulje imaju učinak snižavanja razine lipida u krvi kod ljudi kroz inhibiciju apsorpcije masti te suzbijanje sinteze kolesterola (101). Kulkarni i sur. pokazali su da povećan unos folata, antioksidativnih enzima, cjelovitih žitarica i fitokemikalija mogu smanjiti štetne vaskularne učinke u srcu (102). Također, konzumacija vitamina (askorbat, tokoferol) i minerala (magnezij, selen) hranom pokazala se korisna za kardiovaskularni sustav. Smatra se da taj učinak nastaje njihovom sposobnošću čišćenja slobodnih radikala nastalih tijekom aterogeneze (103,104). Breškić i sur. su ispitivali efekt konzumacije n-3 PUFA-ma obogaćenim kokošnjih jaja na lipidni profil i profil slobodnih masnih kiselina u serumu kao i biljega oksidativnog stresa i upale kod bolesnika sa koronarnom arterijskom bolešću. Konzumacija tri kokošja jaja dnevno obogaćena polinezasićenim masnim kiselinama pokazala je blagotvoran učinak na profil slobodnih masnih kiselina u serumu, odnosno dovela je do sniženja omjera n-6/n-3 PUFA te minimalne protuupalne učinke što dovodi do zaključka da navedena jaja smanjuju sklonost upali, a posljedično tome mogu imati učinak na smanjenje kardiovaskularnog rizika (105). Kolobarić i sur. pokazali su da konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-ma mijenja imunološki odgovor u ljudskom organizmu prema uvjetima rješavanja upale kroz učinke na lipidne medijatore i izlučivanje citokina od strane limfocita T bez pratećih komorbiditeta (106).

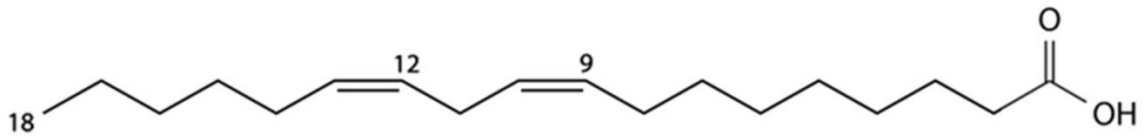
Osim navedenih skupina ljudi, sportaši i sportski nutricionisti sve veći interes pridaju posebno modificiranim namirnicama kao alternativni uobičajenima kako bi se podmirili visoki metabolički troškovi raznih sportova. Naime, u prošlosti se smatralo kako su bjelančevine glavni izvor energije za mišiće, ali već 60-ih godina prošlog stoljeća studije su pokazale da ugljikohidrati ipak imaju značajniju ulogu u opskrbljivanju mišića energijom te se velika pozornost od tada obraća na njih. Smatra se da upravo smanjenje glikogena u mišićima uzrokovano vježbanjem dovodi do zamora mišića, te optimizacija zaliha glikogena uz nadoknadu ugljikohidrata tijekom produženog vježbanja dovodi do poboljšanja fizičke izvedbe. Od tada se velika pozornost obraća na konzumaciju ugljikohidratnih napitaka i gelova tijekom vježbanja, što je postala uobičajena praksa kod profesionalnih sportaša. Upravo razvoj takvih napitaka novi je izazov industriji hrane kako bi razvili proizvode koji potrebnu energiju što prije dostavljaju mišićima, ali bez neželjenih nuspojava poput mučnine. Sve to dovelo je do brojnih studija koje su istraživale brojne oblike funkcionalne hrane te njihov utjecaj na gastrointestinalni sustav, toleranciju i fizičku izvedbu, hrana koja je pokazala pozitivne učinke na navedene ciljeve pokazala se funkcionalnom kod sportaša (107). Grubic i sur. razvili su energetska pločicu bez glukoze koja je prilagođenija smjernicama sportske prehrane, a sadrži

20 g proteina, 25 g izomaltooligosaharidnih biljnih vlakana i 7 g masti. Konzumacija te pločice osigurava glikemijski i inzulinski odgovor povoljniji za održavanje euglikemije od unosa ekvivalentne količine ugljikohidrata, a isto im je omogućilo održavanje potrebne razine performansi tijekom treninga te smanjilo bol u mišićima (108). Studija koju su proveli Kolar i sur. demonstrirala je da konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih s n-3 PUFA-om optimizira mikrovaskularnu funkciju u koži podlaktice, što može ukazivati na potencijalne mehanizme koji interveniraju međudjelovanje između tjelovježbe, n-3 PUFA i endotela kod sportaša (109).

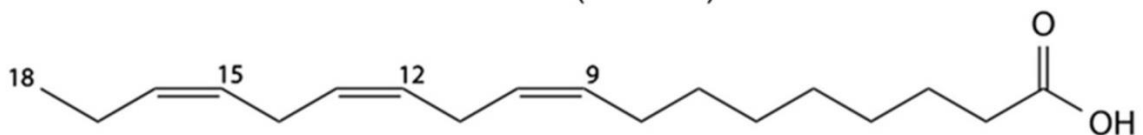
1.7.1. Polinezasićene masne kiseline

Polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids, PUFA*), ovisno o poziciji prve dvostruke veze u ugljikovodičnom lancu se dijele u dvije skupine, n-3 PUFA kod kojih je prva dvostruka veza na C3 (jedan od predstavnika je α -linolenska kiselina (ALA, C18:3, n-3)) i n-6 PUFA kod kojih je prva dvostruka veza na C6 (jedan od predstavnika je linolna kiselina (LA, C:182, n-6)) strukture dva predstavnika polinezasićenih masnih kiselina prikazane su na Slici 1.3.

Linolna kiselina (LA)



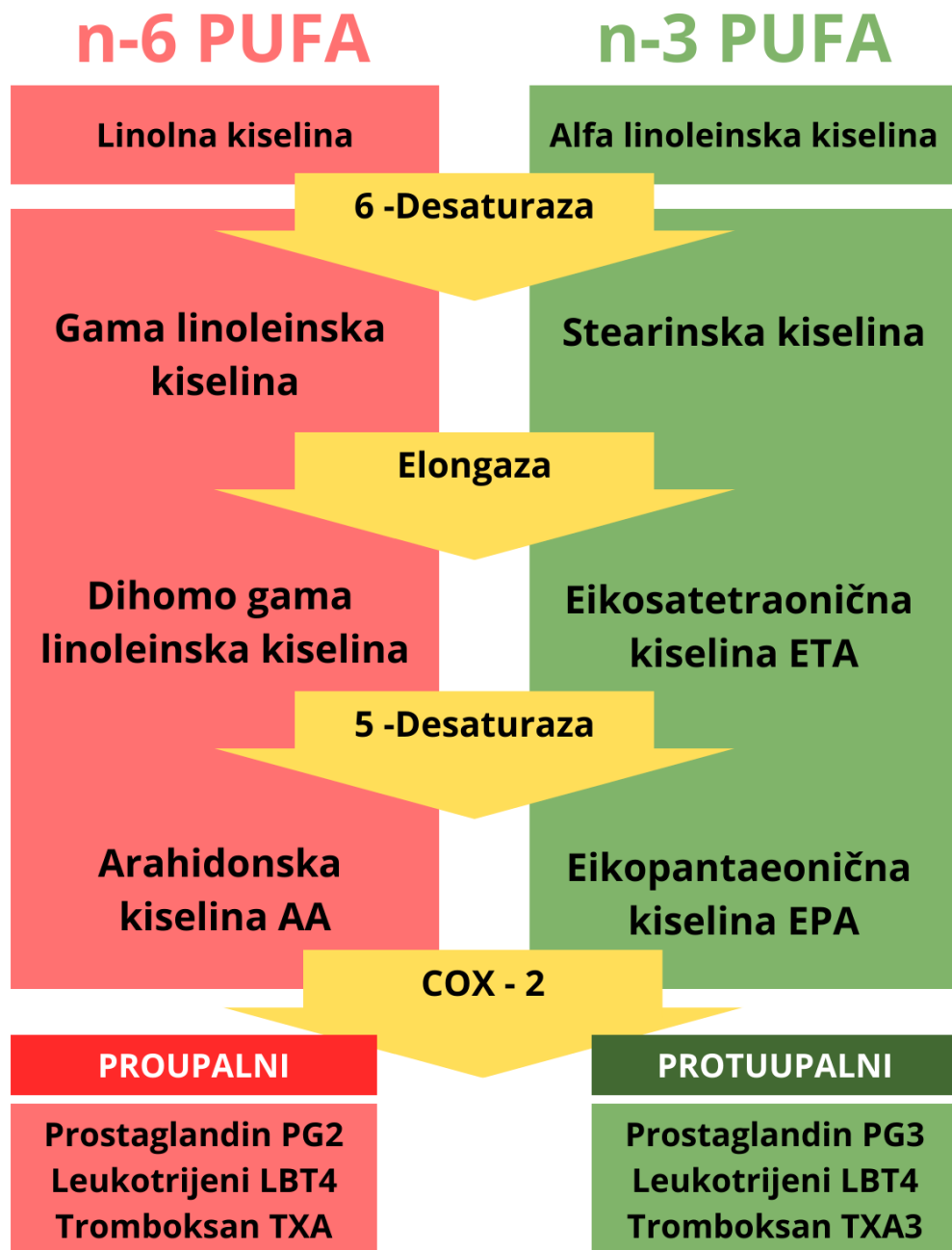
α -linolenska kiselina



Slika 1.3. Kemijske strukture polinezasićenih masnih kiselina. Prikaz kemijskih struktura predstavnika n-3 PUFA (α – linolenska kiselina) i n-6 PUFA (linolna kiselina). (izvor: izradio autor disertacije)

LA i ALA su esencijalne masne kiseline, odnosno moraju se unijeti kroz prehranu, jer ih ljudski organizam ne može samostalno sintetizirati (110). Najčešći i najpoznatiji izvor ALA su listovi zelenog povrća (u kloroplastima), zatim u sojinom, lanenom ili repičinom ulju dok se DHA, koja je biološki aktivan krajnji proizvod esencijalne masne kiseline ALA, unosi primarno putem ribe, posebice masne ribe poput lososa i tune. Ona je važna za razvoj živčanog sustava jer je sastavni dio fosfolipidne membrane stanica mozga i retine. Arahidonska kiselina pripada skupini n-3 PUFA te je krajnji, biološki aktivan produkt linolne kiseline. Važan je sastavni dio moždanih fosfoglicerida, a također ulogu također ima i u sintezi dokosanoida/eikosanoida. Izvori bogati ARA su hrana životinjskog porijekla, ulja poput sojinog, suncokretovog ili kukuruznog (111). Nakon što ih unesemo, ove masne kiseline podvrgnute su metaboličkoj razgradnji u tijelu, posebno u jetri, što je prikazano na Slici 1.4. Proces elongacije i desaturacije transformiraju ALA-u u n-3 PUFA, uključujući dokosaheksaenoičnu (DHA) i

eikosapentaeničnu kiselinu (EPA). S druge strane, LA se metabolizira u ostale n-6 PUFA, poput arahidonske kiseline (ARA) (112,113).

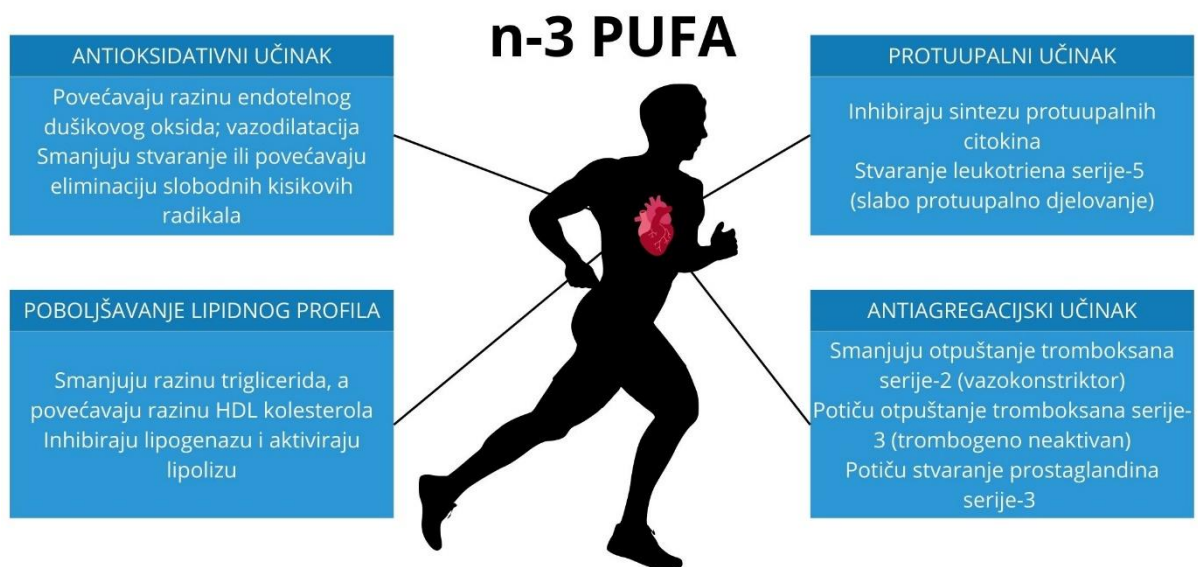


Slika 1.4. Prikaz metabolizma dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina. Shematski prikaz sinteze PUFA iz prekursora esencijalnih masnih kiselina, linolne kiseline (LA; n-6 PUFA put) i alfa-linolenske kiseline (ALA; n-3 PUFA put) kroz procese desaturacije i elongacije izvedenih enzima. (izvor: izradio autor disertacije).

Polinezasićene masne kiseline sastavna su komponenta stanične membrane te promjene u njenim fizikalno-kemijskim značajkama mogu imati utjecaj na funkciju receptora na njoj kao i ionskih kanala i enzima što dovodi do promijene u funkciji endotela i glatkih mišićnih stanica (114). Omjer n-6 PUFA/n-3 PUFA iznimno je važan za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. U situacijama gdje postoji povećan omjer n-6 PUFA u odnosu na n-3 PUFA, dolazi do stvaranja tvari kao što su leukotrieni serije 4 (LTB₄), prostaglandini serije 2 (PGI₂) i tromboksani serije 2 (TXB₂). Ovi spojevi imaju sklonost vazokonstrukcije, aktivacije trombocita te proupalni potencijal. Međutim, ako se omjer pomakne prema većim koncentracijama n-3 PUFA, tada prevladava proizvodnja vazodilatatornih i protuupalnih tvari poput leukotriena serije 5 (LTB₅), prostaglandina serije 3 (PGI₃) i tromboksana serije 3 (TXA₃) (115,116).

S obzirom na veliku prevalenciju akutnog koronarnog sindroma u svim oblicima te da je on među vodećim uzrocima smrtnosti u populaciju brojne studije su provedene o njegovoj prevenciji, pa tako i s n-3 PUFA. Velik broj studija pokazao je da dostatan unos n-3 PUFA ima povoljan učinak na prognozu bolesnika s nedavno preboljenim infarktnom miokarda. Istraživanja su uglavnom provođena na kardiovaskularnim pacijentima gdje su se uspoređivale prehrane bogate ribom, odnosno n-3 PUFA-om sa prehranama bez ribe, odnosno sa niskim udjelom n-3 PUFA, a neka od njih bila su također na kardiovaskularnim pacijentima ali su se n-3 PUFA-e unosile u obliku suplemenata, velik udio navedenih studija pokazao je značajno smanjenje mortaliteta kod pacijenata koji su uzimali n-3 PUFA-e. Međutim, zadnjih nekoliko godina značajan broj opservacijskih i intervencijskih studija koje su istraživale kardioprotektivni učinak n-3PUFA nisu uspjele dokazati isti. Razlike u rezultatima mogle bi se objasniti etničkim razlikama, obzirom da su u populaciji Japanaca i nativnih stanovnika Aljaske isti prisutni, dok su u ostalim populacijama poput Amerikanaca ili osoba oboljelih od dijabetesa izostali. Osim etničkih razlika, razlike u omjeru EPA i DHA, duljini intervencije studiji također pridonose porastu diskrepancije u istima (117,118). Svoj snažan pozitivan potencijal n-PUFA, najizraženije eikosapentaenoična kiselina (EPA) i dokosaheksaenoična kiselina (DHA) ostvaruju putem smanjivanja krvnih razina triglicerida, smanjivanja arterijskog krvnog tlaka, smanjivanja pojavnosti tromboze te rizika od iznenadnih smrti uzrokovanih infarktmi miokarda, što je detaljnije prikazano na Slici 1.5. (119). Peng An. i suradnici proveli su sustavnu i sveobuhvatnu studiju u kojoj su kvantificirane ukupno 884 randomizirane intervencijske studije sa ukupno preko 800 000 ispitanika o utjecaju 27 diferentnih mikronutrijenata na rizik

od nastanka kardiovaskularnih bolesti tj. infarkta miokarda i bolesti koronarnih arterija. Iz rezultata su zaključili da, za razliku od drugih mikronutrijenata, nadomjestak s n-3 PUFA-om ima učinak na smanjenje rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti, a u konačnici i infarkta miokarda (120).



Slika 1.5. Kardiprotektivni učinci n-3 polinezasićenih masnih kiselina (izvor: izradio autor disertacije)

Osim na kardiovaskularne rizike općenito, provedene su brojne studije o direktnom utjecaju n-3 PUFA na sam endotel. Primjena n-3 PUFA u obliku farmakoloških dodataka dovodi do povećanja antioksidativnog kapaciteta, a time i poboljšanja vaskularne reaktivnosti kod bolesnika s poznatom koronarnom bolešću (121). Još jedna od navedenih studija je i ona provedena od strane Stupin i suradnika, također učinku n-3 PUFA, ali u obliku kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om na mladim zdravim ispitanicima na endotelnu funkciju. Studija je provedena na ukupno 40 ispitanika koji su bili podijeljeni u grupe, kontrolnu i n-3 PUFA grupu. Rezultati su pokazali pozitivan protuupalni učinak n-3 PUFA koji je utjecao i na poboljšanje mikrovaskularne endotel ovisne vazodilatacije kod mladih zdravih ispitanika (122). Taj učinak n-3 PUFA-e ostvaruju povećanjem dostupnosti NO-a i poboljšavanjem funkcije eNOS-a što ublažava endotelnu disfunkciju, a time i smanjuje rizik za akutni koronarni sindrom (engl. *acute coronary syndrome*, ACS) (123). Osim u obliku suplemenata, n-3 PUFA-e pokazale su svoje blagotvorne učinke i u obliku funkcionalne hrane, odnosno u obliku kokošnjih jaja obogaćenima

n-3 PUFA. Konzumacija 3 obogaćena jaja na dan (1053 mg n-3 PUFA dnevno) povećala je razinu n-3 PUFA-e u serumu te dovelo do poboljšanja mikrovaskularne reaktivnosti kože, a istodobno smanjilo razine proupalnih citokina (npr. INF- γ) i povećalo protuupalne citokine u serumu (IL-10) u populaciji mladih zdravih osoba (122).

Iz svih studija o smanjenju rizika od KVB u općoj populaciji proizašle su razne smjernice nekih regulatornih agencija, pa je tako Francuska agencija za sigurnost hrane (ANSES) preporučila 500 mg na dan kombiniranih EPA i DHA, a kod osoba s visokim rizikom za nastanak KVB preporuka se povećava na 750 mg na dan (124). Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) nije dala specifičnu preporuku o količini dnevnog unosa n-3 PUFA, ali je zaključila da je suplementacija sigurna dok njen unos ne prelazi 2 g/dan (125).

1.7.2. Selen

Zbog svoje sposobnosti ugradnje u antioksidativne enzime poput selenocisteina, selen (Se) je biološki element u tragovima sa važnom ulogom u oksidativnoj obrani organizma. Primarni predstavnici ljudskih enzima koji sadrže selen su tioredoksin reduktaza i glutation peroksidaza (126,127). Sve veći broj argumenata ide u prilog tome da su endogeni selenoproteini uključeni u brojne procese u ljudskom organizmu poput održavanja superoksidnog aniona/NO, a samim time regulacije vaskularnog tonusa, zatim regulacije stanične adhezije nadzorom izražaja staničnih adhezivnih molekula (engl. *cell adhesion molecules*, CAMs), regulacije apoptoze putem inhibicije/aktivacije kinaze-1 koja je ključna za regulaciju signala apoptoze te proizvodnje eikozanoida kontroliranjem aktivnosti ciklooksigenaza 1 i 2 (COX-1, COX-2) i lipooksigenaze (128). Forgione i suradnici u svom istraživanju testirali su hipotezu da nedostatak GPx1 dovodi do povećanja vaskularnog oksidativnog stresa a posljedično tome i do endotelne disfunkcije. U studiji su koristili nokaut miševе, homozigote s genetskom insuficijencijom GPx1 uspoređujući ih sa normalnim miševima. Rezultati su pokazali da je u skupini nokaut miševa došlo do oslabljene endotel ovisne vazodilatacije, odnosno endotelne disfunkcije vjerojatno bog smanjenja bioraspoloživog dušikovog oksida i povećanog vaskularnog oksidativnog stresa. (129). Studija provedena na pacijentima sa suspektnom bolesti koronarnih arterija procjenjivala je povezanost aktivnosti glutation peroksidaze u eritrocitima sa rizikom od kardiovaskularnog događaja. Rezultati studije pokazali su da je aktivnost GPx1 povezana sa rizikom od koronarne bolesti, odnosno pacijenti kod kojih je izmjeren niži stupanj aktivnosti GPx1 imali su povećan rizik za razvoj kardiovaskularnih događaja. Stoga se može

zaključiti kako aktivnost glutation peroksidaze može imati prognostičku vrijednost zajedno sa tradicionalnim faktorima rizika, odnosno povećanje aktivnosti GPx1 moglo bi pozitivno utjecati na smanjenje rizika od kardiovaskularnih događaja (130).

Suplementacija selenom ima imuno stimulirajući učinak, odnosno selen potiče aktivnost NK stanica, proliferaciju T stanica, funkciju urođenih imunoloških stanica te brojnih drugih. Bentley-Hewitt i suradnici istraživali su potencijalne povoljne učinke selenom obogaćene brokule na ljudsko zdravlje. U studiju su uključili ukupno 18 ispitanika koji su 3 dana konzumirali običnu brokulu te se taj period nazivao period ispiranja nakon čega su ispitanici jeli selenom obogaćenu brokulu (ukupno 200 μ g selena) također kroz 3 dana. Uzimali su uzorke plazme i PBMC-a na početku i na kraju svakog protokola te mjerili koncentracije selena i produkciju citokina. Koncentracija selena u plazmi značajno je porasla nakon konzumacije selenom obogaćene brokule, a kao glavni rezultat studije pokazali su da konzumacija brokule obogaćene selenom dovodi do povećane produkcije interleukina (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 i IL-22) u mononuklearnim stanicama periferne krvi te samim time pojačava imunološki protuupalni odgovor (131). Protuupalni učinak selena istraživan je i u studiji na pacijentima sa sindromom respiratornog distresa. Naime, pacijenti u intenzivnoj jedinici podijeljeni su u dvije skupine, jedna koja je intravenozno primala fiziološku otopinu obogaćenu natrijevim selenitom te kontrolnu skupinu koja je primala čistu fiziološku otopinu. Dodatak natrijevog selenita u fiziološku otopinu obnovio je antioksidativni kapacitet pluća što je smanjilo upalni odgovor kroz povezane koncentracije interleukina (IL-1 i IL-6) te signifikantno poboljšalo mehaniku respiracija kod pacijenata (132).

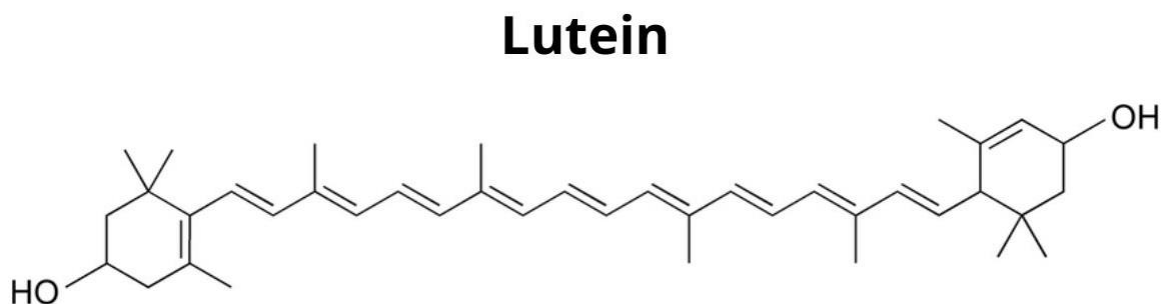
Iz svega navedenog pokazano je da Se ima značajnu ulogu u imunološkom sustavu, endotelnoj funkciji, odnosno, endotelnoj disfunkciji pomoću svojih protuupalnih medijatora, ali i u sintezi GPx1 koji može biti značajan u prevenciji kardiovaskularnih incidenata (133).

1.7.3. Lutein

Lutein je serumski karotenoid koji ljudi ne sintetiziraju i stoga se mora unositi putem hrane bogate luteinom, uglavnom povrće i voće. (134). Prisutan je u raznim vrstama hrane poput tamno zelenog povrća poput kelja i špinata te u žumanjku kokošnjih jaja (135). U navedenoj hrani lutein je prisutan u nekoliko različitih oblika kao trans-lutein, cis-lutein, epoksi-lutein i lutein povezan s proteinima. Koncentracija luteina može varirati ovisno o metodama termičke obrade namirnica te uvjetima skladištenja. Kod biljaka, lutein ima funkciju antioksidansa te ih

štiti od foto-induciranih oštećenja slobodnim radikalima (136). U ljudskom organizmu, lutein ima dvije važne funkcije, prva je filtriranje visokoenergetskog plavog svjetla u oku, a druga je ta da smanjuje redoks osjetljive upalne signalne putove te inhibira indukciju medijatora upale, stoga može spriječiti razvoj ranih upalnih bolesti. Utjecaj luteina najbolje je istražen kod neurodegenerativnih poremećaja, bolestima oka, uključujući dijabetičku retinopatiju, osteoporozu, kožne bolesti te kardiovaskularnih bolesti (137).

Molekula luteina građena je od dugačkog ugljikovog lanca na kojem se izmjenjuju jednostruke i dvostruke ugljik-ugljik veze s metilnim skupinama na oba kraja lanca, a upravo te hidroksilne skupine na krajevima izdvajaju lutein u usporedbi s ostalim karotenoidima (138). Također zahvaljujući hidroksilnim skupinama, ali i prisutnosti konjugiranih dvostrukih veza ostvaruje svoj protuupalni i antioksidativni učinak (139). Struktura molekule luteina prikazana je na Slici 1.6.



Slika 1.6. Kemijska struktura molekule Luteina. (izvor: izradio autor disertacije)

Kako je ranije spomenuto, endotelna funkcija regulirana je putem vazodilatatora te vazokonstriktora, a manjak vazodilatatora NO rezultira generaliziranom vazokonstrikcijom te hipertenzijom. Učinak luteina u preveniranju hipertenzije se ostvaruje preko nekoliko puteva, uključujući i utjecaj na sintezu NO te pojačavanje antioksidativnih učinaka (140).

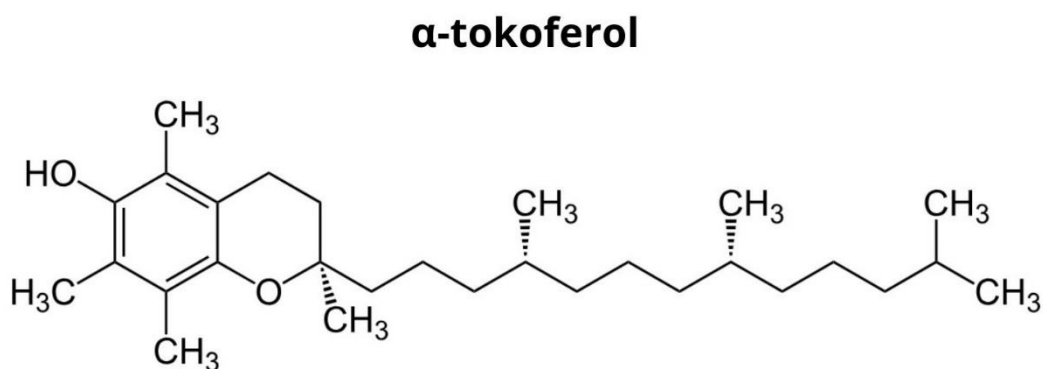
Epidemiološka studija provedena od strane Dwyer i suradnika istraživala je učinak luteina na razvoj ateroskleroze na miševima, ali i kod ljudi u dobi od 40 do 60 godina. Progresija debljine intime medije zajedničke karotidne arterije praćena pomoću ultrazvuka kroz ukupno 18 mjeseci. Studija je pokazala da se kod miševa s najvišim vrijednostima luteina u serumu pokazalo 80 % manje zadebljanje stijenke arterija u odnosu na miševe s najnižim vrijednostima luteina u serumu, a rezultati na miševima i ljudima podržavaju hipotezu da povišen unos luteina ima preaktivni učinak u ranom razvoju ateroskleroze (141). Također, studija provedena u Pekingu na 125 ispitanika sa ranim znakovima ateroskleroze te 107 kontrolnih ispitanika u dobi od 45 do 68 godina istraživala je povezanost rane ateroskleroze prije pojave kalcificiranog plaka, procjenjivane debljinom intime medije s razinama glavnih karotenoida, odnosno luteina. Tijekom studije mjerena je debljina intime medije zajedničke karotidne arterije pomoću ultrazvuka. Rezultati studije pokazali su da su serumske razine luteina značajno niže kod ispitanika sa znakovima ateroskleroze nego u kontrolnoj skupini (142). Nadalje, unos luteina u obliku suplemenata snizio je razine serumskih upalnih citokina (IL-6, MCP-1), LDL kolesterola te triglicerida koji imaju značajnu ulogu u razvoju rane ateroskleroze kod ljudi (142).

Brojni dokazi ukazuju na zaštitni učinak luteina na kardiovaskularne bolesti i koronarne bolesti srca, obzirom da većina takvih bolesnika ima kroničnu upalu niskog stupnja. Pokazana je i inverzna povezanost serumskih razina luteina i IL-6 kod bolesnika sa stabilnom anginom. Naime, kada su mononuklearne stanice periferne krvi pacijenata s koronarnom arterijskom bolešću prethodno tretirane luteinom, a nakon toga je uslijedio tretman lipopolisaharidima, smanjena je lipopolisaharidima inducirana sekrecija IL-6, IL-1 β i TNF (143).

1.7.4. Vitamin E

Vitamin E je jedan od važnijih mikronutrijenata s antioksidativnim svojstvima koji ima značajnu ulogu u ljudskom organizmu. Tu ulogu ostvaruje upravo putem svog antioksidativnog učinka, prekida oksidativnih lančanih reakcija te sposobnosti uklanjanja radikala lipida. Vitamin E je esencijalan, što znači da ga tijelo ne proizvodi samo te ga je neophodno unositi putem prehrane ili suplemenata (144). U najvećim koncentracijama nalazimo ga u orašastim plodovima i raznim biljnim uljima, a po sastavu je lipofilna molekula koja ima osam različitih izomera, četiri tokotrienola (α -, β -, γ - i δ -tokotrienol) četiri tokoferola (α -, β -, γ - i δ -tokoferol). Najzastupljeniji oblik vitamina E u zapadnoj prehrani je γ -tokoferol, a u plazmi i biološki najaktivniji oblik vitamina E je α -tokoferol. Molekula vitamina E sastoji se od ugljikovodičnih

spojeva sa karakterističnim kromanolnim prstenom i fitolnim bočnim lancem zbog kojeg se nazivaju i tokoferoli i tokotrienoli ovisno o zasićenosti odnosno nezasićenosti istog. Kemijska struktura α -tokoferola prikazana je na Slici 1.7. (145).



Slika 1.7. Kemijska struktura molekule α -tokoferola

Osim uloge vitamina E u antioksidativnim procesima, on je jedan od najdjelotvornijih vitamina koji moduliraju imunološku funkciju. Tu funkciju ostvaruje putem protektivnog učinka protiv oksidacije PUFA u membranama imunoloških stanica koja nastaje u odgovoru pri normalnoj obrani od patogena te visokoj metaboličkoj aktivnosti (146). Sastav i struktura stanične membrane igraju ključnu ulogu u funkciji imunoloških stanica, budući da su membranske komponente glavno mjesto za prijenos vanjskih signala i regulaciju genske ekspresije. Vitamin E može značajno doprinijeti očuvanju integriteta staničnih membrana i očuvanju njihovih funkcija. Ova uloga vitamina E manifestira se kroz sprječavanje peroksidacije lipida, čime se štiti membranska struktura od oštećenja. Na taj način, vitamin E podržava procese prijenosa signala, sintezu važnih proteina i regulatornih posrednika te izravno utječe na aktivnost imunoloških stanica. Nadalje, vitamin E također može direktno utjecati na određene karakteristike staničnih membrana, kao što je pokretljivost lipidnih splavi, što zauzvrat može imati utjecaj na distribuciju i pokretanje površinskih signalnih molekula. Ova sposobnost vitamina E dodatno potencira njegovu ulogu u modulaciji funkcije imunoloških stanica (144).

Važan i pozitivan učinak vitamin E ima također i na funkcioniranje kardiovaskularnog sustava, a time i funkciju endotela. Heitzer i suradnici pokazali su da dugotrajna suplementacija vitaminom E poboljšava endotel ovisnu dilataciju krvnih žila podlaktice kod pušača koji boluju od hiperkolesterolemije. Njih karakterizira povećana razina autoantitijela protiv oksidiranog LDL-a, a ovi rezultati sugeriraju da ovakav koristan učinak vitamina E može biti ograničen samo na pojedince s visokom razinom oksidiranog LDL-a (147). Što se tiče učinka vitamina E na kardiovaskularne bolesti provedene su brojne studije, pa su tako Gey i suradnici pokazali inverznu povezanost koncentracije vitamina E u plazmi te smrtnosti od ishemijske bolesti srca. Također, rizik od angine pectoris bio je obrnuto povezan s plazmatskom koncentracijom vitamina E u istraživanju koje je obuhvatilo 110 slučajeva angine, čak i nakon prilagodbe za dob, naviku pušenja, krvni tlak, lipide i relativnu tjelesnu masu (148). Nadalje, u dugotrajnoj perspektivnoj kohortnoj studiji koju su proveli Huang i suradnici na 29092 ispitanika pokazali su da su više vrijednosti serumske koncentracije α -tokoferol-a povezane s manjim rizikom od ukupne smrtnosti od svih uzroka pa tako i od kardiovaskularnih uzroka smrti od 17 % pa sve do 47 % (149). Osim navedenih studija o utjecaju vitamina E na kardiovaskularni sustav, samo je jedna od njih, provedena u Kini, pokazala povezanost više koncentracija vitamina E u serumu te povišenog rizika za infarkt miokarda (150). Općenito, brojna opservacijska istraživanja dosljedno su izvještavala da su visoki unos ili suplementacija vitamina E povezani sa smanjenim rizikom od bolesti srca i ukupnom smrtnošću. Međutim, do sada nijedno intervencijsko ispitivanje na ljudima nije pokazalo korist suplementacije vitamina E u prevenciji bilo kojeg kardiovaskularnog događaja. Smanjenje razine vitamina E u plazmi unutar prvih 48 sati nakon infarkta miokarda te visoka potreba za vitaminom E tijekom reperfuzije mogli bi biti obećavajući terapijski pokazatelji za kratkotrajnu suplementaciju vitaminom E (151).

2. HIPOTEZA

Konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminom E, selenom i luteinom tijekom tri tjedna rezultirat će poboljšanjem mikrovaskularne endotelne funkcije u populaciji zdravih sportaša u usporedbi sa sportašima koji su konzumirali obična kokošja jaja.

3. CILJEVI

U populaciji sportaša:

1) Istražiti hoće li konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminom E, selenom i luteinom u razdoblju od tri tjedna imati povoljan učinak na mikrovaskularnu endotelnu funkciju te na mikrovaskularnu endotelnu reaktivnost nakon akutnog iscrpljujućeg treninga u populaciji mladih zdravih sportaša u usporedbi sa sportašima koji će konzumirati obična kokošja jaja.

2) Ispitati potencijalne mehanizme, s naglaskom na oksidativni stres, koji posreduju odgovor endotela mikrocirkulacije na kombinirani utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminom E, selenom i luteinom te redovitog vježbanja u populaciji zdravih sportaša.

Primarni ishod istraživanja vezan je uz prvi cilj istraživanja, a uključuje promjenu vaskularne reaktivnosti (mikrovaskularne o endotelu ovisne dilatacije mjerene postokluzivnom reaktivnom hiperemijom i acetilkolinom induciranom dilatacijom) dijetetskog protokola.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije i populacija ispitanika

Ovo je bila randomizirana, dvostruko slijepa, prospektivna, intervencijska studija. U studiji je sudjelovalo ukupno 31 zdravih mladih muških natjecateljskih sportaša regrutiranih putem oglasa na Medicinskom fakultetu Osijek, putem oglasa na Kineziološkom fakultetu Osijek te putem oglasa u lokalnim sportskim klubovima (VK Iktus, AK Osijek Žito) kako bi sudjelovali u istraživanju. Svi uključeni sportaši trenirali su neprekidno minimalno godinu dana 5 do 12 puta tjedno. Uključivani su sportaši dobne skupine od 18 do 30 godine normalnog indeksa tjelesne mase (ITM), krvnoga tlaka te serumskih vrijednosti lipida. Isključni kriteriji bili su: pušenje, arterijska hipertenzija, bolest koronarnih arterija, bubrežna oštećenja, šećerna bolest, hiperlipidemija, bolesti perifernih arterija i cerebrovaskularne bolesti te uzimanja bilo kakvih lijekova koji mogu imati utjecaj na endotelnu funkciju, pregled istih prikazan je na Slici 4.1.



Slika 4.1. Shematski prikaz uključnih i isključnih kriterija studije.

Svaki ispitanik potpisao je informirani pristanak. Protokol studije u skladu je sa standardnima utvrđenima posljednjom revizijom Helsinške deklaracije i odobren je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/21-08/07; Broj: 2158-61-07-21-151). Studija je registrirana u registru kliničkih studija ClinicalTrials.gov

(<https://register.clinicaltrials.gov/>) pod naslovom: Učinak obogaćenih QUARTET® kokošnjih jaja na kardiovaskularnu funkciju u kardiovaskularnih pacijenata i zdravih osoba, NCT broj: NCT04564690. Studija je provedena na Medicinskome fakultetu Osijek, u Laboratoriju za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Katedre za fiziologiju i imunologiju.

4.2. Proizvodnja jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E

Jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E producirana su prema ranije utvrđenom protokolu istraživačke skupine Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta u Osijeku (152). Repičino ulje (1,5 %) u hranidbenim smjesama kojim su hranjene kokoši nesilice zamijenjeno je mješavinom ribljeg (1,5 %) i lanenog (2 %) ulja, uz dodatak 0,43 mg/kg smjese selena, te 100 mg/kg mješavine vitamina E i luteina. Ovakvom hranidbenom smjesom nesilica, dobivena su Nutri4 jaja čiji je sadržaj u odnosu na kontrolu (obična jaja) opisan u Tablici 4.1.

Tablica 4.1. Koncentracije mikronutrijenata u običnim i obogaćenim (Nutri4) kokošnjim jajima.

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

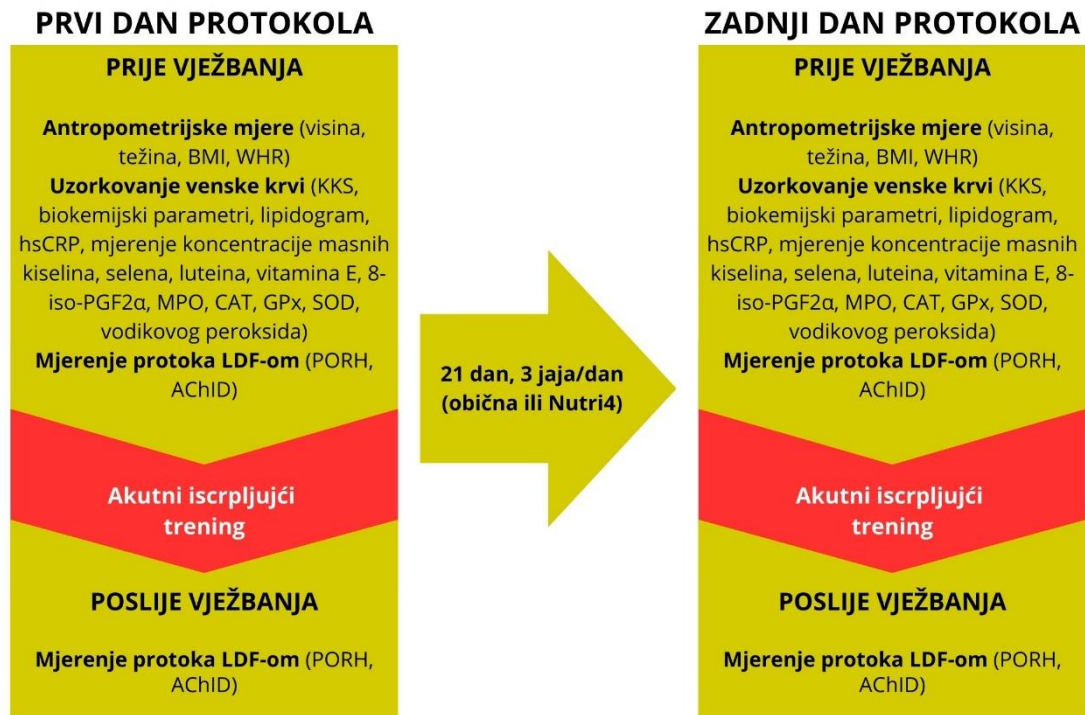
MUFA - mononezasićene masne kiseline, SFA - zasićene masne kiseline, PUFA - polinezasićene masne kiseline, ALA - α-linolenska kiselina, EPA - eikosapentaenska kiselina, LA - linolna kiselina, DHA - dokosaheksaenska kiselina, AA - arahidonska kiselina.

† - nije detektirano.

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

4.3 Protokol istraživanja

Protokol studije uključivao je dva dolaska u Laboratorij za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Medicinskog fakulteta Osijek, neposredno prije i poslije dijetnog protokola koji je trajao 21 dan. Obje posjete bile su u prijednevima, ispitanici su bili natašte, a napomenuto im je da ne izvode nikakve napore tjelesne aktivnosti barem 24 sata prethodno posjeti. Prilikom prve posjete ispitanicima su podijeljena kokošja jaja te su dobili uputstva da jedu tri tvrdo kuhana jaja svaki dan kroz 21 dan (ukupno 63 jaja). Ispitanici su podijeljeni u Nutri4 grupu (14 ispitanika) koji su konzumirali jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E (tri na dan; otprilike 1056 mg n-3 polinezasićenih masnih kiselina, 0.0573 mg selena na dan, 3.29 mg vitamina E na dan i 1.85 mg luteina na dan) te u kontrolnu grupu (17 ispitanika) koji su konzumirali obična kokošja jaja proizvedena na istoj farmi (tri na dan; otprilike 438 mg n-3 polinezasićenih masnih kiselina na dan, 0.0549 mg selena na dan, 1.785 mg vitamina E na dan i 0.33 mg luteina na dan). Jaja obje skupine bila su iste veličine (komercijalna M veličina), a niti ispitanici niti istraživači nisu znali kojoj skupini ispitanici pripadaju. Također, ispitanici su dobili uputu da tijekom trajanja protokola ne uzimaju nikakvu drugu hranu obogaćenu n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom ili vitaminom E ili bilo kakve suplemente bogate drugim mikronutrijentima. Usto, konzumirati su smjeli samo jaja koja su im dodijeljena na početku studije. Vremenski tijek studije prikazan je na Slici 4.1. s izvršenim mjerenjima u obje točke studije odnosno u svakom studijskom posjetu. Prilikom obje posjete ispitanicima je određen indeks tjelesne mase (ITM), omjer struk/bokovi (WHR), mjerio se sastav tijela te uzimao uzorak venske krvi za analizu krvne slike, te standardnih biokemijskih parametara, elektroliti (natrij i kalij), kreatinin, urea, lipidogram (trigliceridi, LDL kolesterol, HDL kolesterol, ukupni kolesterol), GUK te hsCRP. Učinjen je protokol za procjenu mikrovaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože (PORH i ACh inducirana dilatacija) nakon čega je uslijedio trening do maksimalnog iscrpljenja na veslačkom ergometru. Odmah po završetku istog ponovljen je protokol za procjenu mikrovaskularne reaktivnosti u mikrocirkulaciji kože. Protokol po kojem su izvedeni svi navedenih postupci detaljno je opisan u Materijalima i metodama, a shematski prikazan na Slici 4.2.



Slika 4.2. Vremenski tijek studije s provedenim mjerenjima u obje točke studije (svakom studijskom posjetu). BMI, indeks tjelesne mase; WHR, omjer struk-bokovi; KKS, krvna slika; hsCRP, visoko osjetljiv C reaktivni protein; 8-iso-PGF_{2α}, 8-iso-prostaglandin-2-alfa; MPO, mijeloperoksidaza; CAT, katalaza; GPx, glutation peroksidaza; SOD, superoksid dismutaza; PORH, AChID, postokluzivna reaktivna hiperemija, acetilkolinom inducirana vazodilatacija (izvor: izradio autor disertacije)

4.4. Određivanje osnovnih antropometrijskih mjera te mjerenje biokemijskih i kardiovaskularnih parametara

Ispitanicima je prilikom obje posjete laboratoriju izmjerena visina (m) i tjelesna masa (kg) te se iz navedenih podataka se izračunao indeks tjelesne težine (engl. *body mass indeks*, BMI). Također, ispitanicima je izmjeren i opseg struka te opseg bokova nakon čega se izračunao omjer struka i bokova (WHR). Nakon 15 minuta sjedenja, ispitanicima je izmjeren krvni tlak u istom položaju pomoću automatskog tlakomjera (OMRON, Osaka, Japan), a konačne vrijednosti krvnog tlaka i pulsa izražene su kao srednja vrijednost tri sukcesivna mjerenja. Nakon mjerenja krvnog tlaka i pulsa uzet im je uzorak venske krvi, ispitanici su bili natašte prilikom uzorkovanja istog. Prilikom analize venske krvi korištene su standardne laboratorijske metode za određivanje krvne slike te standardnih biokemijskih parametara: elektroliti plazme (natrij i kalij), urea, kreatinin, lipidni profil (ukupan kolesterol, trigliceridi, LDL kolesterol, HDL

kolesterol), glukoza u krvi, te hsCRP (kao biljeg upalnog procesa). Navedena standardizirana analiza krvi provedena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek.

4.5. Analiza masnih kiselina u serumu te koncentracije selena, luteina i vitamina E u serumu.

Za izradu profila ukupno 37 masnih kiselina u serumu korištena je plinska kromatografija-tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS) prema već ustaljenim protokolima (153). Izrada profila masnih kiselina je učinjena uz pomoć GC-MS/MS sistema marke Thermo Fisher GC Trace 1300 zajedno sa TSQ 9000 Triple Quadrupole u BIOcentrovom bioanalitičkom laboratoriju, BIOcentar – inkubacijski centar za bioznanost, Zagreb, Hrvatska.

Koncentracija vitamina E u serumu također je utvrđena prema ranije standardiziranom protokolu (154) koristeći prvo apsolutni etanol za denaturaciju serumskih proteina, a zatim Xylen za odvajanje supernatanta od proteina. Nakon odvajanja supernatana u smjesu je dodan 2,2-bipiridil i željezov(III)klorid što je rezultiralo ružičastim obojenjem smjese. Nakon dvominutne inkubacije mjerena je absorbanca koristeći ELISA čitač na 492 nm. Dobivena absorbanca je bila razmjerna serumskoj koncentraciji vitamina E.

Protokol za mjerenje koncentracije selena (Se) u uzorcima seruma prilagođen je od strane partnerske institucije kroz projektnu suradnju (155). Uzorci seruma su razgrađeni u ultra čistoj dušičnoj kiselini (HNO_3) te vodikovom peroksidu (H_2O_2) u omjeru 5:1 u zatvorenom mikrovalnom sustavu CEM Mars 6 (CEM, Matthew, NC, USA) kroz 60 minuta na 180°C . Masena spektrometrija induktivno spregnute plazme (ICP-MS) (ICP-MS, Agilent 7500a Agilent Technologies Inc., Kalifornija, SAD) korištena je za određivanje koncentracije selena u otopini ragrađenih uzoraka seruma. Svaki uzorak seruma analiziran je na ICP-u, a analitička metoda kontrolirana je referentnim materijalom NIST 1567b (wheat flour, National Institute of Standards and Technology, USA).

Koncentracija luteina u uzorcima seruma također se određivala prema postojećim protokolima (156,157). Jedan mililitar deionizirane vode i 0,01 % askorbinske kiseline otopljene u apsolutnom etanolu se dodalo u 200 ul uzorka seruma te se smjesa promiješala. Nakon toga dodano je 2 ml heksana, promiješano te centrifugirano na 2500 RPM kroz 20 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je odvojen, a koncentracija luteina određena je pomoću HPLC.

HPLC analiza obavljena je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

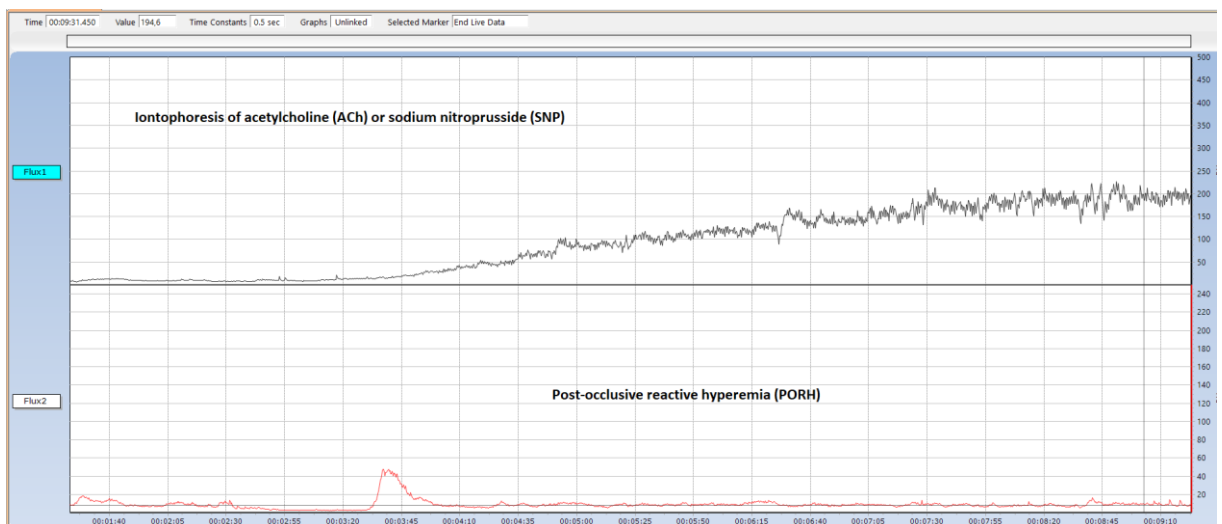
4.6. Mjerenje protoka krvi i vaskularne reaktivnosti mikrocirkulacije kože

Za određivanje protoka krvi u mikrocirkulaciji kože korištena je laser Doppler floumetrija (engl. *laser Doppler flowmetry*, LDF) (MoorVMS-LF, Axminster, UK) koristeći tri različita stimulusa prilikom oba studijska posjeta. LDF mjerenja provedena su prethodno i odmah po završetku akutnoga iscrpljujućega treninga za vrijeme oba posjeta. Nakon 30 minuta aklimatizacije u toploj prostoriji započelo je prikupljanje podataka (srednja vrijednost i standardna devijacija (SD) temperature = 23.5 i 0.5°C) kako bi se izbjegao možebitni utjecaj vanjske temperature na protok krvi u koži ispitanika. Mjerenje se obavljalo na ispitanicima koji su bili u ležećem položaju sa sondom lasera pričvršćenom na odgovarajućem mjestu volarne strane podlaktice, otprilike 15 cm udaljeno od ručnog zgloba, prikaz ispitanika priključenog na LDF, Slika 4.3.



Slika 4.3. Prikaz ispitanika priključenog na LDF. (izvor: izradio autor disertacije)

Prvi protokol ispitivanja funkcije mikrocirkulacije neinvazivni je test izazivanja postokluzivne reaktivne hiperemije (PORH) u kojem se mjeri promjena u protoku krvi nakon okluzije protoka, odnosno u periodu reaktivne hiperemije (158). Sam protokol započinje bazalnim mjerenjem u trajanju od 5 minuta nakon čega se izaziva vaskularna okluzija napuhivanjem manžete tlakomjera, postavljene na nadlakticu, na vrijednosti 30 - 50 mmHg iznad sistoličkog tlaka ispitanika u trajanju od jedne minute prilikom koje se mjerenje i dalje nastavlja. Po otpuštanju jednog minute okluzije mjerenje se nastavlja kroz još 10 minuta gdje se bilježi postokluzivna reaktivna hiperemija. Primjer jednog zapisa LDF-a sa primjenom okluzije i mjerenjem reaktivne hiperemije možemo vidjeti na Slici 4.4.



Slika 4.4. Prikaz originalnog zapisa mjerenja mikrovaskularne reaktivnosti pomoću Laser doppler Flowmetra (MoorVMS-LF, Axminster, UK) iz Laboratorija za kliničku fiziologiju i fiziologiju sporta Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Na slici je prikazano 2 zapisa pomoću dvokanalnog lasera. Gornji zapis pokazuje promjenu protoka nakon administracije acetilkolina, a donji zapis je prikaz promjene protoka nakon okluzije kada se prati postokluzivna reaktivna hiperemija. (izvor: izradio autor disertacije)

Arbitrarne perfuzijske jedinice (PU) korištene su za izražavanje promjene u protoku krvi, a za mjerenja relativne promjene krvnog protoka tijekom reaktivne hiperemije izazvane okluzijom, podaci su izraženi kao površina ispod krivulje (AUC) tijekom bazalnog protoka, okluzije i reperfuzije. Rezultati mjerenja prikazani su kao razlika postotka promjene protoka tijekom okluzije i reperfuzije u odnosu na bazalne vrijednosti protoka (R-O %). Sam protokol je već ranije opisan i utvrđen u našem laboratoriju (159,160).

Druga dva protokola za ispitivanje protoka krvi u mikrocirkulaciji također su neinvazivni testovi koji izazivaju promjenu protoka mikrocirkulacije kože ovisnu o endotelu - kao odgovor na ionoforezu ACh-a te neovisno o endotelu kao odgovoru na ionoforezu SNP-a. Ionoforeza je neinvazivna metoda koja pomoću eksterno primijenjene električne struje služi za supkutanu primjenu nabijenih tvari. Na mjestu prethodno pričvršćene sonde lasera tijekom petominutnog bazalnog mjerenja postavi se ionoforetska elektroda za dostavljanje lijekova. Pozitivno nabijeni vazodilatator acetilkolin (1 %) se aplicira pomoću ionoforeze kroz sedam aplikacijskih intervala od 0.1 mA trajanja 30 s uz pauze od 30 s između pojedinih aplikacijskih intervala, a negativno nabijeni vazodilatator natrijev nitroprusid (1 %) kroz tri aplikacijska intervala od 0.1 mA trajanja 30 s i 4 aplikacijska intervala od 0.2 mA trajanja 30s uz pauze od 90 s između pojedinoga aplikacijskog intervala. Navedeni način aplikacije nabijenih tvari, u pulsovima od 30 s, korišten je kako bi se dostigao stabilni plato maksimalnog odgovora LDF-a (161). I u navedena dva protokola promjene u protoku krvi izražene su u PU. Tijekom aplikacije ACh-a ili SNP-a za određivanje relativne promjene krvnog protoka podatci su izraženi kao AUC tijekom bazalnog protoka i vazodilatacije. Konačni rezultat dilatacije inducirane s ACh ili SNP izražen je kao povećanje protoka u odnosu na bazalni protok.

4.7. Protokol akutnog iscrpljujućeg treninga

Prilikom obje posjete laboratoriju za fiziologiju sporta svi ispitanici su nakon obavljenih počeni mjerenja pristupili akutnom iscrpljujućem treningu izvršenom na veslačkom ergometru. Proveden je trening s postupnim povišenjem intenziteta do maksimalnog opterećenja, a sastojao se od pet submaksimalnih intervala trajanja 4 minute nakon kojih slijedi jedan interval maksimalnog intenziteta (162). Spomenuti veslački protokol je proveden na veslačkome ergometru Dynamic Indoor Rower Concept 2 (Concept2 Inc., Morrisville, VT, USA). Svim sportašima koji nisu bili veslački bila je potrebna kratka obuka iz osnova veslačke tehnike na veslačkom ergometru koju je proveo bivši profesionalni veslač koji je također bio uključen kao istraživač u studiji. Obuka je trajala nekoliko minuta prije početka samog protokola treninga a obuhvaćala je usvajanje nekoliko glavnih pokreta i položaja nužnih kako bi se snaga uspjela u što većem dijelu prenijeti na veslački ergometar, prikaz ključnih točaka zaveslaja je na slici 4.5.



Slika 4.5. Prikaz ključnih točaka veslačke tehnike na ergometru. Veslačka tehnika na ergometru kontinuirani je kružni pokret sa 4 ključne točke prikazane na slici: zahvat, provlak, kraj zaveslaja te oporavak od zaveslaja. (izvor: izradio autor disertacije)

Svaki submaksimalni interval trajao je 4 minute i imao je zadani intenzitet, prvi interval započeo je sa intenzitetom 150 W s porastom svakog slijedećeg intervala za 40 W. Odmor između svakog submaksimalnog intervala trajao je jednu minutu, dok je period odmora prije intervala maksimalnog intenziteta trajao pet minuta. Interval maksimalnog intenziteta je bio bez danoga vremenskoga ograničenja, a ispitanici su instruirani veslati svom snagom do potpunog iscrpljenja. Za subjektivnu ocjenu fizičke težine pojedinog intervala samog ispitanika korištena je samoprocjena napora (RPE). Točnije korištena je skala omjera kategorija (engl. *category-ratio*, CR10), koju je uveo Borg 1998. godine (163), budući da se pokazala vjerodostojnom i opravdanom u zdravih osoba, ali i u sportaša. Skala sadrži vrijednosti od 0 (mirovanje) do 10 (maksimalno iscrpljenje) što je detaljnije prikazano na Slici 4.6. (164).

Broj	Opis
0	mirovanje
1	vrlo lagano
2	prilično lagano
3	umjereno
4	pomalo teško
5	teško
6	teško
7	vrlo teško
8	vrlo teško
9	vrlo, vrlo teško
10	maksimalno iscrpljenje

Slika 4.6. Borgova skala subjektivnog osjećaja opterećenja 1-10, engl. *Borg Rating of Perceived Exertion (RPE) Scale*. U ovom istraživanju u svrhu samoprocjene napora i subjektivne ocjene samog ispitanika o fizičkoj težini pojedinog intervala protokola akutnog treninga korištena je Borgova skala 1-10. (izvor: izradio autor disertacije)

4.8. Mjerenje aktivnosti antioksidativnih enzima te koncentracija 8-izo prostaglandina F_{2α} (8-izo-PGF_{2α}) i mijeloperoksidaze (MPO) te njene serumske aktivnosti

Aktivnosti antioksidativnih enzima, glutacion peroksidaze (GPx), katalaze (CAT) i superoksid dismutaze (SOD) mjerena je u uzorcima seruma koristeći Lambda 25UV-Vis's spektrofotometar opremljen sa UV WinLab 6.0 softverom (PerkinElmer for the Better, Waltham, Massachusetts, USA). Mjerenja su se odvijala prema već ranije uspostavljenim

protokolima Biokemijskog laboratorija Odjela za Biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (165). Izmjerene aktivnosti CAT, GPx i SOD su izražene u jedinici enzima po miligramu proteina (U/mg protein). Za određivanje koncentracije proteina u uzorku seruma pratio se protokol proizvođača Bradford reagensa (Bradford Reagent B6916, Sigma Aldrich) pri 595 nm koristeći albumin goveđeg seruma kao standard.

Koncentracija proteina 8-izo prostaglandina F_{2α} (8-izo-PGF_{2α}), izoprostana proizvedenog u membranskim fosfolipidima putem neenzimske peroksidacije arahidonske kiseline, mjerena je koristeći komercijalno dostupan enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) kit (Elabscience, Catalog No: E-EL-0041, Elabscience Biotechnology Inc., Houston, Texas, SAD) prema uputama proizvođača. Mjerenje absorbance i intenziteta boje učinjeno je koristeći standardnu krivulju spektrofotometra (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California, SAD).

Serumska aktivnost mijeloperoksidaze (MPO), enzima koji katalizira stvaranje hipoklorične kiseline jedne od najjačih oksidativnih molekula koje se stvaraju u ljudskom organizmu, određivala se koristeći komplet za testiranje kolorimetrijske aktivnosti ljudske mijeloperoksidaze prema uputama proizvođača. U uzorke seruma dodana je reakcijska smjesa nakon čega je izvršena inkubacija istih kroz 120 minuta. Optička gustoća i standardi uzoraka određeni su koristeći Lambda 25UV-Vis's spektrofotometar uz UV WinLab 6.0 softver (PerkinElmer for the Better, Waltham, Massachusetts, SAD) pri valnoj duljini od 412 nm.

Komercijalno dostupan komplet ELISA (Human Myeloperoksidase Kit ab272101, abcam, Cambridge, UK) korišten je prema uputama proizvođača za otkrivanje koncentracije MPO proteina u serumu. Proporcionalno količini vezanog analita, generiran je signal, a intenzitet je mjereno pri 450 nm (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornija).

4.9. Unutarstanična produkcija reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u mononuklearnim stanicama periferne krvi

Za procjenu unutarstanične produkcije reaktivnih kisikovih radikala korišten je FACS Canto II protočni citomtar (BD Bioscience; 488 excitation laser and 530/30 BP analysis filter). Za vizualizaciju i analizu podataka korišten je Flow Logic softver v1.0 (Inivai Technologies, Mentone, Australia). Po prethodno uhodanim laboratorijskim protokolima (106), za izolaciju

mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMCs) iz uzorka venske krvi, korišteno je centrifugiranje sa gradijentom gustoće (Ficoll-Paque® PLUS centrifugation media; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Nakon centrifugiranja otprilike 1×10^6 stanica je razrijeđeno u 100 μL fiziološke otopine sa fosfatom (PBS), a nakon toga inkubirano na 4°C otprilike 30 minuta s ili 10 μL diklorofluor-rescein diacetatom (engl. *dichlorofluo-rescein diacetate*, DCF-DA) za detekciju količine vodikovog peroksida i peroksinitrita ili dihidroetidijom (engl. *dihydroethidium*, DHE) za detekciju superoksida. Nakon inkubacije uzorci bojani s DCF-DA su ponovno razrijeđeni u 350 μL PBS te nakon toga analizirani na citometru, dok su uzorci bojani s DHE dodatno isprani s 450 μL PBS te nakon toga očitani putem citometra. Na kraju početnih očitavanja, za stimulaciju proizvodnje ROS-a, 50 μL 1 mM forbol 12-miristat 13-acetata (PMA) dodano je svakom uzorku i nakon 15-minutne inkubacije, uzorci su ponovno očitani na citometru. Podaci su izraženi kao višestruka promjena jedinica DCF fluorescencije u odnosu na kontrolu.

Na samome kraju pregleda Materijala i metoda na slici je shematski prikazan protokol koji je proveden pri svakom od dva posjeta laboratoriju za fiziologiju te mjerenja koja su se provodila (Slika 4.7.).

4.10. Statistička analiza

Svi rezultati prikazani su kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). Preliminarni rezultati potrebni za izračunavanje potrebnog uzorka za potencijalno značajan efekt prikupljeni su na 10 ispitanika. Potreban uzorak izračunat iz preliminarnih rezultata iznosio je 14 po grupi za pokazivanje očekivane razlike u primarnom ishodu (promjena protoka krvi izmjerenih LDF-om) sa stupnjem značajnosti od 0.05 i jakosti statističke analize od 80 % za t-test. Kolmogorov-Smirnov test normalnosti je korišten za testiranje normalne distribucije podataka. Za procjenu razlika unutar skupina (mjerenja prije i nakon svakog dijetetskog protokola) korišten je upareni t-test. Kada varijable nisu normalno distribuirane korišten je Wilcoxon rank-sum test. Razlike između skupina u mjerenjima nakon intervencije testirane su analizom kovarijance (ANCOVA) prilagođenom (kovarijabla) prethodnom mjerenju, $p < 0.05$ smatra se statistički značajnim. Za statističku analizu korišten je statistički program SigmaPlot (verzija 11.2, SYSTAT Software, Chicago, SAD).

ANTROPOMETRIJSKE MJERE

Mjerena je visina i tjelesna masa i kojih je izračunat indeks tjelesne mase (ITM)
Mjeren je opseg struka i bokova te izračunat omjer struk/bokovi (WHR)
Mjeren je krvni tlak (OMRON, Osaka, Japan)



UZORKOVANJE VENSKE KRVI



Uzorci venske krvi korišteni su za analizu krvne slike, te standardnih biokemijskih parametara, elektroliti (natrij i kalij), urea, kreatinin, lipidogram (ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL kolesterol, HDL kolesterol), GUK te hsCRP (kao biljeg upalnog procesa)

Mjerena je aktivnost antioksidativnih enzima - katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i superoksid dismutaze (SOD)

Također mjerena je koncentracija 8-izo-PGF2 α i mijeloperoksidaze te unutarstanična produkcija reaktivnih kisikovih radikala (ROS)

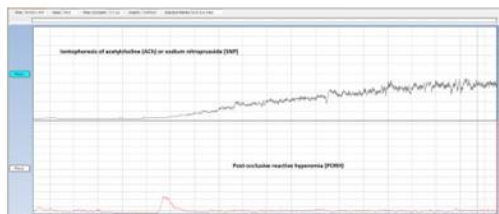
Antropometrijske mjere
Uzorkovanje venske krvi
Mjerenje protoka LDF-om
Akutni iscrpljujući trening

LASER DOPPLER FLOWMETRY (LDF)



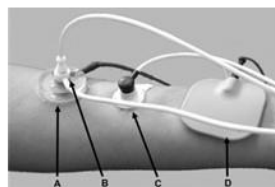
LDF – Laser Doppler Flowmetry, MoorVMS-LDF, Axminster, UK

a) Post okluzivna reaktivna hiperemija (PORH)



b) Iontoforeza (IONTO)

→ Acetilholin (ACh) – endotel-ovisna vazodilatacija
→ Natrijev nitroprusid (SNP) – endotel-neovisna



AKUTNI ISCRPLJUJUĆI TRENING

Provodi se na veslačkom ergometru podijeljen na ukupno 6 intervala shematski prikazanih ispod.



1. Interval – 150W (4min)

Odmor 1 min

2. Interval – 190W (4min)

Odmor 1 min

3. Interval – 230W (4min)

Odmor 1min

4. Interval – 270W (4min)

Odmor 1 min

5. Interval – 310W (4min)

Odmor 5min

6. Interval – MAX (4min)

Slika 4.7. Shematski prikaz protokola studije. (izvor: izradio autor disertacije)

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitanika

U istraživanju je sudjelovao 31 zdravi mladi profesionalni sportaš. Kontrolnu skupinu činilo je 17 profesionalnih sportaša, a Nutri4 skupinu činilo je 14 profesionalnih sportaša koji su trenirali minimalno 5 do maksimalno 12 puta tjedno kroz period duži od godinu dana. Svi ispitanici bili su mladi pojedinci prosječne dobi 22 ± 4 godine, a među eksperimentalnim skupinama nije bilo razlike u godinama (dob kontrolna 22 ± 3 god vs. Nutri4 23 ± 4 god). Također, svi ispitanici bili su normotenzivni, imali su urednu krvnu sliku, te mjerene biokemijske parametre. Nije bilo razlike niti u ostalim mjerenim parametrima (ITM, HR, tlak) između sportaša koji su bili raspoređeni u kontrolnu i u Nutri4 grupu u trenutku započinjanja studije. Svi ispitanici su izvršili dijetetski protokol do kraja. U Tablici 5.1. prikazani su inicijalne antropometrijske mjere te hemodinamski i biokemijski parametri ispitanika.

5.2. Antropometrijske mjere, hemodinamski i biokemijski parametri ispitanika

Utjecaj trotjedne konzumacije običnih kokošnjih jaja (kontrolna skupina) i obogaćenih kokošnjih jaja (Nutri4 skupina) na hemodinamske, antropometrijske i biokemijske parametre ispitanika prikazan je u Tablici 5.1. Srednji arterijski tlak (MAP) i koncentracija kalija značajno je niža nakon dijetetskog protokola u Nutri4 skupini u odnosu na ulazne vrijednosti. Također, uočen je značajan porast serumskih vrijednosti natrija nakon trotjedne konzumacije normalnih kokošnjih jaja, ali unutar referentnih vrijednosti. Razina trombocita i glukoze u serumu nakon dijetetskog protokola bile su više u Nutri4 grupi u usporedbi sa kontrolnom skupinom. Sve ostale značajne promjene također su bile unutar referentnog intervala opće populacije. Nikakve značajne promjene nisu pronađene na preostalim antropometrijskim (BMI, WHR), hemodinamskim (sistolički i dijastolički tlak, HR) te biokemijskim (krvna slika, urea, kreatinin, hsCRP) parametrima, kao i u lipidnom profilu (ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL kolesterol i HDL kolesterol) nakon konzumacije običnih niti obogaćenih kokošnjih jaja u usporedbi s početnim vrijednostima unutar kontrolne niti Nutri4 skupine, kao ni među vrijednostima nakon dijetete između dvije skupine prilagođene početnim vrijednostima.

Tablica 5.1. Utjecaj konzumacije običnih (Kontrolna skupina) i n-3 PUFA-om, selenom, luteinom i vitaminom E obogaćenih kokošnjih jaja na antropometrijske, hemodinamske i biokemijske parametre kod profesionalnih sportaša.

parametar	Kontrolna			Nutri4			p ^b
	Prije	Nakon	p ^a	Prije	Nakon	p ^a	
N (Ž/M)	17 (0/17)			14 (0/14)			
Dob (godine)	22 (3)			23 (4)			
BMI (kg/m ²)	24,9 (4,0)	24,7 (3,9)	0,542	23,6 (2,4)	23,5 (2,4)	0,620	0,463
WHR	0,83 (0,09)	0,84 (0,08)	0,078	0,83 (0,04)	0,82 (0,04)	0,625	0,750
SBP (mmHg)	122 (12)	119 (13)	0,203	124 (15)	118 (12)	0,153	0,090
DBP (mmHg)	70 (9)	71 (9)	0,528	71 (11)	70 (11)	0,268	0,925
MAP (mmHg)	87 (9)	87 (9)	0,799	89 (11)	85 (9)	0,040*	0,434
Puls (otkucaja u minuti)	72 (9)	74 (12)	0,365	70 (9)	69 (12)	0,706	0,213
Eritrociti (x10E12/L)	5,0 (0,3)	5,0 (0,4)	0,481	5,1 (0,3)	5,1 (0,3)	0,480	0,421
Hemoglobin (g/L)	149 (8)	148 (11)	0,512	147 (7)	148 (9)	0,734	0,315
Hematokrit (%)	42,8 (2,4)	42,6 (2,9)	0,326	42,6 (2,0)	43,2 (2,2)	0,266	0,175
Leukociti (x10E9/L)	5,8 (1,0)	5,7 (1,0)	0,321	6,0 (1,1)	6,0 (1,8)	0,947	0,205
Trombociti (x10E9/L)	214 (58)	215 (43)	0,239	234 (36)	230 (62)	0,414	0,044*

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost aritmetičke sredine i standardna devijacija (SD). N- ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; BMI- indeks tjelesne mase; WHR- omjer struk-bokovi; SBP- sistolički krvni tlak; DBP- dijastolički krvni tlak; MAP- srednji arterijski tlak; hsCRP- visoko osjetljivi C reaktivni protein.

* označava statistički značajnu razliku (p<0.05), pri čemu p^a predstavlja razliku prije i nakon unutar skupine (Kontrolna ili Nutri4) - upareni t-test; p^b razlika između nakon Kontrolna usporedno sa nakon Nutri4 grupa – analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja

Nastavak tablice 5.1.

parametar	Kontrolna			Nutri4			
	Prije	Nakon	p ^a	Prije	Nakon	p ^a	p ^b
Urea (mmol/L)	6,2 (1,2)	6,8 (1,3)	0,252	6,4 (0,9)	6,3 (0,9)	0,939	0,852
Kreatinin (μmol/l)	91 (10)	92 (10)	0,548	91 (10)	90 (9)	0,537	0,331
Natrij (mmol/l)	139,4 (1,2)	140,6 (1,9)	0,036*	139,8 (1,4)	139,8 (2,1)	0,945	0,479
Kalij (mmol/l)	4,2 (0,3)	4,1 (0,2)	0,170	4,3 (0,3)	4,1 (0,3)	0,048*	0,441
Kalcij (mmol/l)	2,55 (0,46)	2,54 (0,43)	0,571	2,44 (0,09)	2,43 (0,08)	0,781	0,354
Željezo (μmol/l)	17,0 (5,6)	17,6 (4,6)	0,691	19,2 (9,0)	16,1 (7,0)	0,194	0,851
Transferin (g/l)	2,46 (0,28)	2,49 (0,31)	0,407	2,64 (0,36)	2,59 (0,28)	0,222	0,317
Glukoza (mmol/L)	5,0 (0,5)	4,8 (0,9)	0,663	5,2 (1,0)	5,2 (1,2)	0,727	0,021*
hsCRP (mg/L)	0,86 (0,82)	0,93 (1,30)	0,421	0,66 (0,63)	0,86 (0,79)	0,635	0,188
Kolesterol (mmol/L)	4,0 (0,7)	4,2 (0,8)	0,119	4,4 (1,1)	4,6 (1,1)	0,164	0,636
Trigliceridi (mmol/L)	1,0 (0,5)	1,3 (1,1)	0,241	0,9 (0,5)	1,1 (0,7)	0,312	0,502
HDL kolesterol (mmol/L)	1,3 (0,3)	1,3 (0,3)	0,680	1,5 (0,3)	1,4 (0,3)	0,686	0,809
LDL kolesterol (mmol/L)	2,4 (0,6)	2,6 (0,6)	0,083	2,6 (0,8)	2,7 (0,8)	0,215	0,674

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost aritmetičke sredine (standardna devijacija). N- ispitanika; Ž-žene; M- muškarci; BMI- indeks tjelesne mase; WHR- omjer struk-bokovi; SBP- sistolički krvni tlak; DBP- dijastolički krvni tlak; MAP- srednji arterijski tlak; hsCRP- visoko osjetljivi C reaktivni protein.

* označava statistički značajnu razliku (p<0.05), pri čemu p^a predstavlja razliku prije i nakon unutar skupine (Kontrolna ili Nutri4) - upareni t-test; p^b razlika između nakon Kontrolna usporedno sa nakon Nutri4 grupa – analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja

5.3. Koncentracija selena, vitamina E i luteina u serumu te serumski profil masnih kiselina

Iz dobivenih serumskih uzoraka ispitanika mjerena je koncentracija ukupno 37 slobodnih masnih kiselina, a u Tablici 5.2. prikazane su samo one čije su koncentracije bile iznad razine kvantifikacije. Serumska koncentracija cis-4,7,10,13,16,19-dokoheksaenske kiseline (DHA) značajno je porasla, a koncentracija palmitinske kiseline (C16:0) značajno smanjena nakon konzumacije obogaćenih jaja u usporedbi s početnim mjerenjem unutar Nutri4 grupe. Serumske koncentracije drugih izmjerenih slobodnih masnih kiselina bile su slične prije i nakon odgovarajućeg prehrambenog protokola unutar Nutri4 skupine. Ukupno gledajući konzumacija Nutri4 jaja značajno je smanjila omjer n-6/n-3 u serumu za približno 36%. Serumske koncentracije izmjerenih slobodnih masnih kiselina, kao i omjer n6/n3 ostali su nepromijenjeni (smanjenje od 12%) nakon redovite konzumacije običnih kokošnjih jaja u usporedbi s osnovnim mjerenjima unutar kontrolne skupine. Također koncentracija C15:0 pentadecilne i C16:0 palmitinske kiseline u serumu, kao i ukupni omjer n6/n3 nakon završetka dijetetskog protokola bili su značajno niži u skupini koja je konzumirala Nutri4 jaja nego u kontrolnoj skupini (Tablica 5.2.).

Tablica 5.2. Utjecaj konzumacije običnih (Kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om, selenom, luteinom i vitaminom E na serumski profil masnih kiselina kod profesionalnih sportaša.

Parametar	Kontrola			Nutri4				
	Prije	Nakon	p ^a	Prije	Nakon	p ^a	p ^b	
SFA (μmol/L)								
	C8:0 Kaprilna kiselina	N/F	96,9	NA	29,50	63,8 (34,8)	0,213	0,488
	C12:0 Laurinska kiselina	27,2	38,8 (8.6)	0,412	36,7 (21,8)	51,2 (34,0)	0,422	0,295
	C14:0 Miristinska kiselina	79,8 (33,1)	106,6 (30.8)	0,211	21,6 (23,7)	70,7 (34,7)	0,103	0,855
	C15:0 Pentadecilna kiselina	17,8 (6,3)	21,0 (2.7)	0,422	17,8 (2,2)	16,7 (2,9)	0,753	0,009*
	C16:0 Palmitinska kiselina	1701 (330)	1873 (188)	0,611	1811 (131)	1634 (185)	0,025*	0,022*
	C17:0 Margarinska kiselina	21,5 (5,0)	23,0 (1,9)	0,715	23,0 (2,4)	20,7 (3,6)	0,622	0,355
	C18:0 Stearinska kiselina	809 (117)	802 (73)	0,912	817 (94)	772 (90)	0,714	0,537
PUFA (μmol/L)								
n-5	C14:1[cis-9] Miristoleinska kiselina	<LOQ	11.07	NA	<LOQ	11.26	NA	NA
n-7	C16:1[cis-9] Palmitoleinska kiselina	87,8 (36,4)	159,3 (106,1)	0,111	84,7 (27,5)	70,2 (16,9)	0,433	0,095
	C17:1[cis-10] cis-10-heptadecenska kiselina	23,0 (7,8)	20,4 (6,4)	0,675	22,5 (8,0)	20,0 (2,9)	0,722	0,771
n-9	C18:1[trans-9] Elaidinska kiselina	1022 (308)	1167	0,713	941 (51)	697	0,355	0,325
	C18:1[cis-9] Oleinska kiselina	611 (596)	1115 (694)	0,115	495 (623)	1047 (497)	0,097	0,922
	C20:1[cis-11] 11-Eikosenska kiselina	15,7 (3,3)	16,5 (3,2)	0,835	16,4 (2,0)	14,7 (2,6)	0,711	0,731
	C24:1[cis-15] Nervonska kiselina	6,5	8,09 (0,98)	0,355	6,9	<LOQ	NA	NA

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost aritmetičke sredine (standardna devijacija). < LOQ – ispod limita kvantifikacije; N/D – nije detektirano (engl. *Not Found*).

* označava statistički značajnu razliku (p<0.05), pri čemu p^a predstavlja razliku prije i nakon unutar skupine (Kontrolna ili Nutri4) - upareni t-test; p^b razlika između nakon Kontrolna usporedno sa nakon Nutri4 grupa – analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja

Nastavak tablice 5.2.

Parametar	Kontrola			Nutri4				
	Prije	Nakon	p ^a	Prije	Nakon	p ^a	p ^b	
n-6	C18:2[cis-9,12] Linolna kiselina	1696 (344)	1921 (491)	0,463	1882 (543)	1969 (487)	0,265	0,833
	C18:3[cis-6,9,12] gama-linolenska kiselina	31,3 (5,9)	46,7 (23,6)	0,577	33,2 (16,5)	28,4 (8,8)	0,711	0,075
	C21:2[cis-11,14] Eikosadeinska kiselina	15,7 (3,3)	16,5 (3,2)	0,721	16,4 (2,0)	14,7 (2,6)	0,388	0,512
	C20:3[cis-8,11,14] Dihomogama-linolenska kiselina	94,3 (37,1)	136,9 (92,3)	0,411	107,6 (30,4)	90,5 (27,1)	0,901	0,100
	C20:4[cis-5,8,11,14] Arahidonska kiselina	539 (68)	600 (104)	0,225	578 (54)	538 (89)	0,871	0,221
n-3	C18:3[cis-9,12,15] Alfa-linolenska kiselina	21,0 (9,9)	24,1 (3,6)	0,215	18,1 (4,2)	23,0 (5,9)	0,097	0,751
	C20:4[cis-5,8,11,14] Eikoza-5,8,11,14,17-penaenska kiselina	22,6 (3,8)	28,4 (2,4)	0,157	20,4 (4,3)	22,1 (5,1)	0,422	0,110
	C22:6[cis-4,7,10,13,16,19] cis-4,7,10,13,16,19-dokoahesaenska kiselina	111 (90)	207 (82)	0,088	108 (33)	185 (87)	0,010*	0,621
	n6 / n3 PUFAs	25,2 (19,4)	22,1 (22,3)	0,325	19,5 (9,3)	12,4 (3,2)	<0,001*	<0,001*

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost aritmetičke sredine (standardna devijacija). < LOQ – ispod limita kvantifikacije; N/D – nije detektirano (engl. *Not Found*).

* označava statistički značajnu razliku ($p < 0.05$), pri čemu p^a predstavlja razliku prije i nakon unutar skupine (Kontrolna ili Nutri4) - upareni t-test; p^b razlika između nakon Kontrolna usporedno sa nakon Nutri4 grupa – analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja

Serumske koncentracije selena i vitamina E značajno su porasle nakon dijetetskog protokola u Nutri4 skupini, dok su u kontrolnoj skupini koncentracije ostale nepromijenjene. Također, vrijednosti serumske koncentracije selena i vitamina E nakon dijetetskog protokola značajno su više u Nutri4 skupini usporedno sa kontrolnom skupinom. Serumska koncentracija luteina nije se značajno mijenjala nakon dijetetskog protokola niti u jednoj od skupina ispitanika (Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Utjecaj konzumacije normalnih (Kontrolna skupina) i kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, selenom, luteinom i vitaminom E na serumske koncentracije selen, luteina i vitamina E kod profesionalnih sportaša.

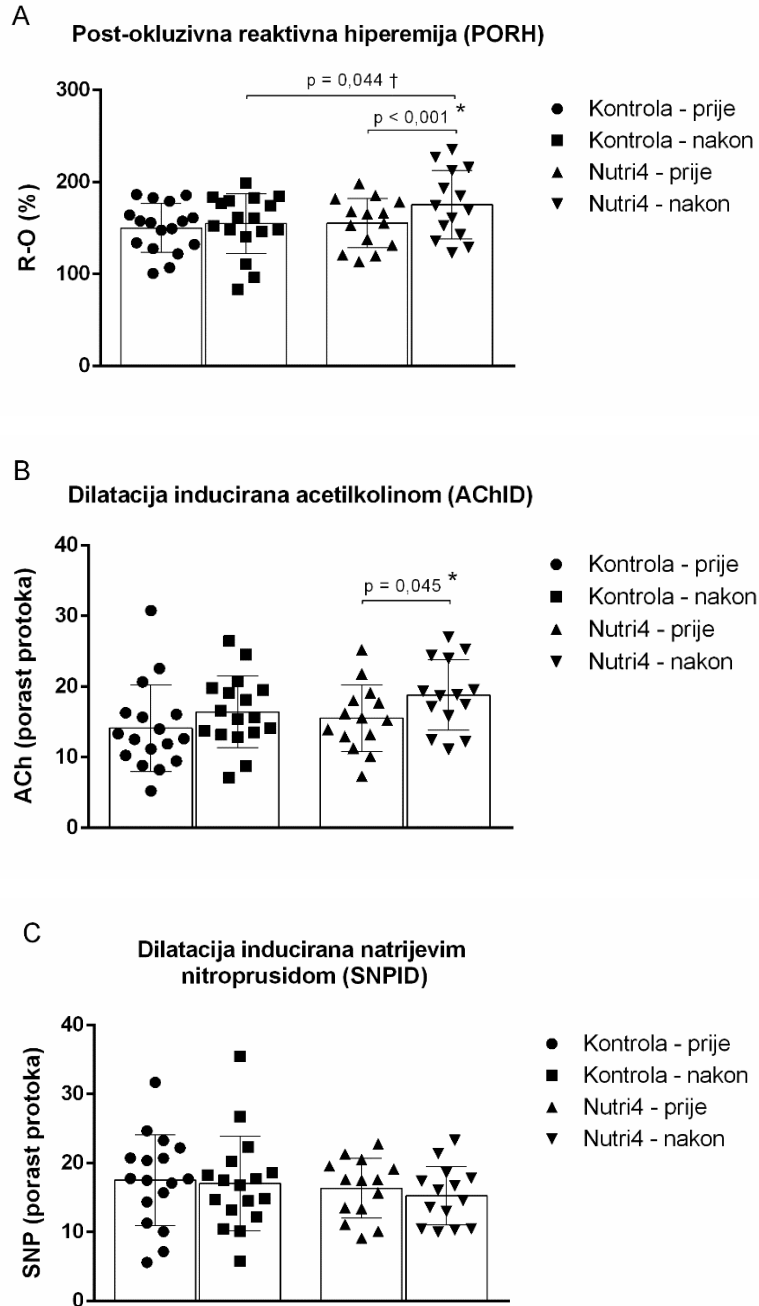
Parametar	Kontrola (N=17)			Nutri4 (N=14)			p ^b
	Prije	Nakon	p ^a	Prije	Nakon	p ^a	
Selen (µg/L)	74,5 (13,9)	70,1 (8,2)	0,105	76,2 (15,0)	89,3 (9,3)	0,009*	0,001*
Vitamin E (µg/ml)	7,03 (4,15)	7,07 (4,30)	0,650	7,58 (7,8)	10,70 (5,27)	<0,001*	0,048*
Lutein (µmol/L)	0,089 (0,027)	0,105 (0,061)	0,163	0,110 (0,0409)	0,088 (0,038)	0,261	0,355

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost aritmetičke sredine (standardna devijacija). N- ispitanika

* označava statistički značajnu razliku (p<0.05), pri čemu p^a predstavlja razliku prije i nakon unutar skupine (Kontrolna ili Nutri4) - upareni t-test; p^b razlika između nakon Kontrolna usporedno sa nakon Nutri4 grupa – analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja

5.4 Endotel-ovisna i endotel-neovisna vazodilatacija mikrocirkulacije kože podlaktice

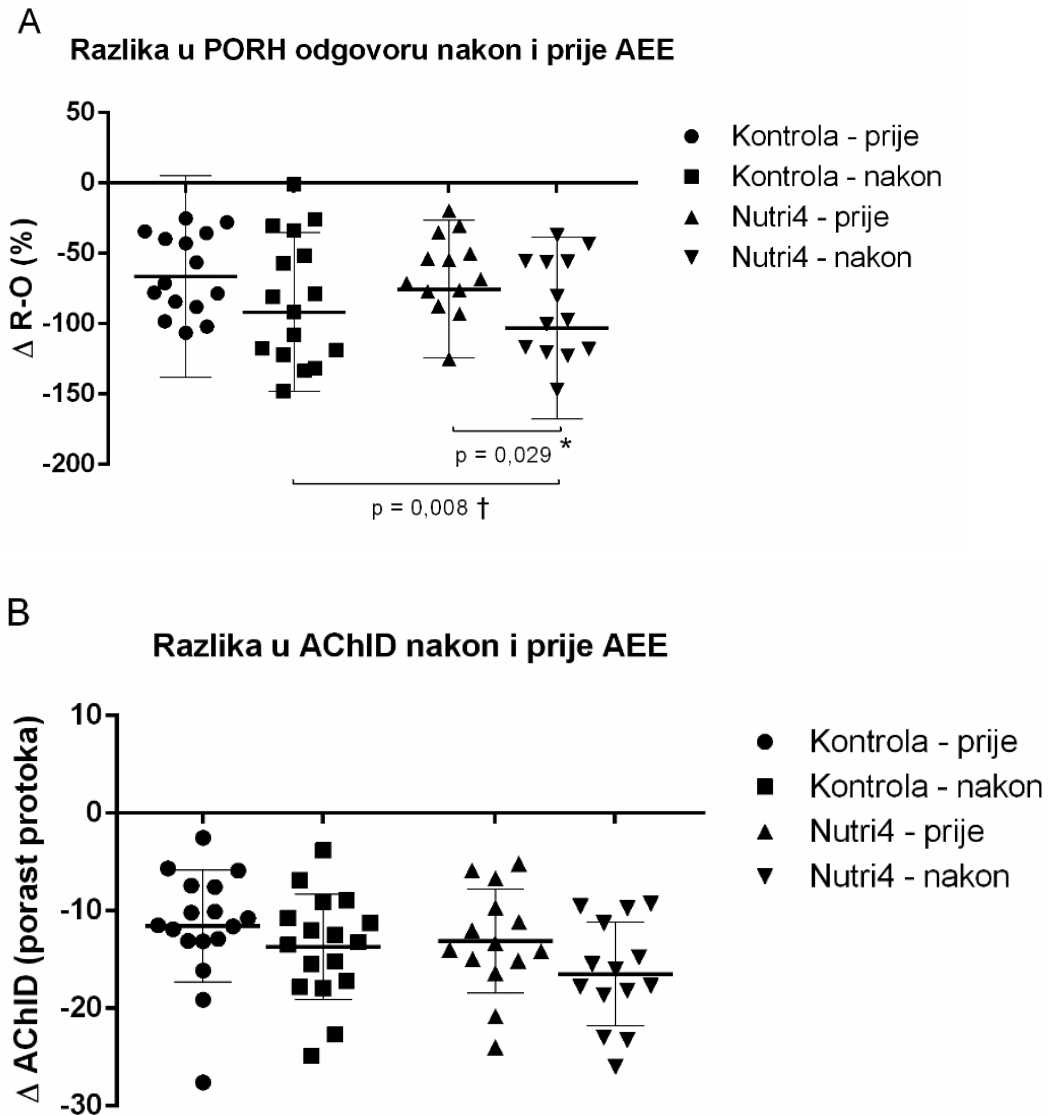
Usporedno s bazalnim mjerenjima, nakon konzumacije obogaćenih kokošnjih jaja postokluzivna reaktivna hiperemija (PORH) (Slika 5.1.A) i dilatacija inducirana acetilkolinom (AChID) (Slika 5.1.B) u koži podlaktice značajno su poboljšane. U kontrolnoj grupi, konzumacija običnih jaja nije potakla nikakve značajne promjene u PORH ili AChID usporedno s bazalnim vrijednostima. Nakon navedenog prehranbenog protokola PORH je također značajno poboljšan u skupini Nutri4 u usporedbi s kontrolnom grupom (prilagođeno osnovnoj vrijednosti). SNP-inducirana dilatacija (SNPID) nije bila značajno pod utjecajem konzumacije obogaćenih niti običnih kokošnjih jaja, baš kao što se nije razlikovala između Nutri4 skupine i kontrolne skupine nakon odgovarajućeg prehranbenog protokola (prilagođeno osnovnoj vrijednosti) (Slika 5.1.C).



Slika 5.1. Utjecaj konzumacije običnih (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom 3 tjedna na mikrovaskularnu reaktivnost kože te endotel ovisnu i endotel neovisnu vazodilataciju kod profesionalnih sportaša. (A) Postokluzivna reaktivna hiperemija, (B) Dilatacija inducirana acetilkolinom (AChID) i (C) dilatacija natrijevim nitroprusidom (SNPID). Mjerenje PORH izražava se kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na početnu vrijednost (R-O%). AChID i SNPID izražavaju se kao povećanje protoka nakon primjene ACh ili SNP u usporedbi s osnovnim protokom. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD) sa pojedinačnim mjerenjima. Kontrolna skupina N = 17, Nutri4 N= 14. *p < 0.05 prije vs. nakon unutar Nutri4 skupine (upareni t-test), † P<0.05 kontrolna skupina nakon vs. Nutri4 skupina nakon analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja.

5.5 Akutni iscrpljujući trening i raspon mikrovaskularne reakcije (Δ PORH)

Konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja značajno je povećala raspon mikrovaskularne reakcije na akutni iscrpljujući trening Δ PORH (Slika 5.2.A), dok se Δ AChID reakcija na akutni iscrpljujući trening (Slika 5.2.B) nije značajno mijenjala usporedno sa bazalnim mjerenjem u Nutri4 grupi ispitanika. U kontrolnoj skupini nisu primijećene značajne promjene niti u Δ PORH (Slika 2A), niti u Δ AChID (Slika 5.2.B) nakon dijetetskog protokola. Povećanje Δ PORH, ali ne i Δ AChID, bilo je značajno veće u skupini Nutri4 u usporedbi s kontrolama nakon odgovarajućeg prehrambenog protokola (prilagođeno osnovnoj vrijednosti).

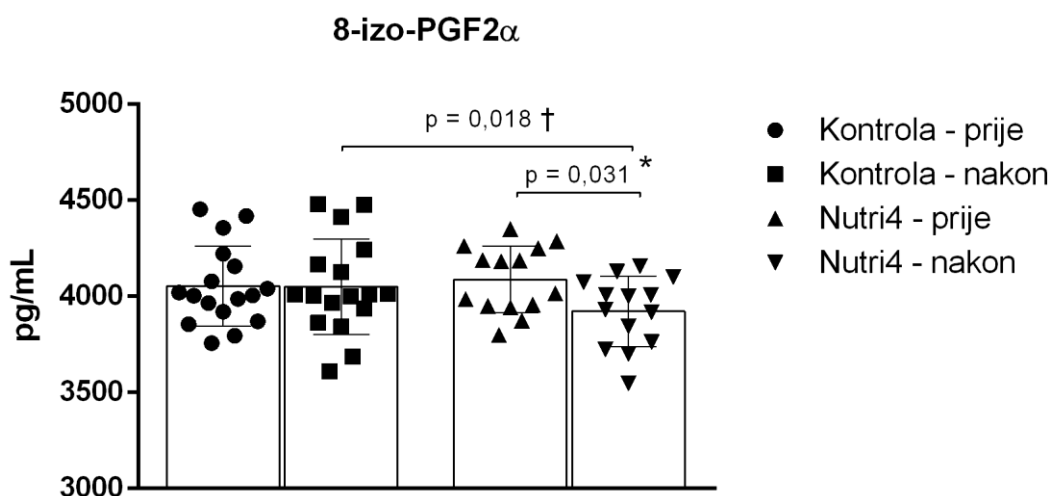


Slika 5.2. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom tri tjedna na raspon mikrovaskularne reakcije kože nakon akutnog iscrpljujućeg treninga (AEE) kod profesionalnih sportaša. A) Razlika u PORH odgovoru nakon i prije AEE, $\Delta PORH = PORH$ nakon AEE – $PORH$ prije AEE; i (B) Razlika u AChID nakon i prije AEE, $\Delta AChID = AChID$ nakon AEE – $AChID$ prije AEE. Mjerenje PORH izražava se kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na početnu vrijednost (R-O%), a $\Delta PORH$ predstavlja razliku u vrijednosti PORH izmjerenoj neposredno nakon (post-) i prije (pre-) akutnog iscrpljujućeg vježbanja (AEE). AChID se izražava kao povećanje protoka nakon primjene ACh u usporedbi s osnovnim protokom, a $\Delta AChID$ predstavlja razliku u vrijednosti AChID izmjerenoj neposredno nakon (post) i prije (prije) akutnog iscrpljujućeg vježbanja (AEE). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD) sa pojedinačnim mjerenjima. PORH- post okluzivna reaktivna hiperemija; AChID- acetilkolinom inducirana dilatacija; AEE- akutni iscrpljujući trening. Kontrolna skupina N = 17, Nutri4 N= 14. * $p < 0.05$ prije vs. nakon unutar Nutri4 skupine (upareni t-test), † $P < 0.05$ kontrolna skupina nakon vs. Nutri4 skupina nakon analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja.

5.6 Aktivnost antioksidativnih enzima, serumska koncentracija 8-izo prostaglandina F 2 α (8-izo-PGF2 α) i serumska aktivnost i koncentracija mijeloperoksidaze (MPO)

Aktivnost serumskih antioksidativnih enzima (CAT, GPx i SOD) u kontrolnoj i Nutri4 skupini prije i nakon odgovarajućeg protokola prikazana je u Tablici 5.4. Serumska aktivnost CAT, GPX i SOD, kao ni aktivnost odgovarajućih enzima u serumu nije značajno promijenjena nakon bilo kojeg od dijetnih protokola.

Koncentracija serumskog proteina 8-izo prostaglandina F2 α (8-izo-PGF2 α) značajno se smanjila nakon tro tjednog protokola u Nutri4 skupini, dok je u kontrolnoj skupini ostala nepromijenjena (Slika 5.3.). Također, koncentracija 8-izo-PGF2 α u serumu proteina bila je značajno smanjena u skupini Nutri4 u usporedbi s kontrolama nakon odgovarajućeg prehrambenog protokola (prilagođeno osnovnoj vrijednosti) (Slika 5.3.).



Slika 5.3. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih OMEGA-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom tri tjedna na koncentraciju serumskog proteina 8-izo prostaglandina F 2 α (8-izo-PGF2 α) kod profesionalnih sportaša. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD) sa pojedinačnim mjerenjima. Kontrolna skupina N = 17, Nutri4 N= 14. *p < 0.05 prije vs. nakon unutar Nutri4 skupine (upareni t-test). † P<0.05 kontrolna skupina nakon vs. Nutri4 skupina nakon analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja.

Tablica 5.4. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 PUFA, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) na aktivnost antioksidativnih enzima

Parametar	Kontrola (N=17)			Nutri4 (N=14)			
	Prije	Nakon	p ^a	Prije	Nakon	p ^a	p ^b
CAT (U/mg protein)	3,185 (0,758)	3,078 (0,808)	0,681	2,440 (0,826)	2,510 (0,725)	0,823	0,289
GPx (U/mg protein)	0,007 (0,004)	0,011 (0,006)	0,088	0,013 (0,007)	0,010 (0,003)	0,246	0,756
SOD (U/mg protein)	9,811 (1,109)	10,061 (0,599)	0,426	9,562 (0,980)	10,279 (0,884)	0,061	0,643

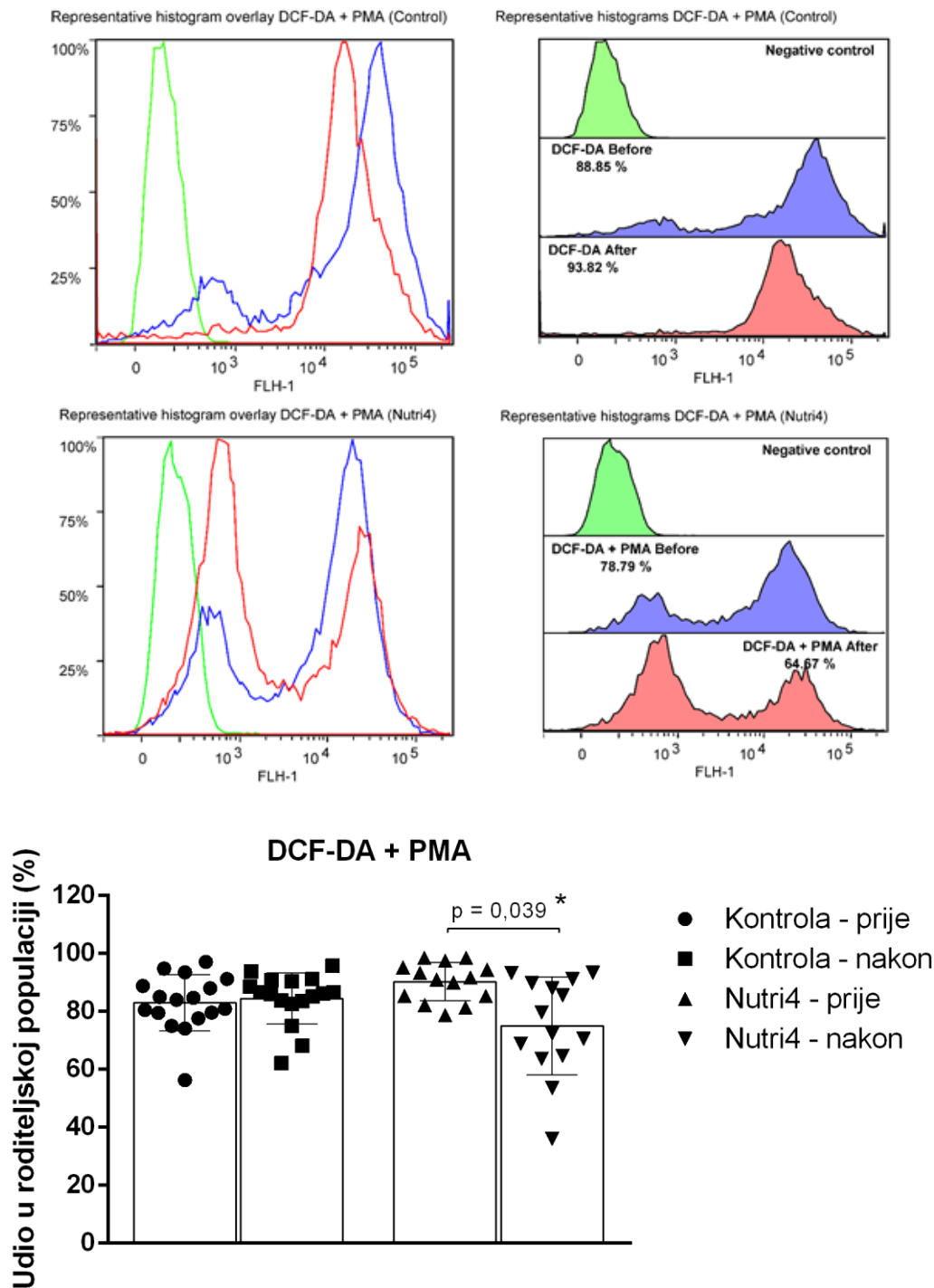
Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost aritmetičke sredine (standardna devijacija). CAT- katalaza; GPx- glutation peroksidaza; SOD- superoksid dismutaza.

* označava statistički značajnu razliku ($p < 0.05$), pri čemu p^a predstavlja razliku prije i nakon unutar skupine (Kontrolna ili Nutri4) - upareni t-test; p^b razlika između nakon Kontrolna usporedno sa nakon Nutri4 grupa – analiza kovarijance (ANCOVA) prilagođena vrijednosti početnog mjerenja

Koncentracija proteina mijeloperoksidaze (MPO) u serumu (MPO pg/mL: kontrola prije 9719 ± 8623 u odnosu na nakon 12019 ± 8316 , $p = 0,233$; Nutri4 prije 6940 ± 5514 u odnosu na nakon 11293 ± 8973 , $p = 0,199$) i aktivnost enzima MPO u serumu (MPO pmol/mL kontrola prije $0,200 \pm 0,174$ naspram poslije $0,201$ naspram $0,205$, $p = 0,971$; Nutri4 prije $0,205 \pm 0,127$ naspram poslije $0,131 \pm 0,089$, $p = 0,086$) ostali su nepromijenjeni prije i poslije navedenog prehrambenog protokola u kontrolnoj i Nutri4 skupini. Slično tome, koncentracija MPO proteina u serumu i aktivnost enzima u serumu nisu se razlikovale između Nutri4 i kontrolne skupine nakon navedenog prehrambenog protokola (prilagođeno osnovnoj vrijednosti).

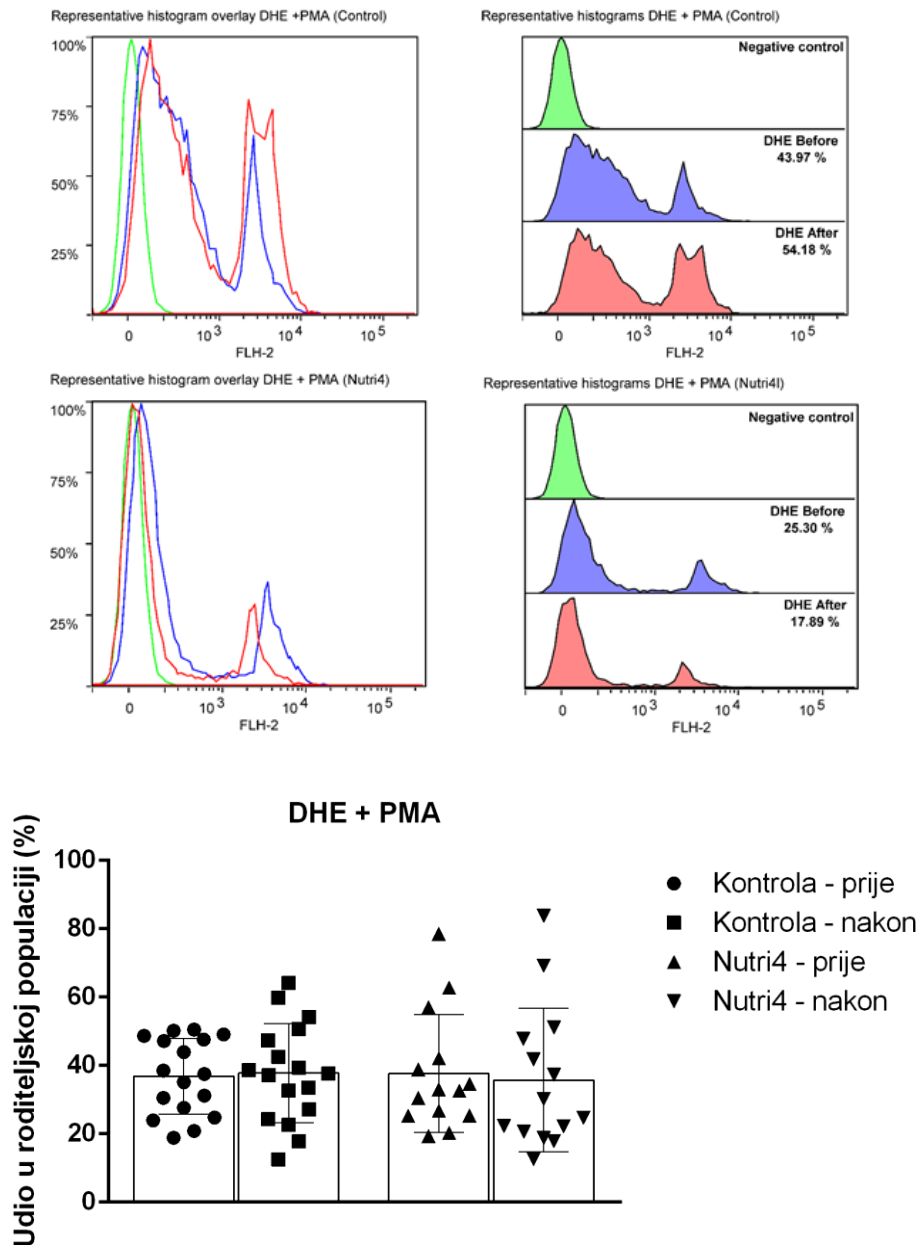
5.7. Stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita i superoksida u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC)

Konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja značajno je smanjila stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC). Konzumacija običnih kokošnjih jaja nije imala značajan učinak na stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita u PBMC (Slika 5.4.).



Slika 5.4. Utjecaj konzumacije običnih kokošjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom tri tjedna na stvaranje vodikovog peroksida i peroksinitrita (DCF-DA) u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC) kod profesionalnih sportaša. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD) sa pojedinačnim mjerenjima. Kontrolna skupina N = 17, Nutri4 N= 14. * $p < 0.05$ prije vs. nakon unutar Nutri4 skupine (upareni t-test).

Dijetetski protokol u obje skupine nije imao nikakav značajan učinak na stvaranje superoksida u PBMC-ima kod profesionalnih sportaša (Slika 5.5.), niti se razlikuje između skupina nakon prehrambenog protokola (prilagođen za početnu vrijednost).



Slika 5.5. Utjecaj konzumacije običnih kokošnjih jaja (Kontrolna skupina) i jaja obogaćenih OMEGA-3 polinezasićenim masnim kiselinama, selenom, luteinom i vitaminom E (Nutri4 grupa) tijekom tri tjedna na stvaranje superoksida (DHE) u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC) kod profesionalnih sportaša. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD) sa pojedinačnim mjerenjima. Kontrolna skupina N = 17, Nutri4 N= 14.

6. RASPRAVA

Ova randomizirana intervencijska studija prva je koja istražuje utjecaj kombinirane suplementacije s četiri različita mikronutrijenta (n-3 PUFA, selen, lutein i vitamin E) u formi funkcionalne hrane na endotelnu funkciju te oksidativni stres kao i utjecaj istih na sposobnost mikrovaskulature u prilagodbi na akutni iscrpljujući trening u populaciji profesionalnih sportaša. Najznačajniji nalaz ove studije je značajno poboljšanje vazodilatacije ovisne o endotelu u mikrocirkulaciji kože podlaktice nakon konzumacije Nutri4 jaja tijekom 3 tjedna. Također, adaptacija mikrožilja kože podlaktice na akutni iscrpljujući trening se poboljšala nakon konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja. Osim vaskularnih promjena, važan nalaz ove studije je i smanjenje koncentracije 8-isoPGF_{2α} u serumu kao i smanjenje stvaranja vodikovog peroksida i peroksinitrita u PBMC-ima što ukazuje na smanjenje razine oksidativnog stresa nakon konzumacije Nutri-4 jaja kod profesionalnih sportaša. Uz sve to vrlo važna činjenica koju je pokazala ova studija je da, iako je konzumacija Nutri4 jaja rezultirala povećanjem koncentracije hranjivih tvari (n-3 PUFA, selen i vitamin E) u serumu, lipidni profil u serumu i krvni tlak ostali su unutar referentnog raspona, a također nisu zabilježeni nikakvi štetni učinci unatoč konzumaciji relativno velike količine kokošnjih jaja. Ovakvi rezultati u skladu su s prethodnim studijama naše istraživačke skupine te podupiru zaključak da se jaja mogu sigurno konzumirati, osobito u mladoj, nutritivno zahtjevnoj populaciji poput sportaša.

6.1. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na hemodinamske i biokemijske parametre te lipidni profil sportaša

Povoljni učinci vježbanja na kardiovaskularno zdravlje danas su opće poznati, kao i da je vježbanje protektivni čimbenik kod CV-ih bolesti. Impresivan broj intervencijskih studija proveden je u svrhu istraživanja učinka redovitog vježbanja na tradicionalne kardiovaskularne čimbenike rizika, kao što su krvni tlak, razina lipida u krvi i sl. u populaciji kardiovaskularnih bolesnika, ali i u populaciji zdravih ispitanika. Dokazi iz brojnih provedenih studija dovode u direktnu vezu redovito vježbanje i snižene vrijednosti krvnoga tlaka i u zdravoj populaciji. Cornelissen i suradnici proveli su opsežnu meta-analizu na ukupno 5223 zdrava ispitanika od kojih su 3401 redovito vježbali, a 1822 su kontrolni ispitanici gdje su proučavali utjecaj treninga izdržljivosti, treninga dinamičkog otpora te treninga izometrijskog otpora na promjene krvnog tlaka. Rezultati analize ukupno 93 studije pokazali su da redoviti treninzi izdržljivosti,

dinamičkog otpora, ali i treninzi izometrijskog otpora snižavaju SBP i DBP (166). Osim pozitivnog učinka redovitog vježbanja na tlak, danas je dobro poznat i istražen učinak n-3 polinezasićenih masnih kiselina. Tako se u velikoj meta-analizi provedenoj od strane Zhanga i suradnika istraživao o dozi ovisan učinak n-3 PUFA-e (tj. dokozaheksaenoičnu kiselinu i eikosapentaensku kiselinu) na promjene krvnog tlaka. U svoju meta-analizu uključivali su studije objavljene prije svibnja 2021 sa ispitanicima starijima od 18 godina te koje su proučavale interakciju između n-3 PUFA te krvnog tlaka. Meta-analizom je uključeno ukupno 4973 ispitanika iz 71 različite studije. Analizom rezultata došli su do zaključka kako je optimalna doza dnevnog unosa n-3 PUFA-e 2-3 grama te takva doza značajno snižava krvni tlak, sistolički i dijastolički. Doze veće od 3 grama na dan mogle bi imati dodatan benefit u snižavanju krvnog tlaka kod bolesnika sa visokim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (167). Još jedna studija, provedena od strane Jaina i suradnika u svojim rezultatima pokazala je blago sniženje krvnoga tlaka nakon suplementacije s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (168). Osim njih Bucher i suradnici su napravili pregled literature u kojem je uključeno 11 velikih studija vezanih za kardiovaskularne rizike sa ukupno 7951 ispitanikom u intervencijskoj te 7855 ispitanikom u kontrolnoj skupini. Analizom rezultata svih studija došli su do zaključka kako konzumacija n-3 PUFA može poboljšati vrijednosti krvnog tlaka, ali i srčanu frekvenciju te lipidni profil pojedinca, a samim time smanjiti i rizik od bolesti koronarnih arterija, srčanog udara te iznenadne smrti (169). Nadalje, postoje i brojne studije o učincima vitamina E te drugih karotenoida na zdravlje kardiovaskularnog sustava u cijelosti, a između ostalog i o utjecaju na krvni tlak. Tako su u svojoj studiji Gammone i suradnici istraživali utjecaj karotena na kardiovaskularne rizike te pokazali da karoteni između ostalog mogu imati korisne učinke na krvni tlak te kroz taj i druge učinke poput reduciranja oksidativnog stresa sniziti i rizik od razvoja bolesti koronarnih arterija i moždanog udara (170).

Svi ispitanici u okviru našeg znanstvenog istraživanja bili su normotenzivni na početku provedbe dijetetskog protokola u obje eksperimentalne skupine. Analiza hemodinamskih parametara, uključujući vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka i dijastoličkog arterijskog tlaka nije ukazivala na statistički značajne promjene niti u Nutri4 skupini niti u kontrolnoj skupini po završetku dijetetskog protokola. Ipak, zapaženo je statistički značajno smanjenje srednjeg arterijskog tlaka u Nutri4 skupini nakon dijetetskog protokola. Ovaj rezultat je unatoč ograničenju ovog istraživanja u smislu kratkog trajanje intervencije od samo tri tjedna u skladu sa prethodno navedenim studijama koje su imale duže vrijeme trajanja te u tom periodu promatrali učinak navedenih suplemenata na krvni tlak.

Parametri krvne slike mjereni u studiji (eritrociti, leukociti, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, trombociti i MPV) bili su unutar referentnih vrijednosti kod obje skupine sportaša na početku protokola. Po završetku tro tjednog dijetetskog protokola nije bilo značajnih razlika u izmjenjenim parametrima krvne slike između ispitivanih skupina. U našoj studiji nije bilo značajne razlike niti između vrijednosti biokemijskih parametara (urea, kreatinin, kalcij, željezo, glukoza) nakon dijetetskog protokola niti u jednoj od skupina ispitanika. Međutim, uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji natrija i kalija nakon dijetetskog režima. Odnosno, razina natrija u kontrolnoj skupini bila je značajno viša, a razina kalija u Nutri4 skupini značajno niža nakon dijetetskog protokola. U prethodnoj studiji naše istraživačke skupine na zdravim mladim ispitanicima također nije bilo značajnih promjena u biokemijskim parametrima i krvnoj slici nakon konzumacije nutritivno obogaćenih kokošnjih niti nakon konzumacije običnih kokošnjih jaja, odnosno u niti jednoj od skupina ispitanika uključenih u studiju (154).

Osim učinka na krvni tlak, brojne studije bavile su se učinkom redovite tjelesne aktivnosti na poboljšanje razine lipida u krvi kod zdravih, ali i pretilih osoba. Gordoni suradnici su u svom preglednom članku iz navedenih studija došli do zaključka kako brojne studije pokazuju da dugotrajna aerobna aktivnost kombinirana sa gubitkom tjelesne mase značajno reducira kolesterol, LDL te triglicerida dok poboljšava HDL. Osim aerobne tjelesne aktivnosti i treninzi otpora također su pokazali sniženje non-HDL kolesterola, čak neovisno o gubitku tjelesne mase. Nadalje, Kraus i suradnici su u svojoj perspektivnoj randomiziranoj studiji na ukupno 111 pretilih sedentarnih ispitanika istraživali utjecaj količine i intenziteta tjelesne aktivnosti na lipoproteine. Ispitanici su bili podijeljeni u kontrolnu i nekoliko različitih intervencijskih skupina ovisno o količini i intenzitetu vježbe u visoko-količinsku-visoko-intenzivnu, nisko-količinsku-visoko-intenzivnu, nisko-količinsku-srednje-intenzivnu skupinu koji su se kroz period od osam mjeseci pridržavali plana i programa tjelovježbe ali bez značajnog učinka na tjelesnu masu. Rezultati studije pokazali su brojne benefite vježbanja na različite lipide i lipoproteine, a učinak je bio najznačajniji u skupini koja je imala veću količinu treninga koji su bili visokog intenziteta. Stoga, usporedno sa rezultatima ostalih skupina zaključili su kako je velika količina tjedne tjelovježbe sa minimalnim promjenama tjelesne težine imala povoljan učinak na lipidogram ispitanika te da je to poboljšanje povezano sa količinom aktivnosti a ne intenzitetom iste. (171,172). Takav pozitivan učinak vježbanja promatran je i na razine triglicerida koje su sniženi samo pod utjecajem redovitog intenzivnijeg vježbanja. Stupin i suradnici pokazali su da su profesionalni veslači usporedno sa sedentarnim ispitanicima imali

značajno nižu razinu triglicerida i apoB, ali i višu razinu HDL kolesterola u krvi. Osim vježbanja n-3 PUFA ima mogućnost za smanjenje serumskih lipida kod osoba s hiperlipidemijom. Naime u preglednom članku Leslie i suradnici su se fokusirali na normolipemične do granično lipemične, ali inače zdrave ispitanike, jer prema istraživanjima American Heart Association-a oni čine velik udio u općoj populaciji. U analizu su uključili ukupno 38 kliničkih intervencijskih studija sa ukupno 2270 ispitanika. Analizom su došli do zaključka kako visoke doze od > 4g/dan hrane obogaćene n-3 PUFA smanjuju razinu triglicerida u serumu za 9 - 26 %, dok je smanjenje rizika od 4-51% nađeno u studijama u kojima su ispitanici unosili 1-5g/dan n-3 PUFA-e putem obogaćene hrane. (173). U ovoj studiji konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, selenom, luteinom i vitaminom E nije imala značajan učinak na lipidni profil sportaša, ali nije ni imala negativan utjecaj na isti obzirom da je konzumirana veća količina kokošnjih jaja. Razlog izostanka pozitivnog učinka na lipidni profil može biti relativno kratko vrijeme konzumacije obogaćenih jaja, kao i nešto niže doze, u usporedbi s prethodno navedenim istraživanjima u analizi.

6.2. Promjena koncentracija n-3 PUFA, luteina, selena i vitamina E nakon konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja, suplementi i prehrana sportaša

Funkcionalno obogaćena jaja koja su konzumirali ispitanici Nutri4 skupine u ovom istraživanju imali su značajno više koncentracije ciljnih mikronutrijenata u odnosu na obična kokošja jaja i to n-3 PUFA-e (134,2 %), selena (27,8 %), vitamina E (84,5 %) i luteina (460 %) (152). Konzumiranjem navedenih jaja kroz tri tjedna prema ranije utvrđenom protokolu zabilježen je porast koncentracija vitamina E za 41,2 % u serumu ispitanika koji su konzumirali funkcionalno obogaćena jaja, dok se koncentracija istog u kontrolnoj skupini gotovo i nije mijenjala. S obzirom na izrazitu razliku između skupina može se zaključiti da konzumacija jaja obogaćenih između ostalog i vitaminom E dovodi do porasta njegove koncentracije u serumu ispitanika. Konzumacijom obogaćenih jaja, ispitanici Nutri4 skupine unosili su samo putem navedenih jaja 22,9 % dnevnih potreba organizma za vitaminom E. Za razliku od vitamina E, konzumacijom funkcionalno obogaćenih jaja ispitanici su unosili 125,5 % dnevnih potreba selena, ali budući da je protokol trajao samo tri tjedna, smatra se da takav kratkotrajni unos nije mogao negativno utjecati na zdravlje ispitanika. Po završetku protokola zabilježen je porast koncentracije selena u krvi ispitanika Nutri4 skupine od 17,2 %, dok nije bilo značajne promjene kod ispitanika kontrolne skupine. Koncentracija luteina u serumu ispitanika iz obje skupine nije pokazala

statistički značajne promjene nakon konzumacije jaja. Zanimljivo je napomenuti da je primijećeno povećanje koncentracije luteina, a to povećanje bilo je čak izraženije u kontrolnoj skupini u usporedbi s Nutri4 skupinom, iako je postotak luteina u obogaćenim jajima izmjeren gotovo šest puta veći nego u običnim kokošnjim jajima. Izostanak statistički značajnijeg povećanja može se objasniti relativno niskim dnevnim unosom luteina u našem istraživanju, gdje je dnevni unos luteina putem konzumacije obogaćenih jaja iznosio 1,8 mg. Odnosno, prema nekim izvorima, prosječan dnevni unos luteina u odraslih osoba kreće se oko 1 - 2 mg, a pozitivan učinak može se očekivati tek kod unosa većih od 5 mg (174). Kada govorimo o polinezasićenim masnim kiselinama ukupno je mjerena koncentracija 37 masnih kiselina u serumu ispitanika. Konzumacija jaja obogaćenih između ostalog n-3 PUFA-ma je dovela do značajnog porasta koncentracije cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenske kiseline (DHA), a koncentracija palmitinske kiseline (C16:0) značajno je smanjena. Također, osim utjecaja na koncentracije pojedinih polinezasićenih masnih kiselina, dijetetski protokol u Nutri4 skupini doveo je do značajne redukcije n-6/n-3 omjera, odnosno, a otprilike 36 %, dok u kontrolnoj skupini ta redukcija nije bila značajna.

Slične rezultate u svom istraživanju na zdravim mladim sedentarnim ispitanicima opazili su Šušnjara i suradnici, odnosno konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA-om, luteinom, selenom i vitaminom E u njihovoj studiji dovela je također do porasta koncentracije vitamina E, luteina te omjera n-3/n-6 PUFA nakon tri tjedna u intervencijskoj skupini ispitanika, dok su navedeni učinci izostali u kontrolnoj skupini (154). Povišenje serumske koncentracije vitamina E kod zdravih pojedinaca u Irskoj nakon konzumacije suplemenata vitamina E pokazali su i Zhao i suradnici u svojoj studiji (175). Razvoj suplemenata vitamina E putem funkcionalne hrane istraživali su i Pandya i suradnici i to u formi praška za limunadu, jogurta, mlijeka, margarina i kruha te promatrali stabilnost njegove koncentracije u navedenim proizvodima. Pokazali su da je koncentracija vitamina E nepromijenjena u prahu za limunadu, jogurtu, margarinu i mlijeku, dok je u kruhu došlo do značajnog smanjenja koncentracije vitamina E tijekom skladištenja do konzumacije (176). Osim vitamina E, suplementacija selenom je također istraživana, tako su Hustad i suradnici radili sa selenom obogaćenih proteina lososa u obliku kapsula te utvrdili 10 % veću koncentraciju selena u serumu ispitanika. Kada je riječ o suplementaciji polinezasićenim masnim kiselinama velik broj istraživanja je proveden s istima te je pokazano kako suplementacija u raznim oblicima dovodi do povećanja razine n-3 PUFA. Zebrowska i suradnici su u svojoj studiji na 24 trkača procjenjivali utjecaj trodnevne suplementacije n-3 PUFA, a u svom istraživanju su dokazali porast n-3 PUFA-u serumu te

sniženje omjera n-6/n-3 PUFA (177). Iste rezultate pokazale su još brojne studije provedene na istu temu, ali istražujući različite učinke n-3PUFA-e (167,178,179). Rezultat je ovo koji je konzistentan sa rezultatima primijećenima u ranijim studijama naše istraživačke skupine sa nutritivno obogaćenim kokošjim jajima na zdravim mladim pojedincima, odnosno značajno povećanje serumskih koncentracija n-3 PUFA i promjena omjera n-6/n-3 PUFA zabilježeno je u intervencijskoj skupini, dok je isti učinak izostao u kontrolnoj skupini (154). Pokazano je kako se n-3 PUFA natječe sa n-6 PUFA za procese razgradnje te proizvodnje vazoprotektivnih metabolita kao npr. za proizvodnju medijatora proizvedenih aktivnošću COX enzima poput prostaglandina i drugih medijatora. U stanjima većeg omjera n-6/n-3 PUFA stvaraju se leukotrieni serije 4 (LTB₄), prostaglandini serije 2 (PGI₂) i tromboksani B serije 2 (TXB₂) s izraženim vazokonstriktijskim učincima, aktivacijskim djelovanjem na trombocite te s izraženim proupalnim potencijalom. Naprotiv, ako je omjer u korist n-3 PUFA, odnosno niži tada dominira proizvodnja leukotriena serije 5 (LTB₅), prostaglandina serije 3 (PGI₃) i tromboksana serije 3 (TXA₃) koji su primarno protuupalni i vazodilatacijski medijatori (180,181).

N-3 PUFA, selen, lutein i vitamin E u ovoj studiji ispitanicima smo davali u obliku jaja obogaćenima navedenim mikronutrijentima tj. u obliku funkcionalne hrane u populaciji sportaša. Kao što je ranije navedeno funkcionalna hrana se definira kao hrana koja je izgledom ista tradicionalnoj te koja je uključena u svakodnevnu prehranu opće populacije, ali osim svoje osnovne nutritivne vrijednosti ima dodatnu zdravstvenu korist. Upravo zbog toga se sve više studija provodi upravo na suplementaciji u obliku funkcionalne hrane, a ne u obliku tableta ili napitaka te su do sada dokazani brojni pozitivni učinci povezani sa zdravljem, uključujući smanjenje pretilosti, rizika od kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze kao i jačanja imunološkog sustava (95,96). Prethodno ovoj provedeno je nekoliko studija s funkcionalno obogaćenim jajima u kojima su postignute povišene koncentracije pojedinih mikronutrijenata i pozitivni učinci na ciljne sustave (106,154).

Ispitanici u studiji bili su profesionalni sportaši, osobe s inače vrlo visokom metaboličkom potrošnjom te su zbog toga pod velikim interesom nutricionista s ciljem postizanja balansirane i cjelovite prehrane. Obzirom na veliku kalorijsku potrošnju kao i nutritivne potrebe, sve veći fokus se stavlja na funkcionalnu hranu sličnu kokošjim jajima obogaćenim n-3 PUFA, luteinom, selenom i vitaminom E korištene u našoj studiji. Grubic i suradnici su razvili energetske pločice bez glukoze sa specifičnim omjerom proteina, vlakana i masti kojom su postigli povoljniji glikemijski i inzulinski odgovor. U ovoj studiji istraživali su učinak korištenja navedenih

energetskih pločica prije, za vrijeme te nakon intenzivne fizičke aktivnosti na održavanje normalne razine glukoze, fizički učinak te oporavak u odnosu na konzumaciju samih ugljikohidrata. Rezultati studije ukazuju na bolje održavanje potrebne razine performansi tijekom treninga te smanjilo bol u mišićima (108). Implementacija funkcionalne hrane u cjelokupnu prehranu sportaša je smjer u kojem danas idu brojna istraživanja kako bi se svi nutrijenti unosili što prirodnijim putem te što efikasnije uz uobičajene prehrambene namirnice sportaša.

6.3. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na mikrovaskularnu i endotelnu funkciju sportaša

Pozitivan učinak redovite fizičke aktivnosti na kardiovaskularno zdravlje te vaskularnu funkciju, kao što je ranije opisano je već dobro istražen i dokazan. Većina istraživanja provedena je na velikim provodnim arterijama (npr. brahijalnoj arteriji), ali sve veći broj istraživanja pokazalo je da redovito vježbanje putem poboljšanja dilatacije ovisne o endotelu, poboljšava i mikrovaskularnu reaktivnost u mikrocirkulaciji kože (182). Među prvim takvim studijama provedena je 1998. godine na elitnim sportašima (trkačima) od strane Kavernma i suradnika. Studija je provedena na ukupno 9 profesionalnih sportaša te 9 kontrolnih ispitanika te su kod profesionalnih sportaša opazili značajno bolji odgovor mikrocirkulacije kože podlaktice, mjeren LDF-om, na iontoforezu ACh od onoga mjenog kod ispitanika koji su svakodnevno amaterski trenirali (77). Sličnu studiju proveli su i Lenasi i Struel koji su istraživali djelovanje redovite tjelesne aktivnosti na ACh i SNP potaknutu vazodilataciju u mikrocirkulaciji dorzuma šake uz pomoć LDF-a u populaciji treniranih biciklista i njihovih sedentarnih kontrola. Njihovi rezultati također su pokazali značajno veći porast protoka induciranog ACh-om u populaciji biciklista u usporedbi sa sedentarnim kontrolama te su iz navedenih rezultata došli do zaključka kako oni indiciraju da redovita fizička aktivnost također modificira i vaskularnu reaktivnost (183). Wang i suradnici su osim utjecaja 8-tjednog treniranja na mikrovaskularnu i endotelnu funkciju mikrocirkulacije kože podlaktice istraživali i utjecaj prestanka treniranja na nju. U svojim rezultatima na zdravim mladim muškarcima demonstrirali su da učestali treninzi u razdoblju 8 tjedana značajno poboljšavaju mikrovaskularnu endotel-ovisnu, ali ne i endotel-neovisnu dilataciju. Ali isto tako da 8 tjedana naknadnog suzdržavanja od treninga u istoj skupini ispitanika je poništilo pozitivne promjene u reaktivnosti mikrocirkulacije nastale pod utjecajem treninga (78). Potencijalan mehanizam

kojim redovita fizička aktivnost poboljšava endotelnu funkciju može se kriti iza već dobro poznate uloge kože, odnosno njene cirkulacije / mikrocirkulacije, u radijaciji topline koja nastaje kao glavni nusproizvod povećanog metabolizma tijekom fizičke aktivnosti (184). Tijekom tjelovježbe dolazi do kožne hiperemije te posljedično promjene hemodinamskih sila, koje bi mogle biti odgovorne za vaskularnu prilagodbu. Naime, Green i suradnici demonstrirali su da stvarajući hiperemičke poticaje slične onima koje stvara i tjelovježba značajno poboljšava funkciju mikrovaskularne vazodilatacije u koži. Za detaljnije proučavanje mehanizama prilagodbe protok krvi je prekinut u jednoj ruci (ali ne i drugoj) postavljanjem manžete tlakomjera na proksimalni dio podlaktice što je dovelo do smanjenja hiperemije tijekom zagrijavanja. Ruka na kojoj je hiperemija spriječena koristeći manžetu nije pokazala prilagodbu na uzastopno dugotrajno zagrijavanje. Navedeno sugerira da je ponavljajući porast prokrvljenosti tkiva ključan za kožnu vaskularnu prilagodbu u ovim uvjetima (82). Takve promjene perfuzije tkiva često su vezane s varijacijama u sili smicanja (engl. *shear stress*) koja ima učinak na krvnu žilu, a rezultati navedenih studija ukazuju kako bi upravo repetitivno povećanje sile smicanja mogao biti glavni stimulus za vaskularnu prilagodbu pri redovitoj fizičkoj aktivnosti. Iz svega navedenog možemo zaključiti kako je endotelna funkcija sportaša u našoj studiji već na početku studije poboljšana, za razliku od endotelne funkcije sedentarnih pojedinaca.

U ovoj studiji pokazali smo kako konzumacija funkcionalno obogaćenih jaja nakon 3 tjedna konzumacije poboljšava postokluzivnu reaktivnu hiperemiju (PORH) i dilataciju induciranu acetilkolinom (AChID) u koži podlaktice sportaša, dok je u kontrolnoj grupi koja je konzumirala obična kokošja jaja takav učinak izostao. Dilatacija inducirana SNP-om nije bila značajno promijenjena niti u jednoj od grupa, kontrolnoj ili Nutri4. Dangardt i suradnici su u svojoj studiji na pretilim adolescentima koji usporedno sa adolescentima normalne tjelesne mase imaju niže vrijednosti koncentracije n-3 PUFA u serumu te blagu endotelnu disfunkciju istraživali utjecaj suplementacije n-3 PUFA na serumske koncentracije istih, vaskularnu funkciju te upalni odgovor. U studiji je sudjelovalo ukupno 25 ispitanika koji su u periodu od 3 mjeseca konzumirali 1.2g/dan n-3 PUFA, a vaskularnu funkciju procjenjivali su koristeći reaktivnu hiperemiju mjerenu na radijalnoj i karotidnoj arteriji pomoću periferne arterijske tonometrije. Rezultati studije pokazali su kako suplementacija n-3 PUFA-om tijekom tri mjeseca dovodi do poboljšanja vaskularne funkcije kod pretilih adolescenata (185). Kad je u pitanju mikrocirkulacija, Mori i suradnici istraživali su utjecaj eikosapentaenske kiseline (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA) na vazodilatatorske i vazokonstriktorske mehanizme u

mikrocirkulaciji podlaktice te pokazali da DHA ima pozitivan učinak u vidu poboljšanja endotelne funkcije, dok je isti odgovor kod EPA izostao (186). Osim mikrocirkulacije kože, Ellis i suradnici su pokazali i pozitivne učinke n-3 PUFA na mikrocirkulaciju mozga (187). Poboljšanje endotelne funkcije i mikrocirkulacije, mjereno LDF-om, nakon konzumacije 1,5 mg n-3 PUFA kroz mjesec dana demonstrirali su i Vasileva i suradnici u svom istraživanju u populaciji pacijenata sa metaboličkim sindromom te pacijenata sa arterijskom hipertenzijom (188). Suplementacijom n-3 PUFA u obliku funkcionalne hrane tj. kokošnjih jaja obogaćenih istima, Stupin i suradnici su utvrdili poboljšanje endotel ovisne vazodilatacije u mikrocirkulaciji kože mladih, zdravih ispitanika također koristeći LDF, isti učinak izostao je u kontrolnoj skupini (122). Nadalje, studijom na štakorima, odnosno uzorcima aorte istih Stupin i suradnici su pokazali da se dijetom sa sniženim koncentracijama unosa selen (0,030 mg/kg) može uzrokovati povećanje oksidativnog stresa u žili te time značajno smanjiti dilataciju uzrokovanu acetilkolinom, odnosno endotel ovisnu vazodilataciju (189). Osim toga, Zapletal i suradnici su također u studiji na štakorima pokazali da suplementacija selenom poboljšava mikrocirkulaciju, u ovom slučaju u jetri testnih životinja s krajnjim protektivnim učinkom od ishemijske ozljede jetre (190). Pozitivne učinke na kardiovaskularni sustav potvrđuju i mikronutrijenti s antioksidativnim svojstvima, lutein i vitamin E. Velika metaanaliza koju su proveli Nguyen i suradnici, a koja je uključivala ukupno 11 studija te 491 pacijenata pokazala je da suplementacija vitaminom E smanjuje razine biljega endotelne disfunkcije, ali i oksidativnog stresa. Slične rezultate pokazali su Barić i suradnici u svojoj studiji na zdravim mladim ispitanicima. Odnosno demonstrirali su da suplementacija vitaminom E i C može spriječiti oštećenje endotelne funkcije izazvano oksidativnim stresom nakon unosa velikih količina soli (191). Nadalje, poboljšanje vazodilatacije ovisne o endotelu nakon konzumacije suplemenata vitamina C i E kod trideset pacijenata sa esencijalnom hipertenzijom predložili su i Plantinga i suradnici, ali je dilatacija promatrana na brahijalnoj arteriji pomoću FMD-a, za razliku od prethodne studije na mikrocirkulaciji (192). Osim toga, Heiter i suradnici su u svojoj studiji prikazali da taj učinak poboljšanja endotelne funkcije vitamin E može ostvariti i kod ljudi sa određenim stupnjem endotelne disfunkcije uzrokovane hiperkolesterolemijom i/ili pušenjem. Naime, uzimanje suplemenata vitamina E kroz 4 mjeseca poboljšalo je vazodilataciju ovisnu o endotelu u malim krvnim žilama podlaktice (147). Kada je riječ o luteinu, u svom pregledu literature Sharafabad i suradnici opisivali su utjecaj i mehanizme učinka luteina na proces ateroskleroze. U pregled literature uključeno je ukupno 19 studija. U zaključku su opisali da je velik broj dokaza kako lutein ima pozitivan učinak na razvoj ateroskleroze te pojedine rizične čimbenike razvoja ateroskleroze poput induciranja upale ali i

smanjenja endotelne disfunkcije (193). Poboljšanje endotelne funkcije nakon konzumacije n-3 PUFA, sarena, luteina i vitamina E u obliku funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja kod mladih zdravih pojedinaca utvrdila je i prethodna studija koju je provela naša radna skupina koristeći LDF (154).

Kada je riječ o pozitivnim učincima navedenih mikronutrijenata na vaskularnu funkciju u populaciji sportaša većina studija provedena je na velikim provodnim krvnim žilama. Upravo su jednu takvu studiju na profesionalnim biciklistima proveli Zebrowska i suradnici te su demonstrirali kako suplementacija n-3 PUFA-om kroz tri tjedna poboljšava endotelnu funkciju u populaciji profesionalnih sportaša. Procjenu endotelne funkcije vršili su pomoću FMD-a. (177). Među rijetkim studijama koje su istraživale zajednički učinak suplementacije n-3 PUFA i vježbanja na kardiovaskularni sustav je na štakorima koju su proveli Berbeau i suradnici. U toj studiji štakori su bili podijeljeni u četiri skupine: kontrolna dijeta-sedentarni, kontrolna dijeta-fizički aktivni, n-3 PUFA-sedentarni te n-3 PUFA-fizički aktivni. Nakon četverotjednog protokola štakori koji su redovito vježbali i konzumirali hranu obogaćenu α -linoličnom kiselinom (ALA) pokazali su dodatan pozitivan učinak na kardiovaskularne čimbenike rizika za razliku od ostalih skupina što upućuje da kombiniranje konzumacije povećanih količina ALA te fizičkog vježbanja ima dodatan pozitivan učinak na kardiovaskularne čimbenike rizika usporedno samo sa jednom od intervencija (194). Naša prethodna studija provedena na profesionalnim sportašima sugerirala je također da suplementacija n-3 PUFA u obliku funkcionalne hrane, u ovom slučaju kokošnjih jaja obogaćenih istima, kroz tri tjedna dovodi do poboljšanja o endotelu ovisne vazodilatacije mikrocirkulacije kože (109). Također, velik broj studija proveden je o utjecaju sarena na performanse sportaša na razne načine (195,196), ali gotovo ni jedna se nije bavila utjecajem suplementacije sarena na vaskularnu reaktivnost u populaciji sportaša. Jednako vrijedi i za antioksidanse vitamin E i lutein, čiji utjecaj na mikrovaskularnu endotelnu funkciju u populaciji sportaša još uvijek nije dobro istražen, za razliku od utjecaj na oksidativni stres kod sportaša, čije su smanjenje nakon suplementacijom vitaminom E već dokazale neke studije (197,198). Naši rezultati potvrđuju zaključke prethodno navedenih studija o pozitivnom učinku navedenih mikronutrijenata na endotelnu funkciju i dokazuju kako se već poboljšani endotel sportaša može još dodatno poboljšati konzumacijom navedenih mikronutrijenata i u obliku funkcionalne hrane.

6.4. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na promjene mikrovaskularne i endotelne funkcije nakon akutnog vježbanja

Kao što je ranije već navedeno, uloga redovitog vježbanja u poboljšanju zdravlja kardiovaskularnog sustava već je dobro poznata i istražena, međutim, utjecaj akutnog aerobnog treninga na vaskularnu funkciju nije toliko dobro istražen. Također, brojne su studije provedene o učinku suplementacije n-3 PUFA-om na sportske izvedbe različitih vrsta, ali ne i na mikrovaskularnu i endotelnu funkciju. Tema je ovo koja još uvijek nije dovoljno istražena i objašnjena obzirom da je akutno vježbanje izazov za kardiovaskularni sustav, a rezultati malog broja provedenih istraživanja nisu konzistentni (199). U svojoj studiji Potočnik i Lenasi ispitivali su učinak akutnog treninga na bicikl ergometru na mikrovaskularnu funkciju kože prsta ruke i podlaktice, a rezultati su predočili reducirani protok odmah po završetku vježbanja u mikrocirkulaciji kože prsta, dok je isti u koži podlaktice u odnosu prije početka vježbanja bio povišen nakon akutne vježbe (86). U studiji Stupina i suradnika uspoređivala se bazalna mikrovaskularna reaktivnost sedentarnih pojedinaca sa reaktivnošću profesionalnih sportaša koja je bila značajno lošija kod sedentarnih ispitanika. Osim toga, paradoksalno su dokazali kako je smanjenje o endotelu ovisne vazodilatacije značajno veće kod profesionalnih sportaša nego sedentarnih pojedinaca nakon akutnog iscrpljujućeg treninga (79). U studiji također naše istraživačke skupine na profesionalnim sportašima postokluzivna reaktivna hiperemija i ACh inducirana dilatacija nakon akutne fizičke aktivnosti bila je još značajnije reducirana nakon tri tjedna konzumacije n-3 PUFA obogaćenim kokošjim jajima što bi također moglo biti paradoksalno obzirom na pretpostavljene pozitivne učinke vježbanja i n-3 PUFA-e na mikrovaskularnu reaktivnost (109).

Navedeno veće smanjenje endotel ovisne vazodilatacije sportaša nego kod sedentarnih pojedinaca te nakon konzumacije n-3 PUFA obogaćenih kokošjih jaja može značiti povećanje raspona mikrovaskularne reakcije na akutni iscrpljujući trening ili bolju iskorištenost kapaciteta vazodilatacije, što je u skladu s hipotezom hormoneze (200). Prema ovoj hipotezi, privremena smanjenja endotelnog odgovora nakon akutnog iscrpljujućeg treninga trebala bi dovesti do bolje dugoročne endotelne funkcije kod sportaša, što je također prikazano u ovoj studiji. Naime, u rezultatima ovog istraživanja prikazano je da konzumacija Nutri4 jaja je značajno povećala raspon mikrovaskularne reakcije na akutni iscrpljujući trening Δ PORH, dok se Δ AChID reakcija na akutni iscrpljujući trening nije značajno mijenjala usporedno sa bazalnim mjerenjem u Nutri4 grupi ispitanika. Također povećanje Δ PORH, ali ne i Δ AChID, bilo je značajno veće u skupini Nutri4 u usporedbi s kontrolama nakon odgovarajućeg prehrambenog protokola

(prilagođeno osnovnoj vrijednosti). Budući da su svi ispitanici bili izloženi akutnom iscrpljujućem treningu jednakog modaliteta, a neposredno nakon provedena su funkcionalna ispitivanja pitanje je koji je mogući razlog smanjene mikrovaskularne reaktivnosti. Velik utjecaj na promjene endotelne funkcije nakon vježbanja mogli bi imati intenzitet i trajanje akutnog treninga. Dokazano je da iz višeg intenziteta vježbanja slijedi značajnije smanjenje protokom posredovane dilatacije neposredno nakon vježbanja. Tako su u svojoj studiji Birk i suradnici ispitivali utjecaj akutne tjelovježbe podijeljene u 3 stupnja ovisno o pulsu (50%, 70% i 85% maksimalnog pulsa) na vaskularnu reaktivnost procijenjenu FMD-om brahijalne arterije. Rezultati studije sugerirali su da je smanjenje FMD-a brahijalne arterije bilo zanemarivo nakon akutnog treninga pri 50% maksimalnog pulsa, dok je bilo značajno pri vježbanju od 85% maksimalnog pulsa iz čega se može zaključiti da postoji negativan utjecaj intenziteta akutne tjelesne aktivnosti na vaskularnu reaktivnost (200). Obzirom da je u ovoj studiji pokazano smanjenje oksidativnog stresa u Nutri4 skupini, potencijalni uzrok povećanja raspona mikrovaskularne reakcije na akutni iscrpljujući trening Δ PORH kod profesionalnih sportaša moglo bi se objasniti podizanjem aerobnog praga. Odnosno, smanjenje oksidativnog stresa moglo bi imati pozitivan učinak na stvaranje laktata koji su glavni marker anaerobne aktivnosti (201), pa na taj način produljiti aerobni dio treninga i tako njegovu duljinu što na kraju dovodi do odrađivanja treninga jačeg intenziteta te posljedično tome dodatnog smanjenja mikrovaskularne reaktivnosti. Kako u studiji nije mjerena razina laktata u krvi, ovakav zaključak na razini je spekulacije te se treba dodatno potvrditi budućim studijama.

6.5. Učinak konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja na biljege oksidativnog stresa kod sportaša

Za zaštitu organizma od oksidativnog stresa zadužen je jasno organiziran sustav antioksidansa koji se svojim koordiniranim djelovanjem odupire redoks poremećajima u stanici ljudskog organizma. Antioksidansi su tvari koje usporavaju ili sprečavaju oksidaciju supstrata, a među glavnim antioksidativnim enzimima ističu se katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GPx) i superoksid-dismutaza (SOD). To su enzimi koji imaju značajnu ulogu u neutralizaciji reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u tijelu, a koji su u svom aktivnom obliku visoko reaktivne molekule sa velikim rizikom oštećenja stanica i tkiva, a proizvode se kao nusproizvod normalnog staničnog metabolizma. Aktivnost ovih antioksidativnih enzima ključna je za održavanje ravnoteže u razinama reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) u organizmu. Visoke

razine ROS-a mogu uzrokovati oksidativni stres, koji potencijalno šteti stanicama i tkivima. S druge strane, niske razine ROS-a mogu imati negativan učinak na normalne stanične procese. Važno je spomenuti da, iako su antioksidativni enzimi od suštinskog značaja za neutralizaciju ROS-a, tijelo raspolaže i drugim obrambenim mehanizmima protiv oksidativnog stresa. To uključuje neenzimske antioksidanse od kojih su najpoznatiji vitamin C i E, koji također doprinose neutralizaciji ROS-a. Nadalje, stanice imaju mehanizme popravka koji mogu sanirati oštećenja uzrokovana djelovanjem ROS-a (202).

U našem istraživanju nije zabilježena značajna promjena u koncentraciji niti jednog od mjerenih antioksidativnih enzima (CAT, GPx i SOD), niti u kontrolnoj, niti u Nutri4 skupini nakon tri tjedna konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja. Unatoč zabilježenom povećanju koncentracije n-3 PUFA, vitamina E, selena u serumu, učinak na antioksidativne enzime je izostao nakon dijetetskog protokola. Rezultati su konzistentni s onima naše istraživačke skupine dobivenima u istraživanju učincima funkcionalno obogaćenih jaja kod mladih zdravih ispitanika (154). U studiji na zečevima, Mattioli i suradnici su istraživali učinak suplementacije n-3 PUFAMA na koncentraciju istih u serumu te oksidativni status jetre, testisa i mozga kod istih. Ukupno je korišteno 20 zečeva podijeljenih u četiri različite skupine ovisno o koncentraciji suplemenata u prehrani koja je trajala 110 dana. Rezultati su pokazali da suplementacija s n-3 PUFA u kombinaciji sa vitaminom E može dovesti do porasta razine antioksidativnih enzima GPx i CAT u jetri (203). Slične rezultate, ali u studiji na štakorima dobili su Umesha i suradnici gdje su istraživali utjecaj prehrane obogaćene n-3 PUFA-om na antioksidativni status te antioksidativne enzime kod istih. Rezultati su pokazali da suplementacija kroz 60 dana sa n-3 PUFA-om dovodi do povećanja koncentracije nekih od antioksidativnih enzima, odnosno povećava koncentraciju katalaze i glutation peroksidaze, ali nema značajan učinak na superoksid dismutazu u jetri štakora. Iz navedenih rezultata zaključili su kako prehrana bogata n-3 PUFA-om dovodi do poboljšanja antioksidativnog statusa te aktivnosti antioksidativnih enzima kod štakora (204). U studijama na ljudima rezultati n-3 PUFA-e nisu toliko konzistentni, pa su tako Tooranga i suradnici u studiji na ispitanicima s dijagnozom dijabetesa tipa 2 utvrdili istraživali utjecaj suplementacije n-3 PUFA na aktivnost antioksidativnih enzima. U studiju je uključeno ukupno 90 pacijenata koji su bili podjeljeni u dvije skupine, eksperimentalnu koja je trošila ukupno 2714mg n-3 PUFA te placebo koja je trošila 2100mg suncokretovog ulja. Rezultati mjerenja koncentracije antioksidativnih enzima na početku i na kraju studije pokazali su da konzumacija 2.7 g n-3 PUFA kroz dva mjeseca nije dovela do značajne promjene u aktivnosti CAT-a, GPx-a i SOD-a u populaciji pacijenata sa

dijabetesom tip 2 (205). Za razliku od n-3 PUFA, sinergistički učinak selen i vitamina E u eliminaciji lipidnih peroksida koji nastaju kao rezultat interakcije prekomjernog ROS-a s PUFA-om. Izravno, kao antioksidans djeluje vitamin E, dok je selen u sprezi s enzimom GPx kao njegov kofaktor (206). Dakle, možemo zaključiti da selen i vitamin E ne samo da imaju ulogu kao vanjski antioksidansi za sprječavanje oksidativnog oštećenja putem uklanjanja slobodnih radikala i superoksida, već također mogu utjecati na regulaciju ekspresije endogenih antioksidativnih enzima na genetskoj razini (207).

Za razliku od antioksidativnih enzima, konzumacija funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja kroz 3 tjedna u našoj studiji značajno je snizila biomarkere oksidativnog stresa tj. 8-iso-PGF2 α te formaciju hidrogen peroksida i peroksinitrita u perifernim mononuklearnim stanicama (PBMC). Navedeni rezultati upućuju da je spomenuti dijetetski režim u intervencijskoj skupini doveo do smanjenja oksidativnog stresa kod zdravih mladih sportaša. Većina provedenih istraživanja sa suplementacijom antioksidansa (uključujući n-3 PUFA, lutein, selen i vitamin E) upućuju na njihov pozitivan učinak na redukciju oksidativnog stresa i u populaciji sportaša. Tako su Buonocore i suradnici u svojoj studiji koju su proveli na ukupno 21 trkaču istraživali su povezanost suplementacije n-3 PUFA-om te fizičke aktivnosti i pratili markere oksidativnog stresa i upale. Dobiveni rezultati demonstrirali su kako suplementacija n-3 PUFA-om kroz 8 tjedana dovodi do smanjenja oksidativnog stresa uzrokovanog akutnim treningom u populaciji sportaša (208). U populaciji nogometaša Capo i suradnici također su istraživali utjecaj osmotjedne suplementacije n-3 PUFA-om na antioksidativni status u PBMC. U studiji je sudjelovalo ukupno 15 nogometaša koji su kroz 8 tjedana pili piće obogaćeno n-3 PUFA. Kroz rezultate studije primijetili su povećanje antioksidativnog kapaciteta te smanjenu produkciju ROS-a u mitohondrijima, ali i smanjenje razine markera oksidativnog stresa nakon akutnog treninga (209). Osim antioksidativnih učinaka n-3 PUFA-e u populaciji sportaša, provode se i brojna istraživanja na drugim mikronutrijentima koji imaju antioksidativni učinak, pa su tako u svojoj studiji Sacke i suradnici istraživali učinak suplementacije vitamina E na markere oksidativnog stresa u populaciji veslačica. Iz rezultata studije zaključili su da dodatak veće količine vitamina E u prehrani ženskih sportašica pruža zaštitu od oksidativnog stresa izazvanog umjerenim tjelesnim vježbama (197). Nadalje, u svojoj studiji Capo i suradnici istraživali su učinak kombinacije antioksidativnih mikroelemenata poput n-3 PUFA i vitamina E u obliku funkcionalnih napitka također na markere oksidativnog stresa potaknute akutnim treningom. Analiza dobivenih rezultata studije sugerira zaštitnu ulogu navedenog napitka protiv oksidativnog stresa te povećanje genske ekspresije antioksidativnih enzima u PBMC-ima nakon

vježbanja (210). Kada je riječ o selenu brojne studije pokazale su slične rezultate učinka selena na oksidativni stres kod sportaša. Tako su u svojoj studiji na 18 profesionalni sportaša Dragan i suradnici istraživali su antioksidativne učinke selena. Trotjedni tretman sa 100 µg/dan selena pokazao je značajne promjene koncentracije peroksida i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze što bi sugeriralo antioksidacijski učinak ovog mikroelementa (211). Neke od studija provedene su i na kombinacijama ranije navedenih mikronutrijenata, jedna od njih je studija provedena na ženskim sportašicama od strane Goldfarba i suradnika. Na ukupno osamnaest sportašica između ostalog su pokazali da ekscentrična vježba s otporom može povećati biomarkere oksidativnog stresa u serumu, ali i da suplementacija vitaminom E, C i selenom može smanjiti taj porast, odnosno smanjiti porast koncentracije proteina karbonila te malondialdehida u plazmi što ponovno potvrđuje njihov kombinirani antioksidativni učinak (212).

No nisu svi rezultati u potpunosti suglasni sa prethodno navedenim studijama, neki rezultata pokazali su da suplementacija ranije navedenim mikronutrijentima može dovesti i do povećanja oksidativnog statusa u pojedinim populacijama ispitanika. Takav učinak pokazan je u studiji na sportašima koji treniraju judo, naime Filaire i suradnici su istraživali utjecaj šestotjedne suplementacije eikozapentanskom kiselinom (EPA) i dokozaheksanskom kiselinom (DHA) na oksidativni status navedenih sportaša. Na početku i na kraju studije uzimani su uzorci prije i nakon akutnog judo treninga. Rezultati su pokazali da suplementacija n-3 PUFA-om kroz šest tjedana dovodi do povećanog oksidativnog stresa u mirovanju prije ali i nakon odrađenog akutnog judo treninga (213). Također, prethodna studija naše istraživačke skupine bavila se utjecajem kokošnjih jaja obogaćenih samo n-3 PUFA-om u populaciji zdravih mladih sportaša. Rezultati mjerenja nisu pokazali pozitivne učinke na povećan rad antioksidativnih enzima, nego je čak zabilježena i niža aktivnost serumske GPx i SOD. Ovaj učinak nastao je vjerojatno zbog već postojeće oksidativne ravnoteže i prilagodbe antioksidativnih mehanizama na povećanje stresa izazvano vježbanjem (109). Rezultati ove studije bili su u skladu sa prethodno navedenom studijom, odnosno izostao je porast aktivnosti antioksidativnih enzima uzrokovan trotjednom konzumacijom jajima obogaćenima n-3 PUFA-om, selenom, luteinom te vitaminom E unatoč njihovom potencijalnom konfluirajućem učinku. Objašnjenje za izostanak navedenog učinka mogao bi se objasniti time da su obje skupine ispitanika u našoj studiji bili sportaši, odnosno kroz sam učinak redovitog i dugotrajnog vježbanja na oksidativni status. Upravo taj učinak mogao bi biti objašnjenje za uočeni nedostatak značajne promjene u antioksidativnoj obrani u populaciji zdravih mladih sportaša, ali opet značajnog smanjenja biomarkera

oksidativnog stresa nakon dijetetskog protokola konzumacije n-3 PUFA, luteinom, selenom i vitaminom E obogaćenih kokošnjih jaja.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem izvršenog istraživanja i pribavljenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Dijetetski režim u trajanju od tri tjedna tijekom kojeg je konzumirano 3 jaja na dan obogaćena navedenim mikronutrijentima smanjila je n-6/n-3 omjer, povećala koncentraciju selena i vitamina E u serumu ispitanika.
- Konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, selenom, luteinom i vitaminom E ima pozitivan učinak na mikrovaskularnu reaktivnost / endotelnu funkciju što se vidi iz značajno bolje reaktivne hiperemije te vazodilatacije na podražaj acetilkolinom krvnih žila mikrocirkulacije kože kod profesionalnih sportaša.
- Akutni trening na veslačkom ergometru s povećanjem intenziteta do maksimalnog iscrpljenja uzrokuje značajno sniženje reaktivne hiperemije krvnih žila u mikrocirkulaciji kože podlaktice kod profesionalnih sportaša u obje skupine na početku protokola.
- Mikrovaskularna prilagodba kože podlaktice na akutni iscrpljujući trening kod profesionalnih sportaša značajno se povećala nakon konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja u Nutri4 skupini.
- Rezultati ukazuju da kombinirano djelovanje n-3 PUFA, luteina, selena i vitamina E potencijalno svoj učinak ostvaruje preko sniženja oksidativnog stresa koje je zabilježeno sniženjem biljega oksidativnog stresa, 8-iso-PGF_{2α} te sniženjem produkcije reaktivnih kisikovih radikala (ROS) u mononuklearnim stanicama periferne krvi.
- Konzumacija kokošnjih jaja nema negativan učinak na biokemijske parametre kao što su serumski lipidni profil i koncentracija jetrenih enzima, stoga je konzumacija jaja sigurna za zdravlje.

8. SAŽETAK

Utjecaj unosa funkcionalne hrane obogaćene nutrijentima na mikrovaskularnu endotelnu funkciju u populaciji sportaša – randomizirana kontrolirana studija

Ciljevi: Istražiti hoće li konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenom i luteinom u razdoblju od tri tjedna imati povoljan učinak na mikrovaskularnu endotelnu funkciju te na mikrovaskularnu endotelnu reaktivnost nakon akutnog iscrpljujućeg treninga u populaciji zdravih mladih sportaša. Također, ispitati potencijalne mehanizme djelovanja s naglaskom na oksidativni stres.

Dizajn studije: Randomizirana, dvostruko slijepa, prospektivna, intervencijska studija (ID NCT04564690).

Ispitanici i metode: U studiji je sudjelovalo ukupno 31 mladih sportaša koji su bili podijeljeni u dvije skupine, Nutri4 grupu (14 ispitanika) koji su konzumirali tri jaja obogaćena n-3 PUFA, luteinom, selenom i vitaminom E dnevno te u kontrolnu grupu (17 ispitanika) koji su konzumirali tri obična kokošja jaja dnevno proizvedena na istoj farmi. Na početku te na samom kraju dijetetskog protokola svim su ispitanicima učinjena antropometrijska mjerenja, te mjereni biokemijski i hemodinamski parametri. Protok krvi u mikrocirkulaciji kože mjeren je metodom mjerenja protoka laser Dopplerom (eng. *laser Doppler flowmetry*, LDF) u odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH) te iontoforezu acetilkolina (AChID) nakon čega su ispitanici bili podvrgnuti akutnom iscrpljujućem treningu (AEE) te je nakon istog ponovljeno mjerenje protoka LDF-om. Razina oksidativnog stresa (8-isoPGF_{2α}, mijeloperoksidaza, produkcija ROS) i aktivnost antioksidativnih enzima (glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza) mjereni su kod svih ispitanika.

Rezultati: Nakon trodnevne konzumacije obogaćenih jaja, Nutri4 skupina pokazala je značajna poboljšanja kako u PORH-u tako i u AChID-u, bez značajnih promjena u kontrolnoj skupini. U Nutri4 skupini došlo je do smanjenja stvaranja vodikovog peroksida i peroksinitrita u perifernim mononuklearnim stanicama, kao i smanjenja serumske koncentracije 8-iso prostaglandina F_{2α}, za razliku od toga, ovi faktori ostali su nepromijenjeni u kontrolnoj skupini. I PORH i AChID smanjeni su nakon AEE prije i nakon prehrambenih intervencija. Međutim, raspon odziva PORH-a na AEE (Δ PORH) povećao se nakon konzumacije obogaćenih jaja.

Zaključak: Konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, selenom, luteinom i vitaminom E rezultirala je poboljšanom mikrovaskularnom reaktivnošću ovisnom o endotelu te smanjenim

oksidativnim stresom kod natjecateljskih sportaša. Također, raspon mikrovaskularne reakcije na akutni iscrpljujući trening poboljšana je nakon konzumacije jaja u Nutri4 skupini.

Ključne riječi: Endotel, funkcionalna hrana, lutein, mikrocirkulacija, n-3 polinezasićene masne kiseline, selen, vitamin E.

9. SUMMARY

The effect of nutrient-enriched, functional food intake on microvascular endothelial function in athletes – a randomized controlled study

Objectives: The investigation of beneficial effects of the consumption of hen eggs enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids, vitamin E, selenium, and lutein over a three-week period on microvascular endothelial function and microvascular endothelial reactivity after acute exhaustive training in a population of healthy young athletes, as well as evaluating the potential mechanisms of action with a focus on oxidative stress.

Study design: Randomized, double-blind, prospective, interventional study (ID NCT04564690).

Participants and methods: The study consisted of a total of thirty-one healthy young athletes divided into two groups: the Nutri4 group (14 participants), who consumed three eggs enriched with n-3 PUFA, lutein, selenium, and vitamin E daily, and the control group (17 participants), which consumed three regular hen eggs daily, produced on the same farm. Anthropometric measurements, as well as biochemical and hemodynamic parameters, were assessed at the beginning and end of the dietary intervention. Skin microcirculation blood flow was measured using laser Doppler flowmetry (LDF) in response to post-occlusive reactive hyperemia (PORH) and acetylcholine iontophoresis (AChID). Afterward, participants underwent acute exhaustive exercise (AEE), and blood flow measurements with LDF were repeated. Levels of oxidative stress (8-isoPGF₂ α , myeloperoxidase, ROS production) and activity of antioxidant enzymes (glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase) were measured in all participants.

Results: After three weeks of consuming enriched eggs, the Nutri4 group showed significant improvements in both PORH and AChID, with no significant changes in the control group. In the Nutri4 group, there was a decrease in serum concentration of 8-iso prostaglandin F₂ α , as well as a decrease in hydrogen peroxide and peroxynitrite formation in peripheral mononuclear cells. On the other hand, these factors showed no alterations in the control group. The response of both PORH and AChID decreased after AEE both before and after dietary interventions. Nevertheless, the responsiveness range of PORH to AEE (Δ PORH) increased following the consumption of enriched eggs.

Conclusion: Consumption of eggs enriched with n-3 PUFA, selenium, lutein, and vitamin E resulted in improved microvascular endothelial reactivity and reduced oxidative stress in

competitive athletes over a three-week period. Additionally, the range of microvascular response to acute exhaustive training was enhanced after consuming Nutri4 eggs.

Keywords: Endothelium; functional food; lutein; microcirculation; n-3 polyunsaturated fatty acids; acids; selenium; vitamin E.

10. LITERATURA

1. Blair SN, Morris JN. Healthy Hearts-and the Universal Benefits of Being Physically Active: Physical Activity and Health. *Ann Epidemiol* [Internet]. 2009;19(4):253–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annepidem.2009.01.019>
2. Paffenbarger RSJ, Laughlin ME, Gima AS, Black RA. Work activity of longshoremen as related to death from coronary heart disease and stroke. *N Engl J Med*. 1970 May;282(20):1109–14.
3. Paffenbarger RSJ, Wing AL, Hyde RT. Physical activity as an index of heart attack risk in college alumni. *Am J Epidemiol*. 1978 Sep;108(3):161–75.
4. Fraser GE, Shavlik DJ. Ten years of life: Is it a matter of choice? *Arch Intern Med*. 2001 Jul;161(13):1645–52.
5. Lee D, Artero EG, Sui X, Blair SN. Mortality trends in the general population: the importance of cardiorespiratory fitness. *J Psychopharmacol*. 2010 Nov;24(4 Suppl):27–35.
6. Schuler G, Adams V, Goto Y. Role of exercise in the prevention of cardiovascular disease: results, mechanisms, and new perspectives. *Eur Heart J*. 2013 Jun;34(24):1790–9.
7. Keul J, Dickhuth HH, Simon G, Lehmann M. Effect of static and dynamic exercise on heart volume, contractility, and left ventricular dimensions. *Circ Res*. 1981 Jun;48(6 Pt 2):1162-70.
8. Morganroth J, Maron BJ, Henry WL, Epstein SE. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann Intern Med*. 1975 Apr;82(4):521–4.
9. Scharhag J, Schneider G, Urhausen A, Rochette V, Kramann B, Kindermann W. Athlete's heart: right and left ventricular mass and function in male endurance athletes and untrained individuals determined by magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Nov;40(10):1856–63.
10. Convertino VA. Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med Sci Sports Exerc*. 1991 Dec;23(12):1338–48.
11. Convertino VA, Mack GW, Nadel ER. Elevated central venous pressure: a consequence of exercise training-induced hypervolemia? *Am J Physiol*. 1991 Feb;260(2 Pt 2):R273-7.
12. Ekblom B, Astrand PO, Saltin B, Stenberg J, Wallström B. Effect of training on circulatory response to exercise. *J Appl Physiol*. 1968 Apr;24(4):518–28.
13. Evans DL. Cardiovascular adaptations to exercise and training. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1985 Dec;1(3):513–31.
14. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AMJ, Kastelein JJP, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008 Nov;359(21):2195–207.
15. Wilt TJ, Bloomfield HE, MacDonald R, Nelson D, Rutks I, Ho M, et al. Effectiveness of statin therapy in adults with coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 2004 Jul;164(13):1427–36.

16. Halverstadt A, Phares DA, Wilund KR, Goldberg AP, Hagberg JM. Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women. *Metabolism*. 2007 Apr;56(4):444–50.
17. Diaz KM, Shimbo D. Physical activity and the prevention of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013 Dec;15(6):659–68.
18. Turnbull F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2003 Nov;362(9395):1527–35.
19. Lindström J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemiö K, et al. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet (London, England)*. 2006 Nov;368(9548):1673–9.
20. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002 Feb;346(6):393–403.
21. Mora S, Cook N, Buring JE, Ridker PM, Lee I-M. Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation*. 2007 Nov;116(19):2110–8.
22. Joyner MJ, Green DJ. Exercise protects the cardiovascular system: Effects beyond traditional risk factors. *J Physiol*. 2009;587(23):5551–8.
23. DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, et al. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation*. 2000 Sep;102(12):1351–7.
24. Rivera-Brown AM, Frontera WR. Principles of exercise physiology: responses to acute exercise and long-term adaptations to training. *PM R*. 2012 Nov;4(11):797–804.
25. Lavie CJ, Arena R, Swift DL, Johannsen NM, Sui X, Lee D-C, et al. Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes. *Circ Res*. 2015 Jul;117(2):207–19.
26. Cantelon JA, Giles GE. A Review of Cognitive Changes During Acute Aerobic Exercise. *Front Psychol*. 2021;12:653158.
27. Higginbotham MB, Morris KG, Williams RS, McHale PA, Coleman RE, Cobb FR. Regulation of stroke volume during submaximal and maximal upright exercise in normal man. *Circ Res*. 1986 Feb;58(2):281–91.
28. ASTRAND PO, CUDDY TE, SALTIN B, STENBERG J. CARDIAC OUTPUT DURING SUBMAXIMAL AND MAXIMAL WORK. *J Appl Physiol*. 1964 Mar;19:268–74.
29. Gledhill N, Cox D, Jamnik R. Endurance athletes' stroke volume does not plateau: major advantage is diastolic function. *Med Sci Sports Exerc*. 1994 Sep;26(9):1116–21.
30. Rowland TW. Circulatory responses to exercise: are we misreading Fick? *Chest*. 2005 Mar;127(3):1023–30.
31. ASTRAND PO, RYHMING I. A nomogram for calculation of aerobic capacity

- (physical fitness) from pulse rate during sub-maximal work. *J Appl Physiol.* 1954 Sep;7(2):218–21.
32. Hale T. History of developments in sport and exercise physiology: A. V. Hill, maximal oxygen uptake, and oxygen debt. *J Sports Sci.* 2008 Feb;26(4):365–400.
 33. American College of Sports Medicine. Position Stand. Physical activity, physical fitness, and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 Oct;25(10):i–x.
 34. Kurl S, Laukkanen JA, Rauramaa R, Lakka TA, Sivenius J, Salonen JT. Systolic blood pressure response to exercise stress test and risk of stroke. *Stroke.* 2001 Sep;32(9):2036–41.
 35. Miyai N, Arita M, Miyashita K, Morioka I, Shiraishi T, Nishio I. Blood pressure response to heart rate during exercise test and risk of future hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2002 Mar;39(3):761–6.
 36. Shen Q, Wu MH, Yuan SY. Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability. *Cell Health Cytoskelet.* 2009 Jul;2009(1):43–50.
 37. Ružić A, Miletić B, Nola AI, Peršić V, Radas MR, Včev A. Endotelna disfunkcija u “enigmatskoj slagalici” kardiovaskularnih bolesti. *Med Glas.* 2009;6(1):3–15.
 38. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc.* 1966;25(6):1773–83.
 39. BENNETT HS, LUFT JH, HAMPTON JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol.* 1959 Feb;196(2):381–90.
 40. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007 Feb;100(2):158–73.
 41. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev.* 1999 Jul;79(3):703–61.
 42. Okada H, Takemura G, Suzuki K, Oda K, Takada C, Hotta Y, et al. Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions. *Crit Care.* 2017 Oct;21(1):261.
 43. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;39(4):287–324.
 44. Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990 Jul;323(1):27–36.
 45. Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear stress biology of the endothelium. *Ann Biomed Eng.* 2005 Dec;33(12):1714–8.
 46. Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov;288(5789):373–6.
 47. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan;340(2):115–26.
 48. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Jun;153(3):1251–6.

49. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* (London, England). 1989 Oct;2(8670):997–1000.
50. 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;263(5579):663–5.
51. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar;91(5):1314–9.
52. Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 1992 Feb;105(2):485–9.
53. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998 Nov;396(6708):269–72.
54. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertens* (Dallas, Tex 1979). 2007 Mar;49(3):590–6.
55. Larsen BT, Gutterman DD, Sato A, Toyama K, Campbell WB, Zeldin DC, et al. Hydrogen peroxide inhibits cytochrome p450 epoxygenases: interaction between two endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. 2008 Jan;102(1):59–67.
56. Taddei S, Versari D, Cipriano A, Ghiadoni L, Galetta F, Franzoni F, et al. Identification of a cytochrome P450 2C9-derived endothelium-derived hyperpolarizing factor in essential hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Aug;48(3):508–15.
57. Faraci FM, Sobey CG, Chrissobolis S, Lund DD, Heistad DD, Weintraub NL. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Jul;281(1):R246-53.
58. Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003 Nov;81(11):1013–28.
59. Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res*. 2002 Apr;90(7):800–6.
60. Wei CM, Hu S, Miller VM, Burnett JCJ. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Nov;205(1):765–71.
61. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol*. 1985 May;248(5 Pt 1):C550-6.
62. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988 Mar;332(6163):411–5.
63. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, et al.

- Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Jun;161(2):859–64.
64. Woods M, Bishop-Bailey D, Pepper JR, Evans TW, Mitchell JA, Warner TD. Cytokine and lipopolysaccharide stimulation of endothelin-1 release from human internal mammary artery and saphenous vein smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;31 Suppl 1:S348-50.
 65. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhäusl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation*. 1990 Apr;81(4):1415–8.
 66. Kiely DG, Cargill RI, Struthers AD, Lipworth BJ. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man. *Cardiovasc Res*. 1997 Feb;33(2):378–86.
 67. Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull*. 1983 Jul;39(3):271–6.
 68. Marwali MR, Mehta JL. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thromb Haemost*. 2006 Oct;96(4):401–6.
 69. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Jan;31(1):23–37.
 70. Cybulsky MI, Gimbrone MAJ. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991 Feb;251(4995):788–91.
 71. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci*. 2005 Sep;118(Pt 18):4103–11.
 72. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb;23(2):168–75.
 73. Gimbrone MAJ, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 May;902:230–40.
 74. Lerman A, Burnett JCJ. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*. 1992 Dec;86(6 Suppl):III12-19.
 75. Aboyans V, Criqui MH, Denenberg JO, Knoke JD, Ridker PM, Fronck A. Risk factors for progression of peripheral arterial disease in large and small vessels. *Circulation*. 2006 Jun;113(22):2623–9.
 76. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Aug;295(7):369–77.
 77. Kvernmo HD, Stefanovska A, Kirkebøen KA, Østerud B, Kvernebo K. Enhanced endothelium-dependent vasodilatation in human skin vasculature induced by physical conditioning. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1998;79(1):30–6.
 78. Wang J-S. Effects of exercise training and detraining on cutaneous microvascular function in man: the regulatory role of endothelium-dependent dilation in skin vasculature. *Eur J Appl Physiol*. 2005 Jan;93(4):429–34.
 79. Stupin M, Stupin A, Rasic L, Cosic A, Kolar L, Seric V, et al. Acute exhaustive rowing exercise reduces skin microvascular dilator function in young adult rowing athletes.

Eur J Appl Physiol [Internet]. 2018;118(2):461–74. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1007/s00421-017-3790-y>

80. Black MA, Green DJ, Cable NT. Exercise prevents age-related decline in nitric-oxide-mediated vasodilator function in cutaneous microvessels. *J Physiol*. 2008 Jul;586(14):3511–24.
81. Beck DT, Casey DP, Martin JS, Emerson BD, Braith RW. Exercise training improves endothelial function in young prehypertensives. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Apr;238(4):433–41.
82. Green DJ, Bilsborough W, Naylor LH, Reed C, Wright J, O’Driscoll G, et al. Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J Physiol*. 2005 Jan;562(Pt 2):617–28.
83. Hwang I-C, Kim K-H, Choi W-S, Kim H-J, Im M-S, Kim Y-J, et al. Impact of acute exercise on brachial artery flow-mediated dilatation in young healthy people. *Cardiovasc Ultrasound*. 2012 Oct;10:39.
84. Currie KD, McKelvie RS, Macdonald MJ. Flow-mediated dilation is acutely improved after high-intensity interval exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Nov;44(11):2057–64.
85. Durand MJ, Dharmashankar K, Bian J-T, Das E, Vidovich M, Gutterman DD, et al. Acute exertion elicits a H₂O₂-dependent vasodilator mechanism in the microvasculature of exercise-trained but not sedentary adults. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2015 Jan;65(1):140–5.
86. Potočnik N, Lenasi H. The responses of glabrous and nonglabrous skin microcirculation to graded dynamic exercise and its recovery. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016 Nov;64(1):65–75.
87. Kerksick CM, Arent S, Schoenfeld BJ, Stout JR, Campbell B, Wilborn CD, et al. International society of sports nutrition position stand: nutrient timing. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017;14:33.
88. Collier R. The DNA-based diet. Vol. 189, *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l’Association medicale canadienne*. Canada; 2017. p. E40–1.
89. Mountjoy M, Sundgot-Borgen JK, Burke LM, Ackerman KE, Blauwet C, Constantini N, et al. IOC consensus statement on relative energy deficiency in sport (RED-S): 2018 update. *Br J Sports Med*. 2018 Jun;52(11):687–97.
90. Loucks AB, Kiens B, Wright HH. Energy availability in athletes. *J Sports Sci*. 2011;29 Suppl 1:S7-15.
91. Condo D, Lohman R, Kelly M, Carr A. Nutritional Intake, Sports Nutrition Knowledge and Energy Availability in Female Australian Rules Football Players. *Nutrients*. 2019 Apr;11(5).
92. Keay N, Francis G, Entwistle I, Hind K. Clinical evaluation of education relating to nutrition and skeletal loading in competitive male road cyclists at risk of relative energy deficiency in sports (RED-S): 6-month randomised controlled trial. *BMJ open Sport Exerc Med*. 2019;5(1):e000523.

93. Plasek B, Lakner Z, Kasza G, Temesi Á. Consumer evaluation of the role of functional food products in disease prevention and the characteristics of target groups. *Nutrients*. 2020;12(1).
94. Gautam RB, Maurya K, Rai M, Singh R, Maurya R, Mehta R, et al. Consumer Behavior Towards Functional Food in Eastern UP-A Study of Market Drivers & Challenges. *Int J Agric Innov Res*. 2018;7(1):1473–2329.
95. Topolska K, Florkiewicz A, Filipiak-Florkiewicz A. Functional Food-Consumer Motivations and Expectations. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 May;18(10).
96. Topolska K, Radzki RP, Filipiak-Florkiewicz A, Florkiewicz A, Leszczyńska T, Cieślík E. Fructan-Enriched Diet Increases Bone Quality in Female Growing Rats at Calcium Deficiency. *Plant Foods Hum Nutr*. 2018 Sep;73(3):172–9.
97. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*. 2015 Jan;385(9963):117–71.
98. Naqvi SA, Khan MS, Vohora SB. Antibacterial, antifungal and anthelmintic studies on *Ochrocarpus longifolius*. *Planta Med*. 1976 Feb;29(1):98–100.
99. Santulli G. Epidemiology of cardiovascular disease in the 21st century: Updated updated numbers and updated facts. *J Cardiovasc Dis Res*. 2013;1(1).
100. Asgary S, Rastqar A, Keshvari M. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. *J Am Coll Nutr*. 2018 Jul;37(5):429–55.
101. Enkhmaa B, Surampudi P, Anuurad E, Berglund L. Lifestyle Changes: Effect of Diet, Exercise, Functional Food, and Obesity Treatment on Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. South Dartmouth (MA); 2000.
102. Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM. In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *J Agric Food Chem*. 2007 Feb;55(4):1491–500.
103. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001 Sep;158(1):195–8.
104. Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger M, Bell M, et al. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2009 Oct;104(7):936–42.
105. Ćurić ŽB, Masle AM, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Stupin A, Mihaljević Z, et al. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome-A Randomized Study. *Biology (Basel)*. 2021 Aug;10(8).
106. Kolobarić N, Drenjančević I, Matić A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Mihalj M. Dietary Intake of n-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults-A Randomised Study. *Nutrients*. 2021 May;13(6).

107. Brouns F, Nieuwenhoven M van, Jeukendrup A, Marken Lichtenbelt W van. Functional foods and food supplements for athletes: from myths to benefit claims substantiation through the study of selected biomarkers. *Br J Nutr.* 2002 Nov;88 Suppl 2:S177-86.
108. Grubic TJ, Sowinski RJ, Nevares BE, Jenkins VM, Williamson SL, Reyes AG, et al. Comparison of ingesting a food bar containing whey protein and isomalto-oligosaccharides to carbohydrate on performance and recovery from an acute bout of resistance-exercise and sprint conditioning: an open label, randomized, counterbalanced, crossover . *J Int Soc Sports Nutr.* 2019 Aug;16(1):34.
109. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Matić A, et al. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Prev Nutr food Sci.* 2021 Dec;26(4):388–99.
110. Drenjančević I, Kralik G, Kralik Z, Mihalj M, Stupin A, Novak S, et al. The Effect of Dietary Intake of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health: Revealing Potentials of Functional Food Provisional chapter Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health: Revealing Potentials of Functional Food. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/67033>
111. 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 [¹³C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br J Nutr.* 2003 Aug;90(2):311–21.
112. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr.* 1991 Sep;54(3):438–63.
113. 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 Feb;59(2):271–5.
114. Simopoulos AP. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients.* 2016 Mar;8(3):128.
115. Kipp AP, Strohm D, Brigelius-Flohé R, Schomburg L, Bechthold A, Leschik-Bonnet E, et al. Revised reference values for selenium intake. *J trace Elem Med Biol organ Soc Miner Trace Elem.* 2015 Oct;32:195–9.
116. Zhao J, Xing H, Liu C, Zhang Z, Xu S. Effect of Selenium Deficiency on Nitric Oxide and Heat Shock Proteins in Chicken Erythrocytes. *Biol Trace Elem Res.* 2016 May;171(1):208–13.
117. Endo J, Arita M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Cardiol.* 2016 Jan;67(1):22–7.
118. 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 Mar;27(3):191–200.
119. 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(5):357–68.
120. 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 Dec;80(24):2269–85.
 121. Shahidi F. Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. *J Food Sci* [Internet]. 2006;69:146–9. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85326344>
 122. 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(11):1–20.
 123. 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 Oct;12(10).
 124. 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 Apr;15(2):137–59.
 125. Hasler CM. Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health. *J Nutr*. 2002 Dec;132(12):3772–81.
 126. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. *Nutrition*. 1999 Mar;15(3):255.
 127. Combs GFJ. Selenium in global food systems. *Br J Nutr*. 2001 May;85(5):517–47.
 128. Ruseva B, Atanasova M, Georgieva M, Shumkov N, Laleva P. Effects of selenium on the vessel walls and anti-elastin antibodies in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012 Feb;237(2):160–6.
 129. Forgione MA, Weiss N, Heydrick S, Cap A, Klings ES, Bierl C, et al. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Apr;282(4):H1255–61.
 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. *N Engl J Med*. 2003 Oct;349(17):1605–13.
 131. Bentley-Hewitt KL, Chen RK-Y, Lill RE, Hedderley DI, Herath TD, Matich AJ, et al. Consumption of selenium-enriched broccoli increases cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated ex vivo, a preliminary human intervention study. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Dec;58(12):2350–7.
 132. Mahmoodpoor A, Hamishehkar H, Shadvar K, Ostadi Z, Sanaie S, Saghaleini SH, et al. The Effect of Intravenous Selenium on Oxidative Stress in Critically Ill Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Immunol Invest*. 2019 Feb;48(2):147–59.
 133. Brigelius-Flohé R, Banning A, Schnurr K. Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxid Redox Signal*. 2003 Apr;5(2):205–15.
 134. Calvo MM. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(7–8):671–96.

135. Khachik F, Spangler CJ, Smith JCJ, Canfield LM, Steck A, Pfander H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem*. 1997 May;69(10):1873–81.
136. Alves-Rodrigues A, Shao A. The science behind lutein. *Toxicol Lett*. 2004 Apr;150(1):57–83.
137. Ahn YJ, Kim H. Lutein as a Modulator of Oxidative Stress-Mediated Inflammatory Diseases. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021 Sep;10(9).
138. Torregrosa-Crespo J, Montero Z, Fuentes JL, Reig García-Galbis M, Garbayo I, Vilchez C, et al. Exploring the Valuable Carotenoids for the Large-Scale Production by Marine Microorganisms. *Mar Drugs*. 2018 Jun;16(6).
139. Zhang H, Yang W, Li Y, Hu L, Dai Y, Chen J, et al. Astaxanthin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2018 Mar;56:18–28.
140. Sung JH, Jo YS, Kim SJ, Ryu JS, Kim MC, Ko HJ, et al. Effect of Lutein on L-NAME-Induced Hypertensive Rats. *Korean J Physiol Pharmacol Off J Korean Physiol Soc Korean Soc Pharmacol*. 2013 Aug;17(4):339–45.
141. Dwyer JH, Navab M, Dwyer KM, Hassan K, Sun P, Shircore A, et al. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation*. 2001 Jun;103(24):2922–7.
142. Zou Z, Xu X, Huang Y, Xiao X, Ma L, Sun T, et al. High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: the Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis*. 2011 Dec;219(2):789–93.
143. 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.
144. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res*. 1999 Jul;38(4):309–36.
145. Jargar JG, Dhundasi SA, Puneekar MD. Status of α -tocopherol concentration and oxidative stress in infertile females of Vijayapur district, Northern Karnataka. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*. 2017;7(10):1045–9.
146. De la Fuente M, Hernanz A, Guayerbas N, Victor VM, Arnalich F. Vitamin E ingestion improves several immune functions in elderly men and women. *Free Radic Res*. 2008 Mar;42(3):272–80.
147. Heitzer T, Ylä Herttuala S, Wild E, Luoma J, Drexler H. Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Feb;33(2):499–505.
148. Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CC, Elton RA, Gey KF, Oliver MF. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene. *Lancet* (London, England). 1991 Jan;337(8732):1–5.
149. Huang J, Weinstein SJ, Yu K, Männistö S, Albanes D. Relationship Between Serum Alpha-Tocopherol and Overall and Cause-Specific Mortality. *Circ Res*. 2019 Jun;125(1):29–40.
150. Wang T, Xu L. Circulating Vitamin E Levels and Risk of Coronary Artery Disease and

- Myocardial Infarction: A Mendelian Randomization Study. *Nutrients*. 2019 Sep;11(9).
151. Ziegler M, Wallert M, Lorkowski S, Peter K. Cardiovascular and metabolic protection by vitamin E: A matter of treatment strategy? *Antioxidants*. 2020;9(10):1–40.
 152. Kralik Z, Kralik G, Košević M, Galović O SM. Natural Multi-Enriched Eggs with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Vitamin E, and Lutein. *Anim* [Internet]. 2023;13(2):321.
 153. Barić L, Drenjančević I, Matić A, Stupin M, Kolar L, Mihaljević Z, et al. Seven-Day Salt Loading Impairs Microvascular Endothelium-Dependent Vasodilation without Changes in Blood Pressure, Body Composition and Fluid Status in Healthy Young Humans. *Kidney Blood Press Res*. 2019;44(4):835–47.
 154. Šušnjara P, Kolobarić N, Matić A, Mihaljević Z, Stupin A, Marci S, et al. Consumption of Hen Eggs Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Vitamin E and Lutein Incites Anti-Inflammatory Conditions in Young, Healthy Participants — A Randomized Study. *Front Biosci - Landmark*. 2022;27(12).
 155. 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.
 156. 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(1):79–83.
 157. Leeson S, Caston L. Enrichment of eggs with lutein. *Poult Sci*. 2004 Oct;83(10):1709–12.
 158. Cracowski J-L, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Sep;27(9):503–8.
 159. 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(4–5):432–42.
 160. 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(24):5313–24.
 161. Lenasi H, Strucl M. The effect of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition on cutaneous microvascular reactivity. *Eur J Appl Physiol*. 2008 Aug;103(6):719–26.
 162. Hahn AG, Bourdon PC, Rebecca K Tanner. *Physiological Tests for Elite Athletes*. 2000. pp. 311-326.
 163. Borg G. Borg's perceived exertion and pain scales. Borg's perceived exertion and pain scales. Champaign, IL, US: Human Kinetics; 1998. viii, 104–viii, 104.
 164. Chen MJ, Fan X, Moe ST. Criterion-related validity of the Borg ratings of perceived exertion scale in healthy individuals: a meta-analysis. *J Sports Sci*. 2002 Nov;20(11):873–99.
 165. Mihaljević Z, Matić 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.
166. Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc*. 2013 Feb;2(1):e004473.
 167. Zhang X, Ritonja JA, Zhou N, Chen BE, Li X. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Intake and Blood Pressure: A Dose-Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*. 2022 Jun;11(11):e025071.
 168. Jain AP, Aggarwal KK, Zhang P-Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(3):441–5.
 169. 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 Mar;112(4):298–304.
 170. Gammone MA, Riccioni G, D’Orazio N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr Res*. 2015;59:26762.
 171. Gordon B, Chen S, Durstine JL. The effects of exercise training on the traditional lipid profile and beyond. *Curr Sports Med Rep*. 2014;13(4):253–9.
 172. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 2002 Nov;347(19):1483–92.
 173. 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 Jun;14:53.
 174. Ranard KM, Jeon S, Mohn ES, Griffiths JC, Johnson EJ, Erdman JWJ. Dietary guidance for lutein: consideration for intake recommendations is scientifically supported. *Eur J Nutr*. 2017 Dec;56(Suppl 3):37–42.
 175. Zhao R, Han X, Zhang H, Liu J, Zhang M, Zhao W, et al. Association of vitamin E intake in diet and supplements with risk of dementia: A meta-analysis. Vol. 14, *Frontiers in aging neuroscience*. Switzerland; 2022. p. 955878.
 176. Pandya JK, DeBonne M, Corradini MG, Camire ME, McClements DJ, Kinchla AJ. Development of vitamin E-enriched functional foods: stability of tocotrienols in food systems. *Int J Food Sci & Technol* [Internet]. 2019; Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:203410752>
 177. Żebrowska A, Mizia-Stec K, Mizia M, Gąsior Z, Poprzęcki S. Omega-3 fatty acids supplementation improves endothelial function and maximal oxygen uptake in endurance-trained athletes. *Eur J Sport Sci*. 2015;15(4):305–14.
 178. Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Glaser R. Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun*. 2011 Nov;25(8):1725–34.
 179. Vijay A, Astbury S, Le Roy C, Spector TD, Valdes AM. The prebiotic effects of omega-3 fatty acid supplementation: A six-week randomised intervention trial. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1–11.

180. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008 Mar;47(2):147–55.
181. Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck W-H. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep.* 2010;62(3):536–47.
182. Padilla J, Simmons GH, Bender SB, Arce-Esquivel AA, Whyte JJ, Laughlin MH. Vascular effects of exercise: endothelial adaptations beyond active muscle beds. *Physiology (Bethesda).* 2011;26(3):132–45.
183. Lenasi H, Struel M. Effect of Regular Physical Training on Cutaneous Microvascular Reactivity. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(4):606–12.
184. Johnson JM, Proppe DW. Cardiovascular Adjustments to Heat Stress. *Suppl 14 Handb Physiol Environ Physiol.* 2011;
185. Dangardt F, Osika W, Chen Y, Nilsson U, Gan L-M, Gronowitz E, et al. Omega-3 fatty acid supplementation improves vascular function and reduces inflammation in obese adolescents. *Atherosclerosis.* 2010 Oct;212(2):580–5.
186. Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med.* 2003 Oct;35(7):772–81.
187. Zaloga GP. Narrative Review of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation upon Immune Functions, Resolution Molecules and Lipid Peroxidation. *Nutrients.* 2021 Feb;13(2).
188. Vasil'ev AP, Strel'tsova 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(4):37–41.
189. Stupin A, Cosic A, Novak S, Vesel M, Jukic I, Popovic B, et al. Reduced Dietary Selenium Impairs Vascular Function by Increasing Oxidative Stress in Sprague-Dawley Rat Aortas. *Int J Environ Res Public Health.* 2017 Jun;14(6).
190. Zapletal C, Heyne S, Breikreutz R, Gebhard M-M, Golling M. The influence of selenium substitution on microcirculation and glutathione metabolism after warm liver ischemia/reperfusion in a rat model. *Microvasc Res.* 2008 Aug;76(2):104–9.
191. 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(3).
192. Plantinga Y, Ghiadoni L, Magagna A, Giannarelli C, Franzoni F, Taddei S, et al. Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2007 Apr;20(4):392–7.
193. 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. *Pharmacol Res.* 2019 Nov;149:104477.

194. Barbeau PA, Holloway TM, Whitfield J, Baechler BL, Quadrilatero J, van Loon LJC, et al. α -Linolenic acid and exercise training independently, and additively, decrease blood pressure and prevent diastolic dysfunction in obese Zucker rats. *J Physiol.* 2017;595(13):4351–64.
195. Diego Fernández-Lázaro, Cesar I. Fernandez-Lazaro, Juan Mielgo-Ayuso, Lourdes Jiménez Navascués ACM and JS-C. The Role of Selenium Mineral Trace Element in. *Nutrients.* 2020;16.
196. Margaritis I, Rousseau A-S, Hininger I, Palazzetti S, Arnaud J, Roussel A-M. Increase in selenium requirements with physical activity loads in well-trained athletes is not linear. *Biofactors.* 2005;23(1):45–55.
197. Sackeck JM, Decker EA, Clarkson PM. The effect of diet on vitamin E intake and oxidative stress in response to acute exercise in female athletes. *Eur J Appl Physiol.* 2000;83(1):40–6.
198. Takanami Y, Iwane H, Kawai Y, Shimomitsu T. Vitamin E supplementation and endurance exercise: Are there benefits? *Sport Med.* 2000;29(2):73–83.
199. Dawson EA, Green DJ, Cable NT, Thijssen DHJ. Effects of acute exercise on flow-mediated dilatation in healthy humans. *J Appl Physiol.* 2013;115(11):1589–98.
200. Birk GK, Dawson EA, Batterham AM, Atkinson G, Cable T, Thijssen DHJ, et al. Effects of exercise intensity on flow mediated dilation in healthy humans. *Int J Sports Med.* 2013;34(5):409–14.
201. Bloomer RJ, Cole BJ. Relationship Between Blood Lactate and Oxidative Stress Biomarkers Following Acute Exercise. *Open Sport Med J.* 2009;3(1):44–8.
202. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312–22.
203. Mattioli S, Collodel G, Signorini C, Cotozzolo E, Noto D, Cerretani D, et al. Tissue antioxidant status and lipid peroxidation are related to dietary intake of n-3 polyunsaturated acids: A rabbit model. *Antioxidants.* 2021;10(5).
204. Umesha SS, Naidu KA. Antioxidants and antioxidant enzymes status of rats fed on n-3 PUFA rich Garden cress (*Lepidium Sativum L*) seed oil and its blended oils. *J Food Sci Technol.* 2015 Apr;52(4):1993–2002.
205. Toorang F, Djazayery A, Djalali M. Effects of Omega-3 Fatty Acids Supplement on Antioxidant Enzymes Activity in Type 2 Diabetic Patients. *Iran J Public Health.* 2016 Mar;45(3):340–5.
206. 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 Nov;11(11).
207. 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 Aug;18(1):310.
208. Buonocore D, Verri M, Giolitto A, Doria E, Ghitti M, Dossena M. Effect of 8-week n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress and inflammation in middle- and long-distance running athletes: a pilot study. *J Int Soc Sports Nutr.* 2020 Nov;17(1):55.

209. Capó X, Martorell M, Sureda A, Llompart I, Tur JA, Pons A. Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells. *Eur J Nutr.* 2015;54(1):35–49.
210. Capó X, Martorell M, Busquets-Cortés C, Sureda A, Riera J, Drobic F, et al. Effects of dietary almond- and olive oil-based docosahexaenoic acid- and Vitamin E-enriched beverage supplementation on athletic performance and oxidative stress markers. *Food Funct.* 2016;7(12):4920–34.
211. Drăgan I, Ploeșteanu E, Cristea E, Mohora M, Dinu V, Troescu VS. Studies on selenium in top athletes. *Physiol.* 1988;25(4):187–90.
212. Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(2):234–9.
213. Filaire E, Massart A, Portier H, Rouveix M, Rosado F, Bage AS, et al. Effect of 6 Weeks of n-3 fatty-acid supplementation on oxidative stress in Judo athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2010 Dec;20(6):496–506.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Luka Kolar, dr.med.

Datum rođenja: 22. srpnja 1994.

Email adresa: lukakolar.vu@gmail.com

Radno iskustvo:

- 2019. – u tijeku
specijalizant kardiologije u Nacionalnoj memorijalnoj bolnici „dr. Juraj Njavro“
Vukovar

Obrazovanje:

- 2019. – u tijeku
Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet
Osijek, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer Osijek
- 2013. – 2019. – Osijek, Hrvatska
Integrirani diplomski studij Medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josip
Juraj Strossmayer Osijek

Osobne vještine i kompetencije:

- materinji jezik: hrvatski
- ostalo: engleski
- vozačka dozvola: B kategorija
- poznavanje računalnih /informatičkih programa: Microsoft Office (Word, Excel, Power Point), SigmaPlot 11.2,

Tehničke vještine i kompetencije:

- kliničke metode: mjerenje vaskularne reaktivnosti mikrocirkulacije kože (engl. LDF - Laser Doppler Flowmetry), test opterećenja miokarda (ergometrijsko testiranje)

Priznanja i nagrade:

- 2018. - Dekanova nagrada za izvannastavne aktivnosti ostvarene u akademskoj godini 2017./2018. koje su pridonijele ugledu Fakulteta na području znanosti i sporta.

Publikacije:

Radovi u časopisima – Znanstveni i pregledni radovi (7)

1. **Kolar, Luka**, Petar Šušnjara, Marko Stupin, Ana Stupin, Ivana Jukić, Zrinka Mihaljević, Nikolina Kolobarić, Iva Bebek, Diana Nejašmić, Marija Lovrić, and et al. 2023. "Enhanced Microvascular Adaptation to Acute Physical Stress and Reduced Oxidative Stress in Male Athletes Who Consumed Chicken Eggs Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Antioxidants—Randomized Clinical Trial" *Life* 13, no. 11: 2140. <https://doi.org/10.3390/life13112140>
2. **Kolar, Luka**; Stupin, Marko; Stupin, Ana; Šušnjara, Petar; Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Jukić, Ivana; Kolobarić, Nikolina; Drenjančević, Ines. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs?. // *Preventive Nutrition and Food Science*, 26 (2021), 4; 388-399 doi:10.3746/pnf.2021.26.4.388 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
3. Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Kolobarić, Nikolina; Šušnjara, Petar; **Kolar, Luka**; Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Stupin, Marko; Jukić, Ivana; Kralik, Zlata et al. Anti-inflammatory potential of n-3 polyunsaturated fatty acids enriched hen eggs consumption in improving microvascular endothelial function of healthy individuals - clinical trial. // *International journal of molecular sciences*, 21 (2020), 11; 4149, 20 doi:.org/10.3390/ijms21114149 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
4. Barić, Lidija; Drenjančević, Ines; Mihalj, Martina; Matić, Anita; Stupin, Marko; **Kolar, Luka**; Mihaljević, Zrinka; Mrakovčić-Šutić, Ines; Šerić, Vatroslav; Stupin, Ana. Enhanced antioxidative defense by vitamins C and E consumption prevents 7-day high-salt diet-induced microvascular endothelial function impairment in young healthy individuals. // *Journal of clinical medicine*, 9 (2020), 3; 843-852 doi:10.3390/jcm9030843 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
5. Barić, Lidija; Drenjančević, Ines; Matić, Anita; Stupin, Marko; **Kolar, Luka**; Mihaljević, Zrinka; Lenasi, Helena; Šerić, Vatroslav; Stupin, Ana. 7-day Salt Loading Impairs Microvascular Endothelium-Dependent Vasodilation Without Changes in Blood Pressure, Body Composition and Fluid Status in Healthy Young Humans. // *Kidney & blood pressure research*, 44 (2019), 4; 835-847 doi:10.1159/000501747 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
6. Stupin, Ana; Stupin, Marko; Barić, Lidija; Matić, Anita; **Kolar, Luka**; Drenjančević, Ines. Sex-Related Differences in Forearm Skin Microvascular Reactivity of Young

Healthy Subjects. // *Clinical hemorheology and microcirculation*, 72 (2019), 4; 339-351 doi:10.3233/CH-180483 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

7. Stupin, Marko; Stupin, Ana; Rašić, Lidija; Čosić, Anita; **Kolar, Luka**; Šerić, Vatroslav; Lenasi, Helena; Ižaković, Krešimir; Drenjančević, Ines. Acute exhaustive rowing exercise reduces skin microvascular dilator function in young adult rowing athletes. // *European journal of applied physiology*, 118 (2018), 2; 461-474 doi:10.1007/s00421-017-3790-y (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

Sažeci sa skupova - Sažeci u zbornicima i časopisima (20)

1. Drenjančević, Ines; **Kolar, Luka**; Stupin, Marko, Stupin, Ana; Šušnjara, Petar; Kolobarić, Nikolina; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana. Antioxidants supplementation in a form of functional food enhances oxidative status of competitive athletes. // *Acta Physiologica September 2022, Volume 236, Supplement 725- Europhysiology 2022 Book of Abstracts Kopenhagen, Danska, 2022. str. 724-725* (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
2. **Kolar, Luka**; Stupin, Marko; Šušnjara, Petar; Stupin, Ana; Drenjančević, Ines. Functional Food Enriched in N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Lutein and Vitamin E Enhances Microvascular Endothelial Function of Competitive Athletes. // *Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e205* Atena, Grčka, 2022. str. e205-e205 doi:10.1097/01.hjh.0000837532.16494.77 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Šušnjara, Petar; Kolobarić, Nikolina; **Kolar, Luka**; Masle, Ana Marija; Breškić Čurić, Željka; Kozina, Nataša; Jukić, Ivana; Stupin, Marko et al. Does Functional Food Provide Benefits for Cardiovascular Health? Ongoing Studies in Scientific Centre of Excellence. // *Journal of Hypertension: June 2022 - Volume 40 - Issue Suppl 1 - p e206* Atena, Grčka, 2022. str. e206-e206 doi:10.1097/01.hjh.0000837544.05525.4c (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. Stupin, Ana; Jukić, Ivana; **Kolar, Luka**; Stupin, Marko; Šušnjara, Petar; Matić, Anita; Kolobarić, Nikolina; Mihaljević, Zrinka; Drenjančević, Ines. Does the endothelium of competitive athletes benefit from the consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs? – Paper presentation. // *Science 4 Health Book of Abstracts Opatija, Hrvatska, 2021. str. 27-27* (poster, recenziran, sažetak, znanstveni)

5. Barić, Lidija; Drenjančević, Ines; Matić, Anita; Šušnjara, Petar; Stupin, Marko; Kolobarić, Nikolina; **Kolar, Luka**; Mihaljević, Zrinka; Stupin, Ana. The effect of 7-day high-salt diet on serum antioxidant enzymes protein concentrations: does antioxidant vitamins supplementation matter?. // ESH-ISH 2021 Abstract Book online, 2021. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
6. Stupin, Marko; **Kolar, Luka**; Stupin, Ana; Jukić, Ivana; Šušnjara, Petar; Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Drenjančević, Ines. n-3 polyunsaturated fatty acids enriched hen eggs consumption enhances microvascular endothelial function in professional athletes. // ESH-ISH 2021 Abstract Book online, 2021. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
7. Jukić, Ivana; Stupin, Ana; **Kolar, Luka**; Perić, Leon; Vincetić, Ivo; Šušnjara, Petar; Jelaković, Ana; Dika, Živka; Karanović, Sandra; Matašin, Marija et al. Assessment of microvascular reactivity in randomly selected adult population EHUH study Croatian scientific foundation. // Journal of hypertension, 39 (2021), Suppl 1 online, 2021. str. e328-e328 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
8. Stupin, Ana; Drenjančević, Ines; Barić, Lidija; Matić, Anita; Šušnjara, Petar; Stupin, Marko; Kolobarić, Nikolina; **Kolar, Luka**; Mihaljević, Zrinka. Vitamins C and E supplementation during 7-day high-salt intake prevents impairment of microvascular endothelium-dependent vasodilation in young healthy individuals. // The 14th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation „Homeostasis – From Cell to Organ“ - Abstract Book online, 2020. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
9. Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Kolobarić, Nikolina; Šušnjara, Petar; **Kolar, Luka**; Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Stupin, Marko; Jukić, Ivana; Kralik, Zlata et al. Original research article presentation: anti-inflammatory potential of n-3 polyunsaturated fatty acids enriched hen eggs consumption in improving microvascular endothelial function of healthy individuals-clinical trial. // Round Table: Why to consume functional food? Osijek, Hrvatska, 2020. (pozvano predavanje, sažetak, znanstveni)
10. **Kolar, Luka**; Stupin, Marko; Stupin, Ana; Matić, Anita; Šušnjara, Petar; Barić, Lidija; Mihaljević, Zrinka; Drenjančević, Ines. Can n-3 PUFA Functional Food Affect Healthy Endothelium in Athletes?. // 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation - Abstract Book Osijek, Hrvatska, 2019. str. O7-/ (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

11. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Matic, Anita; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Jukić, Ivana; Kozina, Nataša; Rašić, Lidija; **Kolar, Luka**; Kolobarić, Nikolina, Šušnjara, Petar; Stupin, Marko Is oxidative stress a link between harmful effects of high NaCl intake and veneficiary effects of N-3 PUFAs intake on microcirculation in normotensive subjects?. // European SOciety for Vascular Medicine Contress 2019, International Union of ANgiology- EUrochap 2019, Central European Vascular Forum- Course 2019, Programme with book of abstract Ljubljana, Slovenija, 2019. str. 35-35 (pozvano predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
12. Drenjancevic, Ines; Mihalj, Martina; Stupin, Ana; Matić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Kozina, Nataša; Rašić, Lidija; **Kolar, Luka**; Kolobarić, Nikolina et al. Functional food in cardiovascular protection- effects of n-3 polyunsaturated fatt acids. // 12 međunarodna znanstvena i stručna konferencija Hranom do zdravlja / Babić, Jurislav ; Šubarić, Drago ; Jašić, Midhat (ur.). Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Tehnološki fakutlet Univerziteta u Tuzli, 2019. str. 56-56 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
13. Matić, Anita; Kolobarić, Nikolina; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka, Stupin, Marko; **Kolar, Luka**; Barić, Lidija; Mihalj, Martina; Jukić, Ivana; Drenjančević, Ines. POSITIVE EFFECT OF n-3 PUFA ON THE LEVEL OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY RESPONSE. // Book of Abstracts of the 12th International Scientific and Professional Conference WITH FOOD TO HEALTH Osijek, Hrvatska; Tuzla, Bosna i Hercegovina, 2019. str. 70-70 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
14. **Kolar, Luka**; Drenjančević, Ines; Barić, Lidija; Stupin, Marko; Matić, Anita; Debeljak, Željko; Stupin, Ana. Changes in the autonomic nervous system during high-salt loading in young healthy individuals. // RECOOP Student Conference 2019 Abstract Book Bratislava, Slovačka, 2019. str. /-/ (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
15. Barić, Lidija; Drenjančević, Ines; Matić, Anita; Stupin, Marko; **Kolar, Luka**; Stupin, Ana. The interplay of oxidative stress and microvascular endothelial function impairment during short-term high-salt loading in young healthy individuals. // 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation - Abstract Book Osijek, Hrvatska, 2019. str. O2-/ (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

16. Stupin, Marko; Drenjančević, Ines; **Kolar, Luka**; Barić, Lidija; Matić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Stupin, Ana Antioxidant Vitamins Supplementation During 7-Days High-Salt Diet Prevents Impairment of Microvascular Reactivity in Response to Vascular Occlusion in Young Healthy Individuals. // *Journal of Hypertension* 37 (Supplement 1) Milano, Italija, 2019. str. e70-e71
doi:10.1097/01.hjh.0000571064.93010.3f (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
17. Stupin, Marko; Stupin, Ana; Rašić, Lidija; Matić, Anita; **Kolar, Luka**; Mihaljević, Zrinka; Drenjančević, Ines Is There a Sex-Related Difference in Endothelium-Dependent Microvascular Response to Acute Salt Loading in Young Healthy Individuals?. // *Journal of Hypertension Vol 36, e-Supplement 1 - ESH 2018 Abstract Book* Barcelona, Španjolska, 2018. str. e195-e196
doi:10.1097/01.hjh.0000539542.63039.bb (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
18. **Kolar, Luka**; Stupin, Marko; Stupin, Ana; Drenjančević, Ines What can we do to prevent athlete's sudden death?. // *23rd International Student Congress on Sport Sciences (ISCSS) - Abstract Book / Koller, Akos (ur.)*. Budimpešta, 2018. str. 33-34 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, stručni)
19. Stupin, Marko; **Kolar, Luka**; Stupin, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; Drenjančević Ines Povoljan kardiovaskularni učinak redovitog vježbanja nije vezan isključivo uz "tradicionalne" čimbenike rizika. // *Cardiologia Croatica* 3(12) / Ivanuša, Mario (ur.). Poreč, Hrvatska, 2017. str. 56-56 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
20. Stupin, Marko; Stupin, Ana; Rašić, Lidija; Ćosić, Anita; **Kolar, Luka**; Lenasi, Helena; Drenjančević, Ines Acute exhausting exercise session affects endothelium-dependent, but not endothelium-independent vasodilation in professional rowers. // *Acta Physiologica* 221, S713, 1-290 Beč, Austrija, 2017. str. 74 (A02-5) (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Druga sudjelovanja na skupovima (I)

1. Drenjančević, Ines; **Kolar, Luka**; Stupin, Marko; Stupin, Ana; Šušnjara, Petar; Jukić, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Kolobarić, Nikolina. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in athletes consuming functional food enriched with n-3 PUFAs, lutein, selenium and vitamin E. // *8th International Scientific Meeting "Physiotherapy in*

sport, recreation and wellness“ in Vukovar Vukovar, Hrvatska, 2022. (predavanje, recenziran, neobjavljeni rad, znanstveni)

Ocjenski radovi - Diplomski radovi (1)

1. **Kolar, Luka** Utjecaj kratkotrajnog velikog unosa soli na varijabilnost srčanog ritma u zdravih mladih muškaraca., 2019., diplomski rad, diplomski, Medicinski fakultet Osijek, Osijek