

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Sveučilište u Dubrovniku**  
**Institut Ruđer Bošković**  
**Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti**

**Željka Breškić Ćurić**

**ENDOTELNA FUNKCIJA I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR  
UZROKOVAN KONZUMACIJOM JAJA OBOGAĆENIH N-3  
POLINEZASIĆENIM MASNIM KISELINAMA, VITAMINOM E,  
SELENIJEM I LUTEINOM KOD KRONIČNOG KORONARNOG  
SINDROMA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Sveučilište u Dubrovniku  
Institut Ruđer Bošković  
Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

**Znanstveno područje:** Interdisciplinarno područje znanosti  
**Znanstvena polja:** biologija, temeljne medicinske znanosti

### ENDOTELNA FUNKCIJA I ANTIOKSIDATIVNI ODGOVOR UZROKOVAN KONZUMACIJOM JAJA OBOGAĆENIH N-3 POLINEZASIĆENIM MASNIM KISELINAMA, VITAMINOM E, SELENIJEM I LUTEINOM KOD KRONIČNOG KORONARNOG SINDROMA

Željka Breškić Ćurić

Doktorski rad je izrađen u: Medicinski fakultet Osijek

**Mentor/i:** Prof. dr. sc. Kristina Selthofer – Relatić, dr. med.  
Izv. prof.dr. sc. Ana Stupin, dr. med.

**Kratki sažetak doktorskog rada:** 30 ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom podijeljenih u dvije grupe konzumiralo je nutritivno obogaćena jaja ili obična kokošja jaja kroz 3 tjedna. Nakon konzumacije obogaćenih jaja zabilježeno je smanjenje serumske koncentracije triglicerida, poboljšala se o endotelu ovisna mikro- i makrovaskularna funkcija, a smanjila se koncentracija IL-17A i TGF-1 $\beta$  u odnosu na bazalno mjerenje, dok se navedeni parametri nisu mijenjali u kontrolnoj grupi. Konzumacija obogaćenih jaja ima blagotvorne učinke u kroničnom koronarnom sindromu.

**Broj stranica:** 108

**Broj slika:** 8

**Broj tablica:** 10

**Broj literaturnih navoda:** 206

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** obogaćena jaja, n-3 PUFA, vitamin E, selenij, mikrovaskularna funkcija, makrovaskularna funkcija, citokini, oksidativni stres

**Datum javne obrane:**

**Povjerenstvo za javnu obranu:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

**Doktorski rad je pohranjen u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
University of Dubrovnik  
Ruđer Bošković Institute  
Doctoral Study of Molecular biosciences**

**PhD thesis**

**Scientific Area:** Interdisciplinary area of science  
**Scientific Fields:** biology, basic medical sciences

### **ENDOTHELIAL FUNCTION AND ANTIOXIDATIVE RESPONSE CAUSED BY CONSUMPTION OF EGGS ENRICHED IN N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, VITAMIN E, SELENIUM AND LUTEIN IN CHRONIC CORONARY SYNDROM**

Željka Breškić Ćurić

**Thesis performed at: Faculty of Medicine Osijek**

**Supervisor/s: prof. dr. sc. Kristina Selthofer – Relatić, dr.med.  
Prof.dr. sc. Ana Stupin, dr.med.**

**Short abstract:** 30 subjects with chronic coronary syndrome divided into two groups consumed enriched eggs or ordinary chicken eggs for 3 weeks. After the consumption of enriched eggs, a decrease in the serum concentration of triglycerides was recorded, endothelium-dependent micro- and macrovascular function improved, and the concentration of IL-17A and TGF-1 $\beta$  decreased compared to the basal measurement, while the mentioned parameters did not change in the control group. Consumption of enriched eggs has beneficial effects in chronic coronary syndrome.

**Number of pages: 108**

**Number of figures: 8**

**Number of tables: 10**

**Number of references: 206**

**Original in: Croatian**

**Key words:** enriched eggs, n-3 PUFA, vitamin E, selenium, microvascular function, macrovascular function, citokines, oxidative stress

**Date of the thesis defense:**

**Reviewers:**

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Kristini Selthofer-Relatić koja je i prije ovog istraživanja bila uz mene i poticala moj znanstveni razvoj. Hvala na ukazanom povjerenju i suradnji te podršci kroz sve ove godine.*

*Iznimno sam zahvalna svojoj komentorici, prof.dr.sc. Ani Stupin na nesebičnom trudu, usmjeravanju i pomoći. Hvala na svakom savjetu i posvećenom vremenu.*

*Zahvaljujem svojoj studijskoj savjetnici, prof. dr.sc. Ines Drenjančević, a ujedno i voditeljici projekta u okviru kojega je rađeno istraživanje, na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju. Bez Vas izrada ove disertacije ne bi bila moguća.*

*Također se zahvaljujem i Brankici Juranić koja je bila velika pomoć i podrška prilikom provođenja istraživanja, kao i Petru Šušnjari na nesebičnoj pomoći u svakom trenutku. Hvala i svim drugim suradnicima koji su pridonjeli izradi ove disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem svom suprugu Dini na bezuvjetnoj i vječnoj podršci. Hvala za razumijevanje i beskrajno strpljenje. Bez tebe ovaj rad ne bi bio završen.*

*Ovaj rad posvećujem Emi i Nori.*

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

Istraživanje je provedeno na Zavodu za fiziologiju i imunologiju (Laboratorij za molekularnu i kliničku imunologiju i Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju) Medicinskog fakulteta u Osijeku, Hrvatska te na Zavodu za bolesti srca i krvnih žila Kliničkog bolničkog centra Osijek.



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

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

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Endotel i endotelna disfunkcija .....	1
1.2. Uloga oksidativnog stresa u nastanku ateroskleroze .....	3
1.3. Uloga upale u nastanku ateroskleroze .....	4
1.4. Ateroskleroza .....	6
1.5. Kronični koronarni sindrom .....	8
1.6. Liječenje kroničnog koronarnog sindroma .....	9
1.7. Funkcionalna hrana i uloga u prevenciji bolesti.....	10
1.8. n-3 polinezasićene masne kiseline (n-3 PUFA) .....	12
1.9. Vitamin E .....	15
1.10. Selenij.....	17
1.11. Lutein .....	18
1.12. Obogaćena kokošja jaja kao primjer funkcionalne hrane .....	19
<b>2. CILJ</b> .....	<b>21</b>
<b>3. HIPOTEZA</b> .....	<b>22</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>23</b>
4.1. Ispitanici .....	23
4.2. Protokol istraživanja.....	24
4.3. Proizvodnja funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja .....	25
4.4. Antropometrijska mjerenja i mjerenja krvnog tlaka .....	27
4.5. Profil slobodnih masnih kiselina, koncentracija vitamina E i selenija i luteina u serumu .....	27
4.5.1. Profil slobodnih masnih kiselina u serumu .....	27
4.6. Lipidni profil i biokemijske analize u serumu .....	29
4.7. O endotelu ovisna i o endotelu neovisna vaskularna reaktivnost u mikrocirkulaciji kože .....	29
4.8. Dilatacija posredovana protokom (eng. flow mediated dilatation, FMD) brahijalne arterije .....	32
4.9. Koncentracija eNOS, iNOS, nNOS.....	33
4.10. Mjerenje koncentracije pro- i anti-upalnih citokina i kemokina u serumu .....	33
4.11. Biljezi oksidativnog stresa i biljezi antioksidativnog odgovora.....	34
4.12. Statistička analiza.....	35
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>37</b>

5.1. Opće karakteristike ispitanika, antropometrijska mjerenja i mjerenja krvnog tlaka.....	37
5.2. Profil slobodnih masnih kiselina, koncentracija vitamina E, selenija i luteina u serumu .....	38
5.3. Lipidni profil i biokemijske analize u serumu .....	42
5.4. O endotelu ovisna i o endotelu neovisna vaskularna reaktivnost u mikrocirkulaciji kože .....	45
5.5. Dilatacija posredovana protokom (eng. flow mediated dilatation, FMD) brahijalne arterije. ....	47
5.6. Koncentracija eNOS, iNOS, nNOS.....	49
5.7. Mjerenje koncentracije pro- i protu-upalnih citokina i kemokina u serumu.....	51
5.8. Biljezi oksidativnog stresa i biomakeri antioksidativnog odgovora .....	52
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>54</b>
6.1. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na koncentraciju slobodnih masnih kiselina u serumu.....	54
6.2. Utjecaj konzumacije obogaćenih jaja na serumske koncentracije vitamina E, selenija i luteina u serumu .....	56
6.3. Konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom i njihov utjecaj na lipidni profil i biokemijske parametre. ....	59
6.4. Promjene mikrovaskularne i makrovaskularne funkcije .....	61
6.5. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na koncentracije izoformi dušik oksid sintetaze .....	63
6.6. Utjecaj konzumacije obogaćenih jaja na serumske koncentracije pro-upalnih i protu-upalnih citokina .....	65
6.7. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na razine oksidativnog stresa i antioksidativni odgovor.....	68
6.8. Ograničenja .....	70
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>71</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>72</b>
<b>9. SAŽETAK.....</b>	<b>92</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>93</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>94</b>

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

AA - arahidonska kiselina

ACE inhibitori - inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (*engl. angiotensin-converting enzyme inhibitors*)

ACh- acetilkolin

ALA -  $\alpha$ -linolenska kiselina

ALT - alanin transaminaza

ApoB - apolipoprotein B

ARB - blokatori angiotenzinskih receptora

AST - aspartate transaminaza

AUC - površina ispod krivulje (*engl. area under the curve*)

BH4 - tetrahydrobiopterin

CABG - aortokoronarno premoštenje (*engl. coronary artery bypass grafting*)

CAM - stanična adhezivna molekula (*engl. cell adhesion molecules*)

cAMP - ciklični adenzin monofosfat (*engl. cyclic adenosine monophosphate cAMP*)

CAT - katalaza

cGMP - ciklički gvanozin monofosfat

CNP - C-natriuretski peptid

CO - ugljikov monoksid

COX - ciklooksigenaza

CRP - C reaktivni protein

DBP - dijastolički krvni tlak (*engl. diastolic blood pressure*)

DHA – dokozaheksaenska kiselina

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

E – eritrociti

EDHF - hiperpolarizacijski čimbenici endotela (*engl. endothelial-derived hyperpolarizing factors*)

eNOS - endotelna dušik-oxid sintetaza

EPA - eikosapentatenska kiselina

ESC – Europsko kardiološko društvo

ET-1 - endotelin 1

FMD – o protoku ovisna vazodilatacija (*engl. flow mediated dilatation*)

FRAP - sposobnost plazme da reducira željezo (*engl. ferric ion reducing antioxidant power*)



GGT – gama glutamil transaminaza  
GM-CSF - čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga  
GPx - glutathion peroksidaza  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodikov peroksid  
H<sub>2</sub>S - vodikov sulfid  
HDL - lipoprotein visoke gustoće (*eng. high density lipoprotein*)  
Hgb - hemoglobin  
HMG-CoA - 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaza  
HR - puls (*eng. heart rate*)  
ICAM-1 - međustanična adhezijska molekula (*eng. intercellular cell adhesion molecule-1*)  
IL - interleukin  
INF $\gamma$  - interferon gamma  
iNOS - inducibilna dušik-oksidi sintetaza  
ITM - indeks tjelesne mase  
L - leukociti  
LA - Linoleična kiselina  
LDF - mjerenje protokola laser Dopplerom (*engl. Laser Doppler flowmetry*)  
LDL - lipoprotein male gustoće (*eng. low density lipoprotein*)  
LTB - leukotrijen  
MCP-1 - monocitni kemotaktični protein-1  
MDA - malondialdehid  
MMP - matriks metaloproteinaza  
MMP - matriksne metaloproteinaze  
MPO - mijeloperoksidaza  
MUFA - mononezasićene masne kiseline  
NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  
NF- $\kappa$ B - nuklearni čimbenik kapa B  
nNOS - neuronalna dušik-oksidi sintetaza  
NO - dušikov oksid  
NOS - dušik-oksidi sintetaza  
NOX - NADPH oksidaze  
oxLDL - oksidirani lipoprotein male gustoće  
PG - prostaglandin  
PGI-2 - prostaciklin

PON - paraoksonaza  
PORH - postokluzivna reaktivna hiperemija  
PU - perfuzijska jedinica (*eng. perfusion units*)  
PUFA - višestruko nezasićene masne kiseline (*eng. polyunsaturated fatty acids*)  
ROS - reaktivne kisikove vrste  
SBP - sistolički krvni tlak (*eng. systolic blood pressure*)  
sGC - topljiva gvanilat ciklaza  
SNP - natrijev nitroprusid  
SOD - superoksid dismutaza  
TBARS - reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline (*eng. thiobarbituric acid reactive substance assay*)  
TBX - tromboksan  
TGF -  $\beta 1$  – transformirajući čimbenik rasta (*eng. transforming growth factor beta*)  
TNF  $\alpha$  - tumor nekrotizirajući čimbenik alfa  
Trc - trombociti  
TXA2 - tromboksan  
VCAM - vaskularna stanična adhezijska molekula (*eng. vascular cell adhesion molecule*)  
VSMC - vaskularne glatke mišićne stanice (*eng. vascular smooth muscle cell*)  
WHR - omjer struka i bokova (*eng. waist to hip ratio*)  
ZCI- Znanstveni centar izvrsnosti

# 1. UVOD

## 1.1. Endotel i endotelna disfunkcija

Stijenka krvne žile sastoji se od tri sloja: intime koju čini endotel, medije koju čine vaskularni glatki mišići te adventicije koja sadrži živce i vezivno tkivo. Endotel čini jedan sloj endotelnih stanica koje oblažu unutarnji lumen svih krvnih žila u organizmu. On nije samo barijera između stijenke krvne žile i njezinog lumena, već izuzetno važan endokrini organ [1,2]. Endotel regulira čitav niz vaskularnih funkcija uključujući kontraktilnost glatkog mišićja, vazodilataciju ovisnu o endotelu, djeluje na upalu, oksidativni stres, sudjeluje u agregaciji trombocita, djeluje na sitenzu i ekspresiju citokina i adhezijskih molekula koje privlače upalne stanice i olakšavaju njihov ulazak u stijenku krvnih žila [3]. Najvažnija tvar koju proizvodi endotel je dušikov oksid (NO). Fiziološki poticaj za sintezu i otpuštanje NO-a iz endotela je naprezanje endotela uzrokovano protokom krvi kroz krvnu žilu. Određene tvari kao što su acetilkolin, histamin, bradikinin, norepinefrin i dr. također mogu povećati sintezu i oslobađanje NO-a iz endotela [3]. NO djeluje kao snažan vazodilator; nakon stvaranja u endotelu prolazi do glatkih mišića tunike medije krvne žile gdje stimulira topljivu gvanilat ciklazu (sGC) koja inducira stvaranje cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP), a on djeluje kao drugi glasnik koji aktivira svoje proteinske mete u stanici. Jedna od njih je protein kinaza G koja utječe na kalcijске kanale na membranama stanica koji imaju bitnu ulogu u kontrakciji mišića [4]. NO se stvara iz atoma dušika L-arginina i O<sub>2</sub>, a nastaje uz pomoć enzima dušik-oksida sintetaze (NOS) [5]. Kočimbenici koji su potrebni NOS-u su kisik, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) (3). Postoje tri izoforme ovog enzima: neuronalna (nNOS), endotelna (eNOS) i inducibilna (iNOS) dušik-oksida sintetaza [6]. eNOS je izoforma koja se nalazi u endotelnim stanicama i regulira vaskularnu funkciju te ima antiaterosklerotske učinke. I akutna i kronična povećanja protoka krvi i posljedično naprezanje stijenke krvne žile potiče ekspresiju i aktivnost eNOS-a, a time i otpuštanje NO [7]. Ekspresiju iNOS-a potiču citokini, a može se eksprimirati u gotovo svim vrstama stanica [8]. Uloga iNOS je kontroverzna, mnogi su istraživači opisali kako je njena povećana aktivacija povezana s bolestima kao što je ateroskleroza i kako iNOS može pridonijeti nastanku disfunkcije endotela. Drugi istraživači sugeriraju kako aktivnost iNOSa-a u patološkim uvjetima zapravo ima zaštitni mehanizam; u nedostatku eNOS-a upravo iNOS održava proizvodnju NO te na taj način ostvaruje pozitivne učinke [9]. nNOS je izoforma koja se nalazi u neuronima i bitna je za kontrolu neuronskih

funkcija, ali se isto tako nalazi i u endotelnim stanicama i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila i također je bitna za normalnu endotelnu funkciju [10].

Disfunkcija u proizvodnji i/ili bioraspoloživosti NO-a glavni je uzrok endotelne disfunkcije. Abnormalnosti u stvaranju NO-a uzrokuju endotelnu disfunkciju koja je temelj brojnih kardiovaskularnih poremećaja kao što je arterijska hipertenzija, ateroskleroza i bolesti povezane s angiogenezom [11]. Endotelnu disfunkciju karakterizira neravnoteža između vazodilatacije i vazokonstrikcije, porast upalnih čimbenika te povišena razina reaktivnih kisikovih vrsta, a posljedično i neravnoteža biodostupnosti NO-a. Endotelne stanice također reagiraju i na promjene u protoku krvi; stalan laminarni protok djeluje ateroprotektivno, dok turbulentni protok, npr. blizu grananja krvnih žila uzrokuje aktivaciju endotelnih stanica koje su onda manje učinkovite u postizanju vazodilatacije, se sprječavanju agregacije trombocita. Oslabljena ekspresija i aktivnost eNOS-a jedan je od mogućih uzroka endotelne disfunkcije. Nastanak endotelne disfunkcije povezan je s oksidativnim stresom te nastankom upale [12,13]. C reaktivni protein (CRP), jedan od reaktanata akutne faze, a koji nastaje u hepatocitima uslijed stimulacije citokinima kao što su IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , smanjuje stvaranje eNOS u endotelnim stanicama što onda smanjuje oslobađanje NO [14]. Reaktivne kisikove vrste (ROS), odnosno superoksidni anion djeluje na smanjenje bioraspoloživosti NO. Superoksidni anion reagira s NO te nastaje peroksinitrit koji onda potiče nitraciju proteina i uzrokuje disfunkciju i apoptozu endotelnih stanica [15]. Osim NO-a, postoje i brojne druge molekule koje sudjeluju u regulaciji vaskularnog tonusa. Jednu grupu vazodilatatora čine prostaglandini. Prostaglandini nastaju djelovanjem enzima ciklooksigenaze (COX) iz arahidonske kiseline. Jedan od prostaglandina, prostaciklin (PGI-2) nastaje u endotelu, djelujući preko adenil ciklaze u glatkim mišićnim stanicama, aktivira ciklični adenzin monofosfat/protein kinazu A (eng. cyclic adenosine monophosphate cAMP) koja reducira vaskularni tonus posredovan kalcijem. Osim prostaglandina, drugu grupu vazodilazatora čine hiperpolarizacijski čimbenici endotela (eng. endothelial-derived hyperpolarizing factors, EDHF). EDHF uzrokuju vazodilazaciju djelujući na kalijeve kanale i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu. U EDHF se ubraja vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ugljikov monoksid (CO), vodikov sulfid (H<sub>2</sub>S), C-natriuretski peptid (CNP), anandamid i sam kalijev ion [16].

S druge strane, endotel stvara i vazokonstriktore kao što je endotelin 1 (ET-1), angiotenzin II, tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) i druge. Ukoliko dođe do neravnoteže između vazodilatatora i vazokonstriktora koji nastaju u endotelnim stanicama dolazi do vazokonstrikcije, pojačanog prometa leukocita, nastanka upale te aktivacije koagulacijske kaskade i posljedične tromboze.

Upravo je pojačano stvaranje vazokonstriktora početni korak u nastanku arterijske hipertenzije što onda vodi u endotelnu disfunkciju i progresiju kardiovaskularnih bolesti [17].

## **1.2. Uloga oksidativnog stresa u nastanku ateroskleroze**

Oksidativni stres jedan je od uzroka nastanka aterogeneze. Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između antioksidativne sposobnosti te povećane količine ROS ili reaktivnih dušikovih vrsta. Ova neravnoteža uzrokuje oštećenje stanica izravnom oksidacijom staničnih proteina, lipida ili deoksiribonukleinske kiseline (eng. deoxyribonucleic acid, DNA), ili aktivacijom signalnih puteva stanične apoptoze [18]. Među ROS, prvi koji se stvara je superoksidni anion, a odgovaran je za formiranje ostalih ROS koji igraju ulogu u endotelu – vodikov peroksid, hidroksilni radikal i peroksinitrit. Superoksidni anion se stvara pomoću mitohondrijskog transportnog lanca elektrona, ali i pomoću NADPH oksidaze (NOX) i ksantin oksidaze [19]. ROS ima važnu ulogu u normalnom funkcioniranju stanica, ali njihova prekomjerna količina rezultira pojavom oksidativnog stresa [20]. Kod šećerne bolesti pokazano je kako je povećana proizvodnja ROS u mitohondrijima povezana s većom interakcijom polimorfonuklearnih leukocita s endotelnim stanicama, a što je jedan od koraka u nastanku oštećenja endotela. NOX su membranski vezani enzimatski kompleksi koji kataliziraju redukciju molekularnog kisika u superoksid. Postoji 7 različitih izoformi ovog enzima, među kojima NOX1, NOX2 i NOX4 imaju bitnu ulogu u nastanku endotelne disfunkcije [21]. ROS nastao ksantin oksidazom predstavlja važan izvor oksidativnog stresa kod ishemije. Povišene razine ROS mogu imati i pozitivne učinke, na primjer važni su u suzbijanju infekcija u makrofazima. Međutim, ukoliko je povećano stvaranje ROS i/ili je smanjen antioksidativni kapacitet, dolazi do stanja oksidativnog stresa [15]. ROS djeluju na lipidne membrane i uzrokuju stvaranje lipidnog peroksidnog radikala koji dalje uzrokuje lipidnu peroksidaciju membrana, smanjuje fluidnost a povećava permeabilnost membrana, što za posljedicu ima daljnje oštećenje stanice [18]. Osim toga, ROS nastao iz NOX ili eNOS sudjeluje u oksidativnoj modifikaciji lipoproteina niske gustoće (eng. low-density lipoprotein, LDL) koji ima proaterogen učinak. Takav LDL oštećuje endotelnu proizvodnju NO i inducira ekspresiju adhezijskih molekula [22].

Antioksidativni sustav organizma čine antioksidativni enzimi i antioksidativne molekule. Najvažniji antioksidativni enzimi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPx), dok antioksidativne molekule obuhvaćaju endogene spojeve kao što su glutation, ubikinon, bilirubin te molekule koje unosimo hranom među kojima su najvažniji

askorbinska kiselina (vitamin C), tokoferoli (vitamin E), karotenoidi i dr. SOD je važan endogeni antioksidativni enzim koji katalizira reakciju u kojoj se dvije molekule superoksidnog aniona pretvaraju u hidrogen peroksid i molekularni kisik. Enzim CAT potom nastali hidrogen peroksid pretvara u vodu i molekularni kisik. GPx koja sadrži selenij pa se naziva još i selenocistein peroksidaza je unutarstanični enzim koji vodikov peroksid pretvara u vodu. Osim toga bitna je jer ima važnu ulogu u inhibiciji procesa peroksidacije lipida [23]. Neke studije pokazale su kako su promjene serumskih koncentracija SOD-a u koleraciji s promjenama u vaskularnoj strukturi i funkciji kod ispitanika sa šećernom bolesti i arterijskom hipertenzijom [24]. Druga studija pokazala je kako je aktivnost SOD i GPx bila niža u muškaraca s poznatom koronarnom aterosklerotskom bolesti nego u klinički zdravih muškaraca, a ista studija sugerira kako je smanjenje aktivnosti SOD i GPx te ukupni antioksidativni kapacitet seruma u muškaraca s koronarnom bolesti bilo izraženije od stupnja hiperkolesterolemije i hipertrigliceridemije [25]. Oksidativni stres aktivira transkripcijske čimbenike za sintezu citokina i kemokina koji potiču nakupljanje upalnih stanica što dovodi do povećanog stvaranja ROS-a te se time dodatno pogoršava stanje. ROS, i posljedično oksidativni stres, potiče proupalno stanje endotela koje je jedan od ključnih procesa u nastanku ateroskleroze [21].

### **1.3. Uloga upale u nastanku ateroskleroze**

Upala predstavlja zaštitni odgovor organizma na infekciju ili ozljedu. To je složen proces u koji su uključene upalne stanice kao što su leukociti koji prepoznaju zahvaćeno tkivo te sudjeluju u eliminaciji uzročnika ili popravka mjesta ozljede. U upali dolazi do interakcije između staničnih površina, izvanstaničnog matriksa te proupalnih medijatora [26]. Međutim, prekomjerna upala može imati štetne učinke i pridonijeti napredovanju kroničnih bolesti kao što je ateroskleroza [27]. Kada je tkivo oštećeno, aktivira se sustav upalnog odgovora, makrofagi nakupljeni u oštećenom tkivu otpuštaju velike količine citokina, kao što su interleukin 6 (IL-6) i TNF- $\alpha$ , koji potiču sintezu CRP-a u jetri. CRP pogoduje oštećenju endotelnih stanica i sprječava njihov popravak. CRP nije prisutan u stijenci zdrave krvne žile, ali se nakuplja već u ranim fazama aterogeneze. Također, uz prisustvo CRP-a, makrofazi pojačano fagocitiraju LDL što pridonosi nastanku pjenastih stanica. CRP aktivira komplement u aterosklerotskom plaku što pridonosi nestabilnosti plaka te može inducirati ekspresiju staničnih adhezijskih molekula (engl. cell adhesion molecules, CAMs) u endotelu koronarnih arterija [28]. Zbog navedenog, serumska koncentracija CRP-a može biti prediktor budućih kardiovaskularnih događaja, a u općoj populaciji serumske koncentracije CRP-a mogu biti prediktor rizika kardiovaskularne smrtnosti

[29,30]. Citokine proizvode stanice uključene u aterogenezu, a na koje i sami djeluju. Oni sudjeluju u svim fazama nastanka ateroskleroze, od početne endotelne disfunkcije do kasnijeg nastanka plaka i njegove rupture. Proučavana je uloga brojnih citokina uključenih u ovaj proces. Obzirom na njihovu ulogu u aterosklerotskom procesu, možemo ih podijeliti na pro-upalne citokine koji ubrzavaju progresiju ateroskleroze (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, IL-20, IL-23, interferon (IFN)  $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , MCP-1, TNF- $\alpha$  i dr.) i protuupalne citokine koji djeluju suprotno (npr. IL-5, IL-10, IL-13, IL-19, IL-27, IL-33 i dr.). Ravnoteža između pro-upalnih i protuupalnih citokina važan je čimbenik koji utječe na razvoj ateroskleroze, ali i na stabilnost samog plaka. Iako brojni citokini imaju važnu ulogu u nastanku ateroskleroze, proinflamatorni citokini IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  su ključni u upali povezanoj aterosklerozom [31]. TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 izlučuju makrofagi, limfociti i vaskularne glatke mišićne stanice, a utječu na gotovo sve stanice uključene u aterogenezu potičući ekspresiju drugih citokina, staničnih adhezijskih molekula te djeluju na vaskularne glatke mišićne stanice i endotelne stanice [32]. Pokazano je da TNF- $\alpha$  potiče interakciju između cirkulirajućih leukocita i endotela regulacijom vaskularnih staničnih adhezijskih molekula (eng. vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) [33]. IL-6 jedan je od citokina koji sudjeluje kako u akutnoj, tako i u kroničnoj fazi upale. Pokazano je kako su koncentracije IL-6 u uzorcima krvi bolesnika s koronarnom bolesti veće nego u krvi zdravih ispitanika, a što je koncentracija veća, to je bolest više uznapredovala. Osim toga koncentracija IL-6 u koronarnim arterijama u blizini rupturiranog plaka bila je povećana u odnosu na sistemsku cirkulaciju u osoba s akutnim infarktom miokarda, što ukazuje na lokalnu proizvodnju ovog upalnog medijatora [34][35]. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) dodatno potiče proizvodnju drugih proupalnih molekula, uključujući IL-6 i proupalni eikozanoid PGE<sub>2</sub>, a što dodatno pridonosi stvaranju aterosklerotskog plaka. Osim toga pojačano izlučivanje IL-1 $\beta$  korelira s povećanim stvaranjem ROS-a povezujući tako upalu s oksidativnim stresom. Pokazalo se kako su serumske koncentracije IL-1 $\beta$  povezane s brojem krvnih žila zahvaćenih aterosklerozom kod ispitanika s koronarnom bolesti [36]. IL-17 također je jedan od proupalnih citokina kojeg uglavnom proizvode Th17 stanice, a ima važnu ulogu u patogenezi nekih upalnih bolesti kao što je psorijaza, ali isto tako ima važnu ulogu i u nastanku ateroskleroze. Obitelj citokina IL-17 ima šest članova od kojih IL-17A ima najveću biološku aktivnost [37]. U diferencijaciji Th17 stanica sudjeluje nekoliko citokina kao što su transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- $\beta$ ), IL-6, IL-21, IL-1 $\beta$  i IL-23. Pokazano je da kod miševa, uz IL-6 i IL-23 u kombinaciji s IL-1 $\beta$  moguće inducirati proizvodnju IL-17 i u odsutnosti TGF- $\beta$  signalizacije, sugerirajući alternativni način za diferencijaciju Th17 stanica [38]. IL-17 inducira izražaj matriks metaloproteinaze (MMP) i čimbenika stimulacije kolonija granulocita i makrofaga

(GM-CSF) u endotelnim stanicama, glatkim mišićnim stanicama i makrofagima što potiče regrutiranje neutrofila i monocita u sam plak [39]. Nasuprot tome, protuupalni citokini kao je IL-10 smanjuju proizvodnju proupalnih citokina, npr. TNF- $\alpha$  te djeluju na smanjenje ekspresije CAMs na endotelnim stanicama [32]. Inhibicija proupalnih citokina i smanjenje upale mogla bi predstavljati novi način liječenja i nadopuna je dosadašnjem pristupu liječenja i prevencije ateroskleroze [40]. Poznato je da neki lijekovi koji se primjenjuju u liječenju koronarne bolesti imaju i protuupalna svojstva kao što su statini i aspirin. Pokazalo se kako statini utječu na stvaranje citokina smanjujući stvaranje proupalnog IL-18, a potičući oslobađanje protuupalnog citokina IL-10 u bolesnika s koronarnom arterijskom bolesti [41].

Proupalni citokini kao što su TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  pogoršavaju endotelnu disfunkciju pojačavanjem ekspresije adhezijskih molekula kao što su VCAM-1, međustanična adhezijska molekula (eng. intercellular cell adhesion molecule-1 - ICAM-1), E-selektin i MCP-1 što za posljedicu ima povećano prijanjanje leukocita na endotel. Prijanjanje leukocita i njihov prolazak kroz endotel izraženije je ukoliko postoje i drugi rizični čimbenici kao što su hiperlipidemija, pušenje, hiperglikemija i drugi [17].

U novije vrijeme istražuju se lijekovi koji bi inhibirali specifične medijatore i citokine u upalnom putu [32]. S obzirom da je uloga IL-17 dobro poznata u nastanku psorijaze, klinička ispitivanja su pokazala kako su antitijela koja djeluju na ovaj citokin (npr. bimekizumab, secukinumab i dr.) učinkoviti u njenom liječenju. Osim toga, lijekovi koji djeluju na IL-17 i IL-23 su učinkoviti i u liječenju reumatoidnog artritisa i psorijatičnog artritisa [42]. Trenutno traje istraživanje učinka ziltivekimaba, monoklonskog protutijela za IL-16 na prevenciju progresije aterosklerotske bolesti [43]. Svakako su potrebna dodatna istraživanja koja bi rasvijetlila može li primjena antitijela koji djeluju na navedene citokine ili njihove receptore, djelovati pozitivno i u sprječavanju nastanka ili usporavanju progresije ateroskleroze.

#### **1.4. Ateroskleroza**

Ateroskleroza je progresivna bolest koja se razvija kroz više godina, a nastaje zbog taloženja kolesterola i masnih čestica u stijenke krvnih žila. To je kronična upalna bolest posredovana proupalnim citokinima, bioaktivnim lipidima i adhezijskim molekulama [44]. U ranoj fazi nastanka ateroskleroze, uzroci njenog nastanka su oštećenje endotela (endotelna disfunkcija), abnormalni metabolizam lipida i hemodinamsko oštećenje [45]. Početni događaj u aterogenezi je prolazak LDL-a kroz endotel te njegovo naknadno taloženje, zadržavanje i oksidativnu modifikaciju u intimi arterije. Kada se endotelne stanice aktiviraju, one ekspimiraju monocitni



kemotaktični protein-1 (MCP-1), interleukin 8 (IL-8), vaskularnu adhezijsku molekulu-1 (VCAM-1), E-selektin i druge upalne čimbenike koji privlače limfocite i monocite i vežu ih za endotel [31]. ICAM-1 i VCAM-1 privlače limfocite i monocite koji se vežu na endotel i infiltriraju u sloj intime arterijske stijenke [31]. MCP-1 također regrutira monocite, pokazano je kako je veća koncentracija MCP-1 u histopatološkim uzorcima karotidnih arterija povezana s većom vulnerabilnošću aterosklerotskog plaka [46]. IL-8 nastaje u brojnim stanicama, uključujući makrofage, glatke mišićne stanice i endotelne stanice, a on sam djeluje na aktivaciju leukocita uključenih u patogenezu ateroskleroze [47]. Monociti migriraju u arterijsku intimu i transformiraju se u makrofage koji fagocitiraju višak lipida dobivenog iz oksidiranog LDL-a (oxLDL) i transformiraju se u pjenaste stanice koje formiraju masnu prugu. Masna pruga čini najraniju vidljivu aterosklerotsku leziju. Limfociti T izlučuju upalne citokine i time pospješuju migraciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (eng. vascular smooth muscle cell, VSMC) iz medije u intimu čime se zadebljava arterijska stijenka te postupno dolazi do formiranja aterosklerotskog plaka. Kontinuirano nakupljanje pjenastih stanica i T limfocita u intimi izaziva kroničnu upalu [48]. U kasnijim fazama razvoja ateroskleroze, veliki broj makrofaga infiltrira stijenku krvne žile, izlučuje matriksne metaloproteinaze (MMP) i uzrokuje razgradnju kolagenih vlakana u izvanstaničnom matriksu plaka što dovodi do pucanja plaka, krvarenja i tromboze [49].

Poznati su brojni rizični čimbenici koji pridonose razvoju ateroskleroze kao što je arterijska hipertenzija, šećerna bolest, hiperlipidemija, pušenje, sjedilački način života, pretilost i drugi. Posebnu ulogu u nastanku aterosklerotskih lezija koronarnih arterija ima hiperlipidemija. Iako je cirkulirajući kolesterol bitan za brojne biološke funkcije, njegov prelazak iz stijenke krvne žile uzrokuje nastanak ateroskleroze, a što je jače izraženo ukoliko je njegova koncentracija u krvi povišena. Razlikuje se nekoliko oblika lipoproteinskih čestica, a lipoprotein niske gustoće (LDL kolesterol) je oblik koji potiče razvoj ateroskleroze. Za razliku od LDL-a, lipoprotein visoke gustoće (HDL kolesterol) naziva se još i dobar kolesterol zbog toga što potiče obrnuti transport kolesterola. Obzirom da svi ljudi imaju cirkulirajući LDL, tijekom života će se kod većine razviti neki stupanj ateroskleroze, međutim ukoliko su vrijednosti LDL-a u krvi visoke, taj proces će se brže razvijati [50,51]. LDL čestice u subendotelnom prostoru oksidiraju i postaju jaki kemoatraktanti. Zbog aktivacije endotela, potaknute upale i oksidativnog stresa, dolazi do oksidativne modifikacije LDL-a i stvaranja oxLDL-a što uzrokuje mijenjanje intime i njezinu interakciju s izvanstaničnim matriksom te povećava ulazak LDL-a u makrofage što onda uzrokuje formiranje plaka [51,52]. Hipertrigliceridemija je također jedan od čimbenika

rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Visoke serumske koncentracije triglicerida često su povezane s niskim koncentracijama HDL-a i visokim koncentracijama LDL-a [53].

Ateroskleroza može zahvatiti sve krvne žile u organizmu pa tako i koronarne arterije. Ateroskleroza koronarnih arterija najčešće se razvija na mjestima turbulentnijeg protoka u koronarnim arterijama kao što su bifurkacije (npr. odvajanje prednje lijeve silazne koronarne arterije od glavne lijeve koronarne arterije [51]. Usprkos stalnom napretku perkutanih koronarnih intervencija i kirurških metoda liječenja aterosklerske bolesti koronarnih arterija, ona je i dalje glavni uzrok smrti u svijetu [54].

### **1.5. Kronični koronarni sindrom**

Ishemijska bolest srca ili koronarna bolest je bolest koja nastaje zbog nastanka aterosklerotskog plaka u epikardijalnim koronarnim arterijama koje opskrbljuju miokard. Koronarne arterije izlaze iz aorte, a razlikujemo desnu koronarnu arteriju i lijevu koronarnu arteriju koja se dijeli na lijevu prednju silaznu arteriju i cirkumfleksnu arteriju, a svaka od njih opskrbljuje određeni dio miokarda [55]. Aterosklerotski plak postupno sužava lumen koronarne arterije, a uslijed neravnoteže između opskrbe i potrebe miokarda za kisikom nastaje ishemija miokarda [56]. Koronarna bolest je dinamičan proces; dugo vremena može biti asimptomatska i stabilna te tada govorimo o kroničnom koronarnom sindromu, ali uslijed erozije ili rupture plaka može doći do akutnog aterotrombotskog događaja i nastanka akutnog koronarnog sindroma. Kronični koronarni sindrom najčešće nastaje zbog stabilnih aterosklerotskih plakova u koronarnim arterijama koji postupno rastu i sužavaju lumen dovodeći do smanjene perfuzije miokarda [50]. Kronični koronarni sindrom može se klinički različito prezentirati; bolesnici mogu imati bol u prsima koja se javlja u naporu (tada govorimo o angini pektoris), ali mogu biti i asimptomatski ili se prezentirati kao novonastalo zatajenje srca. U Tablici 1 su navedene sve kliničke prezentacije kroničnog koronarnog sindroma.

---

**Tablica 1. Kliničke prezentacije kroničnog koronarnog sindroma prema Europskom kardiološkom društvu (eng. European Society of Cardiology – ESC)**

---

1. Suspektna koronarna arterijska bolest i simptomi stabilne angine pektoris

---

2. Novonastalo zatajenje srca ili disfunkcija lijevog ventrikula i koronarna arterijska bolest

---

3. Asimptomatski ili simptomatski pacijenti sa stabiliziranim simptomima unutar 1 godine od akutnog koronarnog sindroma ili nedavne revaskularizacije

---

4. Asimptomatski ili simptomatski pacijenti >1 godine nakon inicijalne dijagnoze ili revaskularizacije

---

5. Pacijenti s anginom i suspektim vazospazmom ili mikrovaskularnom bolesti

---

6. Asimptomatski pacijenti kod kojih je koronarna arterijska bolest verificirana probirom

---

*Izvor: Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. Eur Heart J. 2020 Jan 14;41(3):407–77 [57]*

Ishemijska bolest srca vodeći je uzrok smrti u svijetu. Modifikacijom načina života, redukcijom rizičnih čimbenika, medikamentoznom terapijom te revaskularizacijom može se usporiti napredovanje aterosklerotske bolesti i smanjiti rizik od akutnog aterotrombotskog događaja [58]. Modifikacija načina života obuhvaća zdravu prehranu, postizanje normalne tjelesne težine, prestanak pušenja, redovitu tjelesnu aktivnost, te smanjenje konzumacije alkoholnih pića. Po preporukama ESC, zdrava prehrana podrazumijeva mediteranski način ishrane odnosno prehranu bogatu povrćem i voćem (više od 200 g dnevno i povrća i voća, unos 35 - 45 g vlakana dnevno, po mogućnosti iz cjelovitih žitarica, konzumaciju do 30 g orašastih plodova dnevno, konzumaciju ribe 1-2 puta tjedno). Osim toga preporuča se izbjegavati rafinirane ugljikohidrate, energetske bogatu hranu, izbjegavati gazirana i zaslađena pića, ograničiti unos alkohola na manje od 100g/tjedno ili 15 g/dnevno. Što se tiče unosa masnoća, zasićene masti (engl. saturated fatty acids, SFA) bi trebale činiti <10% ukupnog energetskeg unosa, a potrebno ih je zamijeniti s višestruko nezasićenim mastima (engl. polyunsaturated fatty acids, PUFA) [59].

### **1.6. Liječenje kroničnog koronarnog sindroma**

Optimalna medikamentozna terapija kod kroničnog koronarnog sindroma obuhvaća više skupina lijekova: beta blokatore, blokatore kalcijских kanala, hipolipemike, antiagregacijske

lijekove, nitrata i druge. Beta blokatori i blokatori kalcijevih kanala su prva linija liječenja koja omogućava kontrolu anginalnih simptoma te kontrolu srčane frekvencije čime se smanjuju energetske potrebe miokarda. U sekundarnoj prevenciji primjenjuju se lijekovi kao što su inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori), lijekovi koji djeluju na snižavanje lipida (statini, ezetimib i drugi). ACE inhibitori i inhibitori receptora angiotenzina (ARB) su lijekovi koji se prvenstveno koriste kao antihipertenzivi, međutim oni ostvaruju i brojne druge učinke – smanjuju proteinuriju, usporavaju napredovanje kroničnog bubrežnog zatajenja, poboljšavaju ishode u bolesnika sa zatajenjem srca. S obzirom da hiperlipidemija, a osobito visoke koncentracije LDL-a predstavljaju važan rizični čimbenik u nastanku koronarne bolesti, lijekovi koji djeluju na snižavanje lipida imaju bitnu ulogu u liječenju kroničnog koronarnog sindroma. Statini su lijekovi koji inhibiraju 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktazu (HMG-CoA), ključni enzim u biosintezi kolesterola. Statini smanjuju serumsku koncentraciju kolesterola, smanjuju progresiju aterosklerotskog plaka, dodatno stabiliziraju postojeće aterosklerotske plakove, ali osim toga pokazalo se kako imaju i određene pleotropne učinke koji uključuju smanjenje upale, smanjuju agregaciju trombocita te poboljšavaju vaskularni tonus [60]. Također u terapiji se koriste antiagregacijski lijekovi (acetilsalicilna kiselina i dr.). Male doze acetilsalicilne kiseline ireverzibilno blokiraju stvaranje TXA<sub>2</sub> u trombocitima čime se postiže inhibicija agregacije trombocita tijekom njihovog životnog vijeka (8-9 dana) [61]. U slučaju značajnih suženja koronarnih arterija primjenjuje se revaskularizacija koronarnih arterija perkutanom koronarnom intervencijom (PCI) ili aortokoronarnim premoštenjem (eng. coronary artery bypass grafting, CABG) [59]. Međutim, unatoč svim spomenutim načinima liječenja, bilo medikamentoznim, interventnim ili operativnim, ishemijska bolest srca i dalje je vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, a osobito u Zapadnim zemljama. Stoga je potrebno istražiti dodatne načine koji bi, uz standardu terapiju, imali pozitivne učinke kod ove bolesti.

### **1.7. Funkcionalna hrana i uloga u prevenciji bolesti**

Funkcionalna hrana je posebno formulirana hrana koja sadrži tvari ili žive mikroorganizme koji mogu unaprijediti zdravlje ili spriječiti bolest. Potrebno je da koncentracija tvari bude sigurna i dovoljno visoka za postizanje željenog učinka, a bez neželjenih nuspojava. Funkcionalna hrana može uključivati vitamine, minerale, hranjive tvari, dijetalna vlakna ili probiotike [62,63]. Funkcionalna hrana je prirodna ili prerađena hrana koja sadrži biološki aktivne sastojke, koja se redovno konzumira, a osim samog prehrambenog učinka, postiže i ranije spomenute

pozitivne učinke na zdravlje. Funkcionalne učinke potrebno je potvrditi randomiziranim, placebo kontroliranim kliničkim istraživanjima [62]. Funkcionalna hrana, djelujući na ciljne funkcije u organizmu djeluje na poboljšanje zdravstvenog stanja ili smanjenje rizika od nastanka bolesti. Filozofija hrane kao lijeka poznata je još od doba Hipokrata od kada je poznata izreka "Neka hrana bude tvoj lijek i lijek neka bude tvoja hrana", međutim istraživanja u ovom području počela su se intenzivnije provoditi tek u posljednjih nekoliko desetljeća.

Poznato je kako prehrana ima vrlo važnu ulogu u 5 od 10 vodećih uzroka smrti: aterosklerozi, koronarnoj bolesti srca, šećernoj bolesti, moždanom udaru te određenim vrstama malignih bolesti [64]. Velika studija koja je provedena u Sjedinjenim Američkim Državama u kojoj je sudjelovalo više od 200 000 ispitanika pokazala je da je prehrana s većim upalnim potencijalom (procesiurano meso, crveno meso, rafinirani ugljikohidrati, zašećerena i gazirana pića i dr.) bila značajno povezana s većom učestalošću kardiovaskularnih bolesti i rizikom od kardiovaskularne smrti. Konzumacija proupalne hrane pokazala se povezanom s višom razinom sistemske (povišene serumske koncentracije CRP-a, IL-6 i TNF- $\alpha$ ), vaskularne (određeno kao povišena koncentracija sICAM-1 koji sugerira endotelnu aktivaciju i upalu) i metaboličke upale (viša koncentracija leptina, a manja koncentracija adiponektina u serumu) i nepovoljnim lipidnim profilom (povišeni trigliceridi, snižen HDL) [65]. Stoga, zdrava prehrana svakako može utjecati i na smanjenje upale, važnog patofiziološkog procesa u nastanku ateroskleroze. Istraživanja su pokazala kako je konzumacija preporučenih obrazaca prehrane povezana s nižim rizikom razvoja kardiovaskularnih i drugih kroničnih bolesti. Idealna prehrana za prevenciju kardiovaskularnih bolesti je ona koja sadrži puno voća i povrća, cjelovitih žitarica, orašastih plodova, ribe, mesa peradi, dok se ne preporuča konzumacija crvenog i prerađenog mesa, rafiniranih ugljikohidrata, hrane i pića s dodanim šećerima te zasićenim masnim kiselinama [66]. Koncept funkcionalne hrane pokrenut je u Japanu 1980-ih godina, kada su zbog porasta troškova zdravstvene skrbi te starenja stanovništva pokrenuli sustav za odobravanje hrane s poznatim zdravstvenim dobrobitima kako bi pokušali poboljšati zdravlje stanovništva. Funkcionalna hrana može biti obogaćena određenim nutrijentima koje inače ne sadrži, ali jednako tako u funkcionalnu hranu se ubraja i hrana koja prirodno ima veći udio određenog nutrijenta. S obzirom na navedeno, funkcionalnu hranu možemo podijeliti u nekoliko skupina:

- 1) hrana obogaćena dodatnim hranjivim tvarima (npr. voćni sokovi obogaćeni vitaminom C, vitaminom E, cinkom, kalcijem),
- 2) hrana s dodanim novim nutrijentima ili sastojcima koji se inače ne nalaze u određenoj hrani (npr. probiotici ili prebiotici),

3) hrana iz koje je određena štetna komponenta uklonjena ili smanjena, ili pak zamijenjena nekom drugom s blagotvornim učincima,

4) hrana u kojoj je jedna od komponenti prirodno obogaćena (npr. jaja obogaćena n-3 PUFA),

5) hrana koja i inače sadrži veće koncentracije određenih blagotvornih tvari (npr. bobičasto voće) [67].

Brojna istraživanja pokazuju povezanost crijevne mikrobiote sa zdravljem pa tako postoji i funkcionalna hrana koja sadrži probiotike kao što su jogurt i kefir [64]. Maslinovo ulje koje je dio mediteranske dijeta poznato je po svojim blagotvornim učincima, pa je tako i EPIC studija pokazala kako je konzumacija maslinovog ulja u Španjolskoj povezana s 26% redukcijom rizika od smrtnosti [68]. Druga studija koja je provedena u Francuskoj i uključivala je 7625 ispitanika, nakon 5 godina praćenja pokazala je 41% niži rizik od nastanka moždanog udara u ispitanika koji su konzumirali maslinovo ulje [69]. Potrebna su dodatna istraživanja i drugih potencijalno pozitivnih tvari u obliku funkcionalne hrane u mogućoj prevenciji ili liječenju nekih bolesti.

### **1.8. n-3 polinezasićene masne kiseline (n-3 PUFA)**

Masne kiseline, koje mogu biti zasićene, mononezasićene (eng. Monounsaturated fatty acids, MUFA) ili polinezasićene (eng. Polyunsaturated fatty acids, PUFA) se oksidiraju u mitohondrijima i predstavljaju važan izvor energije. One su glavne komponente fosfolipida staničnih membrana. Zasićene masne kiseline su one koje nemaju dvostruke veze između atoma ugljika. Mononezasićene masne kiseline sadrže jednu dvostruku vezu, tijelo ih može samo proizvesti, ali i unijeti hranom. Polinezasićene masne kiseline su esencijalne masne kiseline koje sadrže više od jedne dvostruke veze između ugljikovih atoma, a u njih se ubrajaju n-3 PUFA i n-6 PUFA koje su definirane su položajem prve dvostruke veze u ugljikovom lancu: kod n-3 PUFA dvostruka veza nalazi se na C3, dok se kod n-6 PUFA prva dvostruka veza nalazi na C6. N-3 i n-6 PUFA predstavljaju važne signalne molekule u organizmu [70]. Najveću aterogenu aktivnost imaju transmasne kiseline koje imaju jednu dvostruku vezu u kojoj su vodikovi atomi jedan nasuprot drugom. Industrijska hrana kao što su kolači, krekeri i slično sadrži visok udio transmasnih kiselina, a njihova konzumacija povećava LDL kolesterol i trigliceride u plazmi [71].

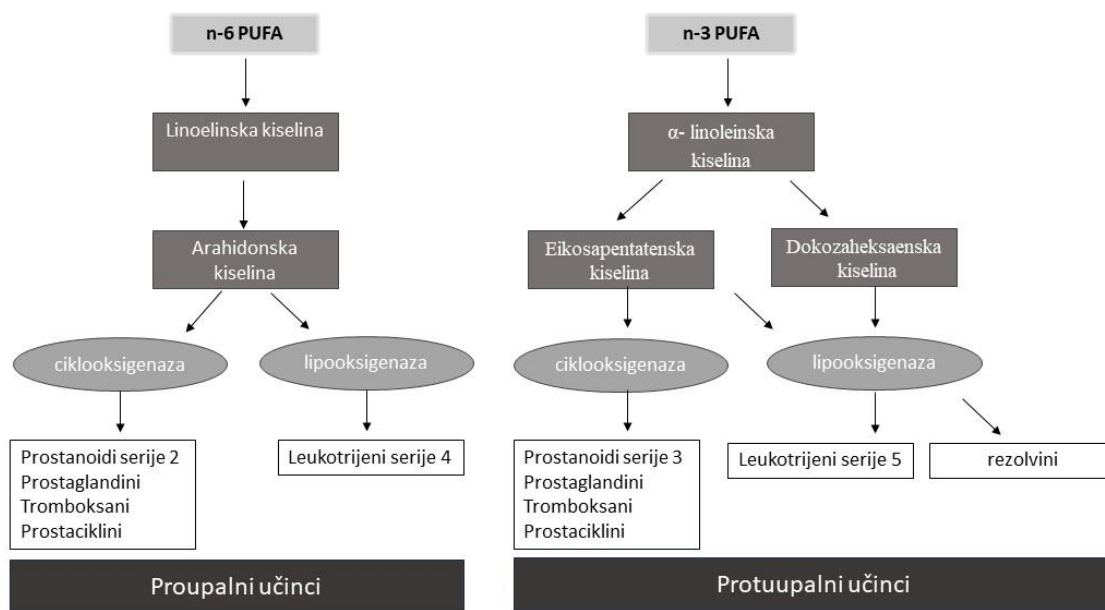
Linoleična kiselina (LA), jedna od n-6 PUFA, prekursor je za arahidonsku kiselinu (AA) iz koje nastaju vazokonstriktivni prostaglandini i leukotrijeni. Nasuprot tome,  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA), najjednostavnija n-3 PUFA koja se svrstava u esencijalne masne kiseline se metabolizira u eikosapentatensku kiselinu (EPA) i dokozaheksaensku kiselinu (DHA). Glavni

izvor EPA i DHA predstavlja riba, dok su glavni izvor ALA orašasti plodovi, soja i repičino ulje. N-6 PUFA odnosno AA i LA se nalaze u suncokretu [72].

**Tablica 2. Podjela n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA)**

n-6 PUFA		n-3 PUFA	
Naziv	Formula	Naziv	Formula
Linolna kiselina (LA)	18:2n-6	$\alpha$ -linoleinska kiselina (ALA)	18:3n-3
$\gamma$ -linoleinska kiselina (DGLA)	18:3n-6	Stearinska kiselina (SDA)	18:4n-3
Dihomo $\gamma$ -linoleinska kiselina (DGLA)	20:3n-6	Eikozatetraenska kiselina (ETA)	20:4n-3
Arahidonska kiselina (AA)	20:4n-6	Eikozapentaenska kiselina (EPA)	20:5n-3
Dohozapentaenična kiselina (DPA)	22:5n-6	Dohopentaenska kiselina (DPA)	22:5n-3

N-6 PUFA se smatraju proupalnim, dok se n-3 PUFA smatraju protuupalnim. Osim toga, protuupalni učinci mogu biti i zbog toga što n-3 PUFA djeluje kompetitivno kao supstrat za metabolizam n-6 PUFA [73]. Kada postoji veći omjer n-6/n-3 PUFA, tada nastaju prostaglandin serije 2 (PGI<sub>2</sub>), leukotrijen serije 4 (LTB<sub>4</sub>), tromboksan B serije 2 (TXB<sub>2</sub>) koji djeluju vazokonstriktorno, aktiviraju trombocite i djeluju proupalno. Ukoliko je omjer manji, odnosno kada je koncentracija n-3 PUFA veća, tada dominira proizvodnja protuupalnih i vazodilatatornih medijatora kao što je PGI<sub>3</sub>, LTB<sub>5</sub>, TXA<sub>3</sub> [74]. Stoga neuravnotežen omjer n-6/n-3 PUFA u korist n-6 PUFA djeluje protrombotski i proupalno što pridonosi nastanku ateroskleroze [75]. Neki od metabolita masnih kiselina kao što su EPA, DHA, prostaglandini serije 3 i 1, mogu djelovati kao endogeni inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (na jednak način djeluju ACE inhibitori, jedni od najpotentnijih antihipertenzivnih lijekova) te mogu djelovati i kao reduktaze 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzima A (HMG-CoA – enzim na kojeg djeluju i statini, najpotentniji hipolipemici), čime također ostvaruju svoje antihipertenzivne, protuupalne i antiaterosklerotske učinke djelujući na endotelne stanice, leukocite i trombocite [76].



Slika 1 Podjela i učinci n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (eng. Polyunsaturated fatty acids, PUFA). Linoleična kiselina jedan je od prekursora za arahidonsku kiselinu iz koje pomoću enzima ciklooksigenaze nastaju prostanoidi serije 2, prostaglandini, tromboksani i prostaciklini, a lipooksigenazom nastaju leukotrijeni serije 4. Svi navedeni imaju proupalne učinke. A-linoleinska kiselina je n-3 PUFA iz koje nastaju eikosapentaenska i dokozaheksaenska kiselina. Iz EPA ciklooksigenazom nastaju prostanoidi serije 3, prostaglandini, tromboksani i prostaciklini koji ostvaruju protupalne učinke. Osim toga, pomoću enzima lipooksigenaze nastaju leukotrijeni serije 5 i rezolvini s također protupalnim učincima.

Izvor: izradila autorica disertacije

Jedna od najistraživijih aktivnih supstanci životinjskog podrijetla upravo su n-3 PUFA, a najbolji izvor su im riba kao što je losos, tuna i sardine. Brojne studije su istraživale učinke n-3 PUFA u kroničnim stanjima kao što su karcinomi, upalne bolesti crijeva, reumatske bolesti i druge, a najviše istraživanja postoji o učincima n-3 PUFA na kardiovaskularni sustav [66].

Studije pokazuju jasno povećanje rizika od pretilosti kada postoji veća koncentracija n-6 PUFA i kada je veći omjer n-6/n-3 PUFA, dok je kod veće koncentracije n-3 PUFA taj rizik manji [77]. Mediteranska prehrana je povezana s boljom funkcijom endotela kod ispitanika s

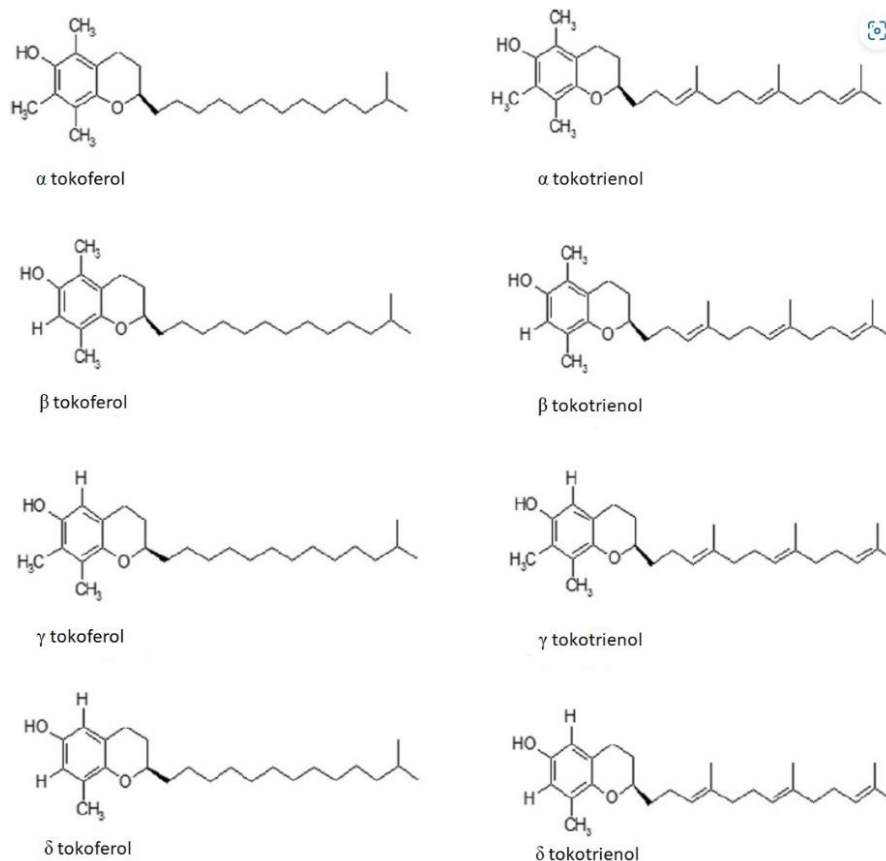


kroničnim koronarnim sindromom, čak i kod onih s težom endotelnom disfunkcijom [78,79]. Također, zamjena zasićenih masnih kiselina nezasićenim, posebice PUFA, smanjuje rizik od ishemijske bolesti srca, a što je dokazala studija koju su proveli Li i suradnici na uzorku od 84628 žena i 42908 muškaraca tijekom 24 do 30 godina praćenja [78]. Konzumacije ribe bogate n-3 PUFA barem jednom tjedno, povezana je s manjim rizikom od bolesti koronarnih arterija [79]. n-3 PUFA snižavaju vrijednosti triglicerida u krvi, ali još uvijek nije poznat mehanizam djelovanja, vjeruje se kako djeluju na receptore aktivirane proliferatorom peroksisoma (eng. Peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR). N-3 PUFA se preporučuju u terapiji kod pacijenata kod kojih ciljne vrijednosti triglicerida u krvi nisu postignute uz statine ili fibrate. Svjetska zdravstvena organizacija preporuča da bi zasićene masne kiseline trebale biti zastupljene u prehrani s manje od 10%. Istraživanja su pokazala kako zamjena zasićenih masnih kiselina u prehrani polinezasićenim smanjuje kardiovaskularni rizik, odnosno da ukoliko se poveća unos PUFA za 5%, dolazi do smanjenja rizika za razvoj koronarne bolesti za 10% [72]. Svjetska zdravstvena organizacija, Američko kardiološko društvo kao i vlade nekih zemalja sada preporučuju dnevni unos od 1,4 do 2,5 g N-3 PUFA dnevno, a od toga EPA i DHA u rasponu od 140 do 600 mg/dan. To predstavlja najmanje 2 porcije ribe tjedno. Preporučeni omjer n-6/n-3 bi trebao u prosjeku biti oko 1 [72]. Unatoč svemu navedenom, istraživanja su pokazala kako Europljani unose značajno više zasićenih masnih kiselina od preporučenih 10% te kako je unos polinezasićenih masnih kiselina u većini europskih zemalja ispod preporučenih vrijednosti [60,80].

## 1.9. Vitamin E

Vitamin E je vitamin topiv u mastima koji djeluje kao antioksidans. On obuhvaća 8 različitih molekula, 4 tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol) i 4 tokotrienola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$  tokotrienol), od kojih je alfa tokoferol najzastupljeniji oblik u ljudskoj prehrani. Svi navedeni su jaki antioksidansi koji štite polinezasićene masne kiseline u membrani od oksidacije, reguliraju proizvodnju slobodnih kisikovih i dušikovih vrsta te moduliraju signalne puteve [81,82]. Glavni izvor vitamina E su biljna ulja kao što su ulje soje, suncokreta, kukuruza, oraha, palmino ulje, voće, povrće te orašasti plodovi kao što je kikiriki, badem, suncokretove sjemenke i kukuruz. Omjeri  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, i  $\delta$ -tokoferola varira ovisno o vrsti ulja. Vitamin E se u organizmu pohranjuje u masnom tkivu gdje se nalazi oko 90% ukupne količine pa se rijetko sreće deficit ovog vitamina. Međutim, koncentracije  $\alpha$ -tokoferola u plazmi ispod 9 mmol/L za muškarce ili ispod 12 mmol/L za žene smatraju se ispod preporučene vrijednosti. Ne postoji strogo definirana

vrijednost preporučenog dnevnog unosa vitamina E, ali u većini zemalja se preporučuje 12mg/dan za žene i 13-15 mg/dan za muškarce. Osim toga, unos vitamina E bi trebao biti u korelaciji s unosom PUFA jer on djeluje na stabilizaciju stanične membrane i štiti n-3 PUFA od oksidacije [83,84].



Slika 2 Prikaz 8 različitih molekula vitamina E

Izvor: izradila autorica disertacije

Tijekom peroksidacije lipida vitamin E veže peroksilni radikal prije nego on reagira s PUFA, te se pri tome stvara tokoferolski radikal koji se mora reducirati s drugim antioksidansima kao što je askorbinska kiselina [85,86]. Osim antioksidativnog učinka, studije su pokazale njegov modulatorni učinak na upalu smanjenjem izlučivanja proupalnih citokina kao što su interleukin IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 [87]. Osim toga, ima i antiaterotrombotske učinke koje postiže svojim djelovanjem na trombocite i sustav zgrušavanja [88]. Vitamin E može modulirati upalni odgovor inhibicijom 5-lipoksigenaze koja smanjuje otpuštanje IL-1 $\beta$  iz monocita; to smanjuje adheziju monocita na endotelne stanice [82]. Poznato je kako vitamin E ima protektivno djelovanje protiv Parkinsonove bolesti i kako uslijed nedostatka vitamina E mogu nastati određeni neurološki poremećaji kao što je spinocerebelarna ataksija i određene miopatije,

međutim uloga vitamina E u prevenciji kardiovaskularnih bolesti nije u potpunosti razjašnjena [89]. Osim toga, vitamin E pojačava proizvodnju NO, a istraživanja su pokazala kako njegova suplementacija u osoba s hiperkolesterolemijom ima pozitivne učinke na vazodilataciju ovisnu o endotelu [90]. Manje studije su pokazale kako je dijeta bogata vitaminom E povezana s nižim rizikom nastanka koronarne arterijske bolesti kod muškaraca i žena te je vitamin E štitio od kardiovaskularnih mortaliteta. Međutim, klinička istraživanja nisu pokazala značajnu korist kod konzumacije vitamina E u prevenciji kardiovaskularnih bolesti [91].

### **1.10. Selenij**

Selenij je jedan od elemenata u tragovima koji je esencijalan za funkciju mnogih enzima u organizmu koji imaju ulogu u raznim biološkim funkcijama kao što su regulacija upalnog odgovora, proliferacija i diferencijacija imunoloških stanica, migracija i adhezija leukocita i dr. Također, selenij je dio antioksidativnog sustava, on povećava antioksidativni kapacitet i utječe na signalne puteve nuklearnog čimbenika kapa B (NF- $\kappa$ B) i na taj način smanjuje produkciju interleukina i TNF- $\alpha$ . Selenij se u organizam unosi raznovrsnom prehranom uključujući žitarice, povrće, plodove mora, meso, mliječne proizvode i orašaste plodove. Ukupna količina selenija u ljudskom organizmu je između 3 i 20 mg, a pohranjen je u različitim organima i tkivima, oko 30% u jetri, 30% u mišićima, 15% u bubrezima, 10% u plazmi i 15% u drugim organima. Selenij se iz crijeva apsorbira te potom jetra sintetizira selenoprotein P koji ulazi u krvotok i opskrbljuje druge organe [92].

Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje dnevni unos od 55  $\mu$ g selenija na dan za odrasle uz dopuštenu gornju granicu od 400  $\mu$ g/dan. Selenij u hrani postoji u obliku organskih spojeva selenija, selenata i selenita koji imaju veću bioraspoloživost od anorganskog selenija, a selenij u biljnoj hrani ima bolju bioraspoloživost od onog u životinjskoj hrani [93]. Svoje biološke učinke uglavnom ostvaruje ugradnjom u selenoproteine. Identificirano je 25 selenoproteina u ljudi; glutation peroksidaza i tioredoksin reduktaza glavni su selenoproteini koje eksprimiraju endotelne stanice, a djeluju kao važni unutarstanični antioksidansi [94–96]. Endotelni selenoproteini uključeni su u regulaciju vaskularnog tonusa održavanjem ravnoteže superoksid anion/NO, kontroliranjem ekspresije molekula stanične adhezije te kontroliranjem aktivnosti ciklooksigenaza i lipooksigenaza [95]. U eksperimentalnih modela, nedostatak selenija u životinja s hiperkolesterolemijom uzrokovao je nižu ekspresiju LDL receptora u jetri i HMG-CoA, s posljedičnim povišenjem koncentracije apolipoproteina B (ApoB), dok je supstitucija selenija u tih modela to promijenila [97]. Također kod štakora hranjenih dijetom s visokim

udjelom kolesterola, dodatak selenita u prehranu smanjio je serumsku koncentraciju LDL-a i triglicerida, vjerojatno kao posljedicu smanjene ekspresije sintetaze masnih kiselina, a što sugerira zaštićen učinak selenija protiv hiperkolesterolemije [98]. Neupitna je uloga selenija u normalnom funkcioniranju kardiovaskularnog sustava. U područjima Kine gdje je tlo siromašno selenijem, povećana je incidencija kardiomiopatije karakterizirane pojačanom fibrozom miokarda (Kešanska bolest). Studija AtheroGene pokazala je kako su niže vrijednosti selenija u serumu povezane s većom smrtnosti kod pacijenata s akutnim koronarnim sindromom [99]. Studije su pokazale kako dodatak selenija u suplemente koji sadrže antioksidanse može smanjiti rizik od kardiovaskularne smrtnosti [100]. Također, nakon 4 godine uzimanja selenijuma i koenzima Q10, smanjio se rizik od kardiovaskularne smrti u grupi zdravih starih ispitanika kao i u podgrupama ispitanika sa šećernom bolesti, arterijskom hipertenzijom i ishemijskom bolesti srca nakon 12 godina praćenja [101]. Studije na animalnim modelima pokazale su kako suplementacija selenija može spriječiti nastanak aterosklerotskih lezija. Ranija istraživanja su pokazala kako suplementacija selenija, samog ili uz dodatak vitamina E, kod zečeva dovodi do redukcije aterosklerotskih lezija u aorti [102]. Dodatak selenija prehrani hrčaka uzrokovao je redukciju aterosklerotskih lezija aorte te je imao zaštitni učinak protiv oksidativnog stresa i oksidacije LDL-a, dok je kod ApoE<sup>-/-</sup> miševa dodatak selenija također djelovao preventivno na oksidativni stres [103,104]. Osim tog značajno je smanjila osjetljivost srca štakora na ishemiju [105].

### **1.11. Lutein**

Lutein je jedan od preko 600 karotenoida koji postoje u prirodi. Karotenoidi su prirodno antioksidansi, a većinu sintetiziraju bakterije, gljive i biljke. Za karotenoide je karakterističan sustav konjugiranih dvostrukih veza koji može apsorbirati svjetlost u rasponu između 400 i 550 nm, ali je također odgovoran i za nestabilnost ovih spojeva. Lutein je jedan od najistraživanijih karotenoida u prehrani, a sintetiziraju ga samo biljke. Glavni izvor luteina je zeleno lisnato povrće kao što je špinat, salata i brokula, ali je prisutan i u ribi, mesu i jajima, osobito žumanjku [106]. Lutein je dio makularnog pigmenta koji štiti makulu od fotooksidativnog oštećenja. Također, on djeluje kao antioksidans koji štiti od kisikovih i lipidnih peroksi radikala. Poznato je kako je suplementacija luteinom učinkovita u liječenju i prevenciji makulopatije povezane sa starenjem [107]. Međutim, moguća uloga luteina u prevenciji ili liječenju kardiovaskularnih bolesti nije u potpunosti poznata. Nedavna istraživanja i kliničke studije pokazale su kako lutein ima protuupalni i antioksidativni učinak, a isto postiže modulacijom upalnih signalnih puteva.

On suprimira aktivaciju nuklearnog čimbenika kB te suprimira stvaranje upalnih citokina kao što su IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ . Smanjuje razinu oksidativnog stresa inducirajući rad antioksidativnih enzima kao što su CAT, SOD, GPX. Osim toga djeluje sinergistički s drugim antioksidansima. Lutein može inhibirati NADH/NADPH oksidazu koja je najvažniji enzim uključen u proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta u endotelu te time poboljšava endotelnu funkciju [108,109]. Na modelu miša pokazano je kako dodatak luteina prehrani može smanjiti stvaranje aterosklerotskih lezija [110]. Jedna studija provedena u Kini pokazala je kako je koncentracija luteina u serumu bile značajno niže kod ispitanika s ranom aterosklerozom te je uočeno kako je koncentracija luteina u serumu obrnuto proporcionalna debljini intime medije karotidnih arterija [111]. Rezultati nekih studija upućuju na to da su veće koncentracije karotenoida u serumu, uključujući lutein, povezane s nižim rizikom kardiovaskularne smrtnosti u odraslih osoba s arterijskom hipertenzijom [112].

### **1.12. Obogaćena kokošja jaja kao primjer funkcionalne hrane**

Jaja su jeftina i dostupna namirnica koja je bogata hranjivim tvarima kao što su bjelančevine, esencijalne masne kiseline, lutein, kolin, vitamini i minerali [113]. Modifikacijom prehrane kokoši moguće je dodatno obogatiti jaja važnim nutrijentima pa je tako dodavanjem biljnih ulja (lanenog i/ili repičinog) u hranu za nesilice moguće povećati sadržaj n-3 PUFA u jajima, dok je dodatkom ribljeg ulja moguće povećati sadržaj EPA i DHA. Proizvodnja ovakvih jaja predstavlja jeftinu strategiju za uključivanje n-3 PUFA u prehranu. Također, modifikacijom prehrane nesilica moguće je jaja obogatiti vitaminom E, selenijem i luteinom koji omogućavaju sinergistički učinak antioksidativnih sastojaka. Konzumacija obogaćenih jaja pruža jednostavniji unos esencijalnih komponenti koje mogu imati pozitivan učinak kod osoba koje ih konzumiraju pa tako i kod kardiovaskularnih bolesnika [114].

Znanstveni centar izvrsnosti (ZCI) za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska je interdisciplinarni centar izvrsnosti iz područja biotehničkih i biomedicinskih znanosti a kojem je uloga prijenos znanja i kompetencija stečenih u biotehničkim znanostima na temeljna i primijenjena biomedicinska istraživanja. Pri ovom Znanstvenom centru formirana je Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane, a koji čini tim istraživača s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti, Odjela za kemiju Osijek i Medicinskog fakulteta Osijek, a koja je započela s radom 2016. godine. Prvi oblik funkcionalne hrane koji je istraživani pri ZCI bila su jaja obogaćena n-3 PUFA. Dosadašnja istraživanja ove skupine pokazala su kako konzumacija jaja obogaćenih n-

3 PUFA kod mladih zdravih ispitanika poboljšava mikrovaskularnu o endotelu ovisnu vazodilataciju, smanjuje serumske koncentracije proupalnog citokina (INF- $\gamma$ ), a povećava koncentraciju protuupalnog citokina (IL-10) [115]. U skupini od 23 sportaša, konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA poboljšala je mikrovaskularnu reaktivnost ovisnu o perifernom endotelu i smanjila je aktivnost serumskih antioksidativnih enzima (GPx i SOD) u grupi ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja u odnosu na grupu koja je konzumirala obična jaja [116]. U skupini ispitanika s koronarnom bolesti (i akutni i kronični koronarni sindrom), zabilježeno je povećanje n-3 PUFA (EPA) u serumu nakon konzumacije 3 kokošja jaja obogaćena s n-3 PUFA kroz 3 tjedna, te je zabilježeno smanjenje omjera n-6/n-3 PUFA, dok u kontrolnoj skupini nisu zabilježene promjene profila masnih kiselina u serumu. Osim toga, konzumacija jaja obogaćenih s n-3 PUFA imala je blagi protuupalni učinak smanjujući koncentraciju proupalnog citokina IL-1A u skupini ispitanika koja je konzumirala obogaćena jaja [117]. Nakon istraživanja provedenih s n-3 PUFA obogaćenim jajima, skupina istraživača s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti proizvela je jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom te su provedene dodatne studije. U studiji provedenoj na 30 zdravih ispitanika u dobi od 18 do 30 godina, pokazano je kako je konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom dovela do značajanog porasta EPA u usporedbi s bazalnim vrijednostima [118]. Osim toga, u istoj grupi ispitanika utvrđen je blagotvoran učinak jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na mikrocirkulaciju zdravih mladih ispitanika, a koji je određen mjerenjem vazodilatacije ovisne o endotelu (PORH i vazodilatacija izazvana iontoforezom ACh), a što je pripisano povećanom ekspresijom proteina COX-2 u skupini koja je konzumirala obogaćena jaja u odnosu na kontrolnu skupinu [118]. Potrebno je istražiti hoće li, uz n-3 PUFA-a, dodatak drugih nutritivnih elemenata kao što su vitamin E, selenij i lutein ostvariti dodatni, kumulativni učinak u kroničnom koronarnom sindromu.

## **2. CILJ**

Utvrđiti učinak funkcionalne hrane u obliku jaja obogaćenih nutrijentima n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na endotelnu funkciju te na antioksidativni odgovor kod kroničnog koronarnog sindroma.

Utvrđiti učinak konzumacije obogaćenih jaja na vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL kolesterola, HDL kolesterola i triglicerida u serumu.

Pokazati kako konzumacija kokošnjih jaja nema štetan učinak na zdravlje, a niti na vrijednosti lipida u krvi.

### **3. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja je da će konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih s 4 funkcionalna elementa (n-3 PUFA, vitamin E, selenij, lutein) kod kroničnog koronarnog sindroma uzrokovati:

- 1) poboljšanje mikrovaskularne reaktivnosti
- 2) poboljšanje antioksidativnog odgovora
- 3) smanjit će serumsku koncentraciju ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i triglicerida, a povećat će serumsku koncentraciju HDL kolesterola



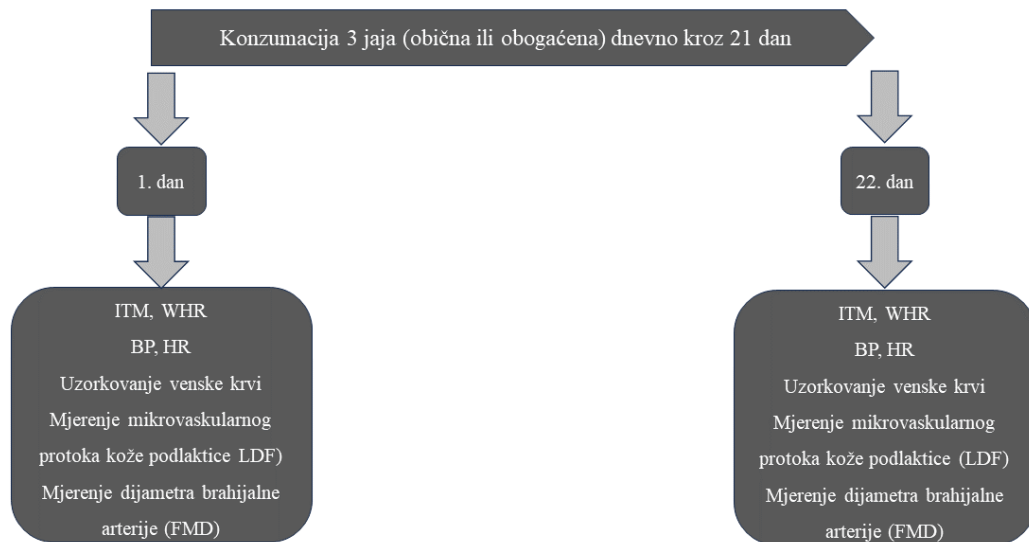
## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ispitanici

U ovoj randomiziranoj, dvostruko slijepoj, placebo kontroliranoj intervencijskoj studiji sudjelovalo je ukupno 30 ispitanika oba spola (9 žena i 21 muškarac) koji su stariji od 18 godina s poznatim kroničnim koronarnim sindromom. Ispitanici su bili osobe koje u osobnoj anamnezi imaju ranije preboljeni akutni koronarni sindrom (uključujući infarkt miokarda sa ST elevacijom, akutni infarkt miokarda bez ST elevacije ili nestabilnu anginu pectoris) ili su imali anginu pectoris, a koronarografijom im je utvrđena aterosklerotska bolest koronarnih arterija. Kod ispitanika je ranije učinjena ili perkutana koronarna intervencija ili kirurško liječenje, a bolest je sada u stabilnoj fazi te zahtjeva daljnju optimalnu medikamentoznu terapiju prema preporukama Europskog kardiološkog društva. Ispitanici su regrutirani u Zavodu za bolesti srca i krvnih žila Kliničkog bolničkog centra Osijek. Isključni kriteriji za sudjelovanje u studiji bili su: kronično ili akutno bubrežno zatajenje, zatajenje jetre (kronična bolest ili oštećena sintetska ili metabolička funkcija jetre), kronična plućna bolest ili stanja kronične hipoksemije, kronične ili aktivne infektivne bolesti sa sistemnim upalnim odgovorom (npr. tuberkuloza), poznate maligne bolesti, autoimune bolesti, nasljedne metaboličke bolesti i druge nasljedne sistemske bolesti, nedavni operativni zahvat (unazad 3 mjeseca), nedavna teža traumatska ozljeda (unazad 6 mjeseci), cerebrovaskularni inzult u zadnjih 6 tjedana, neurodegenerativne bolesti, epilepsija, značajna anemija (vrijednosti hemoglobina <110 g/L kod muškaraca i <100 g/L kod žena), stanje nakon reanimacije (unazad 3 mjeseca), terapija koja značajno utječe na vaskularnu ili imunološku funkciju (npr. imunosupresivni lijekovi, sistemni kortikosteroidi), neregulirane bolesti štitnjače, konzumacija alkohola ili droga.

Za vrijeme trajanja studije ispitanici su redovito uzimali, od strane nadležnog obiteljskog liječnika i/ili specijalista propisanu medikamentoznu terapiju koju koriste i inače, uključujući statine i ostalu terapiju prema smjernicama Europskog kardiološkog društva za liječenje kroničnog koronarnog sindroma (ACE inhibitore, beta blokatore, antitrombocitnu terapiju). Neki ispitanici su koristili i ezetimib. Za vrijeme trajanja protokola, savjetovano im je izbjegavati konzumaciju veće količine hrane bogate n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom kao što je riba, riblje ulje, orašasti plodovi i dr., a što bi moglo utjecati na rezultate istraživanja. Također, tijekom trajanja studije ispitanici nisu koristili suplemente niti druge oblike funkcionalnu hranu obogaćenu n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem niti luteinom.

Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva KBC Osijek (Broj: R2-8262/2020.) i Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/20-08/07, URBROJ: 2158-61-07-20-118).



Slika 3 Vremenski tijek studije s provedenim mjerenjima u svakom studijskom posjetu. (ITM- indeks tjelesne mase, WHR- (eng. waist-to-hip ratio) – omjer struk bokovi BP- (eng. blood pressure) – krvni tlak; HR- (eng. heart rate) – srčana frekvencija)

#### 4.2. Protokol istraživanja

Ispitanici su dobrovoljno regrutirani od strane glavnog istraživača. Prije uključivanja u studiju učinjen je pregled medicinske dokumentacije kako bi se poštovali uključni i isključni kriteriji studije. Kako bi se osigurala objektivna provjera učinka konzumacije obogaćenih jaja, provedena je procedura jednostavne randomizacije kojom su ispitanici bili podijeljeni u dvije skupine, kontrolnu skupinu koja je konzumirala obična kokošja jaja i Nutri4 skupinu koja je konzumirala jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom. Randomizaciju je proveo Istraživač 2 postupkom jednostavne randomizacije pomoću novčića. Nakon randomizacije svakom ispitaniku dodijeljena je jedinstvena šifra i broj 1 (kontrolna grupa) ili 2 (Nutri4) kako niti sudionik niti glavni istraživač ne bi znali kojoj skupini pripadaju ispitanici

sve do završetka protokola. Istraživač 3 dopremao je i numerirao kokošja jaja te ih dijelio ispitanicima. Tijekom studijskog protokola koji traje tri tjedna (21 dan) svi ispitanici su konzumirali tri tvrdo kuhana jaja na dan (ukupno 63 jaja), otprilike u isto doba dana (doručak). U svakoj od grupa bilo je ukupno 15 ispitanika. Eksperimentalna grupa je konzumirala jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom (n-3 PUFA 432 mg, vitamin E 1.098 mg, selenij 0.0191 mg, lutein 0.616 mg/po jajetu), dok je kontrolna grupa konzumirala normalna kokošja jaja (n-3 PUFA 146 mg, vitamin E 0.595 mg, selenij 0.0183 mg, lutein 0.11mg/ po jajetu). Sva jaja, i Nutri4 i obična bila su iste veličine L kako ne bi bilo vidljive razlike među njima.

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju i Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju Katedre za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Sva mjerenja su učinjena prvog dana protokola te po završetku konzumacije jaja, odnosno 22. dan. Sva mjerenja i uzorci krvi uzorkovani su u jutarnjim satima, natašte. Ispitanicima je savjetovana poštediti od jače fizičke aktivnosti 24 sata prije dolaska te je savjetovano izbjegavanje konzumacije kofeina na dan dolaska u laboratorij. Tijekom trajanja dijetalnog protokola ispitanici su vodili dnevnik prehrane, a kako bi se osigurala što bolja suradnja pri konzumaciji jaja, kontaktirani su telefonskim putem nekoliko puta od strane ispitivača.

#### **4.3. Proizvodnja funkcionalno obogaćenih kokošnjih jaja**

Jaja su proizvedena na peradarskoj farmi Marijančanka d.o.o. Marijanci prema protokolima istraživačke grupe Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek [114]. Ukupno 100 kokoši podijeljeno je u dvije grupe. Jedna grupa (kontrolna) hranjena je sa standarnom smjesom za hranjenje koja je sadržavala 5% sojinog ulja, 0,32 mg/kg organskog selenija, 25,20 mg/kg vitamina E i 20,5 mg/kg luteina (ekstrakt cvijeta nevena). Pokusna grupa kokoši hranjena je sa smjesom u kojoj je sojino ulje zamijenjeno s 1,5% ribljeg ulja + 1,5% repičinog ulja + 2,0% lanenog ulja, udio organskog selenija bio je 0,47 mg/kg, vitamina E 125,2 mg/kg i 120,5 mg/kg luteina. Nakon pokusnog perioda u trajanju od pet tjedana, učinjena je analiza ukupno 100 jaja. Pokazano je da je u jajima kokoši koje su hranjene modificiranom prehranom zabilježena povećana količina n-3 PUFA, a smanjena količina n-6 PUFA, osobito arahidonske kiseline što je utjecalo na omjer n-3/n-6 PUFA u jajima. Osim toga, zabilježeno je i značajno povećanje koncentracije selenija i u bjelanjku i u žumanjku, sadržaj vitamina E bio je 2,74 puta veći, a luteina 8.94 puta veći u obogaćenim u usporedbi s običnim jajima. Navedeni način ishrane

omogućio je značajno povećanje koncentracije navedenih nutrijenata u jajima pokusnih kokoši [114]. Sastav jaja naveden je u Tablici 3.

**Tablica 3. Nutritivni sastav jaja i profil masnih kiselina u običnim (Kontrola) i obogaćenim (Nutri4) jajima**

	Kontrolna jaja	Nutri4 jaja
mg/60 g jaja (jestivi dio)*		
Vitamin E (mg)	0,595	1,09
Lutein (mg)	0,11	0,616
Selenij (mg)	0,0183	0,0191
Masne kiseline (mg)		
∑SFA	1566 ± 346	1442±185
∑MUFA	1976 ± 189	2419 ± 139
∑n-6 PUFA	1263 ± 148	747 ± 46
LA	1165 ± 140	702 ± 43
AA	89 ± 9	44 ± 4
∑n-3 PUFA	146 ± 20	342 ± 25
ALA	71 ± 11	189 ± 16
EPA	n.d.	19 ± 2
DHA	75 ± 11	135 ± 11
∑n-6 / ∑n-3 PUFA	8,71	2,18

Podatci su iskazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

∑SFA- (eng. saturated fatty acids) – zasićene masne kiseline (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C23:0); ∑MUFA- (eng. monounsaturated fatty acids) -mononezasićene masne kiseline (C14:1, C16:1, C18:1n9t, C18:1n9c, C20:1n9, C22:1n9); ∑n-6 PUFA- (eng. polyunsaturated fatty acids) – polinezasićene masne kiseline (C18:2n6c, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6, C22:2n6); LA- linoleic acid (C18:2n6c); AA- arahidonska kiselina (C20:4n6); ∑n-3 PUFA- (C18:3n3, C20:3n3, C20:5n3, C22:6n3); ALA- α linoleinska kiselina (C18:3n3); EPA- eikosapentaenoična kiselina (C20:5n3); DHA- dohoheksaenoična kiselina (C22:6n3).

\* L veličina jaja s prosječnom težinom 68g od čega je jestivi dio oko 60g

#### **4.4. Antropometrijska mjerenja i mjerenja krvnog tlaka**

Svim ispitanicima izmjerena je tjelesna visina (m) i tjelesna težina (kg) te je iz tih vrijednosti izračunat indeks tjelesne mase (ITM) koristeći formulu tjelesna masa (kg) / visina<sup>2</sup> (m). Običnim krojačkim metrom izmjeren je opseg struka (cm) i opseg bokova (cm) i izračunat je omjer struk-bokovi. Učinjeno je mjerenje krvnog tlaka i pulsa u tri ponovljena mjerenja prilikom svakog posjeta nakon 15 minuta mirovanja u sjedećem položaju, a iz izmjerenih vrijednosti izračunata je srednja vrijednost. Mjerenje tlaka i pulsa učinjeno je korištenjem automatskog tlakomjera (OMRON M3, OMRON Healthcare Inc., Osaka, Japan), a prema smjernicama Europskog društva za hipertenziju [119].

#### **4.5. Profil slobodnih masnih kiselina, koncentracija vitamina E i selenija i luteina u serumu**

##### **4.5.1. Profil slobodnih masnih kiselina u serumu**

Profil masnih kiselina u serumu izmjeren je u BIOCentru – inkubacijskom centru za bioznanosti u Zagrebu. Za analizu profila masnih kiselina korištena je plinska kromatografija – s tandemskom masenom spektrometrijom. Korišten je GC-MS/MS sustav Thermo Fisher GC Trace 1300 u kombinaciji s TSQ 9000 Triple Quadrupole. Za identifikaciju pojedinačnih masnih kiselina u kromatogramu korištena je standardna mješavina masnih kiselina Supelco 37 Component FAME Mix (Supelco Inc., Bellefonte, PA, SAD). Prije analize uzorci su pohranjeni na -80°C. Za pripremu standardnih otopina priređena je otopina metil estera masnih kiselina (FAME MIX) kao 30 mg/ml ukupne koncentracije masnih kiselina u metilen kloridu od Supelca (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Na 20 µl uzorka seruma u Eppendorf epruveti, dodano je dodatnih 200 µl fiziološke otopine, 1mL metanola i 2 mL kloroforma i miješano je 10 minuta na rotacijskoj miješalici. Potom je dodano 500 µl 1M NaCl-a i ponovno je miješano još 2 minute. Potom je uzorak centrifugiran na 3000 rpm kroz 10 minuta. Centrifugiranjem su razdvojeni slojevi, a potom je 1 mL donjeg sloja kloroforma uzeto u staklenu epruvetu i ispareno do suhog pod strujom dušika. Dodavanjem 1 mL 14% metanolnog borovogfluorida (BF<sub>3</sub>) u ispareni uzorak započeta je metilacija masnih kiselina. Uzorak je zatim stavljen na termoblok na 75 °C na 45 minuta. Nakon hlađenja dodano je 1 ml visoko pročišćene vode i 1 ml heksana i mješano je kroz 2 minute. Nakon odvajanja slojeva, 600 µl gornjeg heksanskog sloja je upareno do suhog. Uzorak je sakupljen i analiziran [120].

#### **4.5.2. Koncentracija vitamina E**

Koncentracija vitamina E u uzorcima seruma mjerena je prema protokolu koji je opisao Jargar [121]. Za određivanje koncentracije vitamina E u plazmi, uzorku je dodan apsolutni alkohol kako bi se postigla denaturacija proteina. Potom je uzorku dodan ksilen i uzorak je centrifugiran. Odvojen je supernatant i dodan je 2,2 bipiridil, a kako bi se dobila crvena boja uzorku je dodan FeCl<sub>2</sub>. Apsorbancija je mjerena spektrometrom (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California) na 492 nm, a dobivena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji vitamina E u serumu [121]. Koncentracija vitamina E mjerena je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

#### **4.5.3. Koncentracija selenija**

Koncentracija selenija u serumu izmjerena je pomoću masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (eng. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Svi uzorci analizirani su u tri primjerka. Uzorci seruma miješani su s ultračistim HNO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 180 °C tijekom 60 minuta u zatvorenom mikrovalnom sustavu CEM Mars (CEM, Matthews, NC, SAD). Svaki uzorak seruma na ICP-u analiziran je internom kontrolom, a za kontrolu analitičke metode korišten je referentni materijal NIST 1567b (pšenično brašno, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju, SAD) [122].

#### **4.5.4. Koncentracija luteina**

Koncentracija luteina u uzorcima seruma mjerena je prema protokolu Tzenga i suradnika [123]. Jedan mililitar destilirane vode i 70 μL otopine etanola s 0.01% askorbinske kiseline (Gram-mol, GRAM-MOL doo, Zagreb, Hrvatska) dodan je u uzorke seruma, smjesa je potom dobro promiješana. Potom je u smjesu dodano dva mL heksana (Carlo Erba, CARLO ERBA Reagents GmbH, Milano, Italija), te je sve zajedno pomiješano i centrifugirano na 2500 rpm/20 min. Nakon centrifugiranja sloj heksana sakupljen i uparen do suhog pod dušikom. Ostatak je otopljen u 100 μL metilen klorida/metanola (45:55) i filtriran kroz membranski filter od 0,2 μm. Dvadeset μL je korišteno za određivanje koncentracije luteina koristeći tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC). Korištena je end-caped HPLC kolona visoke

rezolucije (Hypersil; veličina čestica 5 µm; 4.6 × 250 mm) i C18 analitička kolona (Shim-pack GIST; veličina čestica 5 µm; 250 × 4,6 mm). Za određivanje koncentracija luteina korišten je HPLC LC-30 NEXERA (Shimadzu, Japan, 2018.). Određivanje koncentracije luteina učinjeno je na Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

#### **4.6. Lipidni profil i biokemijske analize u serumu**

Svim ispitanicima uzet je uzorak venske krvi prije početka dijetalnog protokola i dan nakon završetka dijetalnog protokola, a koji su potom analizirani. Dio uzoraka seruma je odvojen i pohranjen u hladnjaku na -80 °C za daljnje analize, a dio je odmah dostavljen u Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek, Osijek, Hrvatska gdje su obavljene daljnje analize.

Vrijednosti kolesterola u serumu određene su enzimatskim testom kolesterol esterazom i kolesterol oksidazom, trigliceridi su određeni enzimatskim testom lipazom, LDL je određen enzimatskim testom kolesterol esterazom, kolesterol oksidazom i katalazom, a HDL vrijednosti su određene prema kalibracijskom pravcu.

Krvna slika određena je putem hematološkoga brojača Sysmex XN-1000 koji direktno određuje broj leukocita (L), eritrocita (E), koncentraciju hemoglobina (Hgb), broj trombocita (Trc), te postotak retikulocita.

Vrijednosti ureje u serumu određene su enzimatski ureazom, kreatinin je određen enzimatskom metodom kreatininazom, vrijednosti kalija određene su indirektnom potenciometrijom, natrij je određen prema kalibracijskom pravcu, kalcij je određen fotometrijskim testom bojanja. Vrijednosti željeza u serumu određene su fotometrijskim testom bojanja, feritin i transferin u serumu su određeni imunoturbidimetrijskim testom. Vrijednosti glukoze u serumu određene su enzimskim UV testom uz heksokinazu. Vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP) su određene imunoturbidimetrijskim testom. Aspartat transaminaza (AST), alanin transaminaza (ALT) su određene fotometrijom – IFCC metodom (eng. International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory medicine), kao i GGT. Svi parametri su određeni na uređaju Olympus AU680, Beckman Coulter.

#### **4.7. O endotelu ovisna i o endotelu neovisna vaskularna reaktivnost u mikrocirkulaciji kože**

Mjerenje protoka u mikrocirkulaciji kože u odgovoru na vaskularnu okluziju (postokluzivna reaktivna hiperemija, PORH) i odgovoru na iontoforezu acetilkolina (ACh), koje se smatraju vazodilatacijom ovisnom o endotelu, te protok u odgovoru na iontoforezu natrijevog nitroprusida (SNP), koji se smatra vazodilatacijom neovisnom o endotelu, mjerene su metodom mjerenja protoka laser Dopplerom (engl. Laser Doppler flowmetry, LDF) (MoorVMS-LDF, Axminster, UK) na koži podlaktice. Ova ispitivanja su učinjena prilikom oba studijska posjeta posjeta u prostoriji u kojoj je temperatura zraka bila  $23.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

S obzirom na osjetljivost tehnike bilo na pomicanje sonde ili pomicanje ispitanika, ispitanici su prilikom mjerenja bili smješteni u udobni ležeći položaj. Nakon razdoblja aklimatizacije i odmora u trajanju 30 minuta, pristupilo se mjerenju. Laserska sonda LDF-a je postavljena na volarnu stranu podlaktice, 13-15 cm od ručnog zgloba, na isto mjesto prilikom oba posjeta. Nakon 2 minute bazalnog mjerenja protoka, napuhivanjem pneumatične manžete 30-50 mmHg iznad sistoličke vrijednosti krvnog tlaka, učinjena je okluzija u području nadlaktice u trajanju od 1 minute. Promjene u mikrocirkulaciji su mjerene prije (B), tijekom (O) i nakon otpuštanja okluzije (R). Protok krvi mikrocirkulacije je izražen u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama (engl. perfusion units, PU) što je određeno softverom koji izračunava površinu ispod krivulje (engl. area under the curve, AUC), a rezultat je izražen kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije i okluzije u odnosu na početnu vrijednost (R-O%) [124].

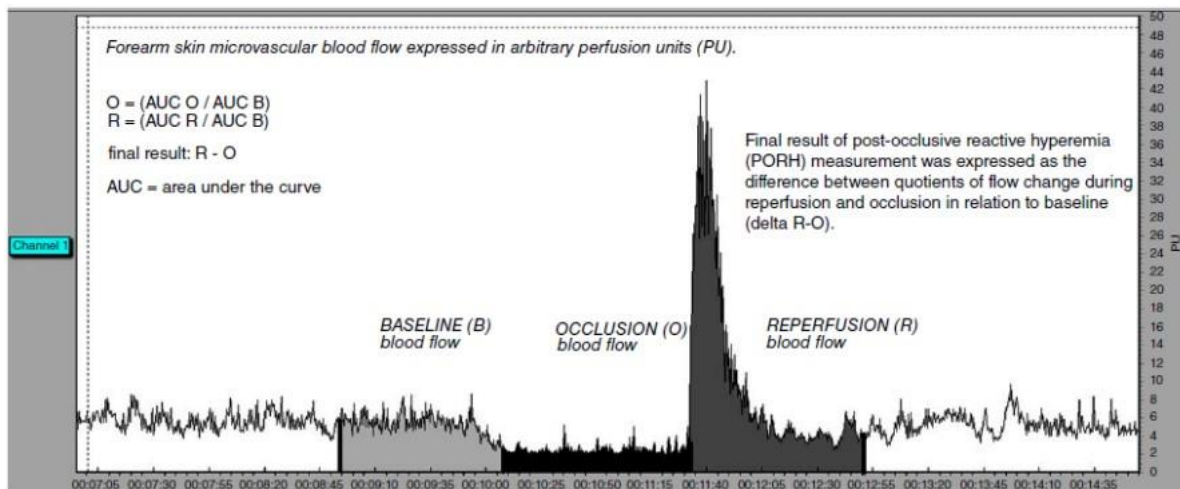
Iontoforeza ACh i SNP je neinvazivna metoda prilikom koje se transdermalno apliciraju nabijene tvari pomoću vanjske električne struje. Iontoforetska elektroda u koju su postavljene tvari (ACh ili SNP) pričvršćena je na lasersku sondu. Nakon 2 minute mjerenja bazalnog protoka, pozitivno nabijeni vazodilatator ACh (1%) je primijenjen pomoću iontoforeze (Iontophoresis Controller MoorVMS-ION)) u sedam aplikacijskih intervala od 0.1 mA tijekom 30 sekundi s 30 sekundi pauze između pojedinih aplikacija. Negativno nabijeni SNP (1%) primijenjen je iontoforezom s tri impulsa od 0.1 mA u trajanju od 30s, nakon čega je uslijedilo 4 pulsa od 0.2 mA sa 90s između svakog impulsa. Protokoli su prilagođeni kako bi se postigao stabilan plato maksimalnog odgovora na iontoforezu. Mikrovaskularni protok krvi izražen je u PU i opisan kao AUC korištenjem originalnog softvera kojeg je osigurao proizvođač (MoorVMS-PC v4.0, Axminster, UK). AUC je određena tijekom početnoga protoka i tijekom stabilnog platoa postignutog nakon primjene ACh-a ili SNP-a. Konačni rezultat izražen je kao povećanje protoka krvi nakon primjene ACh-a ili SNP-a u usporedbi s početnim protokom. Rezultati su izraženi kao porast protoka između bazalnog protoka i protoka nakon primjene ACh ili SNP-a [125,126].



Mjerenja su učinjena u Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.



Slika 4 Prikaz uređaja za LDF i iontoforezu. Slika preuzeta s Internetnet stranice proizvođača ([www.moor.co.uk/products/monitoring/laser-doppler-monitor/](http://www.moor.co.uk/products/monitoring/laser-doppler-monitor/))



Slika 5 Određivanje postokluzivne reaktive hiperemije (PORH) u mikrocirkulaciji kože mjerenjem protoka metodom laser Doppler (LDF). Protok u mikrocirkulaciji određen je kao površina ispod krivulje (AUC, engl. Area Under the Curve) tijekom bazalnoga protoka, okluzije i reperfuzije. Vrijednosti protoka tijekom okluzije i reperfuzije izražene su u obliku postotka u odnosu na bazalni protok, a konačan rezultat izražen je kao razlika postotka promjene protoka tijekom okluzije i reperfuzije u odnosu na bazalni protok (R-O). Promjene u protoku mikrocirkulacije izražene su arbitrarnim perfuzijskim jedinicama (PU, engl. perfusion units). (Izvor: Cavka A, Cosic A, Grizelj I, Koller A, Jelaković B, Lombard JH, Phillips SA, Drenjancevic I. 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. doi: 10.1159/000355723; zapis originalnoga mjerenja, Laboratorij za fiziologiju mikrocirkulacije, Katedra za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek)[124].

#### **4.8. Dilatacija posredovana protokom (eng. flow mediated dilatation, FMD) brahijalne arterije**

Promjene promjera brahijalne arterije u odgovoru na vaskularnu okluziju te sublingvalnu primjenu nitroglicerina određene su pomoću ultrazvuka i odgovarajuće vaskularne sonde (GE Healthcare, Chicago IL, USA, Vivid iQ R2). Mjerenje je vršeno u ležećem položaju ispitanika. Snimanje brahijalne arterije učinjeno je u uzdužnoj ravnini, oko 5 cm proksimalno od antekubitalne jame desne ruke, koja je bila abducirane približno 80° od tijela, sa supiniranom podlakticom. Vaskularna linearna ultrazvučna sonda postavljena je pod kutom od 60° za

vizualizaciju lumena i intime, za mjerenje promjera i brzine protoka (pulsni Doppler). Nakon osnovnog snimanja, izvršena su Doppler očitavanja brzine protoka.

Nakon bazalnog mjerenja, pomoću manžete tlakomjera postavljene proksimalno od mjesta postavljanja sonde, učinjena je vaskularna okluzija na način da je manžeta napuhana najmanje 50 mmHg iznad izmjerene vrijednosti sistoličkog tlaka u trajanju od 5 minuta. Nakon naglog ispuhivanja manžete, ponovno je izmjeren promjer brahijalne arterije. 10 minuta nakon reperfuzije, ispitanicima je aplicirano 400 mikrograma nitroglicerina (Nitrolingual 0,4 mg/dozi sublingvalni sprej, Medis Adria d.o.o) sublingvalno kako bi se odredila o endotelu neovisna vazodilatacija te su promjer brahijalne arterije i brzina protoka ponovno mjereni 5 minuta nakon primjene NTG. Zabilježene ultrazvučne snimke analizirane su softverom Brachial Analyzer for Research v.6 (Medical Imaging Applications, SAD). Protokom posredovana, kao i NTG uzrokovana dilatacija brahijalne arterije izražena je kao postotak povećanja promjera nakon vaskularne okluzije ili primjene NTG-a u usporedbi s bazalnim promjerom arterije (% FMD i % NTG-MD) [127]. Mjerenja su učinjena u Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

#### **4.9. Koncentracija eNOS, iNOS, nNOS**

Koncentracije eNOS, iNOS i nNOS izmjerene su iz uzoraka seruma enzimatskim imunosorbentnim testom (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) korištenjem komercijalno dostupnih kitova (nNOS - CSB-E13872h, CUSABIO, Wuhan, Hubel Province, China), eNOS - CSB-E08322h, CUSABIO, Wuhan, Hubel Province, China i iNOS - CSB-E08148h, CUSABIO, Wuhan, Hubel Province, China), a analize su učinjene prema uputama proizvođača. Mjerenje intenziteta obojenja odnosno apsorbance mjereno je spektrometrom (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California) uz korištenje standardne krivulje. Konačni intenzitet boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji ispitivanog analita u uzorku. Mjerenja su učinjena u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

#### **4.10. Mjerenje koncentracije pro- i anti-upalnih citokina i kemokina u serumu**

Koncentracije TGF-1 $\beta$ , C3a, INF- $\gamma$ , IL6, IL10, IL-17A, IL-23, TNF- $\alpha$  i MCP-1 u serumu izmjerene su s ProcartaPlex Human TGF beta 1 Simplex, ProcartaPlex Human C3a Simplex i

Human ProcartaPlex Mix&Match 7-plex kompletom reagensa koji se temelji na antitijelima i panelima za višestruku kvantifikaciju proteina pomoću platforme Luminex 200. Analiza je učinjena u softveru ProcartaPlex Analyst free software, a koncentracije su izračunate u pikogramima po mililitru. Mjerenja su učinjena u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek, Osijek, Hrvatska.

#### **4.11. Biljezi oksidativnog stresa i biljezi antioksidativnog odgovora**

U svrhu utvrđivanja razine oksidativnog stresa učinjeno je mjerenje stvaranja reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (eng. thiobarbituric acid reactive substance assay, TBARS) TBARS, a u svrhu određivanja antioksidativnog odgovora određena je sposobnost reduciranja željeza u plazmi (eng. ferric ion reducing antioxidant power, FRAP).

TBARS je metoda kojom se određuje koncentracija malondialdehida (MDA) u uzorku, a služi kao biljeg razine oksidativnog stresa. Reakcijom MDA s tiobarbiturnom kiselinom nastaje ružičasta otopina čija se apsorbanca mjeri nanofotometrom P300 UV/VIS, IMPLEN na 572 i 532 nm, a izraženi su kao mikromolarni MDA ekvivalenti ( $\mu\text{M}$  MDA) [128].

FRAP je metoda procjene antioksidativnog kapaciteta plazme. Redukcijom željeza iz  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  praćena je prijenosom elektrona, a količina elektrona proporcionalna je koncentraciji antioksidansa u uzorku. Za određivanje FRAP-a potrebna je otopina željezovoga klorida koja se miješa s uzorkom (2,25 ml reagensa dodaje se u 75  $\mu\text{l}$  plazme). FRAP reagens sastoji se od 388 mM acetatnoga pufera (pH vrijednost 3,6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) otopljenoga u 40 mM HCl i 20 mM  $\text{FeCl}_3$  (željezov(III) klorid) otopljenoga u vodi. Smjesa se zatim inkubira 4 min te nastaje plavo obojeni željezno-tripiridiltriazinski kompleks, nakon čega se mjeri apsorbanca otopine na valnoj duljini od 593 nm pomoću nanofotometra (P300 UV/VIS, IMPLEN) s Troloxom (TE) kao standardom. Rezultati su izraženi kao mikromolarni TE ekvivalenti ( $\mu\text{M/L}$  TE). Apsorbancija se koristi za izračunavanje koncentracije antioksidansa u uzorku, pomoću standardne krivulje [129]. Mjerenja su učinjena u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

U ovom istraživanju učinjena su mjerenja serumske aktivnosti antioksidativnih enzima CAT, GPx i SOD.

Mjerenje aktivnosti enzima u uzorcima seruma provedeno je pomoću spektrometra Lambda 25UV-Vis opremljenog programskim paketom UV WinLab 6.0 (PerkinElmer For the Better, Waltham, Massachusetts, SAD).

Aktivnost katalaze (CAT) mjerena je prema protokolu po Aebiju, korištenjem vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) koncentracije 0,036% kao supstrata u reakcijskoj smjesi s 50 mmol natrijfosfatnog pufera pri pH (7,0). Uslijed razgradnje  $H_2O_2$  pratio se pad apsorbancije tijekom 2 minute svakih 10 sekundi pri valnoj duljini od 240nm [130]. Aktivnost CAT izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina (U/ mg proteina).

Aktivnost glutation peroksidaze (GPx) mjerena je neizravno mjerenjem brzine oksidacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u  $NADP^+$  (metoda po Wendelu). Promjene u apsorbanciji izmjerene su na 340 nm svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Jedna jedinica GPx-a katalizirala je oksidaciju 1  $\mu$ mol-a GSH u GSSG u jednoj minuti pomoću  $H_2O_2$  pri pH 7,0 i 25 °C. Aktivnost GPx izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina (U/mg proteina).

Aktivnost SOD izmjerena je pomoću određivanja inhibicije redukcije citokroma C u sustavu ksantin-ksantin-oksidaza. Aktivnost je određena prema modifikaciji metode koju je opisao Flohé [131]. Jedna jedinica SOD-a inhibirala je stopu redukcije citokroma C za 50 % u povezanom sustavu pomoću ksantin-oksidaze (XOD) i ksantina. Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

Koncentracija proteina u uzorcima (mg/ml) mjerena je Bradfordovim reagensom na 595 nm (Bradford Reagent B6916, Sigma Aldrich), prema protokolu proizvođača, koristeći goveđi serum albumin kao standard. Mjerenja su učinjena u Biokemijskom laboratoriju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

U svrhu utvrđivanja oksidativnog stresa izmjerene su serumske koncentracije OxLDL-a, 8-izo-PGF2a i napredni oksidacijski proteinski proizvodi (AOPP). Serumske koncentracije ljudskog OxLDL (MyBioSource, MyBioSource Inc., San Diego, CA, SAD), 8-izo prostaglandin F2 $\alpha$  (8-izo-PGF2a) (MyBioSource, MyBioSource Inc., San Diego, CA, SAD) i napredni oksidacijski proteinski proizvodi (AOPP) (MyBioSource, MyBioSource Inc., San Diego, CA, SAD) izmjereni su komercijalno dostupnim setovima za imunoenzimski test (ELISA) na kompaktnom čitaču apsorbancije za 96 jažica mikroploče (BioRad PR 3100 TSC, Bio-Rad Laboratories, CA, SAD) na 450 nm. Mjerenja su učinjena u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Osijek.

#### **4.12. Statistička analiza**

Svi rezultati iskazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD). Izračun veličine uzorka dobiven je od preliminarno uključenih 10 ispitanika; izračunata veličina uzorka

bila je 14 po skupini kako bi se dobile razlike u ishodima mjerenima u ovom istraživanju s razinom značajnosti od 0,05 i statističkom snagom od 80% za upareni t-test. Za procjenu normalnosti distribucije podataka korišten je Kolmogorov-Smirnov test normalnosti. Za procjenu razlika unutar grupa (mjerenja provedena prije i nakon odgovarajućeg protokola prehrane) korišten je upareni t-test. Razlike između grupa u mjerenju nakon intervencije testirane su analizom kovarijance (ANCOVA) prilagođenom osnovnom vrijednošću („prije“ kao kovarijabla).  $p < 0,05$  smatra se statistički značajnim. Za statističku analizu korišten je SigmaPlot, verzija 11.2 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, SAD).

## 5. REZULTATI

U studiju je bilo uključeno ukupno 30 ispitanika, a svi uključeni ispitanici završili su trotjedni protokol tijekom kojeg su konzumirali 3 jaja dnevno. Ispitanici u kontrolnoj skupini (njih 15), konzumirali su obična kokošja jaja, dok su ispitanici u Nutri4 skupini (njih 15) konzumirali jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom (Tablica 4).

### 5.1. Opće karakteristike ispitanika, antropometrijska mjerenja i mjerenja krvnog tlaka

Opće karakteristike bolesnika koji su bili sudjelovali u ovoj studiji navedene su u Tablici 4. U kontrolnoj skupini od ukupno 15 ispitanika, bilo je uključeno 5 ispitanika ženskog spola i 10 ispitanika muškog spola. U Nutri4 skupini od ukupno 15 ispitanika, bilo je uključeno 4 ispitanika ženskog spola i 11 ispitanika muškog spola. Prosječna dob i u kontrolnoj i u Nutri4 grupi bila je 59 godina. Sudionici koji su bili uključeni u studiju u obje skupine bili su pretili (određeno kao indeks tjelesne mase (ITM) iznad 30 kg/m<sup>2</sup> i omjer struk bokovi (eng. waist to hip ratio, WHR >0.90). Ispitanici su imali sistolički i dijastolički krvni tlak unutar preporučenih vrijednosti (130/80 mmHg, uz korištenje antihipertenzivne terapije koja je uključivala beta blokatore, inhibitore angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACEI) ili blokatore angiotenzinskih receptora (ARB), blokatore kalcijevih kanala). Navedena mjerenja pokazuju kako su skupine ispitanika bile uniformne prema dobi, ITM, WHR i vrijednostima arterijskog tlaka, te da nije bilo značajnih odstupanja u navedenim varijablama kao i drugim biokemijskim pokazateljima (Tablice 4. i 8.) prilikom ulaska u studiju između Kontrolne i Nutri4 skupine.

Nakon konzumacije jaja niti u Nutri4 grupi niti u kontrolnoj grupi nije bilo statistički značajne razlike u ITM, WHR, vrijednostima sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka kao niti srednjeg arterijskog tlaka i frekvencije pulsa u usporedbi s inicijalnim mjerenjima. Također nije bilo razlike između grupa u navedenim mjerenjima nakon konzumacije jaja normaliziranim u odnosu na početnu vrijednost.

**Tablica 4. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na antropometrijske, hemodinamske i biokemijske parametre u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom**

Parametri	Kontrola (N=15)		Nutri4 (N=15)	
	prije	poslije	prije	poslije
N (Ž/M)	15 (5/10)		15 (4/11)	
Dob (godine)	59 ± 10		59 ± 8	
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	30,3 ± 4.7	30.2 ± 4.6	32,1 ± 6.5	32,1 ± 6,6
WHR	0,93 ± 0.08	0,93 ± 0.08	0,93 ± 0.07	0,94 ± 0,07
SBP (mmHg)	125 ± 21	123 ± 16	122 ± 17	123 ± 15
DBP (mmHg)	82 ± 17	77 ± 10	78 ± 12	78 ± 10
MAP (mmHg)	94 ± 14	92 ± 11	93 ± 13	93 ± 11
HR (otkucaja u minuti)	68 ± 11	66 ± 10	65 ± 8	64 ± 9

Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

ITM – indeks tjelesne mase; WHR- (eng. waist-to-hip ratio) – omjer struk bokovi SBP- (eng.systolic blood pressure) – sistolički krvni tlak; DBP- (eng. diastolic blood pressure) - dijastolički krvni tlak; MAP- (eng. mean arterial pressure) – srednji arterijski tlak; HR- (eng. heart rate) – srčana frekvencija; hsCRP- visoko senzitivni C reaktivni protein; HDL- (eng. high-density lipoprotein) – lipoprotein visoke gustoće; LDL- (eng. low-density lipoprotein) – lipoprotein male gustoće; AST- aspartat aminotransferaza; ALT- alanin aminotransferaza; GGT- gama-glutamil transferaza.

\* P<0.05 prije vs. poslije unutar grupe (Kontrola ili Nutri4)

## **5.2. Profil slobodnih masnih kiselina, koncentracija vitamina E, selenija i luteina u serumu**

Utjecaj konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja (Nutri4) i običnih (Kontrola) jaja na profil slobodnih masnih kiselina u serumu prikazan je u Tablici 5. Konzumacija Nutri4 jaja uzrokovala je statistički značajno sniženje serumske koncentracije dvije zasićene masne kiseline (miristinske i stearinske kiseline) u usporedbi s početnim mjerenjem. Štoviše, nakon



konzumacije jaja koncentracije miristinske kiseline bila je statistički značajno niža u Nutri4 u usporedbi s kontrolnom skupinom neovisno (normalizirano) o početnim vrijednostima.

Što se tiče polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), serumska koncentracija palmitoleinske kiseline (n-7 PUFA) bila je statistički značajno niža nakon dijetalnog protokola u Nutri4 nego u kontrolnoj skupini, neovisno o vrijednosti početnih mjerenja. Serumska koncentracija tri n-6 PUFA (gama-linoleinska kiselina, eikozadienska kiselina, dihomo-gama-linoleinska kiselina) statistički je bila značajno smanjena nakon konzumacije Nutri4 jaja u usporedbi s početnim mjerenjem. U kontrolnoj skupini, konzumacija običnih kokošnjih jaja nije uzrokovala značajnu promjenu koncentracije n-6 PUFA u usporedbi s početnim mjerenjem, niti je bilo razlike između grupa nakon konzumacije jaja (analiza prilagođena početnim vrijednostima).

Nakon konzumacije Nutri4 jaja došlo je do povećanja serumske koncentracije sve tri mjerene n-3 PUFA (alfa-linoleinska kiselina, eikosa-pentaenska kiselina, dokozaheksaenoična kiselina), iako je porast eikosa-pentaenske kiseline dosegao razinu statističke značajnosti u usporedbi s početnim mjerenjem. U kontrolnoj skupini, konzumacija običnih kokošnjih jaja nije uzrokovala značajnu promjenu koncentracije n-3 PUFA u usporedbi s početnim mjerenjem. Serumska koncentracija eikosa-pentaenske kiseline bila je statistički značajno viša nakon konzumacije jaja u Nutri4 u usporedbi s kontrolnom skupinom (analiza prilagođena početnim vrijednostima). Navedene promjene serumske koncentracije n6- i n3-PUFA u Nutri4 skupini uzrokovale su statistički značajno smanjenje n-6/n-3 PUFA omjera u usporedbi s početnim omjerom. U kontrolnoj skupini, konzumacija običnih kokošnjih jaja nije uzrokovala značajnu promjenu n-6/n-3 PUFA omjera u usporedbi s početnim mjerenjem, niti je bilo razlike između grupa nakon konzumacije jaja (analiza prilagođena početnim vrijednostima).

**Tablica 5. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na profil slobodnih masnih kiselina u serumu**

		Kontrola (N=15)		Nutri4 (N=15)	
		Prije	Poslije	Prije	Poslije
SFA (μmol/L)					
	C8:0 Kaprilna kiselina	N/F	N/F	33,6	61,2
	C10:0 Kaprinska kiselina	<LOQ	<LOQ	67,8 ± 34,2	70,8
	C12:0 Laurinska kiselina	29,9 ± 10,5	92,8	27,7 ± 1,7	27,70
	C14:0 Miristinska kiselina	85,6 ± 5,5	98,5 ± 49,7	86,0 ± 27,6	69,1 ± 17,5 *†
	C15:0 Pentadecilna kiselina	15,0 ± 3,2	15,9 ± 3,2	16,4 ± 4,7	15,0 ± 2,8
	C16:0 Palmitinska kiselina	1936 ± 324	1958 ± 372	2263 ± 446	2112 ± 443
	C17:0 Margarična kiselina	21,0 ± 5,6	22,0 ± 3,0	22,2 ± 4,3	20,9 ± 3,9
	C18:0 Stearinska kiselina	886 ± 192	815 ± 68	887 ± 83	826 ± 77 *
PUFA (μmol/L)					
n-7	C16:1[cis-9] Palmitoleinska kiselina	311 ± 113	257 ± 135	218 ± 121	196 ± 105†
	C17:1[cis-10] cis-10-heptadecenska kiselina	14,0 ± 0,8	<LOQ	<LOQ	14,60
	C18:1[cis-9] Oleinska kiselina	930 ± 814	1421 ± 362	1550 ± 423	1554 ± 504
n-9	C20:1[cis-11] 11-eikosenska kiselina	18,6 ± 10,8	12,7 ± 4,1	14,1 ± 4,6	14,4 ± 4,9
	C24:1[cis-15] Nervonska kiselina	<LOQ	9,73 ± 0,54	7,34 ± 0,96	6,86 ± 0,02
n-6	C18:2[cis-9.12] Linolna kiselina	1424 ± 359	1540 ± 205	1806 ± 407	1854 ± 906
	C18:3[cis-6.9.12] gamma-linoleinska kiselina	53,8 ± 10,8	59,6 ± 15,4	60,8 ± 12,8	46,2 ± 11,9 *
	C21:2[cis-11.14] Eikozadienska kiselina	16,9 ± 0,5	15,8 ± 3,5	17,7 ± 3,2	16,2 ± 4,3 *
	C20:3[cis-8.11.14] Dihomogamma-linoleinska kiselina	89,6 ± 21,8	99,9 ± 22,4	187,2 ± 74,8	140,8 ± 71,5 *
	C20:4[cis-5.8.11.14] Arahidonska kiselina	647 ± 179	759 ± 104	683 ± 172	683 ± 211
n-3	C18:3[cis-9.12.15] alfa-Linoleinska kiselina	17,4 ± 3,5	19,5 ± 4,6	21,3 ± 6,9	28,8 ± 14,9
	20:5[cis-5.8.11.14] Eikosa-5.8.11.14.17-pentaenska kiselina	20,7 ± 9,0	25,0 ± 13,0	29,0 ± 16,2	37,3 ± 13,7 *†
	C22:6[cis-4.7.10.13.16.19] cis-4.7.10.13.16.19-Dokozaheksaenoična kiselina	143,4 ± 132,2	165,3 ± 81,4	244,5 ± 90,5	296,0 ± 18,9
n6 / n3 PUFA		26,3 ± 19,9	23,3 ± 19,4	26,7 ± 24,8	17,5 ± 17,1 *

Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

<LOQ – ispod limita kvantifikacije, N/F nije nađeno

\* P<0.05 prije vs. nakon unutar grupe (kontrolne i Nutri4 grupe) - paired t-test

† P<0.05 razlika između grupa

Tablica 6. prikazuje utjecaj konzumacije Nutri4 jaja i običnih jaja na koncentracije selenija, vitamine E i luteina u serumu kod pacijenata oboljelih od kroničnog koronarnog sindroma. U Nutri4 grupi, nakon konzumacije jaja, statistički značajno se povećala serumska koncentracija vitamina E u usporedbi s koncentracijom mjerenom prije dijetalnog protokola. Koncentracija vitamina E u kontrolnoj skupini nije se značajno mijenjala nakon dijetalnog protokola. Po završetku dijetalnog protokola nisu izmjerene značajne razlike u koncentracijama vitamina E između Kontrolne i Nutri4 grupe (analiza prilagođena početnom mjerenju).

U Nutri4 grupi, nakon konzumacije obogaćenih jaja, serumska koncentracija selenija bila je statistički značajno veća u usporedbi s koncentracijom selenija prije dijetalnog protokola. U Kontrolnoj grupi serumska koncentracija selenija se nije značajno mijenjala nakon konzumacije jaja. Vrijednosti koncentracija selenija nisu se razlikovale između grupa po završetku dijetalnog protokola.

Nakon konzumacije običnih i Nutri4 jaja, koncentracija luteina se nije statistički značajno promijenila u odnosu na koncentraciju luteina u serumu na početku protokola. Nisu zabilježene značajne razlike u koncentraciji luteina u serumu između Nutri4 i kontrolne grupe po završetku protokola.

**Tablica 6. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i Nutri4 jaja na koncentracije selenija, vitamina E i luteina u serumu kod kroničnog koronarnog sindroma**

Parametri	Kontrola (N=15)		Nutri4 (N=15)	
	prije	poslije	prije	poslije
82Se (µg/L)	70,0 ± 16,1	75,5 ± 15,9	71,1 ± 19,3	85,1 ± 27,3 *
Vitamin E (ug/mL)	8,99 ± 4,17	8,88 ± 3,97	7,17 ± 4,40	9,36 ± 4,44 *
Lutein (µmol/L)	0,15 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,16 ± 0,09

Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna devijacija SD).

n-3 PUFAs- n-3 polinezasićene masne kiseline; Se- selenij

\* P<0.05 prije vs. poslije unutar grupe (Kontrola ili Nutri4) - paired t-test

### 5.3. Lipidni profil i biokemijske analize u serumu

Utjecaj konzumacije običnih (kontrolnih) i obogaćenih (Nutri4) jaja na lipidni profil ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom prikazan je u Tablici 7. U Nutri4 skupini ispitanika, nakon opisanog dijetalnog protokola, statistički se značajno smanjila serumska koncentracija triglicerida, dok su koncentracije ukupnog kolesterola, HDL-a i LDL-a ostale nepromijenjene, neovisno o početnim vrijednostima. U kontrolnoj skupini nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji serumskih lipida (ukupni kolesterol, HDL, LDL, trigliceridi) nakon konzumacije običnih kokošnjih jaja u usporedbi s početnim vrijednostima. Nisu zabilježene značajne razlike između grupa u navedenim parametrima nakon dijetalnog protokola.

**Tablica 7. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na lipidogram u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom**

Parametri	Kontrola (N=15)		Nutri4 (N=15)		Referentna vrijednost
	Prije	Poslije	Prije	Poslije	
Kolesterol (mmol/L)	3,53 ± 0,63	3,55 ± 0,62	4,14 ± 1,50	3,81 ± 0,87	<5
Trigliceridi (mmol/L)	1,44 ± 0,75	1,36 ± 0,66	1,58 ± 0,80	1,30 ± 0,60 *	<1,70
HDL (mmol/L)	1,20 ± 0,34	1,13 ± 0,34	1,20 ± 0,34	1,24 ± 0,40	>1,20
LDL (mmol/L)	2,01 ± 0,50	1,98 ± 0,51	2,52 ± 1,16	2,22 ± 0,54	<3,00

Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

HDL- (eng. high-density lipoprotein) – lipoprotein visoke gustoće; LDL- (eng. low-density lipoprotein) – lipoprotein male gustoće

\* P<0.05 prije vs. poslije unutar grupe (Kontrola ili Nutri4)

U Tablici 8. prikazane su rezultati biokemijskih analiza uzoraka seruma ispitanika. Parametri krvne slike (uključujući broj eritrocita, leukocita, trombocita, hemoglobin i hematokrit) nisu se značajno mijenjali nakon konzumacije jaja niti u kontrolnoj niti u Nutri4 skupini ispitanika u usporedbi s početnim mjerenjima. Također nije bilo značajne razlike u navedenim parametrima između grupa po završetku dijetalnog protokola.

Nisu zabilježene značajne razlike u parametrima bubrežne funkcije (urea, kreatinin), niti su zabilježene značajne razlike u mjerenim elektrolitima (Na, K, Ca) nakon dijetetskog protokola niti u jednoj skupini ispitanika. Za navedene parametre nije bilo značajne razlike između grupa ispitanika na kraju dijetalnog protokola. Konzumacija niti običnih niti Nutri4 kokošnjih jaja nije značajno utjecala na vrijednosti fibrinogena, željeza, transferina, glukoze i CRP-a, dok se u kontrolnoj skupini nakon konzumacije običnih jaja značajno smanjila koncentracija feritina u serumu. Nisu zabilježene promjene koncentracija parametara jetrene funkcije (AST, ALT) dok se razina GGT-a značajno smanjila u obje skupine nakon dijetalnog protokola u odnosu na početne vrijednosti (Tablica 8). Za navedene parametre nisu zabilježene značajne razlike u vrijednostima na kraju protokola između Nutri4 i Kontrole grupe.

**Tablica 8. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na biokemijske parametre u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom**

Parametar	Kontrola (N=15)		Nutri4 (N=15)		Referentna vrijednost
	Prije	Poslije	Prije	Poslije	
E(x10E12/L)	4,8 ± 0,4	4,8 ± 0,5	5,0 ± 0,7	4,9 ± 0,6	3,86 – 5,08
Hemoglobin (g/L)	142 ± 10	142 ± 13	143 ± 12	144 ± 13	119 - 157
Hematokrit (%)	42 ± 3	42 ± 4	42 ± 4	42 ± 4	36 - 47
L(x10E9/L)	7,3 ± 2,2	7,2 ± 1,8	7,0 ± 2,3	7,9 ± 2,4	3,4 – 9,7
Trc(x10E9/L)	210 ± 54	207 ± 58	229 ± 68	221 ± 50	158 – 424
Urea (mmol/L)	5,8 ± 1,8	6,4 ± ,7	6,4 ± 2,1	6,7 ± 2,1	2,8 – 8,3
Kreatinin (µmol/l)	74,1 ± 20,1	76,3 ± 27,4	80,7 ± 18,4	80,3 ± 13,1	49 – 90
Natrij (mmol/l)	139,7 ± 2,2	139,6 ± 2,1	139,5 ± 3,1	139,7 ± 2,6	137 – 146
Kalij (mmol/l)	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,4	3,9 – 5,1
Kalcij (mmol/L)	2,39 ± 0,09	2,40 ± 0,10	2,37 ± 0,07	2,36 ± 0,10	2,14 – 2,53
Fibrinogen	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,4	3,1 ± 0,5	3,0 ± 0,5	1,8 – 3,5
Željezo (µmol/L)	15,5 ± 4,7	14,3 ± 4,0	17,0 ± 5,8	15,1 ± 5,8	8,0 – 30,0
Transferin (g/L)	2,50 ± 0,45	2,46 ± 0,38	2,53 ± 0,50	2,58 ± 0,37	2,0 – 3,6
Feritin (µg/L)	161 ± 133	149 ± 136*	151 ± 117	138 ± 115	10 – 120
Glukoza (mmol/L)	7,1 ± 2,4	6,5 ± 1,6	6,3 ± 1,9	6,2 ± 1,9	4,4 – 6,4
HsCRP (mg/L)	1,56 ± 1,30	2,14 ± 2,81	1,28 ± 0,83	1,32 ± 1,26	<5
AST (U/L)	29,0 ± 5,9	27,5 ± 6,3	28,8 ± 9,8	28,1 ± 7,9	8 – 30
ALT (U/L)	39,5 ± 29,0	3,1 ± 14,3	34,6 ± 14,7	33,3 ± 13,8	10 – 36
GGT (U/L)	27 ± 20	25 ± 17 *	25 ± 9	23 ± 8 *	9 – 35

Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

E – eritrociti, L – leukociti, Trc – trombociti, hsCRP- visoko senzitivni C reaktivni protein; AST- aspartat aminotransferaza; ALT- alanin aminotransferaza; GGT- gama-glutamil transferaza.

\* P<0.05 prije vs. poslije unutar grupe (Kontrola ili Nutri4)

#### 5.4. O endotelu ovisna i o endotelu neovisna vaskularna reaktivnost u mikrocirkulaciji kože

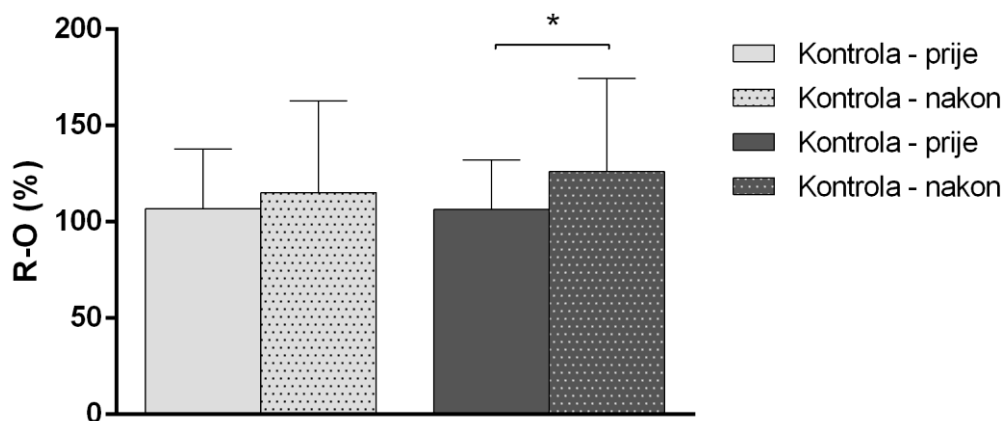
PORH i vazodilatacija izazvana ACh predstavljaju jednostavan test za procjenu endotelne funkcije mjerenjem protoka krvi u mikrocirkulaciji kože pomoću LDF, dok iontoforeza SNP predstavlja test za procjenu o endotelu neovisne vazodilatacije. Rezultati ove studije su pokazali kako je konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom (Nutri4 jaja) dovela do PORH odgovora, dok u skupini ispitanika koji su konzumirali obična jaja nije zabilježena promjena protoka krvi kao odgovora na vaskularnu okluziju (PORH). Nije bilo razlike u PORH odgovoru nakon odgovarajućeg dijetnog protokola između Kontrolne i Nutri4 grupe (Slika 6A).

Zatim, u skupini ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja (Nutri4 grupa), nakon konzumacije obogaćenih jaja, značajno se poboljšala ACh-inducirana dilatacija (AChID) mikrocirkulacije kože podlaktice u usporedbi s bazalnim mjerenjem (Slika 6B). U grupi ispitanika koji su konzumirali obična (Kontrolna) jaja, nije zabilježena promjena u AChID između početnog mjerenja i mjerenja nakon konzumacije običnih kokošnjih jaja. Nije bilo statistički značajne razlike u AChID periferne mikrocirkulacije između kontrolne i Nutri4 skupine nakon odgovarajućih dijetnih protokola (prilagođeno početnom mjerenju).

Konzumacija jaja (ni običnih ni Nutri4 jaja) nije uzrokovala promjene u SNP-induciranoj dilataciji (SNPID) periferne mikrocirkulacije u usporedbi s početnim mjerenjima. Nadalje, nije bilo razlike u SNPID između grupa nakon provedenog odgovarajućeg dijetnog protokola (prilagođena početnoj vrijednosti (Slika 6C).

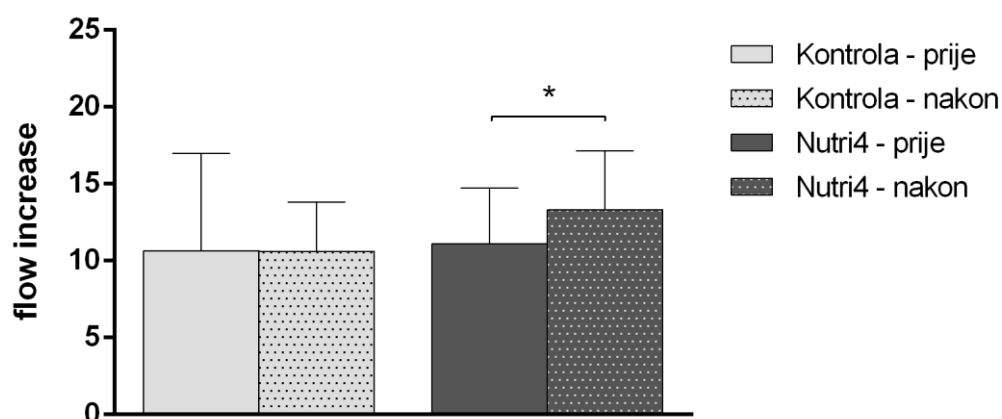
A

##### Post-okluzivna reaktivna hiperemija (PORH)



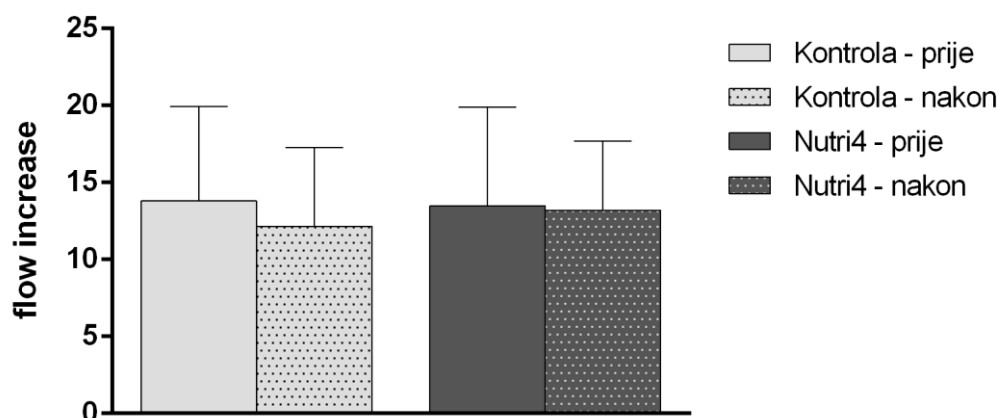
B

## Acetilkolinom inducirana dilatacija (AChID)



C

## Natrijevim nitroprusidom inducirana dilatacija (SNPID)



Slika 6 Utjecaj konzumacije običnih (Kontrola) i obogaćenih (Nutri4) jaja na o endotelu ovisnu i o endotelu neovisnu vaskularnu reaktivnost mikrocirkulacije kože podlaktice procijenjeno laser Dopplerom (LDF). (A) Postokluzivna reaktivna hiperemija (PORH), (B) Dilatacija izazvana acetilkolinom (AChID), (C) Dilatacija inducirana natrijevim nitroprusidom (SNPID). PORH se izražava 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 između osnovnog protoka i protoka nakon primjene ACh ili SNP. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD); \*  $P < 0,05$  prije vs. poslije unutar grupe - upareni t-test.

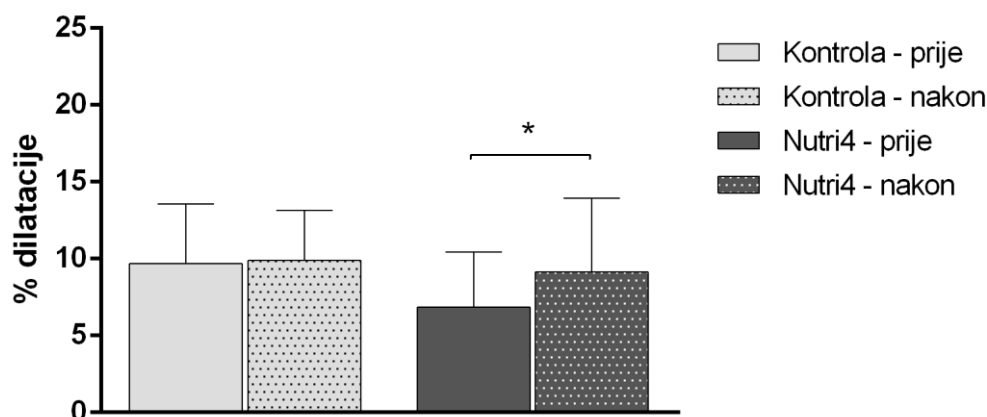


### **5.5. Dilatacija posredovana protokom (eng. flow mediated dilatation, FMD) brahijalne arterije.**

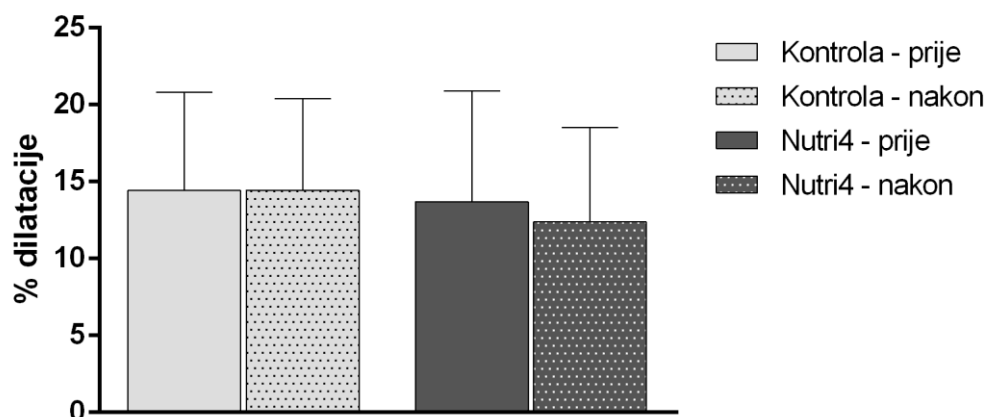
FMD brahijalne arterije je neinvazivnu metodu za procjenu arterijske vazodilatacije ovisne o endotelu koja je dominantno posredovana NO-om, te danas predstavlja referentnu metodu za procjenu endotelne funkcije velikih krvnih žila.. Slika 7. prikazuje FMD brahijalne arterije u Kontrolnoj i Nutri4 skupini prije i nakon provedenog odgovarajućeg dijetalnog protokola. U ovoj studiji, u skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom koja je konzumirala obogaćena (Nutri4) jaja, bilo je zabilježeno značajno poboljšanje FMD-a brahijalne arterije nakon provedenog dijetalnog protokola (FMD % dilatacije prije  $6.84 \pm 3.60$  vs. nakon konzumacije obogaćenih jaja  $9.14 \pm 4.79$ ,  $P=0.015$ ), dok u kontrolnoj skupini (koja je konzumirala obična jaja) nije bilo značajne razlike u vrijednostima FMD-a nakon provedenog dijetalnog protokola u usporedbi s početnim mjerenjem (FMD % dilatacija prije  $9.67 \pm 3.60$  vs. nakon  $9.89 \pm 3.26$ ,  $P=0.850$ ). Nije bilo značajne razlike u FMD brahijalne arterije između Kontrolne i Nutri4 skupine nakon dijetalnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju) (Slika 7A).

Nitroglicerinom (NTG) posredovana dilatacija (NTG-MD) brahijalne arterije predstavlja metodu za procjenu o endotelu neovosne dilatacije velikih krvnih žila. Niti u Nutri4 skupini niti u Kontrolnoj skupini nije bilo značajne promjene u NTG-MD nakon provedenog dijetalnog protokola u odnosu na bazalna mjerenja (Nutri4 grupa: NTG % dilatacija prije  $13,70 \pm 7,19$  vs. nakon  $12,38 \pm 6,12$ ,  $P=0,502$ ; Kontrolna grupa: NTG % dilatacija prije  $14.42 \pm 6.40$  vs. nakon  $14.46 \pm 5.95$ ,  $P=0.985$  (Slika 7B). Nije bilo značajne razlike u NTG-MD između Kontrolne i Nutri4 grupe na kraju dijetalnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju).

**A Protokom posredovana dilatacija (FMD) brahijalne arterije**



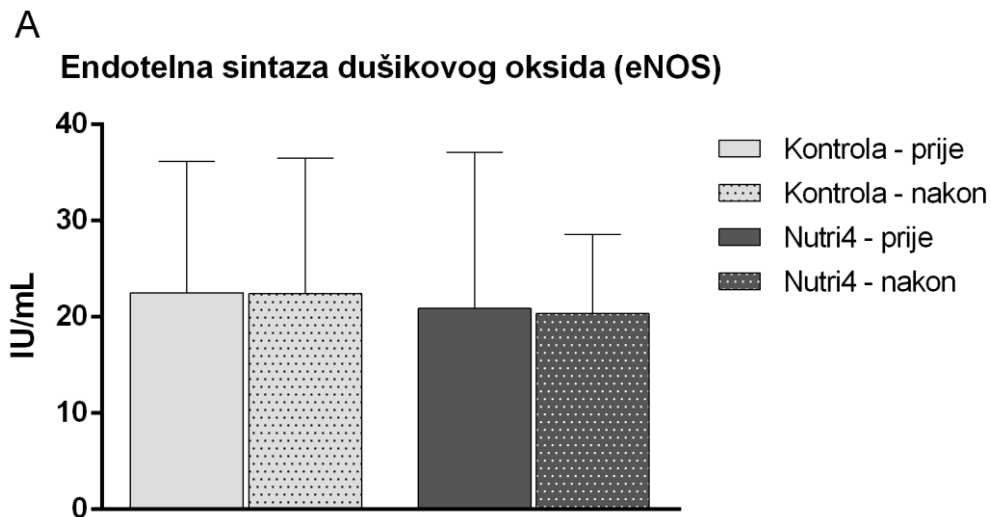
**B Nitroglicerinom posredovana dilatacija (NTG-MD) brahijalne arterije**

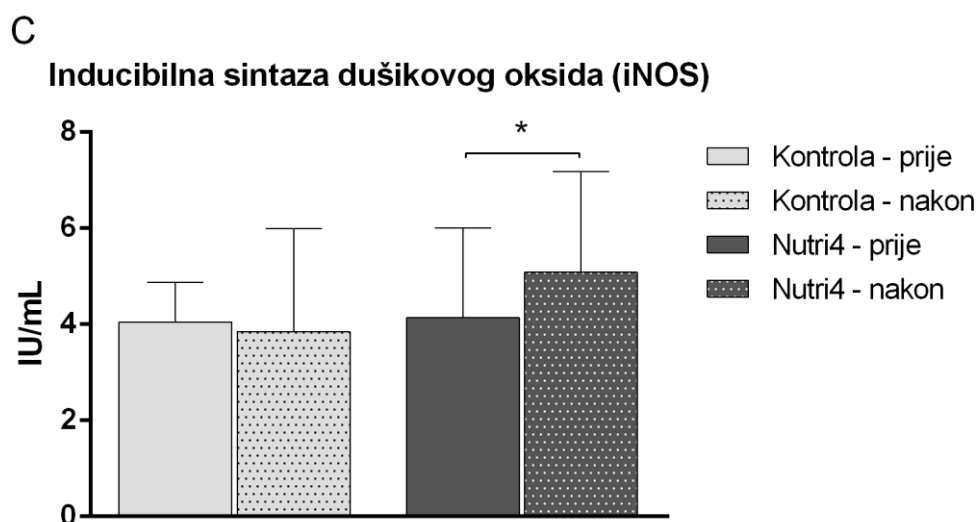
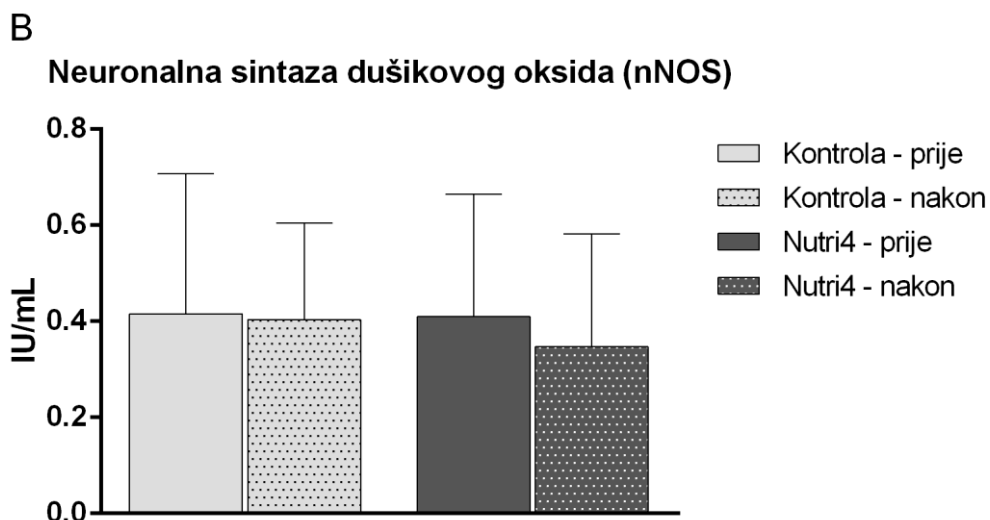


Slika 7 prikaz utjecaja konzumacije običnih (Kontrola) i obogaćenih (Nutri4) jaja na protok brahijalne arterije (FMD, ovisan o endotelu) i dilataciju posredovanu nitroglicerinom (NTG, neovisno o endotelu). (A) Dilatacija posredovana protokom (FMD), (B) Dilatacija posredovana nitroglicerinom (NTG). Promjene u promjeru brahijalne arterije izražene su kao postotna promjena u odnosu na promjer žile prije okluzije ili primjene NTG. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD); \*  $P < 0,05$  prije vs. poslije unutar grupe, upareni t-test.

## 5.6. Koncentracija eNOS, iNOS, nNOS

Slika 8. prikazuje utjecaj konzumacije običnih i obogaćenih jaja na koncentracije tri izoforme enzima NOS. U Nutri4 skupini ispitanika značajno se povećala koncentracija iNOS-a u serumu nakon konzumacije obogaćenih jaja ( $4,62 \pm 2,68$  prije vs.  $5,39 \pm 4,57$  IU/ml) (Slika 8 C), dok se koncentracije nNOS i eNOS nisu statistički značajno mijenjale u usporedbi s početnim mjerenjem (Slika 8 A i B). U kontrolnoj skupini nisu zabilježene statistički značajne razlike u koncentraciji ovih enzima nakon konzumacije jaja u usporedbi s početnim mjerenjem. Nisu zabilježene značajne razlike u koncentracijama eNOS, nNOS i iNOS između grupa nakon odgovarajućeg dijetalnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju).





Slika 8 prikazuje učinak konzumacije običnih (Kontrola) i obogaćenih (Nutri4) jaja na serumske koncentracije tri izoforme sintaze dušikovog oksida. (A) endotelna NOS (eNOS), (B) neuronalna NOS (nNOS), (C) inducibilna NOS (iNOS). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD); \*  $p < 0,05$  prije vs. poslije unutar grupe - upareni t-test.

## 5.7. Mjerenje koncentracije pro- i protu-upalnih citokina i kemokina u serumu

U tablici 9 prikazan je utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na serumsku koncentraciju pro i protu-upalnih citokina i kemokina. U Nutri4 skupini značajno se bila smanjila koncentracija TGF-1 $\beta$  i IL-17A nakon konzumacije obogaćenih jaja u usporedbi s početnim mjerenjem, dok je koncentracija TNF- $\alpha$ , C3a, INF- $\gamma$ , IL6, IL10, IL-23, TNF- $\alpha$  i MCP-1 ostala nepromijenjena po završetku dijetalnog protokola. U kontrolnoj skupini nisu zabilježene statistički značajne razlike u izmjerenoj koncentraciji navedenih citokina i kemokina nakon konzumacije jaja u usporedbi s početnim koncentracijama (Tablica 9). Mjerene koncentracije pro- i protu-upalnih citokina nisu se značajno razlikovale između grupa po završetku odgovarajućeg dijetalnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju).

**Tablica 9. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na serumsku koncentraciju pro i antiupalnih citokina i kemokina**

Parametri	Kontrola (N=15)		Nutri4 (N=15)	
	prije	poslije	prije	poslije
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	3,42 $\pm$ 0,66	3,55 $\pm$ 0,5	3,47 $\pm$ 0,52	3,3 $\pm$ 0,46
TGF-1 $\beta$ (pg/mL)	2845 $\pm$ 867	3181 $\pm$ 587	2497 $\pm$ 1344	1556 $\pm$ 531 *
C3a(pg/mL)	4232 $\pm$ 2639	4243 $\pm$ 2685	4548 $\pm$ 2296	4635 $\pm$ 1946
INF- $\gamma$ (pg/mL)	9,86 $\pm$ 1,73	9,55 $\pm$ 1,34	9,83 $\pm$ 1,50	9,36 $\pm$ 1,16
IL-6 (pg/mL)	18,1 $\pm$ 0,6	18,0 $\pm$ 0,8	17,7 $\pm$ 0,8	17,4 $\pm$ 1,3
IL-10 (pg/mL)	0,86 $\pm$ 0,28	0,87 $\pm$ 0,45	0,77 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,17
IL-17A (pg/mL)	9,0 $\pm$ 0,23	8,69 $\pm$ 0,83	9,04 $\pm$ 0,25	7,73 $\pm$ 1,37 *
IL-23 (pg/mL)	9,89 $\pm$ 0,69	9,85 $\pm$ 0,58	10,24 $\pm$ 0,54	10,29 $\pm$ 0,92
MCP-1 (pg/mL)	37,4 $\pm$ 16,3	36,7 $\pm$ 22,6	24,6 $\pm$ 15,4	31,2 $\pm$ 2,45

Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija SD).

TNF- $\alpha$ - tumor nekrotizirajući čimbenik alfa, TGF-1 $\beta$  – transformirajući čimbenik rasta 1 beta; C3a – komponenta komplementa; INF- $\gamma$  – interferon gama; IL-6 – interleukin 6; IL-10 – interleukin 10; IL 17A – interleukin 17A; IL-23 – interleukin 23; MCP-1- monocitni kemoatraktivni protein-1.

\* P<0.05 prije vs. poslije unutar grupe (Kontrola ili Nutri4) - paired t-test

## 5.8. Biljezi oksidativnog stresa i biomakeri antioksidativnog odgovora

U tablici 10 prikazan je utjecaj konzumacije funkcionalno obogaćenih jaja (Nutri4) i običnih jaja (Kontrola) na biomarkere oksidativnog stresa i biomarkere antioksidativnog odgovora kod bolesnika s kroničnim koronarnim sindromom.

Tri tjedna konzumacije niti običnih niti obogaćenih jaja nisu utjecala na razine oksidativnog stresa niti antioksidativni kapacitet u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom. Nakon konzumacije jaja nije zabilježeno značajne razlike u razini oksidativnog stresa (određenog kao TBARS) niti je bilo značajne razlike izmjerenim vrijednostima antioksidativnog kapaciteta, određenom kao FRAP niti u kontrolnoj niti u Nutri4 skupini ispitanika u usporedbi s osnovnim mjerenjima prije konzumacije jaja. Također nisu zabilježene razlike između ispitivanih grupa niti na početku niti po završetku dijetalnog protokola.

Antioksidativni enzimi predstavljaju važne markere oksidativnog stresa, a njihova se aktivnost generalno povećava tijekom oksidativnog stresa. Nakon provedenog dijetalnog protokola u skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom, aktivnosti CAT i SOD u serumu nisu se značajno mijenjale niti u kontrolnoj niti u Nutri 4 skupini. Osim toga, aktivnosti ova dva enzima nisu se razlikovale između grupa niti na početku dijetalnog protokola, niti po njegovom završetku. Aktivnost GPx bila je znatno niža u skupini Nutri4 u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali na nju nije utjecala konzumacija obogaćenih jaja.

ELISA analizom nisu utvrđene promjene serumske koncentracije oksidiranog lipoproteina niske gustoće (OxLDL), 8-izo prostaglandina F<sub>2α</sub> niti AOPP-a niti u kontrolnoj niti u Nutri4 grupi nakon konzumacije jaja.

**Tablica 10. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na biomarkere oksidativnog stresa i antioksidativni kapacitet**

Parametri	Kontrola (N=15)		Nutri4 (N=15)	
	Prije	Poslije	Prije	Poslije
<b><i>Biljezi oksidativnog stresa</i></b>				
TBARS (mM/L TE)	0,029 ± 0,007	0,032 ± 0,008	0,033 ± 0,008	0,490 ± 0,007
8-iso-PGF2 $\alpha$ (pg/mL)	140 ± 58	129 ± 48	223 ± 266	227 ± 282
AOPP ( $\mu$ mol/L)	0,056 ± 0,003	0,055 ± 0,003	0,056 ± 0,004	0,055 ± 0,003
OxLDL (pg/mL)	103 ± 10	102 ± 9	111 ± 7	110 ± 5

***Biljezi antioksidativnog odgovora***

FRAP ( $\mu$ m/MDA)	0,250 ± 0,021	0,246 ± 0,034	0,397 ± 0,166	0,355 ± 0,128
CAT (U/mg protein)	4,716 ± 1,464	4,022 ± 1,054	5,138 ± 1,462	4,507 ± 1,873
GPx (U/mg protein)	0,021 ± 0,003	0,022 ± 0,002	0,017 ± 0,003	0,017 ± 0,003
SOD (U/mg protein)	5,073 ± 0,400	5,287 ± 0,259	5,400 ± 0,343	5,387 ± 0,233

Podatci su predstavljeni kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija SD.

TBARS- eng. thiobarbituric acid reactive substances; 8-iso-PGF2 $\alpha$ - 8-iso prostaglandin F2 $\alpha$ , AOPP- eng. advanced oxidation protein products; OxLDL- eng. oxidized low-density lipoprotein; FRAP- ferric reducing ability of plasma; CAT- katalaza; GPx- glutation peroksidaza; SOD- superoksid dismutaza

\* P<0.05 prije vs. poslije unutar grupe (Kontrola ili Nutri4) - paired t-test

## 6. RASPRAVA

Istraživanje koje je dio ove disertacije prva je prospektivna, randomizirana, intervencijska, dvostruko slijepa studija koja je ispitala utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih s četiri nutrijenta (n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom) na mikrovaskularnu i makrovaskularnu reaktivnost, lipidni profil, razinu oksidativnog stresa i antioksidativni kapacitet, koncentraciju proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina i kod pacijenata oboljelih od kroničnog koronarnog sindroma. U istraživanju je sudjelovalo ukupno 30 ispitanika podijeljenih u dvije skupine, kontrolnu i Nutri4 skupinu.

Najznačajniji rezultati ovog istraživanja su sljedeći: (a) konzumacija jaja Nutri4 poboljšala je o endotelu ovisnu vazodilataciju na razini mikro i makrocirkulacije (tj., mikrovaskularni PORH i AChID te FMD brahijalne arterije), te je povećala koncentraciju iNOS u serumu; (b) konzumacija Nutri4 jaja smanjila je razinu triglicerida u serumu; (c) konzumacija Nutri4 jaja smanjila je serumske koncentracije proupalnih citokina IL-17A i TGF-1 $\beta$ ; i (d) konzumacija Nutri4 jaja nije značajno utjecala na biomarkere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (TBARS, OxLDL, 8-iso-PGF2 $\alpha$ , AOPP, FRAP, aktivnost CAT, SOD i GPx u serumu) u ispitanika s CCS.

Ovom istraživanju prethodilo je istraživanje čiji je cilj bio istražiti utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA kod ispitanika s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom, a koje je pokazalo kako konzumacija ovih jaja povećava koncentraciju n-3 PUFA u serumu, mijenja profil slobodnih masnih kiselina u povoljniji omjer n-6/n-3 te ostvaruje blage protuupalne učinke.

### **6.1. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na koncentraciju slobodnih masnih kiselina u serumu**

U ovoj studiji, konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom uzrokovala je značajni porast serumske koncentracije n-3 PUFA (eikosapentaenoične kiseline) dok se koncentracija n-6 PUFA u serumu smanjila ( $\gamma$ -linoleična kiselina, eikosadienoilna kiselina, dihomo-  $\gamma$ -linoleična kiselina), što je rezultiralo smanjenjem a time i povoljnijim omjerom n-6/n-3 PUFA.

U posljednja tri desetljeća u zapadnim zemljama izrazito se povećala količina n-6 PUFA u prehrani, dok se količina n-3 PUFA smanjila. Istraživanja pokazuju kako je omjer n-6/n3 PUFA



u prehrani sada oko 20:1 dok je u prošlosti taj omjer bio oko 1:1, a s porastom ovog omjera povezuje se i porast prevalencije pretilosti u zapadnim zemljama [132]. Nedavna istraživanja na ljudima pokazuju da uz apsolutne količine unosa n-6 i n-3 PUFA, omjer n-6/n-3 PUFA igra važnu ulogu u povećanju razvoja pretilosti. Visok unos n-6 PUFA uzrokuje hiperaktivnost endokanabinoidnog sustava, dok n-3 PUFA smanjuje tu hiperaktivnost te vodi u normalnu homeostazu. Endokanabinoidni sustav ima važnu ulogu u regulaciji apetita i metabolizma, a njegova hiperaktivnost pridonosi nastanku pretilosti [77]. Jedna meta-analiza koja je obuhvatila i analizirala ukupno 31 studiju i obuhvatila 1450 ispitanika, zaključila je kako je niži omjer n-6/n-3 PUFA povezan sa snižavanjem koncentracije proupalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6 u odrasloj populaciji [133]. Skupina istraživača u Kini u randomiziranom kliničkom istraživanju ispitala je utjecaj prehrane s različitim omjerom n-6/n-3 na lipidogram u 75 ispitanika s hiperlipidemijom. Zaključeno je kako se smanjenjem omjera n-6/n-3 PUFA postižu niže koncentracije ukupnog kolesterola i triglicerida u krvi nakon 60 dana modificirane prehrane [134]. Osim s razvojem pretilosti i poremećaja lipidnog profila, postoje istraživanja koja povećani omjer n-6/n3 PUFA povezuju s nastankom arterijske hipertenzije. Studija koju su proveli Yang i suradnici na 75 ispitanika s hiperkolesterolemijom pokazala je da se primjenom ulja s manjim omjerom n-6/n-3 PUFA, nakon 60 dana prati smanjenje serumske koncentracije triglicerida i ukupnog kolesterola, a što je vrlo značajan učinak za prevenciju kardiovaskularnih bolesti [134].

Ovim istraživanjem je pokazano kako s malim modifikacijama prehrane, odnosno konzumacijom jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom se može postići pozitivan učinak na n-6/n-3 PUFA omjer. Isti rezultat, odnosno smanjenje n-6/n-3 PUFA omjera, zabilježen je i u istraživanju Kolara i suradnika koji su proučavali utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA u skupini od 23 sportaša koji su konzumirali obogaćena jaja kroz 3 tjedna [135]. U ispitanika s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom, konzumacija n-3 PUFA obogaćenih jaja promijenila je profil slobodnih masnih kiselina na povoljniji, niži omjer n6/n3 [117], što je konzistentno rezultatima ove studije. Obzirom na navedeno može se zaključiti kako konzumacija nutritivno obogaćenih jaja omogućava izmjenu lipidnog statusa te povoljno djeluje na n-6/n3 PUFA omjer kod bolesnika s kroničnim koronarnim sindromom jednostavnom modifikacijom prehrane. Potrebno je provesti dodatna istraživanja o mogućem blagotvornom djelovanju n-3 PUFA iz obogaćenih jaja i na druge bolesti kao što su arterijska hipertenzija i pretilost, međutim za potvrdu pozitivnog učinka, svakako je potrebno promatrati djelovanje kroz duži vremenski period.

## **6.2. Utjecaj konzumacije obogaćenih jaja na serumske koncentracije vitamina E, selenija i luteina u serumu**

Također, konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom uzrokovala je značajno povećanje serumske koncentracije vitamina E i selenija u pacijenta oboljelih od kroničnog koronarnog sindroma. Ipak, nakon konzumacije obogaćenih jaja nije zabilježen značajan porast serumske koncentracije luteina u navedenoj populaciji.

Prethodna istraživanja povezuju konzumaciju selenija u namirnicama ili suplementa s incidencijom nastanka bolesti srca. Primjerice, istraživanje Huang i suradnika pokazalo je da je u područjima Kine s niskim udiom selenija u tlu zamijećena povećana učestalost Kešanske bolesti. Kešanska bolest je bolest koju karakterizira ekstenzivna fibroza miokarda i nastanak kardiomiopatije [136]. AtheroGene studija koja je trajala 6,1 godinu i provedena je na ukupno 1731 ispitanika, utvrdila je da su niske koncentracije selenija u serumu povezane su s većim rizikom kardiovaskularne smrti kod ispitanika s akutnim koronarnim sindromom [99]. Poznato je, a i brojne studije su potvrdile povezanost između nedostatka selenija u organizmu i povećanog rizika od nastanka aterosklerotskih plakova [48]. Adekvatan unos selenija može prevenirati nastanak ateroskleroze na više različitih mehanizama, inhibirajući oksidativni stres, djelujući na upalu, djelujući na endotelnu disfunkciju te kalcifikacije krvnih žila. Većinu učinaka selenij ostvaruje pomoću selenoproteina koji su prisutni u samoj arterijskoj stijenci [48]. Također postoje dokazi kako dodatak selenija suplementima koji sadrže antioksidanse može smanjiti rizik od kardiovaskularne smrtnosti [100]. Na primjer, studija koju su proveli Alehagen i suradnici pokazala je da je suplementacija selenija i koenzima Q10 smanjila rizik od kardiovaskularne smrti u skupini zdravih starijih ispitanika kao i u skupinama pacijenata sa šećernom bolesti, arterijskom hipertenzijom i ishemijskom bolesti srca nakon 12 godina praćenja, međutim mehanizam nije u potpunosti razjašnjen [101]. Osim suplementacije selenija u obliku kapsula ili tableta, jedan od načina je svakako i konzumacija hrane bogate selenijem ili funkcionalne hrane. Na primjer, Thomson i suradnici su pokazali kako konzumacija 2 brazilska oraščića dnevno kroz 12 tjedana povećava serumsku koncentraciju selenija i pojačava aktivnost glutathion peroksidaze [137]. U drugoj epidemiološkoj studiji promatran je utjecaj konzumacije 5 indijskih oraščića dnevno i ekstrakta zelenog čaja u razdoblju od 6 tjedana te je zaključeno kako je u promatranoj populaciji smanjen rizik nastanka kolorektalnog karcinoma, vjerojatno uslijed učinka selenoproteina na gene uključene u karcinogenezu [138]. Iz svega navedenom može se zaključiti kako selenij, odnosno njegov dodatak prehrani, ima važnu ulogu

u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti, a funkcionalna hrana omogućava jednostavan način unosa selenija, koji evidentno rezultira porastom serumske koncentracije selenija.

Uloga vitamina E u prevenciji i liječenju nastanka ateroskleroze nije u potpunosti razjašnjena. Vitamin E glavni je antioksidans topiv u mastima, a koji je prisutan u LDL česticama te ima važnu ulogu u zaštiti LDL-a od oksidativnog oštećenja sprječavajući lipidnu peroksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina. Osim toga vitamin E smanjuje ulazak oksidiranog LDL-a u makrofage [85]. Učinci vitamina E su istraživani na eksperimentalnim životinjskim modelima; konzumacija vitamina E u miševa se pokazala povezana s redukcijom aterosklerotskih lezija aorte (144). U miševa koji su primali vitamin E i koenzim Q10 pokazana je sporija progresija ateroskleroze aorte [139]. Meta-analiza autora Jayedi i suradnika pokazala je kako su više koncentracije vitamina C, vitamina E i  $\beta$ -karotena povezane s nižim rizikom od ukupne kardiovaskularne smrtnosti [140]. Ranija su istraživanja sugerirala kako je suplementacija vitamina E učinkovita kako u prevenciji, tako i liječenju kardiovaskularnih bolesti. Tako je studija koju su proveli Gey i suradnici dovela do zaključka kako je viša koncentracija vitamina E u plazmi povezana s nižom stopom smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, te kako bi se rizik od ishemijske bolesti srca smanjio ukoliko bi koncentracija vitamina E u plazmi bila  $> 27.5-30.0$   $\mu\text{mol}$  vitamin E/L [141]. U istraživanju koje su proveli Rimm i suradnici sudjelovalo je ukupno 39910 ispitanika muškog spola u dobi od 40 do 75 godina koji su bili zdravi, bez poznate koronarne bolesti, šećerne bolesti i hipertenzije. Na temelju upitnika o njihovoj prehrani i unosu vitamina E, vitamina C i karotena, nakon 4 godine praćenja, pronađena je povezanost između manje učestalosti koronarne bolesti kod ispitanika koji su unosili veće količine vitamina E prehranom [142]. Druga studija proučavala je unos vitamina E, vitamina C i vitamina A u 34486 žena u postmenopauzi bez poznatih kardiovaskularnih bolesti. U toj studiji također je pronađeno da je unos vitamina E obrnuto proporcionalan s rizikom smrti od koronarne bolesti tijekom sedam godina praćenja [143]. ARIC studija koja je provedena na više od 10 000 ispitanika u dobi od 45 do 64 godine, na temelju upitnika o prehrani, pronašla je da je debljina intima-medije karotidne arterije (a koja predstavlja indikator ateroskleroze) mjerene ultrazvukom bila manja u ispitanika koji su konzumirali više namirnica bogatih vitaminom E, a što je bilo više izraženo u ženskoj populaciji [144]. Jedna studija navodi kako je zabilježena manja progresija koronarne lezije kod pacijenata koju su primali suplemente s vitaminom E. U toj studiji provedenoj na ukupno 156 muškaraca u dobi od 40 do 59 godina kod kojih je ranije učinjeno aortokoronarno premoštenje, primijenjen je dodatak prehrani koji je sadržavao vitamin E 100 IU/dnevno, u usporedbi s kontrolnom grupom koja je konzumirala

placebo. Nakon 2 godine, koronarografijom je dokazana sporija progresija lezija koronarnih arterija [145,146]

Međutim, novija klinička ispitivanja nisu potvrdila pozitivne učinke vitamina E na kardiovaskularni rizik. Studija koju su proveli Sesso i suradnici obuhvatila je 14641 ispitanika muškog spola u dobi od 50 i više godina koji su konzumirali 400 IU vitamina E svaki drugi dan i 500 mg vitamina C svaki dan. Nakon 8 godina praćenja niti konzumacija vitamina E niti vitamina C nije reducirala rizik od kardiovaskularnih bolesti [147]. Studija koja je proučavala primjenu vitamina E kod ispitanika s jednim ili više kardiovaskularnih rizika (4495 ispitanika oba spola prosječne dobi od 64,6 godine), nije pokazala razlike između učestalosti kardiovaskularne smrtnosti, infarkta miokarda ili cerebrovaskularnog inzulata kod ispitanika koji su primali vitamin E u usporedbi s placeboom [147,148]. U studiji koju su proveli Lonn i suradnici u ispitanika s poznatom kardiovaskularnom bolesti ili sa šećernom bolesti, dugotrajna primjena vitamina E nije spriječila veće kardiovaskularne događaje [149]. Za sada, nije moguće u potpunosti objasniti ovakve kontradiktorne rezultate različitih studija. S obzirom kako postoji više različitih izoformi vitamina E, postoji mogućnost njihovog i različitog učinka. Osim toga, moguć je različit učinak sintetskog, odnosno prirodnog oblika vitamina E. Naime, ranije studije su proučavale isključivo prehranu osoba uključenih u ispitivanje, a izvor vitamina E bila je hrana, dok su studije u kojima se nije pokazao pozitivan učinak vitamina E sadržavale suplemente. Upravo bi zato obogaćena jaja mogla predstavljati dobar način unosa vitamina E u organizam. Američko kardiološko društvo ne preporuča uporabu antioksidativnih dodataka prehrani, uključujući i one dodatke koji sadrže vitamin E jer nema jasnih dokaza kako njihova primjena uistinu i smanjuje rizik i djeluje preventivno na razvoj kardiovaskularnih bolesti. Međutim oni ipak savjetuju konzumaciju hrane koja sadrži antioksidativne vitamine, uključujući i vitamin E, a za koje se smatra kako mogu djelovati preventivno na kardiovaskularne bolesti (npr. voće, povrće, orašaste plodove) [91].

Poznato je kako žumanjak kokošnjeg jaja obiluje luteinom. Jedno je istraživanje pokazalo kako konzumacija jednog jaja dnevno kroz 5 tjedana ( $143 \pm 28 \mu\text{g}$  luteina u žumanjku) povećava serumsku koncentraciju luteina u starijih osoba, bez utjecaja na serumsku koncentraciju lipida [150]. Randomizirana klinička studija autora Kellyja i suradnika pokazala je kako konzumacija jednog jaja dnevno obogaćenog luteinom ( $921.4 \pm 105 \mu\text{g}$  u žumanjku) kroz 90 dana povećava serumsku koncentraciju luteina [151]. Međutim, rezultati ove studije u kojoj je dnevna količina suplementiranog luteina iznosila  $616 \mu\text{g}$  u svakom jajetu u Nutri4 skupini, te  $110 \mu\text{g}$  u svakom jajetu u kontrolnoj skupini nije rezultirala značajnim porastom serumske koncentracije luteina. Jedno od mogućih objašnjenja je da koncentracija u jajima nije bila povećana u takvom omjeru

da bi utjecala na serumske razine luteina. Obzirom da nisu zabilježene značajne razlike u serumskim koncentracijama luteina nakon konzumacije niti običnih niti obogaćenih kokošnjih jaja, potrebno je utvrditi koja koncentracija luteina u žumanjku je potrebna kako bi se konzumacijom obogaćenih jaja postigli pozitivni učinci.

Iz svega navedenog može se zaključiti kako su kokošja jaja obogaćena s n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom, odličan izvor ovih važnih nutrijenata koji imaju bitnu ulogu u normalnom funkcioniranju organizma. Također ovi rezultati potvrda su pridržavanju zadanog dijetnog protokola od strane ispitanika. S obzirom na poznatu ulogu vitamina E, selenija i luteina u oksidativnom stresu i upali, buduća istraživanja bi mogla promatrati utjecaj obogaćenih jaja i u drugim bolestima kao što su metabolički sindrom, arterijska hipertenzija, šećerna bolest, ali autoimune i reumatološke bolesti.

### **6.3. Konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom i njihov utjecaj na lipidni profil i biokemijske parametre.**

U ovom istraživanju, konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom rezultiralo je značajnim smanjenjem serumske koncentracije triglicerida, ali ne i promjene koncentracije ukupnog kolesterola, te HDL-a i LDL-a. Također, konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja rezultirala je značajnim smanjenjem GGT-a, koji inače predstavlja hepatobilijarni enzim, a koji bi mogao predstavljati biljeg aterosklerotske bolesti srca.

Poznato je kako je dislipidemija, a osobito visoke koncentracije LDL kolesterola i triglicerida, jedan od najvažnijih rizičnih čimbenika za nastanak ateroskleroze, a osobito koronarne arterijske bolesti [152]. Iako su jaja nutritivno vrlo dobra namirnica bogata proteinima, mineralima i elementima u tragovima, preporuke za konzumaciju kod kardiovaskularnih bolesti su kontradiktorne. Općeprihvaćeno je mišljenje kako jaja sadrže kolesterol i kako se zbog utjecaja na koncentraciju lipida u krvi, njihova konzumacija kod kardiovaskularnih bolesnika ne preporuča. Ipak, rezultati provedenih istraživanja nisu jednoznačni. EVIDENT II studija provedena na 728 ispitanika koji su konzumirali 5-6 jaja tjedno pokazala je kako konzumacija jaja nije povezana s promjenama u lipidogramu u ispitanika s kroničnim metaboličkim poremećajima, a dok je lipidni profil kod ispitanika bez ovih poremećaja bio čak i bolji kada su konzumirali više jaja [153]. Istraživanje koje su proveli Drouin-Chatier i suradnici, koje je pratilo 14806 ispitanika tijekom više od 32 godine pokazalo je kako umjerena konzumacija jaja, do jednog jaja dnevno, nije povezana s povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti već ga

čak i smanjuje u Azijskoj populaciji [154]. Nasuprot tome studija provedena u Americi kod više od 29000 ispitanika a koja je trajala 17,5 godina utvrdila je povezanost između većeg unosa kolesterola prehranom i konzumacije jaja s većim rizikom od nastanka kardiovaskularnih incidenata i sveukupnom smrtnosti [155].

Postoje brojne studije koje su proučavale utjecaj n-3 PUFA na serumske koncentracije LDL kolesterola i triglicerida u serumu. Suplementacija n-3 PUFA (EPA i DHA) može reducirati koncentraciju lipida, osobito triglicerida u ispitanika s hiperlipidemijom [156]. S druge strane, u jednom multicentričnom istraživanju koje je obuhvatilo 13078 ispitanika koji imaju vrlo visok kardiovaskularni rizik te koriste statine u terapiji, pokazalo se kako konzumacija n-3 PUFA u usporedbi s kukuruznim uljem, nije smanjila rizik od velikih kardiovaskularnih događaja [157]. Europsko kardiološko društvo preporuča suplemente koji sadrže n-3 PUFA u kombinaciji sa statinima kod pacijenata s visokim koncentracijama triglicerida u serumu [158]. Osim n-3 PUFA, na lipidni profil utječe i vitamin E. Jedno istraživanje je pokazalo kako konzumacija kapsula koje sadrže vitamin E (180 mg tokotrienola i 40 mg tokoferola) u ispitanika na kroničnom programu hemodijalize reducira ukupni kolesterol i trigliceride, a povoljno djeluje na koncentraciju HDL-a [159].

Ovim istraživanjem pokazano je kako se serumska koncentracija triglicerida snizila kod ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom koji su konzumirali obogaćena jaja, dok se koncentracije ukupnog kolesterola, LDL-a i HDL-a nisu značajno mijenjale. Važno je naglasiti da, s obzirom da se radi o pacijentima s od ranije poznatim kroničnim koronarnim sindromom, svi ispitanici su imali terapiju prema smjernicama koja je uključivala statine te su vrijednosti lipidograma, uključujući trigliceride na početku protokola bile unutar referentnih vrijednosti preporučenih za ovu skupinu. Konzumacija obogaćenih jaja dodatno je snizila koncentraciju triglicerida te se može zaključiti kako su n-3 PUFA u ovim jajima imala pozitivan učinak na koncentraciju lipida u serumu. Važno je istaknuti kako, unatoč konzumaciji 3 jaja dnevno kroz 21 dan, nisu zabilježeni nepovoljni učinci jaja na lipidogram niti u kontrolnoj skupini.

GGT je hepatobilijarni enzim čija je serumska koncentracija povišena kod opstruktivnih žučnih bolesti, prekomjernog unosa alkohola, a postoji poveznica i s nealkoholnom masnom bolesti jetre. Novija istraživanja povezuju povišene koncentracije GGT-a i s inzulinskom rezistencijom i aterosklerozom, ali i arterijskom hipertenzijom, srčanim zatajavanjem, aritmijama te sa općenito mortalitetom uzrokovanim kardiovaskularnim bolestima [160]. Jedna retrospektivna studija koju su proveli Kim i suradnici, analizirala je 5120 asimptomatskih pojedinaca koji u anamnezi nisu imali niti koronarnu bolest niti su konzumirali alkohol, a koji su u sklopu sistematskog pregleda učinili CT koronarografiju. U ovoj skupini ispitanika je utvrđeno da su

osobe s višim koncentracijama GGT-a imale veću učestalost i težinu koronarne ateroskleroze određene na CT koronarografiji, a viša koncentracija GGT-a bila je neovisni prediktor aterosklerotskih plakova u koronarnim arterijama, osobito kalcificiranih plakova [161]. Stoga bi smanjenje GGT-a nakon konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom moglo predstavljati povoljan učinak obogaćenih jaja, međutim potrebna su dodatna istraživanja u ovom području.

Na temelju navedenog može se zaključiti kako konzumacija kokošnjih jaja, običnih ili obogaćenih, nema negativnog utjecaja na mjerene biokemijske parametre uključujući krvnu sliku, parametre jetrene i bubrežne funkcije ili upalne biljege (hsCRP) kod pacijenta s kroničnim koronarnim sindromom te je u potpunosti sigurna. Osim toga, vrijednosti lipidograma se nisu značajno mijenjale u kontrolnoj skupini koja je konzumirala tri obična jaja dnevno, dok je kod ispitanika koji su konzumirali funkcionalno obogaćena jaja nakon protokola koncentracija triglicerida bila statistički značajno niža.

#### **6.4. Promjene mikrovaskularne i makrovaskularne funkcije**

U skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom koji su konzumirali kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom zabilježeno je poboljšanje mikrovaskularne i makrovaskularne endotelne funkcije nakon konzumacije jaja.

Endotelna disfunkcija rani je korak u nastanku ateroskleroze, a procjena endotelne funkcije može pomoći u prevenciji, ali i liječenju kardiovaskularnih bolesti. Mikrovaskularna reaktivnost predstavlja sposobnost vazodilatacije ili vazokonstrukcije malih krvnih žila kao odgovor na promjene u protoku krvi, na prisutnost različitih vazoaktivnih medijatora, ili primjerice promjene u temperaturi (grijanje i hlađenje). Periferne arterije su lako dostupne za analizu te su izvrstan model za mjerenja endotelne funkcije. Ultrazvučna procjena FMD-a brahijalne arterije i LDF predstavljaju jednostavne, dostupne i neinvazivne metode za procjenu endotelne funkcije mjerenjem promjera brahijalne arterije pomoću ultrasonografije, odnosno određivanjem protoka u mikrocirkulaciji kože podlaktice (124–126). LDF se koristi u procjeni mikrovaskularne reaktivnosti u odgovoru na različite podražaje kao što su vaskularna okluzija (PORH) ili iontoforeza nabijenih vazoaktivnih čestica (ACh i SNP). PORH predstavlja povećanje protoka krvi do kojeg dolazi nakon privremene okluzije protoka krvi. Acetilkinolin uzrokuje vazodilataciju krvnih žila, djelujući na sam endotel, dok SNP uzrokuje o endotelu neovisnu vazodilataciju. Određivanjem mikrovaskularne reaktivnosti u području kože podlaktice mogu se dobiti reprezentativni podatci o stanju mikrovaskularne funkcije cijelog

organizma [124–126]. Ranija istraživanja provedena u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju na mladim zdravim ispitanicima koji su konzumirali kokošja jaja obogaćena s n-3 PUFA (1053 mg PUFA dnevno) kroz 3 tjedna, pokazala su poboljšanje PORH-a mikrocirkulacije kože podlaktice, dok kod ispitanika s akutnim i kroničnim koronarnim sindromom koji su konzumirali jaja obogaćena s n-3 PUFA (ukupno 1053mg dnevno) kroz tri tjedna, nisu zabilježeni učinci na mikrocirkulaciju [117]. Ovo je istraživanje pokazalo kako kod pacijenta s kroničnim koronarnim sindromom konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom djeluje povoljno i na mikro- i na makrovaskularnu endotelnu funkciju. Ova razlika u rezultatima može se tumačiti sinergističkim djelovanjem n-3 PUFA, vitamina E selenija i luteina na endotelnu funkciju.

Postoje istraživanja koja su pokazala kako povećana koncentracija vitamina E u serumu djeluje na poboljšanje mikrovaskularne i makrovaskularne reaktivnosti potaknute vazodilatatorima te kako vitamin E djeluje na vaskularnu reaktivnost. U istraživanju koje su proveli Neunteufl i suradnici na ukupno 22 muškarca koji su bili pušači i 11 kontrolnih zdravih ispitanika. Pokazano je kako je u skupini pušača koja je uzimala suplemente vitamina E kroz 4 tjedna može došlo do prolaznog oštećenja endotelne funkcije nakon intenzivnog pušenja zbog poboljšanja oksidativnog statusa, ali je i pokazano da navedena suplementacija ne može obnoviti kroničnu endotelnu disfunkciju [162]. Nadalje, oralna primjena mješavine tokoferola bogate  $\gamma$ -tokoferolom u kratkotrajnoj nikotinskoj nadomjesnoj terapiji primijenjenoj pri odvikavanju od pušenja kod 25 muških zdravih ispitanika poboljšala je makrovaskularnu endotelnu disfunkciju procijenjenu FMD-om brahijalne arterije kod zdravih bivših pušača [163]. Osim toga, na životinjskom modelu, pokazano je kako nedostatak vitamina E u štakora s dijabetesom značajno pogoršava endotelnu disfunkciju [164].

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da suplementacija vitamina E u obliku funkcionalne hrane (zajedno sa n-3 PUFA, selenijem i luteinom) ima značajan povoljan učinak na o endotelu-ovisnu vaskularnu relaksaciju u pacijenata sa kroničnim koronarnim sindromom. Osim navedenih učinaka vitamina E, poznato je kako n-3 PUFA smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti. N-3 PUFA djeluju vazoprotektivno, poboljšavajući o endotelu ovisnu vazodilataciju, a što je pokazano u studiji Goodfellow i suradnika [165,166]. U navedenoj studiji kod 15 ispitanika s hiperkolesterolemijom koji su konzumirali n-3 PUFA u dozi od 5g dnevno u usporedbi s placebo, zabilježeno je signifikantno poboljšanje endotelne funkcije procijenjene pomoću FMD-a brahijalne arterije [166]. Poznato je da visoke koncentracije slobodnih masnih kiselina nastale iz triglicerida utječu na endotelnu funkciju na više različitih načina; one pridonose upali što uzrokuje povećanu propusnost endotela, te



smanjuju proizvodnju NO-a djelovanjem na eNOS. Konzumacija hrane bogate n-3 PUFA može sniziti koncentracije slobodnih masnih kiselina, a time i smanjiti razinu povezanih upalnih citokina, smanjiti oksidativni stres te zaštititi endotel [167]. Studije su pokazale kako dodatak n-3 PUFA prehrani poboljšava mikrovaskularnu i makrovaskularnu funkciju. Na primjer, studija Stirban i suradnika pokazala je da suplementacija n-3 PUFA kroz 6 tjedana u 34 ispitanika sa šećernom bolesti poboljšava postpradnijalno makrovaskularnu funkciju određenu kao FMD [168]. Studija Hammera i suradnika obuhvatila je 70 ispitanika s perifernom arterijskom bolesti koji su bili podijeljeni u dvije skupine, a uzimali su ili 4 g n-3 PUFA ili placebo kroz ukupno 3 mjeseca. U grupi koja je konzumirala n-3 PUFA zabilježeno je signifikantno poboljšanje FMD-a brahijalne arterije u usporedbi s placeboom [169]. Također jedna studija provedena na ispitanicima (n=22) s arterijskom hipertenzijom i metaboličkim sindromom pokazala je kako suplementacija 1,5 g n-3 PUFA kroz mjesec dana poboljšava endotelnu funkciju i mikrocirkularnu reaktivnost određenu pomoću LDF-a, a osim učinaka na endotel djeluje i blago antihipertenzivno te snižava koncentraciju triglicerida u serumu te snižava vrijednosti CRP-a kod ispitanika koji su konzumirali n-3 PUFA u usporedbi s placeboom [170]. S obzirom na navedene rezultate, može se zaključiti da konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih s ova 4 nutrijenta značajno poboljšava mikrovaskularnu o endotelu-ovisnu reaktivnost te ima značajan utjecaj na poboljšanje mikrovaskularne funkcije kod pacijenata sa kroničnim koronarnim sindromom. Vitamin E, selenij i n-3 PUFA igraju važnu ulogu u održavanju endotelne ravnoteže, a njihova nadomjestak u obliku funkcionalne hrane može pridonijeti boljoj funkciji endotela u kroničnom koronarnom sindromu. Važno je naglasiti kako je ovo, koliko je poznato, prva studija u kojoj je proučavan zajednički, a potencijalno i kumulativni učinak kombinacije različitih nutrijenata u obliku funkcionalne hrane na endotelnu funkciju, dok su u većini drugih istraživanja zasebno korišteni suplementi n-3 PUFA, vitamina E, selenija i luteina.

### **6.5. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na koncentracije izoforni dušik oksid sintetaze**

U ovoj studiji, konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom u kroničnom koronarnom sindromu jaja uzrokovala je porast koncentracije iNOS-a u serumu, dok se koncentracije eNOS-a i nNOS-a nisu promijenile, a niti su se mijenjale razine ove 3 izoforme NOS-a u skupini koja je konzumirala obična jaja.

Dušikov oksid je molekula koja igra ključnu ulogu u normalnom funkcioniranju samog endotela, a poremećaj u njegovoj sintezi ili bioraspoloživosti dovodi do endotelne disfunkcije.

NOS ima vrlo važnu ulogu u nastanku brojnih bolesti kao što su upalne bolesti, šećerna bolest, pretilost, ali i ateroskleroza. Pokazano je kako izoforma nNOS ima ključnu ulogu u zaštiti srčanog mišića od povećanog oksidativnog stresa, te da je važan u sprečavanju nepovoljnog strukturnog preoblikovanja u zatajivanju srca kod štakora [171]. Na modelu eksperimentalnih životinja pokazano je kako miševi kojima nedostaje nNOS ili eNOS imaju lošiju funkciju lijevog ventrikula i posljedičnu remodelaciju nakon infarkta miokarda izazvanog ligacijom koronarne arterije [172]. Drugo istraživanje koje je također učinjeno na modelu miša pokazalo je kako delecija sve tri izoforme NOS uzrokuje infarkt miokarda i iznenadnu srčanu smrt [173]. Pri nastanku aterosklerotskih promjena u krvnim žilama, uslijed poremećaja eNOS-a, dolazi do smanjene bioraspoloživosti NO u stijenci krvne žile. U istraživanju koje su proveli Stebbins i suradnici, pokazano je kako n-3 PUFA mogu aktivirati eNOS u kulturama humanih endotelih stanica [174]. U ranijem istraživanju pri Znanstvenom centru izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju koje je provedeno na 34 mlade zdrave odrasle osobe koje su konzumirale jaja obogaćena s n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom kroz ukupno 3 tjedna, zabilježeno je povećanje koncentracije nNOS enzima u serumu [175]. U ovome istraživanju u kojem je sudjelovalo ukupno 30 ispitanika podijeljenih u dvije skupine, u skupni koja je konzumirala jaja obogaćena s n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom pronađene su statistički značajne razlike u koncentraciji iNOS u serumu, dok se koncentracije eNOS-a i nNOS-a nisu značajno promijenile. Poboljšanje funkcije endotela kod kroničnog koronarnog sindroma moglo bi se dijelom objasniti promjenama u koncentraciji iNOS-a, a onda posljedično tome i boljoj bioraspoloživosti NO što bi trebalo blagotvorno djelovati na endotelnu funkciju. Iako je prekomjerna ekspresija ovog enzima povezana sa septičkim šokom, nekim autoimunim bolestima, pa čak i malignim bolestima, on također ima pozitivne učinke i neophodan je za normalno funkcioniranje stanica [174]. NO nastao uz iNOS je važan za normalni upalni odgovor, dok su poremećaji u regulaciji iNOS povezani s nekim akutnim i kroničnim bolestima. Zanimljivo je da neka istraživanja sugeriraju da na ravnotežu između korisnih i štetnih učinaka iNOS-a može utjecati istodobna prisutnost ili odsutnost oksidativnog stresa [176]. Studija koju su proveli Wilmes V. i suradnici na post portem modelima humanog srca, pokazala je povećanu ekspresiju iNOS u srcu nakon infarkta miokarda, ali isto tako i u regijama srca koja nisu zahvaćena infarktoma što ukazuje na oštećenje kardiomiocita i prije nego se može histološki otkriti [176]. Studije na animalnim modelima pokazuju kako n-3 PUFA (EPA) može povećati razinu NO-a aktivirajući eNOS što onda potiče o endotelu ovisnu vazodilataciju koronarnih arterija goveda *ex vivo* [177,178]. U istraživanju provedenom kod transgeničnih miševa koji imaju prekomjernu ekspresiju humanog endotelina-1 (ET-1), uklanjanje gena za iNOS,

rezultiralo je oslabljenom vazodilatacijom ovisnom o endotelu te posljedično povišenom krvnom tlaku kod ET<sup>+/+</sup> iNOS<sup>-/-</sup> miševa [179]. S druge strane, primjena vitamina C i  $\alpha$ -tokoferola u ispitanika s pojačanom ekspresijom eNOS i iNOS induciranom visokom razinom glukoze uzrokovala je smanjenje ekspresije obje ove izoforme [180]. Smatralo se da povećana ekspresija iNOS-a dovodi do povećanja koncentracije NO što uzrokuje vazodilataciju koja postupno dovodi do sistemske i koronarne hipoperfuzije što onda pridonosi pojavi kardiogenog šoka kod ispitanika s infarktom srca. Međutim inhibitor NOS-a se nije pokazao učinkovit u prevenciji nastanka kardiogenog šoka. Naime u TRIUMPH studiji kod koje je sudjelovalo 398 ispitanika s infarktom miokarda s refraktornim kardiogenim šokom, primjena tilarginina, inhibitora NOS, nije imala učinka na smrtnost u ovoj grupi ispitanika [181].

S obzirom na navedeno, potrebna su dodatna istraživanja o ulozi svih izoformi NOS i u endotelnoj funkciji ali i u nastanku endotelne disfunkcije, a osobito o utjecaju funkcionalne hrane na ekspresiju ovih enzima. Možemo pretpostaviti kako je u ovom istraživanju konzumacija obogaćenih jaja uzrokovala povećanje koncentracije iNOS što je posljedično pozitivno djelovalo na endotelnu funkciju.

## **6.6. Utjecaj konzumacije obogaćenih jaja na serumske koncentracije pro-upalnih i protu-upalnih citokina**

Važan rezultat ove studije predstavlja smanjenje serumske koncentracije pro-upalnih citokina IL-17A i TGF-1 $\beta$  u kroničnom koronarnom sindromu nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom. Prethodno istraživanje pri Znanstvenom centru izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju ispitalo je učinak konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA u ispitanika s koronarnom bolesti. Pokazalo se kako njihova konzumacija može smanjiti serumsku koncentraciju IL-6 u akutnom koronarnom sindromu i koncentraciju IL-1a kod svih ispitanika s koronarnom bolesti [117]. Međutim u ovom istraživanju koncentracije TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-23 nisu se značajno mijenjale. Citokini predstavljaju važne medijatore imunoloških i upalnih odgovora organizma u zdravlju i u bolesti. Poznato je da je u podlozi koronarne bolesti ateroskleroza koja predstavlja kroničnu upalnu bolest, a brojni citokini imaju važnu ulogu u nastanku iste. Međutim do sada nisu poznati mehanizmi na koje pojedini citokini djeluju u patofiziološkom procesu nastanka aterosklerotskog plaka. Pokazano je kako je progresija aterosklerotskog plaka uvijek povezana s povećanom kako lokalnom, tako i sistemnom razinom proupalnih citokina. Primjerice, poznato je kako su u aterosklerotskom plaku pronađene povišene koncentracije IL-1A i IL-1 $\beta$ ,

a primjena lijekove koji blokiraju receptore za IL-1 kao što je anakinra u miševa značajno smanjuje veličinu aterosklerotskih lezija [182]. CANTOS studija provedena je na ukupno 10061 ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom koji u anamnezi imaju raniji infarkt miokarda i imaju povišen CRP kao znak upale. Nakon 48 mjeseci praćenja ispitanika, pokazalo se kako primjena anti-IL-1 $\beta$  protutijela (canakinumab) smanjuje rizik od rekurentnih kardiovaskularnih događaja u ispitanika u usporedbi s placebom [182,183].

IL-6 je jedan od citokina čija se pojačana ekspresija smatra rizičkim čimbenikom za koronarnu bolest, međutim istraživanja o njegovoj ulozi su različita, neka sugeriraju da ima proupalne učinke, a druge studije spominju protuupalne [184]. Kod životinja i ljudi s razvijenom aterosklerozom dokazana je povećana ekspresija IL-23 što sugerira njegovu ulogu kao proupalnog i proaterogenog citokina. U istraživanju koje su proveli Abbas i suradnici mjerena je serumska koncentracija IL-23 kod pacijenata sa stenozom karotidnih arterija i kod zdravih ispitanika. Studija je pokazala kako je koncentracija IL-23 bila viša u ispitanika (n= 177) s aterosklerotskim promjenama karotidnih arterija nego u zdravih ispitanika (n=24), a veće koncentracije IL-23 su se u kasnijem praćenu pokazale povezane s višom smrtnošću. [185]. Međutim, u ovom istraživanju niti konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja niti konzumacija običnih kokošnjih jaja nije utjecala na serumske koncentracije IL-6 i IL-23.

IL-17A je jedan od citokina koji ima važnu ulogu u obrani organizma od različitih mikrobioloških patogena, te sudjeluje u nastanku upale. Poznata je njegova uloga u nastanku nekih autoimunih bolesti kao što su psorijaza, astma, reumatoidni artritis, multipla skleroza i upalne bolesti crijeva, međutim njegova uloga u nastanku endotelne disfunkcije i ateroskleroze se zadnjih godina intenzivno istražuje [186]. IL-17A luče pretežito Th-17 stanice i on potiče oslobađanje kemokina koji privlače neutrofile i monocite u područje aterosklerotske lezije, potiču lučenje upalnih citokina iz makrofaga kao što su IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i općenito potiče proaterogeni fenotip [187]. Neke studije navode kako IL-17 može djelovati i kao protu-upalni citokin, ovisno o drugim citokinima u njegovom okruženju [188,189]. Ekspresija IL-17A povezana je s povećanom upalom i vulnerabilnošću aterosklerotskog plaka u krvnim žilama. Isto je pokazano u studiji Erbel i suradnika koji su proučavali uzorke 79 ispitanika s učinjenom endarterektomijom karotidnih arterija [190]. IL-17 povezuje se i s arterijskom hipertenzijom; studija koja je proučavala 90 ispitanika na hemodijalizi s refrakternom hipertenzijom utvrdila je višu serumsku koncentraciju IL-17A kod ispitanika refrakternom hipertenzijom u usporedbi s ispitanicima čija je hipertenzija bila bolje kontrolirana [191]. Osim navedenog, angiotenzin II (koji ima važnu ulogu u nastanku art. hipertenzije), inducira stvaranje IL-17A na mišjem modelu [189,192]. Zanimljivo je da statini, lijekovi za snižavanje lipida (koje su uzimali i

ispitanici u ovoj studiji) djeluju na smanjenje upale i stabiliziraju aterosklerotske plakove djelujući inhibitorno na proupalne i proagregacijske učinke upravo IL-17A na endotelnim stanicama [193]. U ovom istraživanju, nakon konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom, zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije IL-17A, dok se koncentracije IL-17A u kontrolnoj skupini nisu značajnije mijenjale.

Vitamin E smanjuje diferencijaciju Th17 stanica i inhibira stvaranje osteoklasta aktiviranih s IL-17A u pacijenata s reumatoidnim artritismom, a druga istraživanja navode kako n-3 PUFA mogu smanjiti koncentraciju IL-17A u in vitro matičnim stanicama prikupljenim iz masnog tkiva pretilih ispitanika [194,195]. Navedeni učinci vitamina E i n-3 PUFA mogli bi objasniti smanjenje IL-17A naših ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom koji su konzumirali obogaćena jaja (i imali povećana koncentracija vitamina E i n-3 PUFA u serumu) u ovoj studiji. Osim utjecaja na IL-17A, konzumacija obogaćenih jaja u usporedbi s kontrolnom skupinom, rezultirala je smanjenjem koncentracije TGF- $\beta$ 1, važnog citokina u međustaničnoj signalizaciji [196]. Poremećaji u regulaciji signalizacije posredovane TGF- $\beta$ 1 kod ljudi može uzrokovati arteriovenske malformacije, aneurizme, aterosklerozu, srčanu fibrozu i valvularnu bolest srca. Endotelni TGF- $\beta$ 1 ima važnu ulogu u signalizaciji i vaskularnoj upali povezanoj s aterosklerozom, a što je pokazano na modelu ApoE<sup>-/-</sup> miša [197]. Učinak TGF- $\beta$  na aterosklerozu ovisi o ravnoteži između proaterogenih i antiaterogenih signalnih putova [198]. Studije su pokazale povišene koncentracije TGF- $\beta$ 1 u aterosklerotskim plakovima u koronarnim arterijama a što je dokazano na uzorcima 26 koronarnih arterija post-mortem. Naime, Panutsopoulos i suradnici su imunohistokemijskim metodama utvrdili kako je koncentracija TGF- $\beta$ 1 bila više u grupi ispitanika s prisutnim plakom na koronarnim arterijama i u grupi s kompleksnijim lezijama koronarnih arterija nego u grupama koji su imali tek početne aterosklerotske promjene na koronarnim arterijama [199]. Inhibicija endotelne TGF- $\beta$  signalizacije u hiperlipidemičnih miševa uzrokovala je smanjenje razine upale u stijenci krvne žile te su smanjile daljnju progresiju ateroskleroze [200].

Na temelju rezultata ove studije može se zaključiti kako konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom ostvaruje protuupalni učinak smanjujući serumske koncentracije IL-17A i TGF- $\beta$ 1, proupalnih citokina važnih u nastanku ateroskleroze, a time i potencijalno na sprječavanje razvoja ili progresije ateroskleroze u bolesnika s kroničnim koronarnim sindromom. Međutim, ne postoji velik broj istraživanja koja su promatrala utjecaj ovih nutrijenata na razine citokina te su svakako potrebna dodatna istraživanja u ovom području. Osim toga, ova studija mogla bi biti važna u istraživanju i drugih upalnih bolesti kod

kojih ovi citokini igraju važnu ulogu – moguće je da bi konzumacija ovih obogaćenih jaja mogla ostvariti pozitivne učinke i u bolestima kao što su psorijaza, reumatoidni artritis i druge.

### **6.7. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na razine oksidativnog stresa i antioksidativni odgovor**

U ovom istraživanju, konzumacija obogaćenih jaja nije utjecala na razinu oksidativnog stresa i antioksidativni kapacitet niti u kontrolnoj niti u Nutri4 skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom.

Oksidativni stres, kako je ranije navedeno, ima izuzetno važnu ulogu u nastanku ateroskleroze, a time i u nastanku kroničnog koronarnog sindroma. Poremećaj ravnoteže između slobodnih kisikovih vrsta i antioksidansa uzrokuje oksidaciju lipoproteina što dalje dovodi do nastanka ateroskleroze. Istraživanje koje su proveli su Varadhan i suradnici provedeno je na 100 ispitanika s poznatom koronarnom bolesti u dobi od 35-70 godina i 60 kontrolnih ispitanika, a mjerene su koncentracije pro-oksidativnog i pro-upalnog enzima mijeloperoksidaze (MPO), anti-oksidativnog i protuupalnog enzima paraoksonaze (PON), te koncentracije OxLDL-a koji predstavlja produkt oksidacije LDL-a, malondialdehida koji predstavlja oksidativni marker i koncentracije glutaciona. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je kako je kod ispitanika s koronarnom arterijskom bolesti zabilježena povećana razina oksidativnog stresa i snižen antioksidativni kapacitet u usporedbi s kontrolnom skupinom te su zaključili kako su potrebne modifikacije načina života kako bi se smanjio oksidativni stres i poboljšao antioksidativni status ovih ispitanika. Međutim još uvijek nisu poznati svi mehanizmi kojima oksidativni stres djeluje i kako snižene razine antioksidansa utječu na nastanak kardiovaskularnih bolesti [201].

Epidemiološke studije pokazale su kako je konzumacija povrća i voća obrnuto proporcionalna s pojavnosti određenih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti (uključujući i koronarnu bolest), maligne bolesti i druge, a što može biti povezano s brojnim antioksidantima koje ova hrana sadrži [202]. Selenij i vitamin E predstavljaju snažne antioksidanse. Metaanalizom koja je analizirala 14 pojedinačnih studija o utjecaju suplementacije selenija na biljege oksidativnog stresa u odraslih osoba je utvrđeno kako je suplementacija selenija smanjila razinu oksidativnog stresa (smanjila se MDA, povisile su se koncentracije glutaciona te totalnog antioksidativnog kapaciteta) [203]. Također studija koju su proveli Barić i suradnici je pokazala kako suplementacija vitamina E (900 IU/dnevno) s vitaminom C (1000 mg dnevno) prevenira povećanje oksidativnog stresa kod 51 mladog zdravog ispitanika tijekom 7 dana dijete s

visokim udjelom soli u usporedbi s ispitanicima koji nisu koristili suplemente vitamina C i vitamine E [204].

Poznata je uloga oxLDL-a u nastanku ateroskleroze, a studija koju su proveli Vardhan i suradnici na 100 ispitanika s klinički dokazanom koronarnom arterijskom bolesti u usporedbi sa šezdeset ispitanika bez koronarne bolesti iste dobi (35-70 godina) pokazala je višu koncentraciju oxLDL-a u krvi kod ispitanika s koronarnom bolesti nego u zdravih ispitanika. I ovi rezultati još jednom sugeriraju kako su kod ispitanika s poznatom koronarnom bolesti povišene razine oksidativnog stresa, a snižen je antioksidativni kapacitet [201]. U ovoj studiji, konzumacija kokošnjih jaja nije značajno utjecala na koncentraciju oxLDL-a niti u skupini koja je konzumirala obična jaja niti u Nutri4 skupini. Potrebno je naglasiti kako su ispitanici prije i tijekom studije u terapiji imali lijekove za sniženje lipida u krvi i kako su vrijednosti lipidograma u ovoj skupini ispitanika bile unutar referentnih vrijednosti što bi moglo utjecati na razinu oxLDL-a kao mogućeg markera razine oksidativnog stresa u ovih ispitanika. Statini su lijekovi koji djeluju na lipidogram i jedna su osnovnih grupa lijekova koji se primjenjuju u kroničnom koronarnom sindromu, ali oni ne samo da djeluju na razine kolesterola i LDL-a, ostvaruju i druge pozitivne učinke. Studija koju su u Iranu proveli Shahsvari G. i suradnici na ukupno 83 ispitanika s poznatom koronarnom bolesti dokazanom koronarografijom pokazala je kako primjena atorvastatina kod ovih ispitanika smanjuje serumske razine TBARS-a, a povećava razine FRAP-a kod dugotrajne primjene lijeka, što ukazuje na smanjenje razine oksidativnog stresa kod tih ispitanika [205]. Jedna druga studija koju su proveli Thomas M. i suradnici, također je pokazala kako primjena atorvastatina čak i kod ispitanika (40 ispitanika) s koronarnom bolesti i s urednim vrijednostima lipidograma uzrokuje promjene u biljezima oksidativnog stresa (određenog kao TBARS i FRAP) [206]. Međutim, u ovoj studiji, konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom nije utjecala na razine oksidativnog stresa ili razinu antioksidativnog kapaciteta u kroničnom koronarnom sindromu. Nije u potpunosti jasno zašto konzumacija jaja obogaćenih antioksidansima kao što su vitamin E i selenij nije utjecala na razine oksidativnog stresa. Moguće je da je razdoblje od 3 tjedna koliko je trajao naš protokol prekratak da bi antioksidansi ostvarili svoje učinke. Osim toga, treba naglasiti kao je kronični koronarni sindrom kronična bolest koja traje najčešće dugi niz godina, a oksidativni stres kao takav vjerojatno ima veću ulogu na samom početku bolesti ili pri akutizaciji tegoba, dok su naši ispitanici imali bolest u stabilnoj fazi. Međutim, svakako su potrebna dodatna istraživanja u ovom području kako bi se utvrdilo može li konzumacija ovih obogaćenih jaja ipak ostvariti antioksidativne učinke, ne samo kod kroničnog koronarnog sindroma, nego i drugih bolesti u kojima oksidativni stres ima važnu ulogu. Također je u

budućnosti potrebno istražiti mogu li se prehranom modificirati razine oksidativnog stresa i antioksidativnog kapaciteta u kroničnom koronarnom sindromu i može li to dalje utjecati na sami tijek bolesti, a time i na kardiovaskularne incidente u ovoj populaciji.

## **6.8. Ograničenja**

Istraživanje koje čini ovu doktorsku disertaciju ima nekoliko ograničenja. Svi ispitanici za vrijeme trajanja studije koristili su svoju terapiju preporučenu od strane specijalista kardiologa prema smjernicama za liječenje kroničnog koronarnog sindroma, a zbog toga nije moguće isključiti moguće učinke te terapije na rezultate studije. Međutim, razlike između dvije promatrane skupine ispitanika ipak pokazuju kako su pozitivni učinci posljedica konzumacije jaja, bez obzira na medikamentoznu terapiju. Ispitanicima je na početku protokola objašnjeno kako tijekom istraživanja ne konzumiraju hranu bogatu n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom kako ista ne bi utjecala na rezultate istraživanja. Osim toga kako bi se postigla što bolja suradnja i kako bi ispitanici uistinu i konzumirali ova naša jaja svakodnevno, u više navrata tijekom trajanja protokola bili su kontaktirani telefonom. Treba naglasiti kako je ovo prvo istraživanje koje je proučavalo zajednički učinak nekoliko nutrijenata u obliku funkcionalne hrane u kroničnom koronarnom sindromu te će u budućnosti biti potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se potvrdili pozitivni učinci konzumacije ovih jaja.



## 7. ZAKLJUČAK

1. Konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom u razdoblju od tri tjedna uzrokovala je značajno poboljšanje o endotelu ovisne vazodilatacije u mikro- i makrocirkulaciji.
2. Konzumacija obogaćenih jaja utjecala je na značajno sniženje serumske koncentracije triglicerida u serumu ispitanika, a nije imala utjecaja na ukupni kolesterol, LDL kolesterol i HDL kolesterol.
3. U grupi ispitanika koja je konzumirala obična kokošja jaja nisu zabilježene promjene u serumskim koncentracijama lipidograma
3. U grupi ispitanika koja je konzumirala obogaćena jaja zabilježeno je povećanje serumske koncentracije iNOS.
4. Konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja smanjila je koncentracije proupalnih citokina IL-17A i TGF-1 $\beta$ .
5. Konzumacija niti običnih niti obogaćenih kokošnjih jaja nije utjecala na razine oksidativnog stresa
6. Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti kako konzumacija obogaćenih jaja može rezultirati dodatnim korisnim učinkom u pacijenata s kroničnim koronarnim sindromom, jer su se zapaženi pozitivni učinci javili neovisno o standardnoj terapiji koju su ovi ispitanici uzimali.
7. Pokazano je kako konzumacija kokošnjih jaja u razdoblju od tri tjedna nije imala negativne učine na lipidni profil kao niti na jetrenu funkciju kako u eksperimentalnoj tako ni u kontrolnoj skupini što ukazuje na sigurnost konzumacije jaja u svakodnoj prehrani čak i u populaciji kardiovaskularnih bolesnika.

## 8. LITERATURA

1. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial Function. *Circulation*. 2005 Jan 25;111(3):363–8.
2. Vita JA. Endothelial Function. *Circulation*. 2011 Dec;124(25).
3. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris Nikolaos Papageorgiou C, Stefanadis C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012 Jan 1;10(1):4–18.
4. Klinger JR, Kadowitz PJ. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. *Am J Cardiol*. 2017 Oct;120(8):S71–9.
5. Shimokawa H, Godo S. Nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization mediated by hydrogen peroxide in health and disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2020 Aug 10;127(2):92–101.
6. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: what's new to NO? *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017 Mar 1;312(3):C254–62.
7. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*. 2017 Jan;219(1):22–96.
8. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012 Apr 1;33(7):829–37.
9. Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, Zulli A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Sep;93:370–5.
10. Costa ED, Rezende BA, Cortes SF, Lemos VS. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol*. 2016 Jun 2;7.
11. Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Lorgis L, Cottin Y, Vergely C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*. 2013 Dec;140(3):239–57.
12. Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Siasos G, Tsioufis C, Tousoulis D. Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines*. 2021 Jul 6;9(7):781.
13. Jay Widmer R, Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2014 Oct;2014(3):43.
14. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PWM, Badiwala M V., Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DAG, Stewart DJ. A Self-Fulfilling Prophecy. *Circulation*. 2002 Aug 20;106(8):913–9.

15. Incalza MA, D’Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018 Jan;100:1–19.
16. Durand MJ, Gutterman DD. Diversity in Mechanisms of Endothelium-Dependent Vasodilation in Health and Disease. *Microcirculation*. 2013 Apr;20(3):239–47.
17. Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, Luo S, Li Z, Liu P, Han J, Harding IC, Ebong EE, Cameron SJ, Stewart AG, Weng J. Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacol Rev*. 2021 Jul 4;73(3):924–67.
18. Yang X, Li Y, Li Y, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Xing Y, Shang H. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol*. 2017 Aug 23;8.
19. Hernandez-Mijares A, Rocha M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Bellod L, de Pablo C, Alvarez A, Roldan-Torres I, Sola-Izquierdo E, Victor VM. Human Leukocyte/Endothelial Cell Interactions and Mitochondrial Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients and Their Association With Silent Myocardial Ischemia. *Diabetes Care*. 2013 Jun 1;36(6):1695–702.
20. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):713–35.
21. Batty M, Bennett MR, Yu E. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Cells*. 2022 Nov 30;11(23):3843.
22. Cyrus T, Praticò D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA, Funk CD. Absence of 12/15-Lipoxygenase Expression Decreases Lipid Peroxidation and Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*. 2001 May 8;103(18):2277–82.
23. Góth L, Rass P, Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*. 2004 Sep 1;8(3):141–9.
24. Gómez-Marcos MA, Blázquez-Medela AM, Gamella-Pozuelo L, Recio-Rodríguez JI, García-Ortiz L, Martínez-Salgado C. Serum Superoxide Dismutase Is Associated with Vascular Structure and Function in Hypertensive and Diabetic Patients. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9124676.
25. Zawadzka-Bartczak E. Activities of red blood cell anti-oxidative enzymes (SOD, GPx) and total anti-oxidative capacity of serum (TAS) in men with coronary atherosclerosis and in healthy pilots. *Med Sci Monit*. 2005 Sep;11(9):CR440-4.

26. Keane MP, Strieter RM. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28(Supplement):N13–26.
27. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–11.
28. Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Postgrad Med J.* 2008 Jul 1;84(993):368–71.
29. Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, Chiva-Blanch G. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front Immunol.* 2018 Mar 2;9.
30. Li Y, Zhong X, Cheng G, Zhao C, Zhang L, Hong Y, Wan Q, He R, Wang Z. Hs-CRP and all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: A meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2017 Apr;259:75–82.
31. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Grechko A V., Myasoedova VA, Orekhov AN. Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* 2018 Apr;104(2):114–24.
32. Tousoulis D, Oikonomou E, Economou EK, Crea F, Kaski JC. Inflammatory cytokines in atherosclerosis: current therapeutic approaches. *Eur Heart J.* 2016 Jun 7;37(22):1723–32.
33. Mackesy DZ, Goalstone ML. Extracellular signal-regulated kinase-5: Novel mediator of insulin and tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated vascular cell adhesion molecule-1 expression in vascular cells 细胞外信号调节激酶-5 : 一种新的调节胰岛素与肿瘤坏死因子 $\alpha$ 刺激下的血管细胞上的血管细胞粘附分子-1表达的介质. *J Diabetes.* 2014 Nov;6(6):595–602.
34. Aker S, Bantis C, Reis P, Kuhr N, Schwandt C, Grabensee B, Heering P, Ivens K. Influence of interleukin-6 G-174C gene polymorphism on coronary artery disease, cardiovascular complications and mortality in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009 Sep 1;24(9):2847–51.
35. Maier W, Altwegg LA, Corti R, Gay S, Hersberger M, Maly FE, Sütsch G, Roffi M, Neidhart M, Eberli FR, Tanner FC, Gobbi S, von Eckardstein A, Lüscher TF. Inflammatory Markers at the Site of Ruptured Plaque in Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2005 Mar 22;111(11):1355–61.
36. Dimosiari A, Patoulis D, Kitas GD, Dimitroulas T. Do Interleukin-1 and Interleukin-6 Antagonists Hold Any Place in the Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease

- and Related Co-Morbidities? An Overview of Available Clinical Evidence. *J Clin Med*. 2023 Feb 6;12(4):1302.
37. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol*. 2011 Oct;23(5):613–9.
  38. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 Cells in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Feb;35(2):258–64.
  39. Wang Y, Zang J, Liu C, Yan Z, Shi D. Interleukin-17 Links Inflammatory Cross-Talks Between Comorbid Psoriasis and Atherosclerosis. *Front Immunol*. 2022 Apr 13;13.
  40. Weber C, von Hundelshausen P. CANTOS Trial Validates the Inflammatory Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017 Oct 27;121(10):1119–21.
  41. Y. Liu, H. Jiang, W. Liu, H. Shang, Y. Tang, R. Zhu, B. Li. Effects of fluvastatin therapy on serum interleukin-18 and interleukin-10 levels in patients with acute coronary syndrome. *Acta Cardiol*. 2010 Jun 30;65(3):285–9.
  42. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol*. 2023 Jan 5;23(1):38–54.
  43. Ridker PM. Inhibiting Interleukin-6 to Reduce Cardiovascular Event Rates. *J Am Coll Cardiol*. 2021 Apr;77(15):1856–8.
  44. Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci*. 2018 Jun 29;132(12):1243–52.
  45. Tabas I, García-Cardeña G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *Journal of Cell Biology*. 2015 Apr 13;209(1):13–22.
  46. Georgakis MK, van der Laan SW, Asare Y, Mekke JM, Haitjema S, Schoneveld AH, de Jager SCA, Nurmohamed NS, Kroon J, Stroes ESG, de Kleijn DPV, de Borst GJ, Maegdefessel L, Soehnlein O, Pasterkamp G, Dichgans M. Monocyte-Chemoattractant Protein-1 Levels in Human Atherosclerotic Lesions Associate With Plaque Vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Jun;41(6):2038–48.
  47. An Z, Li J, Yu J, Wang X, Gao H, Zhang W, Wei Z, Zhang J, Zhang Y, Zhao J, Liang X. Neutrophil extracellular traps induced by IL-8 aggravate atherosclerosis via activation NF- $\kappa$ B signaling in macrophages. *Cell Cycle*. 2019 Nov 2;18(21):2928–38.
  48. Liu H, Xu H, Huang K. Selenium in the prevention of atherosclerosis and its underlying mechanisms. *Metallomics*. 2017;9(1):21–37.
  49. Liu Y, Yu H, Zhang Y, Zhao Y. TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target. *Med Hypotheses*. 2008 Jan;70(2):314–6.

50. Wang T, Palucci D, Law K, Yanagawa B, Yam J, Butany J. Atherosclerosis: pathogenesis and pathology. *Diagn Histopathol*. 2012 Nov;18(11):461–7.
51. Seidman MA, Mitchell RN, Stone JR. Pathophysiology of Atherosclerosis. In: *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*. Elsevier; 2014. p. 221–37.
52. Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. *Netherlands Heart Journal*. 2017 Apr 13;25(4):231–42.
53. Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Ž, Riccardi G, Taskinen MR, Tokgozoglul L, Verschuren WMM, Vlachopoulos C, Wood DA, Zamorano JL. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J*. 2016 Oct 14;37(39):2999–3058.
54. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Heart Lung Circ*. 2013 Jun;22(6):399–411.
55. Wirtz PH, von Känel R. Psychological Stress, Inflammation, and Coronary Heart Disease. *Curr Cardiol Rep*. 2017 Nov 20;19(11):111.
56. Ford TJ, Corcoran D, Berry C. Stable coronary syndromes: pathophysiology, diagnostic advances and therapeutic need. *Heart*. 2018 Feb;104(4):284–92.
57. Momoniat T, Ilyas D, Bhandari S. ACE inhibitors and ARBs: Managing potassium and renal function. *Cleve Clin J Med*. 2019 Sep;86(9):601–7.
58. Ferraro R, Latina JM, Alfaddagh A, Michos ED, Blaha MJ, Jones SR, Sharma G, Trost JC, Boden WE, Weintraub WS, Lima JAC, Blumenthal RS, Fuster V, Arbab-Zadeh A. Evaluation and Management of Patients With Stable Angina: Beyond the Ischemia Paradigm. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Nov;76(19):2252–66.
59. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, Prescott E, Storey RF, Deaton C, Cuisset T, Agewall S, Dickstein K, Edvardsen T, Escaned J, Gersh BJ, Svitil P, Gilard M, Hasdai D, Hatala R, Mahfoud F, Masip J, Muneretto C, Valgimigli M, Achenbach S, Bax JJ, ESC Scientific Document Group. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020 Jan 14;41(3):407–77.
60. Almeida SO, Budoff M. Effect of statins on atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med*. 2019 Nov;29(8):451–5.
61. Soodi D, VanWormer JJ, Rezkalla SH. Aspirin in Primary Prevention of Cardiovascular Events. *Clin Med Res*. 2020 Aug;18(2–3):89–94.

62. Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P. Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2020 Mar 25;11(1):93–118.
63. Temple NJ. A rational definition for functional foods: A perspective. *Front Nutr*. 2022 Sep 29;9.
64. 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.
65. Li J, Lee DH, Hu J, Tabung FK, Li Y, Bhupathiraju SN, Rimm EB, Rexrode KM, Manson JE, Willett WC, Giovannucci EL, Hu FB. Dietary Inflammatory Potential and Risk of Cardiovascular Disease Among Men and Women in the U.S. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Nov;76(19):2181–93.
66. Petersen KS, Kris-Etherton PM. Diet Quality Assessment and the Relationship between Diet Quality and Cardiovascular Disease Risk. *Nutrients*. 2021 Nov 28;13(12):4305.
67. Bigliardi B, Galati F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci Technol*. 2013 Jun;31(2):118–29.
68. Buckland G, Mayén AL, Agudo A, Travier N, Navarro C, Huerta JM, Chirlaque MD, Barricarte A, Ardanaz E, Moreno-Iribas C, Marin P, Quirós JR, Redondo ML, Amiano P, Dorronsoro M, Arriola L, Molina E, Sanchez MJ, Gonzalez CA. Olive oil intake and mortality within the Spanish population (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr*. 2012 Jul;96(1):142–9.
69. Samieri C, Feart C, Proust-Lima C, Peuchant E, Tzourio C, Stapf C, Berr C, Barberger-Gateau P. Olive oil consumption, plasma oleic acid, and stroke incidence: The Three-City Study. *Neurology*. 2011 Aug 2;77(5):418–25.
70. de Carvalho C, Caramujo M. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*. 2018 Oct 9;23(10):2583.
71. Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Giaipaoi S, Jansen A, Karvonen M, Katan M, Nissinen A, Nedeljkovic S, Pekkanen J, Pekkarinen M, Punsar S, Rasanen L, Simic B, Toshima H. Dietary Saturated and transFatty Acids and Cholesterol and 25-Year Mortality from Coronary Heart Disease: The Seven Countries Study. *Prev Med (Baltim)*. 1995 May;24(3):308–15.
72. Molendi-Coste O, Legry V, Leclercq IA. Why and How Meet n-3 PUFA Dietary Recommendations? *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011:1–11.
73. Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *IUBMB Life*. 2015 Sep;67(9):659–67.

74. Kang JX. The Importance of Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cell Function. In: Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence. Basel: KARGER; 2003. p. 23–36.
75. Kromhout D, de Goede J. Update on cardiometabolic health effects of  $\omega$ -3 fatty acids. *Curr Opin Lipidol*. 2014 Feb;25(1):85–90.
76. Das U. Essential Fatty Acids - A Review. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006 Dec 1;7(6):467–82.
77. Simopoulos A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* [Internet]. 2016 Mar 2 [cited 2023 Jul 20];8(3):128. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/3/128>
78. Li Y, Hruby A, Bernstein AM, Ley SH, Wang DD, Chiuve SE, Sampson L, Rexrode KM, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Saturated Fats Compared With Unsaturated Fats and Sources of Carbohydrates in Relation to Risk of Coronary Heart Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Oct;66(14):1538–48.
79. Zheng J, Huang T, Yu Y, Hu X, Yang B, Li D. Fish consumption and CHD mortality: an updated meta-analysis of seventeen cohort studies. *Public Health Nutr*. 2012 Apr 14;15(4):725–37.
80. Eilander A, Harika RK, Zock PL. Intake and sources of dietary fatty acids in Europe: Are current population intakes of fats aligned with dietary recommendations? *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2015 Sep 19;117(9):1370–7.
81. Lee G, Han S. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*. 2018 Nov 1;10(11):1614.
82. Mathur P, Ding Z, Saldeen T, Mehta JL. Tocopherols in the Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Related Cardiovascular Disease. *Clin Cardiol*. 2015 Sep;38(9):570–6.
83. Schmölz L, Birringer M, Lorkowski S, Wallert M. Complexity of vitamin E metabolism. *World J Biol Chem*. 2016 Feb 26;7(1):14–43.
84. Raederstorff D, Wyss A, Calder PC, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*. 2015 Oct 28;114(8):1113–22.
85. Traber MG. Vitamin E. *Advances in Nutrition*. 2021 May;12(3):1047–8.
86. Galli F, Bonomini M, Bartolini D, Zatini L, Reboldi G, Marcantonini G, Gentile G, Sirolli V, Di Pietro N. Vitamin E (Alpha-Tocopherol) Metabolism and Nutrition in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants*. 2022 May 18;11(5):989.



87. Sozen E, Demirel T, Ozer NK. Vitamin E: Regulatory role in the cardiovascular system. *IUBMB Life*. 2019 Apr;71(4):507–15.
88. Violi F, Nocella C, Loffredo L, Carnevale R, Pignatelli P. Interventional study with vitamin E in cardiovascular disease and meta-analysis. *Free Radic Biol Med*. 2022 Jan;178:26–41.
89. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*. 2020 Mar 16;94(3):651–715.
90. Heitzer T, Herttuala SY, Wild E, Luoma J, Drexler H. Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Feb;33(2):499–505.
91. Saremi A, Arora R. Vitamin E and Cardiovascular Disease. *Am J Ther*. 2010 May;17(3):e56–65.
92. Mistry HD, Broughton Pipkin F, Redman CWG, Poston L. Selenium in reproductive health. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Jan;206(1):21–30.
93. Zhang F, Li X, Wei Y. Selenium and Selenoproteins in Health. *Biomolecules*. 2023 May 8;13(5):799.
94. Avery J, Hoffmann P. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients*. 2018 Sep 1;10(9):1203.
95. Brigelius-Flohé R, Banning A, Schnurr K. Selenium-Dependent Enzymes in Endothelial Cell Function. *Antioxid Redox Signal*. 2003 Apr;5(2):205–15.
96. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*. 2008 Mar 28;13(2):102–8.
97. Dhingra S, Bansal MP. Modulation of hypercholesterolemia-induced alterations in apolipoprotein B and HMG-CoA reductase expression by selenium supplementation. *Chem Biol Interact*. 2006 May;161(1):49–56.
98. IIZUKA Y, SAKURAI E, TANAKA Y. Effect of Selenium on Serum, Hepatic and Lipoprotein Lipids Concentration in Rats Fed on a High-Cholesterol Diet. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2001 Jan 1;121(1):93–6.
99. Benstoem C, Goetzenich A, Kraemer S, Borosch S, Manzanares W, Hardy G, Stoppe C. Selenium and Its Supplementation in Cardiovascular Disease—What do We Know? *Nutrients*. 2015 Apr 27;7(5):3094–118.
100. Jenkins DJ, Kitts D, Giovannucci EL, Sahye-Pudaruth S, Paquette M, Blanco Mejia S, Patel D, Kavanagh M, Tsirakis T, Kendall CW, Pichika SC, Sievenpiper JL. Selenium, antioxidants, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a systematic review and

- meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2020 Dec;112(6):1642–52.
101. Alehagen U, Aaseth J, Alexander J, Johansson P. Still reduced cardiovascular mortality 12 years after supplementation with selenium and coenzyme Q10 for four years: A validation of previous 10-year follow-up results of a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial in elderly. *PLoS One.* 2018 Apr 11;13(4):e0193120.
  102. Schwenke DC, Behr SR. Vitamin E Combined With Selenium Inhibits Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits Independently of Effects on Plasma Cholesterol Concentrations. *Circ Res.* 1998 Aug 24;83(4):366–77.
  103. Krohn RM, Lemaire M, Negro Silva LF, Lemarié C, Bolt A, Mann KK, Smits JE. High-selenium lentil diet protects against arsenic-induced atherosclerosis in a mouse model. *J Nutr Biochem.* 2016 Jan;27:9–15.
  104. Agbor GA, Vinson JA, Patel S, Patel K, Scarpati J, Shiner D, Wardrop F, Tompkins TA. Effect of Selenium- and Glutathione-Enriched Yeast Supplementation on a Combined Atherosclerosis and Diabetes Hamster Model. *J Agric Food Chem.* 2007 Oct 1;55(21):8731–6.
  105. Tanguy S. Dietary selenium intake affects cardiac susceptibility to ischaemia/reperfusion in male senescent rats. *Age Ageing.* 2003 May 1;32(3):273–8.
  106. Crupi P, Faienza MF, Naeem MY, Corbo F, Clodoveo ML, Muraglia M. Overview of the Potential Beneficial Effects of Carotenoids on Consumer Health and Well-Being. *Antioxidants.* 2023 May 10;12(5):1069.
  107. Beatty S, Chakravarthy U, Nolan JM, Muldrew KA, Woodside J V., Denny F, Stevenson MR. Secondary Outcomes in a Clinical Trial of Carotenoids with Coantioxidants versus Placebo in Early Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2013 Mar;120(3):600–6.
  108. Ahn YJ, Kim H. Lutein as a Modulator of Oxidative Stress-Mediated Inflammatory Diseases. *Antioxidants.* 2021 Sep 13;10(9):1448.
  109. 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.
  110. Dwyer JH, Navab M, Dwyer KM, Hassan K, Sun P, Shircore A, Hama-Levy S, Hough G, Wang X, Drake T, Merz CNB, Fogelman AM. Oxygenated Carotenoid Lutein and Progression of Early Atherosclerosis. *Circulation.* 2001 Jun 19;103(24):2922–7.

111. Zou Z, Xu X, Huang Y, Xiao X, Ma L, Sun T, Dong P, Wang X, Lin X. High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: The Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis*. 2011 Dec;219(2):789–93.
112. Zhu X, Cheang I, Tang Y, Shi M, Zhu Q, Gao R, Liao S, Yao W, Zhou Y, Zhang H, Li X. Associations of Serum Carotenoids With Risk of All-Cause and Cardiovascular Mortality in Hypertensive Adults. *J Am Heart Assoc*. 2023 Feb 21;12(4).
113. Sanlier N, Üstün D. Egg consumption and health effects: A narrative review. *J Food Sci*. 2021 Oct;86(10):4250–61.
114. Kralik Z, Kralik G, Košević M, Galović O, Samardžić M. Natural Multi-Enriched Eggs with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Vitamin E, and Lutein. *Animals*. 2023 Jan 16;13(2):321.
115. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z, Matić A, Stupin M, Jukić I, Kralik Z, Grčević M, Kralik G, Šerić V, Drenjančević I. Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals—Clinical Trial. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 10;21(11):4149.
116. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Matić A, Jukić I, Kolobarić N, Drenjančević I. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Prev Nutr Food Sci*. 2021 Dec 31;26(4):388–99.
117. Čurić ŽB, Masle AM, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Stupin A, Mihaljević Z, Jukić I, Stupin M, Matić A, Kozina N, Šušnjara P, Juranić B, Kolobarić N, Šerić V, Drenjančević I. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome-A Randomized Study. *Biology (Basel)*. 2021 Aug 14;10(8).
118. Šušnjara P, Mihaljević Z, Stupin A, Kolobarić N, Matić A, Jukić I, Kralik Z, Kralik G, Miloloža A, Pavošević T, Šerić V, Lončarić Z, Kerovec D, Galović O, Drenjančević I. Consumption of Nutritionally Enriched Hen Eggs Enhances Endothelium-Dependent Vasodilation via Cyclooxygenase Metabolites in Healthy Young People—A Randomized Study. *Nutrients*. 2023 Mar 25;15(7):1599.
119. Mancia G, Kreutz R, Brunström M, Burnier M, Grassi G, Januszewicz A, Muiesan ML, Tsioufis K, Agabiti-Rosei E, Algharably EAE, Azizi M, Benetos A, Borghi C, Hitij JB, Cifkova R, Coca A, Cornelissen V, Cruickshank JK, Cunha PG, Danser AHJ, Pinho RM

- de, Delles C, Dominiczak AF, Dorobantu M, Doumas M, Fernández-Alfonso MS, Halimi JM, Járαι Z, Jelaković B, Jordan J, Kuznetsova T, Laurent S, Lovic D, Lurbe E, Mahfoud F, Manolis A, Miglinas M, Narkiewicz K, Niiranen T, Palatini P, Parati G, Pathak A, Persu A, Polonia J, Redon J, Sarafidis P, Schmieder R, Spronck B, Stabouli S, Stergiou G, Taddei S, Thomopoulos C, Tomaszewski M, Van de Borne P, Wanner C, Weber T, Williams B, Zhang ZY, Kjeldsen SE. 2023 ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* 2023 Dec;41(12):1874–2071.
120. Wang L, Summerhill K, Rodriguez-Canas C, Mather I, Patel P, Eiden M, Young S, Forouhi NG, Koulman A. Development and validation of a robust automated analysis of plasma phospholipid fatty acids for metabolic phenotyping of large epidemiological studies. *Genome Med.* 2013;5(4):39.
  121. Jargar JG, Hattiwale SH, Das S, Dhundasi SA, Das KK. A modified simple method for determination of serum  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2012 Jan 1;23(1).
  122. 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. *Anal Chim Acta.* 2006 Jul;573–574:432–8.
  123. Tzeng MS, Yang FL, Wang-Hsu GS, Chen BH. Determination of major carotenoids in human serum by liquid chromatography. *J Food Drug Anal.* 2020 Jul 14;12(1).
  124. Cavka A, Cosic A, Grizelj I, Koller A, Jelaković B, Lombard JH, Phillips SA, Drenjancevic I. Effects of AT1 Receptor Blockade on Plasma Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) Level and Skin Microcirculation in Young Healthy Women on Low Salt Diet. *Kidney Blood Press Res.* 2013;37(4–5):432–42.
  125. Stupin M, Stupin A, Rasic L, Cosic A, Kolar L, Seric V, Lenasi H, Izakovic K, Drenjancevic I. Acute exhaustive rowing exercise reduces skin microvascular dilator function in young adult rowing athletes. *Eur J Appl Physiol.* 2018 Feb 21;118(2):461–74.
  126. Lenasi H, Štrucl M. The effect of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibition on cutaneous microvascular reactivity. *Eur J Appl Physiol.* 2008 Aug 31;103(6):719–26.
  127. Thijssen DHJ, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ. Assessment of flow-mediated dilation in

- humans: a methodological and physiological guideline. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011 Jan;300(1):H2–12.
128. Oakes KD, Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*. 2003 May;63(4):447–63.
129. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996 Jul;239(1):70–6.
130. Aebi H. [13] Catalase in vitro. In 1984. p. 121–6.
131. Flohé L, ötting F. [10] Superoxide dismutase assays. In 1984. p. 93–104.
132. Yang LG, Song ZX, Yin H, Wang YY, Shu GF, Lu HX, Wang SK, Sun GJ. Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. *Lipids*. 2016 Jan 2;51(1):49–59.
133. Wei Y, Meng Y, Li N, Wang Q, Chen L. The effects of low-ratio n-6/n-3 PUFA on biomarkers of inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Food Funct*. 2021;12(1):30–40.
134. Yang Y, Xia Y, Zhang B, Li D, Yan J, Yang J, Sun J, Cao H, Wang Y, Zhang F. Effects of different n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids ratios on lipid metabolism in patients with hyperlipidemia: a randomized controlled clinical trial. *Front Nutr*. 2023 Jun 1;10.
135. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Matic A, Jukić I, Kolobarić N, Drenjančević I. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Prev Nutr Food Sci*. 2021 Dec 31;26(4):388–99.
136. Huang J, Xie L, Song A, Zhang C. Selenium Status and Its Antioxidant Role in Metabolic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Jul 6;2022:1–15.
137. Thomson CD, Chisholm A, McLachlan SK, Campbell JM. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am J Clin Nutr*. 2008 Feb;87(2):379–84.
138. Hu Y, McIntosh GH, Le Leu RK, Somashekar R, Meng XQ, Gopalsamy G, Bambaca L, McKinnon RA, Young GP. Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans. *British Journal of Nutrition*. 2016 Dec 14;116(11):1901–11.
139. Thomas SR, Leichtweis SB, Pettersson K, Croft KD, Mori TA, Brown AJ, Stocker R. Dietary Cosupplementation With Vitamin E and Coenzyme Q<sub>10</sub> Inhibits Atherosclerosis

- in Apolipoprotein E Gene Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Apr;21(4):585–93.
140. Jayedi A, Rashidy-Pour A, Parohan M, Zargar MS, Shab-Bidar S. Dietary and circulating vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -carotene and risk of total cardiovascular mortality: a systematic review and dose–response meta-analysis of prospective observational studies. *Public Health Nutr.* 2019 Jul 11;22(10):1872–87.
  141. Gey K, Moser U, Jordan P, Stähelin H, Eichholzer M, Lüdin E. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5):787S-797S.
  142. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. *New England Journal of Medicine.* 1993 May 20;328(20):1450–6.
  143. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary Antioxidant Vitamins and Death from Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. *New England Journal of Medicine.* 1996 May 2;334(18):1156–62.
  144. Kritchevsky SB, Shimakawa T, Tell GS, Dennis B, Carpenter M, Eckfeldt JH, Peacher-Ryan H, Heiss G. Dietary Antioxidants and Carotid Artery Wall Thickness. *Circulation.* 1995 Oct 15;92(8):2142–50.
  145. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Cashin-Hemphill L, Sevanian A, Johnson R, Azen SP. Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *JAMA.* 1995 Jun 21;273(23):1849–54.
  146. Meydani M. Vitamin E and Atherosclerosis: Beyond Prevention of LDL Oxidation. *J Nutr.* 2001 Feb;131(2):366S-368S.
  147. Sesso HD. Vitamins E and C in the Prevention of Cardiovascular Disease in Men. *JAMA.* 2008 Nov 12;300(18):2123.
  148. Roncaglioni MC. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general Practice. *The Lancet.* 2001 Jan;357(9250):89–95.
  149. Effects of Long-term Vitamin E Supplementation on Cardiovascular Events and Cancer. *JAMA.* 2005 Mar 16;293(11):1338.
  150. Goodrow EF, Wilson TA, Houde SC, Vishwanathan R, Scollin PA, Handelman G, Nicolosi RJ. Consumption of One Egg Per Day Increases Serum Lutein and Zeaxanthin Concentrations in Older Adults without Altering Serum Lipid and Lipoprotein Cholesterol Concentrations. *J Nutr.* 2006 Oct;136(10):2519–24.

151. Kelly ER, Plat J, Haenen GRMM, Kijlstra A, Berendschot TTJM. The Effect of Modified Eggs and an Egg-Yolk Based Beverage on Serum Lutein and Zeaxanthin Concentrations and Macular Pigment Optical Density: Results from a Randomized Trial. *PLoS One*. 2014 Mar 27;9(3):e92659.
152. Ference BA, Graham I, Tokgozoglul, Catapano AL. Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Sep 4;72(10):1141–56.
153. Mesas AE, Garrido-Miguel M, Fernández-Rodríguez R, Fernández Franco S, Lugones-Sánchez C, García-Ortiz L, Martínez-Vizcaíno V. Egg Consumption and Blood Lipid Parameters According to the Presence of Chronic Metabolic Disorders: The EVIDENT II Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022 Feb 17;107(3):e963–72.
154. Drouin-Chartier JP, Chen S, Li Y, Schwab AL, Stampfer MJ, Sacks FM, Rosner B, Willett WC, Hu FB, Bhupathiraju SN. Egg consumption and risk of cardiovascular disease: three large prospective US cohort studies, systematic review, and updated meta-analysis. *BMJ*. 2020 Mar 4;m513.
155. Zhong VW, Van Horn L, Cornelis MC, Wilkins JT, Ning H, Carnethon MR, Greenland P, Mentz RJ, Tucker KL, Zhao L, Norwood AF, Lloyd-Jones DM, Allen NB. Associations of Dietary Cholesterol or Egg Consumption With Incident Cardiovascular Disease and Mortality. *JAMA*. 2019 Mar 19;321(11):1081.
156. Jacobson TA, Ito MK, Maki KC, Orringer CE, Bays HE, Jones PH, McKenney JM, Grundy SM, Gill EA, Wild RA, Wilson DP, Brown WV. National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1--full report. *J Clin Lipidol*. 2015;9(2):129–69.
157. Nicholls SJ, Lincoff AM, Garcia M, Bash D, Ballantyne CM, Barter PJ, Davidson MH, Kastelein JJP, Koenig W, McGuire DK, Mozaffarian D, Ridker PM, Ray KK, Katona BG, Himmelmann A, Loss LE, Rensfeldt M, Lundström T, Agrawal R, Menon V, Wolski K, Nissen SE. Effect of High-Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High Cardiovascular Risk: The STRENGTH Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020 Dec 8;324(22):2268–80.
158. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglul, Wiklund O, Mueller C, Drexel H, Aboyans V, Corsini A, Doehner W, Farnier M, Gigante B, Kayikcioglu M, Krstacic G, Lambrinou E, Lewis BS, Masip J,

- Moulin P, Petersen S, Petronio AS, Piepoli MF, Pintó X, Räber L, Ray KK, Reiner Ž, Riesen WF, Roffi M, Schmid JP, Shlyakhto E, Simpson IA, Stroes E, Sudano I, Tselepis AD, Viigimaa M, Vindis C, Vonbank A, Vrablik M, Vrsalovic M, Zamorano JL, Collet JP, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, John Chapman M, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Wiklund O, Windecker S, Aboyans V, Baigent C, Collet JP, Dean V, Delgado V, Fitzsimons D, Gale CP, Grobbee D, Halvorsen S, Hindricks G, Iung B, Jüni P, Katus HA, Landmesser U, Leclercq C, Lettino M, Lewis BS, Merkely B, Mueller C, Petersen S, Petronio AS, Richter DJ, Roffi M, Shlyakhto E, Simpson IA, Sousa-Uva M, Touyz RM, Nibouche D, Zelveian PH, Siostrzonek P, Najafov R, van de Borne P, Pojskic B, Postadzhiyan A, Kypris L, Špinar J, Larsen ML, Eldin HS, Viigimaa M, Strandberg TE, Ferrières J, Agladze R, Laufs U, Rallidis L, Bajnok L, Gudjónsson T, Maher V, Henkin Y, Gulizia MM, Mussagaliyeva A, Bajraktari G, Kerimkulova A, Latkovskis G, Hamoui O, Slapikas R, Visser L, Dingli P, Ivanov V, Boskovic A, Nazzi M, Visseren F, Mitevska I, Retterstøl K, Jankowski P, Fontes-Carvalho R, Gaita D, Ezhov M, Foscoli M, Giga V, Pella D, Fras Z, de Isla LP, Hagström E, Lehmann R, Abid L, Ozdogan O, Mitchenko O, Patel RS. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020 Jan 1;41(1):111–88.
159. Khosla P, Daud Z, Tubie B, Sheyman M, Osia R, Adams J, Tubie S. Vitamin E tocotrienol supplementation improves lipid profiles in chronic hemodialysis patients. *Vasc Health Risk Manag*. 2013 Nov;747.
160. Ndrepepa G, Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. *Ann Transl Med*. 2016 Dec;4(24):481–481.
161. Kim YG, Park GM, Lee SB, Yang DH, Kang JW, Lim TH, Kim HK, Choe J, Lee SW, Kim YH. Association of gamma-glutamyl transferase with subclinical coronary atherosclerosis and cardiac outcomes in non-alcoholics. *Sci Rep*. 2020 Oct 22;10(1):17994.
162. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Söregi G, Lehr S, Huber K, Maurer G, Weidinger F, Kostner K. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Feb;35(2):277–83.
163. Mah E, Pei R, Guo Y, Masterjohn C, Ballard KD, Taylor BA, Taylor AW, Traber MG, Volek JS, Bruno RS. Greater  $\gamma$ -tocopherol status during acute smoking abstinence with



- nicotine replacement therapy improved vascular endothelial function by decreasing 8-iso-15(S)-prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Exp Biol Med*. 2015 Apr 30;240(4):527–33.
164. Dhein S, Kabat A, Olbrich A, Rösen P, Schröder H, Mohr FW. Effect of Chronic Treatment with Vitamin E on Endothelial Dysfunction in a Type I in Vivo Diabetes Mellitus Model and in Vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003 Apr 1;305(1):114–22.
  165. Zehr KR, Walker MK. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial function in humans at risk for atherosclerosis: A review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018 Jan;134:131–40.
  166. Goodfellow J, Bellamy MF, Ramsey MW, Jones CJ, Lewis MJ. Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Feb;35(2):265–70.
  167. Mallick R, Duttaroy AK. Modulation of endothelium function by fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 2022 Jan 16;477(1):15–38.
  168. Stirban A, Nandreaan S, Götting C, Tamler R, Pop A, Negrean M, Gawlowski T, Stratmann B, Tschoepe D. Effects of n-3 fatty acids on macro- and microvascular function in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2010 Mar;91(3):808–13.
  169. Hammer A, Moertl D, Schlager O, Matschuck M, Seidinger D, Koppensteiner R, Steiner S. Effects of n -3 PUFA on endothelial function in patients with peripheral arterial disease: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *British Journal of Nutrition*. 2019 Sep 28;122(6):698–706.
  170. 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.
  171. Damy T, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Oliviéro P, Boczkowski J, Ebrahimian T, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *The FASEB Journal*. 2003 Oct;17(13):1–22.
  172. Dawson D, Lygate CA, Zhang MH, Hulbert K, Neubauer S, Casadei B. *nNOS* Gene Deletion Exacerbates Pathological Left Ventricular Remodeling and Functional Deterioration After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2005 Dec 13;112(24):3729–37.
  173. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara

- N. Spontaneous Myocardial Infarction in Mice Lacking All Nitric Oxide Synthase Isoforms. *Circulation*. 2008 Apr 29;117(17):2211–23.
174. Stebbins CL, Stice JP, Hart CM, Mbai FN, Knowlton AA. Effects of dietary decosahexaenoic acid (DHA) on eNOS in human coronary artery endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2008 Dec;13(4):261–8.
175. Šušnjara P, Kolobarić N, Matic A, Mihaljević Z, Stupin A, Marczy S, Drenjančević I. 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. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2022 Dec 27;27(12):332.
176. Wilmes V, Scheiper S, Roehr W, Niess C, Kippenberger S, Steinhorst K, Verhoff MA, Kauferstein S. Increased inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in human myocardial infarction. *Int J Legal Med*. 2020 Mar 29;134(2):575–81.
177. Ander BP, Dupasquier CM, Prociuk MA, Pierce GN. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol*. 2003;8(4):164–72.
178. Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Miyake T, Matsuzaki M. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca(2+)-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *FEBS Lett*. 2001 Jan 5;487(3):361–6.
179. Quaschnig T, Voss F, Herzfeld S, Relle K, Kalk P, Godes M, Pfab T, Kraemer-Guth A, Bonz AW, Theuring F, Galle J, Hoher B. Lack of iNOS Impairs Endothelial Function in Endothelin-1 Transgenic Mice. *Kidney Blood Press Res*. 2008;31(2):127–34.
180. Hoshiyama M, Li B, Yao J, Harada T, Morioka T, Oite T. Effect of High Glucose on Nitric Oxide Production and Endothelial Nitric Oxide Synthase Protein Expression in Human Glomerular Endothelial Cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2004 Nov 17;95(2):e62–8.
181. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*. 2020 Jan;40(1):158–89.
182. Kurilenko N, Fatkhullina AR, Mazitova A, Koltsova EK. Act Locally, Act Globally—Microbiota, Barriers, and Cytokines in Atherosclerosis. *Cells*. 2021 Feb 7;10(2):348.
183. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ.

- Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*. 2017 Sep 21;377(12):1119–31.
184. Luc G, Bard JM, Juhan-Vague I, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Arveiler D, Fruchart JC, Ducimetiere P. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Fibrinogen as Predictors of Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jul;23(7):1255–61.
  185. Abbas A, Gregersen I, Holm S, Daissormont I, Bjerkeli V, Krohg-Sørensen K, Skagen KR, Dahl TB, Russell D, Almås T, Bundgaard D, Alteheld LH, Rashidi A, Dahl CP, Michelsen AE, Biessen EA, Aukrust P, Halvorsen B, Skjelland M. Interleukin 23 Levels Are Increased in Carotid Atherosclerosis. *Stroke*. 2015 Mar;46(3):793–9.
  186. Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*. 2017 May;614:8–14.
  187. Gong F, Liu Z, Liu J, Zhou P, Liu Y, Lu X. The paradoxical role of IL-17 in atherosclerosis. *Cell Immunol*. 2015 Sep;297(1):33–9.
  188. Allam G, Abdel-Moneim A, Gaber AM. The pleiotropic role of interleukin-17 in atherosclerosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018 Oct;106:1412–8.
  189. Nordlohne J, von Vietinghoff S. Interleukin 17A in atherosclerosis – Regulation and pathophysiologic effector function. *Cytokine*. 2019 Oct;122:154089.
  190. Erbel C, Dengler TJ, Wangler S, Lasitschka F, Bea F, Wambsganss N, Hakimi M, Böckler D, Katus HA, Gleissner CA. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res Cardiol*. 2011 Jan 1;106(1):125–34.
  191. Wang Z, Shi W, Liang X, Wang W, Liang J. Association of interleukin 17 / angiotensin II with refractory hypertension risk in hemodialysis patients. *Afr Health Sci*. 2016 Oct 17;16(3):766.
  192. Ge S, Hertel B, Koltsova EK, Sørensen-Zender I, Kielstein JT, Ley K, Haller H, von Vietinghoff S. Increased Atherosclerotic Lesion Formation and Vascular Leukocyte Accumulation in Renal Impairment Are Mediated by Interleukin-17A. *Circ Res*. 2013 Sep 27;113(8):965–74.
  193. Hot A, Lavocat F, Lenief V, Miossec P. Simvastatin inhibits the pro-inflammatory and pro-thrombotic effects of IL-17 and TNF- $\alpha$  on endothelial cells. *Ann Rheum Dis*. 2013 May;72(5):754–60.
  194. Chehimi M, Ward R, Pestel J, Robert M, Pesenti S, Bendridi N, Michalski M, Laville M, Vidal H, Eljaafari A. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit IL-17A Secretion through Decreased ICAM-1 Expression in T Cells Co-Cultured with Adipose-Derived

- Stem Cells Harvested from Adipose Tissues of Obese Subjects. *Mol Nutr Food Res*. 2019 Jun 20;63(11):1801148.
195. Kim KW, Kim BM, Won JY, Min HK, Lee SJ, Lee SH, Kim HR. Tocotrienol regulates osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med*. 2021 Mar;36(Suppl 1):S273–82.
  196. Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Dec 1;8(12).
  197. Xia M, Wu F, Yang Y, Lu W, Song M, Ma Z. The possibility of visualizing TGF- $\beta$ 1 expression in ApoE<sup>-/-</sup> mice atherosclerosis using MR targeted imaging. *Acta Radiol*. 2023 Feb 9;2841851231153989.
  198. Nurgazieva D, Mickley A, Moganti K, Ming W, Ovsyi I, Popova A, Sachindra, Awad K, Wang N, Bieback K, Goerdt S, Kzhyshkowska J, Gratchev A. TGF- $\beta$ 1, but Not Bone Morphogenetic Proteins, Activates Smad1/5 Pathway in Primary Human Macrophages and Induces Expression of Proatherogenic Genes. *The Journal of Immunology*. 2015 Jan 15;194(2):709–18.
  199. Panutsopoulos D, Papalambros E, Sigala F, Zafiroopoulos A, Arvanitis DL, Spandidos DA. Protein and mRNA expression levels of VEGF-A and TGF-beta1 in different types of human coronary atherosclerotic lesions. *Int J Mol Med*. 2005 Apr;15(4):603–10.
  200. Chen PY, Qin L, Li G, Wang Z, Dahlman JE, Malagon-Lopez J, Gujja S, Cilfone NA, Kauffman KJ, Sun L, Sun H, Zhang X, Aryal B, Canfran-Duque A, Liu R, Kusters P, Sehgal A, Jiao Y, Anderson DG, Gulcher J, Fernandez-Hernando C, Lutgens E, Schwartz MA, Pober JS, Chittenden TW, Tellides G, Simons M. Endothelial TGF- $\beta$  signalling drives vascular inflammation and atherosclerosis. *Nat Metab*. 2019 Aug 26;1(9):912–26.
  201. Varadhan S, Venkatachalam R, Perumal SM, Ayyamkulamkara SS. Evaluation of Oxidative Stress Parameters and Antioxidant Status in Coronary Artery Disease Patients. *Arch Razi Inst*. 2022 Apr;77(2):853–9.
  202. Ganesan K, Kumar KS, Rao PVS. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2011 Jan;12(1):73–8.
  203. Zakeri N, kelishadi MR, Asbaghi O, Naeini F, Afsharfard M, Mirzadeh E, Naserizadeh S kasra. Selenium supplementation and oxidative stress: A review. *PharmaNutrition*. 2021 Sep;17:100263.
  204. Barić L, Drenjančević I, Mihalj M, Matić A, Stupin M, Kolar L, Mihaljević Z, Mrakovčić-Šutić I, Šerić V, Stupin A. 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 Mar 20;9(3):843.
205. Shahsavari G, Raoufi A, Toolabi A, Hosseninejadmir N, Ahmadvand H, Safariebrahimsarabie M. The effect of atorvastatin treatment duration on oxidative stress markers and lipid profile in patients with coronary artery diseases: A case series study. *ARYA Atheroscler*. 2017 Nov;13(6):282–7.
206. Thomas MK, Narang D, Lakshmy R, Gupta R, Naik N, Maulik SK. Correlation Between Inflammation and Oxidative Stress in Normocholesterolemic Coronary Artery Disease Patients ‘on’ and ‘off’ Atorvastatin for Short Time Intervals. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2006 Feb 9;20(1):37–44.

## 9. SAŽETAK

**Uvod:** Zdrava prehrana može pozitivno djelovati na smanjenje rizika od neželjenih kardiovaskularnih događaja u ishemijskoj bolesti srca. Cilj ove studije bio je utvrditi učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem, i luteinom na o endotelu ovisnu vazodilataciju na mikrovaskularnoj i makrovaskularnoj razini te na biljege upale i oksidativnog stresa u kroničnom koronarnom sindromu (CCS).

**Materijali i metode:** U ovom dvostruko slijepom, prospektivnom, placebo kontroliranom istraživanju (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04564690) 30 CCS ispitanika (9 žena i 21 muškarac) bilo je podijeljeno u Kontrolnu (N=15) skupinu koja je konzumirala tri obična kokošja jaja dnevno (n-3 PUFA 146 mg, vitamin E 0.595 mg, selenij 0.0183 mg, lutein 0.11mg/ po jajetu), i Nutri4 skupinu ((N=15) koja je konzumirala 3 obogaćena jaja (n-3 PUFA 432 mg, vitamin E 1.098 mg, selenij 0.0191 mg, lutein 0.616 mg/po jajetu)) kroz 3 tjedna. Mikrovaskularna i makrovaskularna o endotelu ovisna vazodilatacija određeni su mjerenjen postokluzivne reaktivne hiperemije i vazodilazacije inducirane acetilkolinom (AchID) na koži podlaktice i o protoku ovisnom vazodilazacijom (FMD) brahijalne arterije. Učinjena su mjerenja lipidograma, koncentracije protu i proupalnih citokina, koncentracije izoformi dušik oksid sintetaze, biomarkera oksidativnog stresa prije i nakon dijetalnog protokola.

**Rezultati:** Obogaćena, ali ne i obična kokošja jaja, značajno su pobošljšala mikrovaskularnu PORH i AchID i makrovaskularni FMD, povećaja su serumske koncentracije inducibilne NOS, snizila su razine triglicerida, te su snizila razine proinflammatoryh citokina IL-17A i TGF-1 $\beta$  u odnosu na početna mjerenja. Konzumacija obogaćenih jaja nije imala učinka na razine oksidativnog stresa.

**Zaključak:** Ispitanici s kroničnim koronarnim sindromom mogu imati koristi od konzumacije obogaćenih kokošnjih jaja poboljšanjem lipidograma, stvarajući poboljniji protuupalni milje i poboljšavajući vaskularni odgovor na mirko i makrovaskularnoj razini.

## 10. SUMMARY

**Introduction:** A healthy diet could have the effect of reducing the risk of cardiovascular events in ischemic heart disease. The aim of this study was to determine the impact of the consumption of chicken eggs enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids, selenium, vitamin E, and lutein on micro- and macrovascular endothelium-dependent dilation, inflammation biomarkers, and oxidative stress levels in participants with chronic coronary syndrome (CCS).

**Materials and Methods:** In this double-blind prospective placebo-controlled clinical study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04564690, 30 CCS patients (9 women and 21 men) were randomized in Control group ((N=15) who ate three regular chicken eggs/daily (n-3 PUFAs 146 mg, vitamin E 0.595 mg, selenium 0.0183 mg, lutein 0.11mg/ per egg)), and Nutri4 group ((N=15) who ate three enriched chicken eggs (n-3 PUFAs 432 mg, vitamin E 1.098 mg, selenium 0.0191 mg, lutein 0.616 mg/per egg)) for three weeks. Microvascular and macrovascular endothelium-dependent vasodilation was evaluated by measuring forearm skin post-occlusive reactive hyperemia (PORH) and acetylcholine-induced dilation (AChID) and the flow-mediated dilation (FMD) of the brachial artery, respectively. The serum lipid profile, anti- and proinflammatory cytokine levels, serum concentration of nitric oxide synthase (NOS) isoforms, and oxidative stress biomarkers were measured before and after the diet protocols.

**Results:** Enriched, but not regular, chicken eggs significantly improved microvascular PORH and AChID and macrovascular FMD, increased the serum concentration of inducible NOS, decreased serum triglyceride levels, and decreased proinflammatory cytokine IL-17A and TGF-1 $\beta$  levels compared to initial measurements.

**Conclusion:** Patients with CCS can benefit from the consumption of enriched chicken eggs due to improved lipid biomarkers, a more favorable anti-inflammatory milieu, and improved vascular relaxation at micro- and macrovascular levels.

## 11. ŽIVOTOPIS

Željka Breškić Ćurić rođena je 14. kolovoza 1989. godine u Osijeku. Nakon Osnovne škole „Grigor Vitez“ i I Gimnazije u Osijeku završava Studij medicine na Medicinskom fakultetu u Osijeku 2014. godine. Tijekom studija boravila je na međunarodnoj studentskoj razmjeni u Makedoniji. Po završetku studija odradila je pripravnički staž u KBC Osijek, a nakon položenog stručnog ispita 2015. stekla je Hrvatske liječničke komore za samostalni rad. Zapošljava se u Domu zdravlja Županja u kojem radi od travnja do rujna 2015. godine nakon čega se zapošljava u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci. Specijalizaciju iz kardiologije započela je u svibnju 2016. godine. Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta J.J Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu upisala je 2020. godine. Zaposlena je na Medicinskom fakultetu u Osijeku kao asistent na Katedri za patofiziologiju od 2022. godine. Autor je više znanstvenih i stručnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima. Član je Hrvatske liječničke komore i Hrvatskog društva fiziologa. Aktivno sudjeluje na domaćim i inozemnim znanstvenim i stručnim skupovima te tečajevima trajnog usavršavanja za doktore medicine i kardiologe.



## POPIS PUBLIKACIJA

### Originalni radovi

1. Breškić Ćurić Ž, Stupin A, Masle AM, Šušnjara P, Kozina N, Mihaljević Z, Jukić I, Kibel A, Kolobarić N, Juranić B, Nejašmić D. Patients with Chronic Coronary Syndrome Can Benefit from Consumption of Enriched Chicken Eggs: The Effects on Microvascular Function, Inflammatory Biomarkers, and Oxidative Status—Randomized Clinical Study. *Applied Sciences*. 2023 Nov 17;13(22):12442.

2. Breškić Ćurić, Željka; Masle, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selthofer-Relatić, Kristina; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Stupin, Marko; Matić, Anita; Kozina, Nataša 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*, 10 (2021), 8; 774, 20 doi:10.3390/biology10080774

3. Jukić, Ivana; Kolobarić, Nikolina; Stupin, Ana; Matić, Anita; Kozina, Nataša; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Šušnjara, Petar; Stupin, Marko; Breškić Ćurić, Željka et al; Carnosine, small but mighty - prospect of use as functional ingredient for functional food formulation // *Antioxidants*, 10 (2021), 7; 1037, 31 doi: 10.3390/antiox10071037

4. Stupin, Ana; Cvetko, Ana; Kralik, Gordana; Mihalj, Martina; Šušnjara, Petar; Kolobarić, Nikolina; Breškić Ćurić, Željka; Lukinac, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selthofer-Relatić, Kristina et al; The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids enriched hen eggs consumption on IgG and total plasma protein N-glycosylation in healthy individuals and cardiovascular patients // *Glycobiology*, 2021 (2021) doi:10.1093/ glycob/cwab051

5. Švitek, L; Pušeljić, Nora; Breškić Ćurić, Željka; Selthofer-Relatić, Kristina; Aortic and Cerebral aneurysms: Link with Genetic Predisposition, Risk Factors, and Aortopathies // *Southeastern European Medical Journal*, 3 (2019), 1; 29-41

6. Lukić Milinović, I., Breškić Ćurić, Ž., Krajina-Andričević, M., & Brkić, N. (2020). Treacher Collins syndrome: aneurysm of the ascending aorta and severe aortic insufficiency. *Liječnički vjesnik*, 142(1-2), 35-36.

### Posteri

1. Klobučar L, Breškić Ćurić Ž, Lukić I, Selthofer-Relatić K. Case report: a 55-year-old patient with hypertrophic cardiomyopathy and heterozygous missense variant of TTN and MYH6 genes. *Cardiologia Croatica* [Internet]. 2023

2. Stupin A, Curic ZB, Masle AM, Susnjara P, Kolobaric N, Mihaljevic Z, Jukic I, Kibel A, Selthofer-Relatic K, Juranic B, Drenjancevic I. MICROVASCULAR ENDOTHELIUM FUNCTION RESPONSE TO N-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, VITAMIN E, SELENIUM AND LUTEIN ENRICHED FUNCTIONAL FOOD IN PATIENTS WITH CHRONIC CORONARY SYNDROME. *Journal of Hypertension*. 2023 Jun 1;41(1):e209-10.
3. Drenjancevic I, Stupin A, Susnjara P, Kolobaric N, Kolar L, Masle AM, Curic ZB, Kozina N, Jukic I, Stupin M, Kibel A. DOES FUNCTIONAL FOOD PROVIDE BENEFITS FOR CARDIOVASCULAR HEALTH? ONGOING STUDIES IN SCIENTIFIC CENTRE OF EXCELLENCE. *Journal of Hypertension*. 2022 Jun 1;40(Suppl 1):e206.
4. Breškić Ćurić, Željka; Masle, Ana Marija; Selthofer Relatić, Kristina; Kristina; Kibel, Aleksandar; Stupin, Ana; Šušnjara, Petar; Juranić, Brankica; Drenjančević, Ines; Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih s 4 funkcionalna elementa na mikrovaskularnu funkciju u pacijenata s kroničnom koronarnom bolesti; 5. Hrvatski kongres o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatska, 2021. str. 2-2
5. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Breškić-Ćurić Željka; Masle, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selhofer-Relatić, Kristina; Jukić, Ivana; Stupin, Marko; Matić, Anita et al; Changes in serum levels of inflammatory biomarkers in patients with acute and chronic coronary syndrome consuming n-3 PUFA enriched hen eggs- a randomized study. // Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2021; Trogir, Hrvatska, 2021. str. 41-41
6. Drenjančević, Ines; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Breškić Ćurić, Željka; Masle, Ana Marija; Kibel, Aleksandar; Selthofer-Relatić, Kristina; Jukić, Ivana; Stupin, Marko; Matić, Anita et al; Changes in serum PUBLIKACIJE levels of inflammatory biomarkers in patients with acute and chronic coronary syndrome consuming n-3 polyunsaturated fatty acid enriched hen eggs - a randomized study // Annual meeting of the Croatian Immunological Society 2021, Abstract book; Trogir, Hrvatska, 2021. str. 40-40
7. Selthofer-Relatić, Kristina; Breškić Ćurić, Željka; Čikeš, Maja; Skorić, Boško; Planinc, Ivo; Miličić, Davor; From left ventricular hypertrophy to Waldenström macroglobulinemia: a case report // *Cardiologia Croatica*; Zagreb: Medicinska naklada, 2019. str. 256-256 doi:<https://doi.org/10.15836/ccar2019.256>
8. Brkić, Nikolina; Breškić Ćurić, Željka; Šalov Maja; Teška sideropenična anemija kod trudnice - prikaz ishoda liječenja željezovom karboksimaltozom; 11. Internistički kongres, 2021.

9. Babić, Marina; Breškić, Željka; Perković, Romana; Heffer, Marija; Recognition of Facial Expressions by Doctors at the Clinical Hospital Center Osijek, Liječnički vjesnik, Zagreb, Studeni 2012.

10. Berlančić, Terezija; Perković, Romana; Babić, Marina; Breškić, Željka; Butković Soldo, Silvija; Short-Term Mortality of Diabetic and Non Diabetic Patients after Stroke in Eastern Croatia; Liječnički vjesnik, Zagreb, Studeni 2013.

#### Kongresna priopćenja

1. Mihaljević, Zrinka; Matić, Anita; Stupin, Ana; Mihalj, Martina; Selthofer-Relatić, Kristina; Kibel, Aleksandar; Breškić-Ćurić, Željka; Lukinac, Anamarija; Kolobarić, Nikolina; Šušnjara, Petar; Drenjančević, Ines; Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched chicken eggs consumption in patients with known atherosclerotic coronary artery disease on pro-inflammatory cytokines // The 14th Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with international participation „Homeostasis – From Cell to Organ“ - Abstract Book, Virtual conference (online), 2020.

2. (ZCI za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta u Osijeku) Drenjančević, 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 fatty acids // 12 međunarodna znanstvena i stručna konferencija Hranom do zdravlja / Babić, Jurislav ; Šubarić, Drago ; Jašić, Midhat (ur.). Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Tehnološki fakultet Univerziteta u Tuzli, 2019. str. 56-56

3. Breškić Ćurić, Željka; Selthofer-Relatić, Kristina; Stupin, Marko; Šerić, Vatroslav; Matić, Anita; Kibel, Aleksandar; Mihaljević, Zrinka; Šušnjara, Petar; Lukinac, Ana Marija; Juranić, Brankica; Drenjančević, Ines; Effect of n-3 Polysaturated Fatty Acid-enriched Chicken Eggs Consumption on the Microcirculatory Function and Blood Biochemical Markers in Patients with Known Atherosclerotic Coronary Artery Disease - Preliminary Results // 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation - Abstract Book, Osijek, Hrvatska, 2019. str. O3-/

4. Breškić Ćurić, Željka; Masle, Ana Marija; Selthofer-Relatić, Kristina; Kibel, Aleksandar; Stupin, Ana; Mihaljević, Zrinka; Jukić, Ivana; Stupin, Marko; Matić, Anita; Kozina, Nataša; Šušnjara, Petar; Juranić, Brankica; Šerić, Vatroslav; Drenjančević, Ines; The effect of consumption of eggs enriched with four functional elements (Nutri4) on lipid profile in patients

with chronic coronary artery disease; 13. Hrvatski kongres o aterosklerozi s međunarodnim sudjelovanjem, 2021.

Sudjelovanje na domaćem ili međunarodnom skupu bez priopćenja

CroEcho 2023 - 12. hrvatski dvogodišnji ehokardiografski kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, 2023.

Simpozij Invazivne kardiologije, Slavonski Brod, 2023.

Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation, Osijek, 2023.

Festival znanosti – Kako sačuvati srce? U prirodi i društvu... Osijek, 2023.

14. Kongres hrvatskoga kardiološkog društva, Zagreb, 2022,

5.hrvatski kongres o hipertenziji s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 2021.

13. hrvatski kongres o aterosklerozi s međunarodnim sudjelovanjem - domaći kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, 2021.

11. Internistički kongres, sto svi trebamo znati – domaći simpozij, Opatija, 2021.

25. Dani internista Slavonije i Baranje – domaći kongres, Osijek, 2021.

Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation, Osijek, 2019.

Domaći simpozij s međunarodnim sudjelovanjem "Akutna stanja u kardiologiji - novosti u 2018. godini", Zagreb, 2018.

Međunarodni simpozij Novosti iz nefrologije i arterijske hipertenzije - Smjernice u svakodnevnom radu - kako premostiti zjap, Zagreb, 2018.

Simpozij "Izvršnost hrvatske kardiologije i hipertenzijologije", Zagreb, 2018.

Festival znanosti - tribina Kako zapravo srce izgleda?, Osijek, 2018.

Drugi splitski kardiološki đir: Abeceda venskog tromboembolizma, Split, 2017.

Domaći simpozij "Akutna stanja u kardiologiji - recentni stavovi", Zagreb, 2017.

Simpozij "Aktiviraj srce, aktiviraj život", Zagreb, 2017.

Prvi splitski kardiološki đir: Abeceda atrijske fibrilacije, Split, 2016.

9. hrvatski internistički kongres - domaći simpozij, Opatija, 2016.