

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

---

Breškić Ćurić, Željka

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:236:843578>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Doctoral School, Josip Juraj University  
in Osijek](#)



**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Sveučilište u Dubrovniku**  
**Institut Ruđer Bošković**  
**Doktorski 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**

Doktorski rad

Osijek, 2024.

## 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:** Endotel ima ključnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa, regulaciji koagulacije i održavanju hemostaze, a endotelna disfunkcija povezana je s nastankom kardiovaskularnih bolesti. Cilj ovog rada jest utvrditi 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. Nakon konzumacije obogaćenih jaja zabilježeno je smanjenje serumske koncentracije triglicerida, poboljšala se mikrovaskularna i makrovaskularna funkcija ovisna o endotelu, a smanjila se koncentracija IL-17A i TGF-1 $\beta$  u odnosu na bazalno mjerenje, dok se navedeni parametri nisu mijenjali u kontrolnoj skupini. Konzumacija obogaćenih jaja ima blagotvorne učinke u kroničnom koronarnom sindromu.

**Broj stranica: 105**

**Broj slika: 7**

**Broj tablica: 13**

**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: 5.6.2024.**

**Povjerenstvo za javnu obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Ines Bilić – Ćurčić, član;
2. izv. prof. dr. sc. Valentina Pavić, član;
3. doc. dr. sc. Hrvoje Lalić, član;
4. prof. dr. sc. Lada Zibar, zamjena člana;
5. izv. prof. dr. sc. Rosemary Vuković, zamjena člana

**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**  
**Ruder 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 SYNDROME**

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.**

**Abstract:** The endothelium plays a key role in the regulation of vascular tone, regulation of coagulation and platelet aggregation, and endothelial dysfunction is associated with the development of cardiovascular diseases. The aim of this study is to determine the effect of eggs enriched in n-3 PUFA, vitamin E, selenium and lutein on endothelial function and on the antioxidant response in chronic coronary syndrome. 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: 105**

**Number of figures: 7**

**Number of tables: 13**

**Number of references: 206**

**Original in: Croatian**

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

**Date of the thesis defense: 5.6.2024.**

#### **Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Ines Bilić – Ćurčić, PhD (reviewer)
2. Assoc. Prof. Valentina Pavić, PhD (reviewer)
3. Asst. Prof. Hrvoje Lalić, PhD (reviewer)
4. Prof. Lada Zibar, PhD (substitute)
5. Assoc. Prof. Rosemary Vuković, PhD (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 tijekom svih ovih godina.*

*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 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.*

Ovaj doktorski rad financiran je od strane Europskih strukturnih 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

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                                                                              | 1  |
| 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 višestruko nezasićene 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 |
| 2. CILJ .....                                                                                                              | 21 |
| 3. HIPOTEZA .....                                                                                                          | 22 |
| 4. MATERIJALI I METODE .....                                                                                               | 23 |
| 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.....                                                                | 26 |
| 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 |
| 4.5.2. Koncentracija vitamina E .....                                                                                      | 27 |
| 4.5.3. Koncentracija selenija .....                                                                                        | 28 |
| 4.5.4. Koncentracija luteina.....                                                                                          | 28 |
| 4.6. Lipidni profil i biokemijske analize u serumu .....                                                                   | 29 |
| 4.7. Vaskularna reaktivnost ovisna o endotelu i vaskularna reaktivnost neovisna o endotelu u<br>mikrocirkulaciji kože..... | 30 |
| 4.8. Dilatacija posredovana protokom (engl. <i>flow mediated dilatation</i> , FMD) brahijalne arterije                     | 32 |

|                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.9. Koncentracija eNOS-a, iNOS-a, nNOS-a.....                                                                                                                    | 32        |
| 4.10. Mjerenje koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina u serumu .....                                                                         | 33        |
| 4.11. Biljezi oksidativnog stresa i biljezi antioksidativnog odgovora .....                                                                                       | 33        |
| 4.11.1. TBARS.....                                                                                                                                                | 33        |
| 4.11.2. FRAP .....                                                                                                                                                | 34        |
| 4.11.3. Određivanje serumske aktivnosti antioksidativnih enzima .....                                                                                             | 34        |
| 4.12. Statistička analiza .....                                                                                                                                   | 35        |
| <b>5. REZULTATI.....</b>                                                                                                                                          | <b>37</b> |
| 5.1. Opće značajke 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. Vaskularna reaktivnost ovisna o endotelu i vaskularna reaktivnost neovisna o endotelu u mikrocirkulaciji kože.....                                           | 44        |
| 5.5. Dilatacija posredovana protokom (engl. <i>flow-mediated dilatation</i> , FMD) brahijalne arterije. ....                                                      | 47        |
| 5.6. Koncentracija eNOS-a, iNOS-a i nNOS-a .....                                                                                                                  | 49        |
| 5.7. Mjerenje koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina u serumu.....                                                                           | 51        |
| 5.8. Biljezi oksidativnog stresa i biomarkeri 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.....                     | 55        |
| 6.2. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na serumske koncentracije vitamina E, selenija i luteina .....               | 56        |
| 6.3. Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na lipidni profil i biokemijske parametre .....                    | 59        |
| 6.4. Promjene mikrovaskularne i makrovaskularne funkcije .....                                                                                                    | 62        |
| 6.5. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na koncentracije izoformi sintaze dušikovog(II) oksida.....                  | 64        |
| 6.6. Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na serumske koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina ..... | 66        |
| 6.7. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na razine oksidativnog stresa i antioksidativni odgovor .....                | 69        |
| 6.8. Ograničenja .....                                                                                                                                            | 71        |



|                     |    |
|---------------------|----|
| 7. ZAKLJUČAK.....   | 72 |
| 8. LITERATURA ..... | 73 |
| 9. SAŽETAK .....    | 88 |
| 10. SUMMARY .....   | 89 |
| 11. ŽIVOTOPIS ..... | 90 |

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

- AA – arahidonska kiselina (engl. *Arachidonic acid*)
- ACE-inhibitori – inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*)
- Ach – acetilkolin (engl. *Acetylcholine*)
- ALA –  $\alpha$ -linolenska kiselina (engl.  *$\alpha$ -Linolenic acid*)
- ALT – alanin transaminaza (engl. *Alanine Transaminase*)
- AOPP – napredni oksidacijski proteinski proizvodi (engl. *advanced oxidation protein products*)
- ApoB – apolipoprotein B
- ARB – blokatori angiotenzinskih receptora (engl. *Angiotensin Receptor Blocker*)
- AST – aspartat transaminaza
- AUC – površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*)
- BH4 – tetrahidrobiopterin (engl. *Tetrahydrobiopterin*)
- CABG – aortokoronarno premoštenje (engl. *coronary artery bypass grafting*)
- CAM – stanična adhezijska molekula (engl. *cell adhesion molecules*)
- cAMP – ciklični adenzin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate cAMP*)
- CAT – katalaza (engl. *Catalase*)
- CCS – kronični koronarni sindrom (engl. *chronic coronary syndrome*)
- cGMP – ciklički gvanozin monofosfat (engl. *Cyclic Guanosine Monophosphate*)
- CNP – C-tip natriuretskog peptida (engl. *C Type Natriuretic Peptide*)
- CO – ugljikov(II) oksid
- COX – ciklooksigenaza (engl. *Cyclooxygenasa*)
- CRP – C-reaktivni protein
- DBP – dijastolički krvni tlak (engl. *diastolic blood pressure*)
- DHA – dokozaheksaenska kiselina (engl. *Docosahexaenoic Acid*)
- DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)
- E – eritrociti
- EDHF – hiperpolarizacijski čimbenici endotela (engl. *endothelial-derived hyperpolarizing factors*)
- ELISA – enzimatski imunosorbentni test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- eNOS – endotelna sintaza dušikovog(II) oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)
- EPA – eikozapentaenska kiselina (engl. *Eicosapentaenoic Acid*)
- ESC – Europsko kardiološko društvo (engl. *European Society of Cardiology*)

ET-1 – endotelin-1

FMD – dilatacija posredovana protokom (engl. *flow mediated dilation*)

FRAP – metoda mjerenja sposobnosti reduciranja željeza u plazmi (engl. *ferric ion reducing antioxidant power*)

GGT – gama-glutamil transaminaza

GM-CSF – čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophages colony-stimulating factor*)

GPX – glutation peroksidaza (engl. *Glutathione peroxidase*)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodikov peroksid

H<sub>2</sub>S – sumporovodik

HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*)

Hgb – hemoglobin

HMG-CoA – 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A reduktaza

HR – puls (engl. *heart rate*)

ICAM-1 – međustanična adhezijska molekula (engl. *intercellular cell adhesion molecule-1*)

IL – interleukin

INF $\gamma$  – interferon gama

iNOS – inducibilna sintaza dušikovog(II) oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

ITM – indeks tjelesne mase

L – leukociti

LA – linolna kiselina (engl. *Linoleic acid*)

LDF – laser-doplerska floumetrija (engl. *Laser Doppler flowmetry*)

LDL – lipoprotein male gustoće (engl. *low-density lipoprotein*)

LTB – leukotrien (engl. *leukotriene*)

MCP-1 – monocitni kemotaktični protein-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*)

MDA – malondialdehid

MMP – matriks metaloproteinaze

MPO – mijeloperoksidaza

MUFA – jednostruko zasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*)

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

NF- $\kappa$ B – nuklearni čimbenik kapa B (engl. *nuclear factor kappa-B*)

nNOS – neuralna sintaza dušikovog(II) oksida (engl. *neuronal nitric oxide synthase*)

NO – dušikov(II) oksid (engl. *nitric oxide*)

NOS – sintaza dušikovog(II) oksida (engl. *nitric oxide synthase*)

NTG – nitroglicerín

oxLDL – oksidirani lipoprotein male gustoće (engl. *oxidized low density lipoprotein*)

PG – prostaglandín

PGI-2 – prostaglandín I2

PON – paraoksonaza (engl. *Paraoxonase*)

PORH – postokluzivna reaktivna hiperemija

PU – perfuzijska jedinica (engl. *Perfusion units*)

PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SBP – sistolički krvni tlak (engl. *systolic blood pressure*)

sGC – topljiva gvanilat ciklaza (engl. *soluble guanyly cyclase*)

SNP – natrijev nitroprusid (engl. *Sodium Nitroprusside*)

SOD – superoksid dismutaza

SFA – zasićene masne kiseline (engl. *saturated fatty acids*)

TBARS – reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substance assay*)

TGF- $\beta$ 1 – transformirajući čimbenik rasta (engl. *transforming growth factor  $\beta$* )

TNF  $\alpha$  – čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

Trc – trombociti

TXA – tromboksan (engl. *Thromboxane*)

VCAM – vaskularna stanična adhezijska molekula (engl. *vascular cell adhesion molecule*)

VSMC – vaskularne glatke mišićne stanice (engl. *vascular smooth muscle cell*)

WHR – omjer struka i bokova (engl. *waist-to-hip ratio*)

ZCI – Znanstveni centar izvrsnosti

## 1. UVOD

### 1.1. Endotel i endotelna disfunkcija

Stijenka krvne žile sastoji se od triju slojeva: 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 niz vaskularnih funkcija uključujući kontraktilnost glatkog mišićja, vazodilataciju ovisnu o endotelu, djeluje na upalu, oksidativni stres, sudjeluje u agregaciji trombocita, djeluje na sintezu i ekspresiju citokina i adhezijskih molekula koje privlače upalne stanice i olakšavaju njihov ulazak u stijenku krvnih žila [3]. Najvažniji kemijski spoj koji proizvodi endotel jest dušikov(II) oksid (NO). Fiziološki poticaj za sintezu i otpuštanje NO iz endotela jest naprezanje endotela uzrokovano protokom krvi kroz krvnu žilu. Određeni spojevi kao što su acetilkolin, histamin, bradikinin, norepinefrin i dr. također mogu povećati sintezu i oslobađanje NO iz endotela [3].

NO djeluje kao snažan vazodilator; stvara se u endotelu te djeluje na glatke mišićne tunike medije krvne žile, gdje stimulira topljivu gvanilat ciklazu (sGC) koja inducira stvaranje cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP), a koji djeluje kao drugi glasnik koji aktivira svoje proteinske mete u stanici. Jedna od njih jest 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 kisika, a nastaje uz pomoć enzima sintaze dušikovog(II) oksida (NOS) [5]. Sučimbenici koji su potrebni NOS-u jesu kisik, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) (3). Tri su izoforme tog enzima: neuralna (nNOS), endotelna (eNOS) i inducibilna (iNOS) sintaza dušikovog(II) oksida [6]. ENOS je izoforma koja se nalazi u endotelnim stanicama i regulira vaskularnu funkciju te ima antiaterosklerotske učinke. Akutna i kronična povećanja protoka krvi i posljedično naprezanje stijenke krvne žile potiču 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-a kontroverzna je, mnogi su istraživači opisali kako je njezina povećana aktivacija povezana s bolestima kao što je ateroskleroza i kako iNOS može pridonijeti nastanku disfunkcije endotela. Drugi istraživači sugeriraju kako aktivnost iNOS-a u patološkim uvjetima zapravo ima zaštitni mehanizam; u nedostatku eNOS-a upravo iNOS održava proizvodnju NO te tako 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 glavni je uzrok endotelne disfunkcije. Abnormalnosti u stvaranju NO uzrokuju endotelnu disfunkciju koja je temelj brojnih kardiovaskularnih poremećaja kao što su arterijska hipertenzija, ateroskleroza i bolesti povezane s angiogenezom [11]. Endotelnu disfunkciju odlikuje neravnoteža između vazodilatacije i vazokonstrikcije, porast upalnih čimbenika te povišena razina reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS), a posljedično i neravnoteža biodostupnosti NO. Endotelne stanice također reagiraju 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. 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, koji nastaje u hepatocitima uslijed stimulacije citokinima kao što su IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , smanjuje stvaranje eNOS-a u endotelnim stanicama, što smanjuje oslobađanje NO [14]. ROS, odnosno superoksidni anion djeluje na smanjenje bioraspoloživosti NO. Superoksidni anion reagira s NO te nastaje peroksinitrit koji potiče nitriranje proteina i uzrokuje disfunkciju i apoptozu endotelnih stanica [15]. Osim NO, brojne su druge molekule koje sudjeluju u regulaciji vaskularnog tonusa. Jednu skupinu vazodilatatora čine prostaglandini. Prostaglandini (PGI) nastaju djelovanjem enzima ciklooksigenaze (COX) iz arahidonske kiseline. Jedan od PGI-a, tj. prostaglandin (PGI-2) nastaje u endotelu, djelujući preko adenil-ciklaze u glatkim mišićnim stanicama, aktivira ciklični adenozin monofosfat / protein-kinazu A (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) koja reducira vaskularni tonus posredovan kalcijem. Osim prostaglandina drugu skupinu vazodilatatora čine hiperpolarizacijski čimbenici endotela (engl. *endothelial-derived hyperpolarizing factors*, EDHF). EDHF uzrokuju vazodilataciju djelujući na kalijeve kanale i Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPazu. U EDHF ubraja se vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ugljikov(II) oksid (CO), sumporovodik (H<sub>2</sub>S), C-natriuretski peptid (CNP) 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. Ako 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 vodi u endotelnu disfunkciju i progresiju kardiovaskularnih bolesti [17].

## 1.2. Uloga oksidativnog stresa u nastanku ateroskleroze

Oksidativni stres jedan je od uzroka aterogeneze. Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između antioksidativne sposobnosti i povećane količine ROS-a ili reaktivnih dušikovih vrsta. Ta neravnoteža uzrokuje oštećenje stanica izravnom oksidacijom staničnih proteina, lipida ili deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), ili aktivacijom signalnih puteva stanične apoptoze [18]. Prvi koji se stvara među ROS-ima jest superoksidni anion, a odgovaran je za formiranje ostalih ROS-a koji igraju ulogu u endotelu – vodikov peroksid, hidroksilni radikal i peroksinitrit. Superoksidni anion stvara se pomoću mitohondrijskog transportnog lanca elektrona, ali i pomoću NADPH oksidaze (NOX) i ksantin oksidaze [19]. ROS ima važnu ulogu u normalnom funkcioniranju stanica, ali njegova prekomjerna količina rezultira pojavom oksidativnog stresa [20]. Kod šećerne bolesti pokazano je kako je povećana proizvodnja ROS-a 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. Sedam je različitih izoformi tog enzima, među kojima NOX1, NOX2 i NOX4 imaju bitnu ulogu u nastanku endotelne disfunkcije [21]. ROS koji nastaje ksantin oksidazom predstavlja važan izvor oksidativnog stresa kod ishemije. Povišene razine ROS-a mogu imati i pozitivne učinke, naprimjer, makrofagi proizvode povećane količine ROS-a pomoću NAD(P)H oksidaze, što pridonosi suzbijanju infekcija. Međutim, ako je povećano stvaranje ROS-a i/ili je smanjen antioksidativni kapacitet, dolazi do oksidativnog stresa [15]. ROS djeluje na lipidne membrane i uzrokuje stvaranje lipidnog peroksidnog radikala koji dalje uzrokuje lipidnu peroksidaciju membrana, smanjuje fluidnost te povećava permeabilnost membrana, čija je posljedica daljnje oštećenje stanice [18]. Osim toga ROS nastao iz NOX-a ili eNOS-a sudjeluje u oksidativnoj modifikaciji lipoproteina niske gustoće (engl. *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 jesu 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 vodikov peroksid i molekularni kisik. Enzim CAT potom nastali vodikov peroksid pretvara u vodu i molekularni kisik. GPx koji sadrži selenij, pa se naziva još i selenocistein peroksidaza, unutarstanični je enzim koji vodikov peroksid pretvara u vodu. Osim toga bitan je jer ima važnu ulogu u inhibiciji procesa peroksidacije lipida [23]. Neke studije pokazale su kako su promjene serumskih koncentracija SOD-a u korelaciji s promjenama u vaskularnoj strukturi i funkciji kod ispitanika sa šećernom bolešću i arterijskom hipertenzijom [24]. Druga studija pokazala je kako je aktivnost SOD-a i GPx-a bila niža u muškaraca s poznatom koronarnom aterosklerotskom bolešću nego u klinički zdravih muškaraca, a ista studija tvrdi kako je smanjenje aktivnosti SOD-a i GPx-a te ukupni antioksidativni kapacitet seruma u muškaraca s koronarnom bolešću 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, potiču 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 infekcije ili popravka mjesta ozljede. U upali dolazi do interakcije među staničnim površinama, izvanstaničnim matriksom i proupalnim medijatorima [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 endotelne stanice i sprječava njihov popravak. CRP nije prisutan u stijenci zdrave krvne žile, ali se nakuplja već u ranim fazama aterogeneze. Također, uz prisutnost CRP-a, makrofagi 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*, CAM) u endotelu koronarnih arterija [28]. Zbog navedenog serumski koncentracija CRP-a može biti prediktor kardiovaskularnih događaja, a u općoj populaciji serumski koncentracija CRP-a mogu biti prediktor rizika kardiovaskularne smrtnosti [29, 30]. Citokine proizvode stanice uključene u aterogenezu, na koje citokini također 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 taj proces. S obzirom na njihovu ulogu u aterosklerotskom procesu, možemo ih podijeliti na proupalne 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 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, 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 proupalnih 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, proupalni citokini IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  ključni su u upali povezanoj s 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 (engl. *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 bolešću 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 sistemska cirkulaciju u osoba s akutnim infarktom miokarda, što ukazuje na lokalnu proizvodnju tog 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>, 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 bolešću [36]. IL-17 također je jedan od proupalnih citokina koji uglavnom proizvode Th17 stanice. On ima važnu ulogu u patogenezi nekih upalnih bolesti kao što je psorijaza, a također 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 je 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, što donosi alternativni način za diferencijaciju Th17 stanica [38]. IL-17 inducira izražaj matriks metaloproteinaza (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 što je IL-10 smanjuju proizvodnju proupalnih citokina, npr. TNF- $\alpha$ , te djeluju na smanjenje ekspresije CAM-a na endotelnim stanicama [32]. Inhibicija proupalnih citokina i smanjenje upale mogli bi predstavljati novi način liječenja i nadopuna su dosadašnjem pristupu liječenja i prevencije ateroskleroze [40]. Poznato je da neki lijekovi koji se primjenjuju u liječenju koronarne bolesti imaju i protuupalna svojstva, primjerice statini i aspirin. Pokazalo se kako statini utječu na stvaranje citokina smanjujući stvaranje proupalnog IL-18 te potičući oslobađanje protuupalnog citokina IL-10 u bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću [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 (engl. *Intercellular cell adhesion molecule-1*, ICAM-1), E-selektin i MCP-1, što za posljedicu ima povećano prianjanje leukocita na endotel. Prianjanje leukocita i njihov prolazak kroz endotel izraženije je ako 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 na to da je uloga IL-17 dobro poznata u nastanku psorijaze, klinička ispitivanja pokazala su kako su protutijela koja djeluju na taj citokin (npr., bimekizumab, secukinumab i dr.) učinkoviti u njezinom liječenju. Osim toga lijekovi koji djeluju na IL-17 i IL-23 učinkoviti su 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 pokazala može li primjena protutijela koja 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 više godina, a nastaje zbog taloženja kolesterola i masnih čestica u stijenkama krvnih žila. To je kronična upalna bolest koju posreduju proupalni citokini, bioaktivni lipidi i adhezijske molekule [44]. U ranoj fazi ateroskleroze, uzroci njezinog nastanka jesu oštećenje endotela (endotelna disfunkcija), abnormalni metabolizam lipida i hemodinamsko oštećenje [45]. Početni događaj u aterogenezi jest prolazak LDL-a kroz endotel te njegovo naknadno taloženje, zadržavanje i oksidativna modifikacija u intimi arterije. Kada se endotelne stanice aktiviraju, one eksprimiraju MCP-1, interleukin 8 (IL-8), vaskularnu adhezijsku molekulu-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule*

I, 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 djeluje tako da potiče regrutaciju monocita; 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, 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. T-limfociti izlučuju upalne citokine i time pospješuju migraciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (engl. *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 matriks metaloproteinaza (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, primjerice, 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, njegovo odlaganje u stijenki krvne žile uzrokuje nastanak ateroskleroze, što je jače izraženo ako je njegova koncentracija u krvi povišena. Razlikuje se nekoliko oblika lipoproteinskih čestica, a lipoprotein niske gustoće (LDL-kolesterol) jest oblik koji potiče razvoj ateroskleroze. Za razliku od LDL-a, lipoprotein visoke gustoće (HDL-kolesterol) naziva se još i dobar kolesterol jer potiče obrnuti transport kolesterola. S obzirom na to da je cirkulirajući LDL prisutan u krvi svih ljudi, tijekom života kod većine će se razviti neki stupanj ateroskleroze, međutim ako su vrijednosti LDL-a u krvi visoke, taj će se proces 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 pak 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 aterosklerotske bolesti koronarnih arterija, ona je i dalje glavni uzrok smrti u svijetu [54].

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

Ishemijska bolest srca ili koronarna bolest jest 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 je bolest dinamičan proces; dugo 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 očitovati; bolesnici mogu imati bol u prsima koji se javlja u naporu (tada govorimo o angini pectoris), ali mogu biti i asimptomatski ili se očitovati kao novonastalo zatajenje srca. U tablici 1 navedene su sve kliničke prezentacije kroničnog koronarnog sindroma.

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

- 
1. Suspektna koronarna arterijska bolest i simptomi stabilne angine pektorisa

---

  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 suspektnim 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. Prilagodбом načina života, smanjenjem rizičnih čimbenika, medikamentoznom terapijom te revaskularizacijom može se usporiti napredovanje aterosklerotske bolesti i smanjiti rizik od akutnog aterotrombotskog događaja [58]. Prilagodba načina života obuhvaća zdravu prehranu, postizanje normalne tjelesne težine, prestanak pušenja, redovitu tjelesnu aktivnost i smanjenje konzumacije alkoholnih pića. Po preporukama ESC-a, 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 preporučuje se izbjegavati rafinirane ugljikohidrate, energetske bogatu hranu, gazirana i zaslađena pića, ograničiti unos alkohola na manje od 100 g/tjedno ili 15 g/dnevno. Što se tiče unosa masnoća, zasićene masti (engl. *saturated fatty acids*, SFA) trebale bi činiti < 10 % ukupnog energetskeg unosa, a potrebno ih je zamijeniti višestruko nezasićenim masnim kiselinama (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) [59].

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

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

nitrate i druge. Beta-blokatori i blokatori kalcijevih kanala prva su linija liječenja koja omogućava kontrolu bolova u prsima te kontrolu srčane frekvencije, čime se smanjuju energetske potrebe miokarda. U sekundarnoj prevenciji primjenjuju se lijekovi kao što su inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*, ACE-inhibitori), lijekovi koji djeluju na snižavanje lipida (statini, ezetimib i drugi). ACE-inhibitori i inhibitori receptora angiotenzina (ARB) lijekovi su 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 na to da hiperlipidemija, a osobito visoke koncentracije LDL-a, predstavlja 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 pleiotropne učinke koji uključuju smanjenje upale, smanjuju agregaciju trombocita te poboljšavaju vaskularni tonus [60]. Također se u terapiji 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 njihova životnog vijeka (8 – 9 dana) [61]. U slučaju značajnih suženja koronarnih arterija primjenjuje se revaskularizacija koronarnih arterija perkutanom koronarnom intervencijom (PCI) ili aortokoronarnim premoštenjem (engl. *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 na Zapadu. Stoga je potrebno istražiti dodatne načine koji bi, uz standardu terapiju, imali pozitivne učinke kod te bolesti.

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

Funkcionalna je hrana posebno formulirana hrana koja sadrži tvari ili žive mikroorganizme koji mogu unaprijediti zdravlje ili spriječiti bolest. Takva hrana trebala bi sadržavati dovoljnu količinu određenih tvari za postizanje željenog učinka bez neželjenih nuspojava. Funkcionalna hrana može uključivati vitamine, minerale, hranjive tvari, dijetalna vlakna ili probiotike [62, 63]. Funkcionalna je hrana prirodna ili prerađena hrana koja sadrži biološki aktivne sastojke, koja se redovno konzumira, a osim prehrambenog učinka postiže i spomenute pozitivne učinke

na zdravlje. Funkcionalne učinke potrebno je potvrditi randomiziranim, placebo-kontroliranim kliničkim istraživanjima [62]. Funkcionalna hrana, djelujući na ciljane funkcije u organizmu, djeluje na poboljšanje zdravstvenog stanja ili smanjenje rizika od nastanka bolesti. Filozofija hrane kao lijeka poznata je još od Hipokrata, kada je poznata izreka „Neka hrana bude tvoj lijek i lijek neka bude tvoja hrana“, međutim istraživanja u tom području počela su se intenzivnije provoditi tek u proteklih 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 (prerađeno meso, crveno meso, rafinirani ugljikohidrati, zašćerena 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 pridržavanje preporučenih načina prehrane povezano s nižim rizikom razvoja kardiovaskularnih i drugih kroničnih bolesti. Idealna prehrana za prevenciju kardiovaskularnih bolesti jest ona koja sadrži puno voća i povrća, cjelovitih žitarica, orašastih plodova, ribe, mesa peradi, dok se ne preporučuje 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 i 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 ubraja se 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 studija EPIC pokazala kako je konzumacija maslinovog ulja u Španjolskoj povezana s 26 % smanjenjem 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 višestruko nezasićene masne kiseline (n-3 PUFA)**

Masne kiseline, koje mogu biti zasićene, jednostruko nezasićene (engl. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) ili višestruko nezasićene (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) oksidiraju se u mitohondrijima i predstavljaju važan izvor energije. One su glavne komponente fosfolipida staničnih membrana. Zasićene masne kiseline one su koje nemaju dvostruke veze između atoma ugljika. Jednostruko nezasićene masne kiseline sadrže jednu dvostruku vezu, tijelo ih može samo proizvesti, ali i unijeti hranom. Višestruko nezasićene masne kiseline jesu 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 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 PUFA 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 sl. sadrži visok udio transmasnih kiselina, a njihova konzumacija povećava LDL-kolesterol i trigliceride u plazmi [71].

Linolna kiselina (engl. *Linoleic acid*, LA), jedna od n-6 PUFA, prekursor je za arahidonsku kiselinu (engl. *Arachidonic acid*, AA) iz koje nastaju vazokonstriktivni prostaglandini i leukotrijeni. Nasuprot tome  $\alpha$ -linolenska kiselina (engl.  *$\alpha$ -Linolenic acid*, ALA),

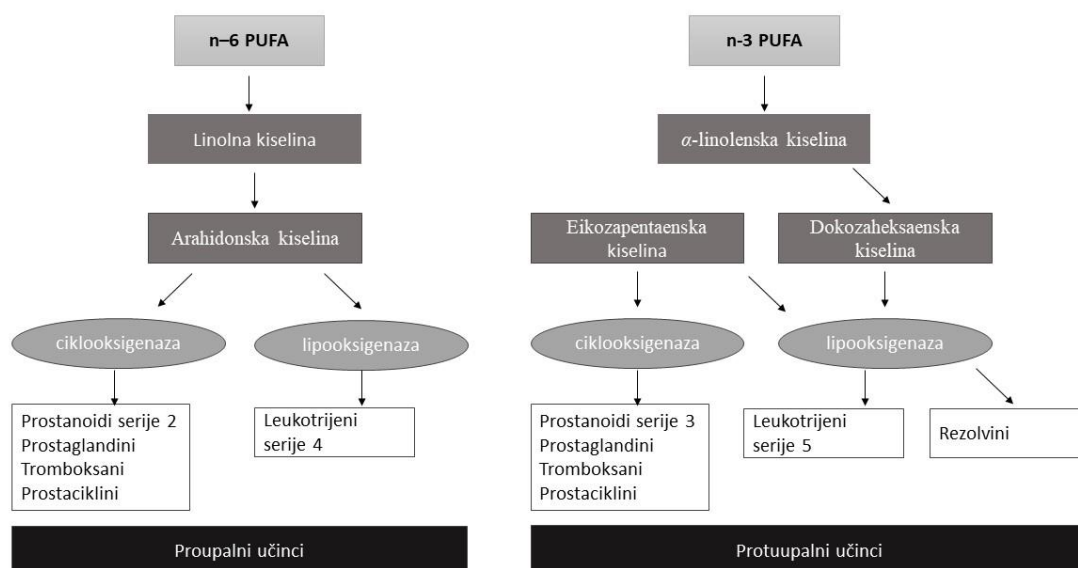


najjednostavnija n-3 PUFA koja se svrstava u esencijalne masne kiseline metabolizira se u eikozapentaensku kiselinu (engl. *Eicosapentaenoic acid*, EPA) i dokozaheksaensku kiselinu (engl. *Docosahexaenoic acid*, DHA). Glavni izvor EPA-e i DHA-e predstavlja riba, dok su glavni izvor ALA-e orašasti plodovi, soja i repičino ulje. N-6 PUFA, odnosno AA i LA nalaze se u suncokretu [72].

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

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

N-6 PUFA smatra se proupalnom, dok se n-3 PUFA smatra 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. Ako 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 (jednako djeluju ACE-inhibitori koji se ubrajaju među najpotentnije antihipertenzivne lijekove) te mogu djelovati i kao reduktaze 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzima A (HMG-CoA – enzim na koji 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 višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA). Linolna 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-linolenska kiselina je n-3 PUFA iz koje nastaju eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina. Iz EPA-e ciklooksigenazom nastaju prostanoidi serije 3, prostaglandini, tromboksani i prostaciklini koji ostvaruju protuupalne učinke. Osim toga pomoću enzima lipooksigenaze nastaju leukotrijeni serije 5 i rezolvini, također s protuupalnim učincima.

Izvor: izradila autorica

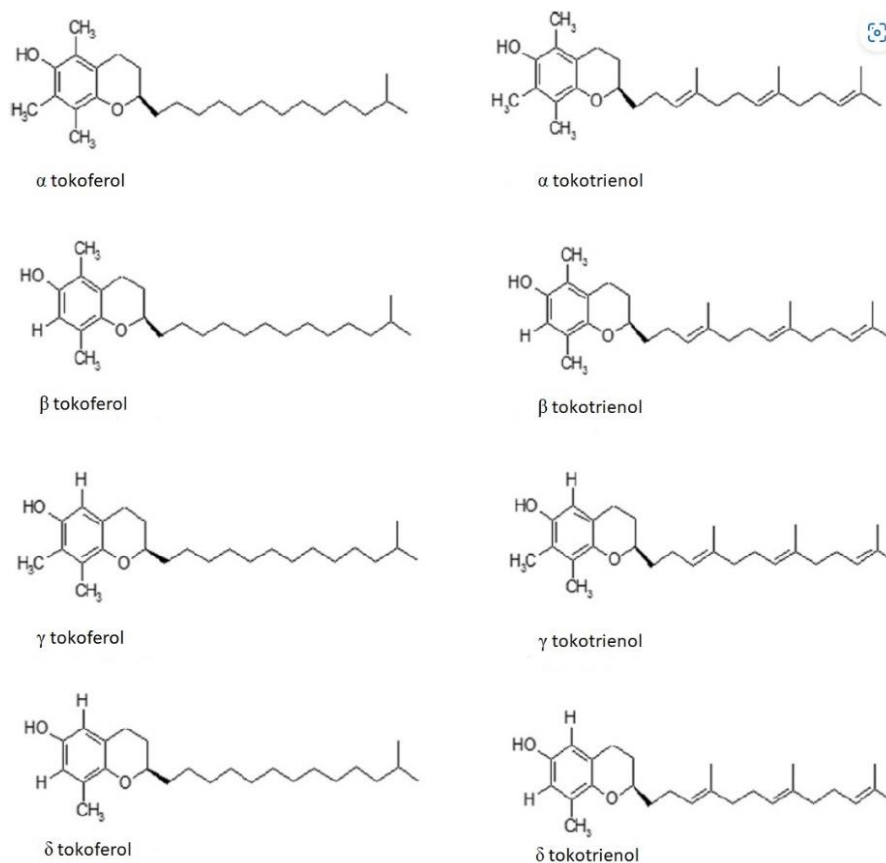
Jedna od najistraživanijih aktivnih supstanci životinjskog podrijetla upravo je n-3 PUFA, a najbolji su izvor riba kao što je losos, tuna i sardine. Brojne studije istraživale su učinke n-3 PUFA u kroničnim stanjima kao što su karcinomi, upalne bolesti crijeva, reumatske bolesti i druge, a najviše istraživanja 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 povezana je 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 nezasićenima, posebice PUFA, smanjuje rizik od ishemijske bolesti srca, a što je dokazala studija koju su proveli Li i suradnici na uzorku od 84 628 žena i 42 908 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 da djeluju na receptore aktivirane proliferatorom peroksisoma (engl. *peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR). N-3 PUFA preporučuju se u terapiji kod pacijenata kod kojih ciljne vrijednosti triglicerida u krvi nisu postignute uz statine ili fibrate. Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje da bi zasićene masne kiseline trebale biti zastupljene u prehrani s manje od 10 %. Istraživanja su pokazala kako zamjena zasićenih masnih kiselina u prehrani višestruko nezasićenima smanjuje kardiovaskularni rizik, odnosno da, ako 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-a i DHA-a od 140 do 600 mg/dan. To predstavlja najmanje 2 porcije ribe tjedno. Preporučeni omjer n-6/n-3 PUFA trebao bi u prosjeku biti oko 1 [72]. Unatoč svemu navedenom istraživanja su pokazala da Europljani unose značajno više zasićenih masnih kiselina od preporučenih 10 % te da je unos višestruko nezasićenih masnih kiselina u većini europskih zemalja ispod preporučenih vrijednosti [60, 80].

### 1.9. Vitamin E

Vitamin E jest vitamin topiv u mastima koji ima antioksidativno djelovanje. On obuhvaća osam različitih molekula, četiri tokoferola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol) i četiri tokotrienola ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$  tokotrienol), od kojih je  $\alpha$ -tokoferol najzastupljeniji oblik u ljudskoj prehrani. Svi navedeni jaki su antioksidansi koji štite višestruko nezasićene masne kiseline u membrani od oksidacije, reguliraju proizvodnju slobodnih kisikovih i dušikovih vrsta te moduliraju signalne puteve [81, 82]. Glavni izvor vitamina E jesu 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 variraju ovisno o vrsti ulja. Vitamin E u organizmu pohranjuje se u masnom tkivu gdje se nalazi oko 90 % ukupne količine, pa se rijetko sreće deficit tog vitamina. Međutim koncentracije  $\alpha$ -tokoferola u plazmi ispod 9 mmol/L za muškarce ili ispod 12 mmol/L za žene smatraju se ispod preporučenih vrijednosti. Ne postoji strogo definirana vrijednost preporučenog dnevnog unosa vitamina E, ali u većini zemalja preporučuje se 12 mg/dan za žene i 13 – 15 mg/dan za muškarce. Osim toga unos vitamina E trebao bi biti u korelaciji s unosom PUFA-e jer on djeluje na stabilizaciju stanične membrane i štiti n-3 PUFA od oksidacije [83, 84].



Slika 2. Prikaz osam različitih molekula vitamina E  
Izvor: izradila autorica

Tijekom peroksidacije lipida vitamin E veže peroksilni radikal prije nego on reagira s PUFA-ma, te se pritom 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 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 da vitamin E ima protektivno djelovanje protiv Parkinsonove bolesti i da 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 pokazale su 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. Selenij je također dio antioksidativnog sustava, povećava antioksidativni kapacitet i utječe na signalne puteve nuklearnog čimbenika kapa B (NF- $\kappa$ B) i tako 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 iznosi 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, 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 biorasploživost od anorganskog selenija, a selenij u biljnoj hrani ima bolju biorasploživost od onog u životinjskoj hrani [93]. Svoje biološke učinke uglavnom ostvaruje ugradnjom u selenoproteine. Utvrđeno 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 da su niže vrijednosti selenija u serumu povezane s većom smrtnosti kod pacijenata s akutnim koronarnim sindromom [99]. Studije su također pokazale da 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 skupini zdravih starih ispitanika, kao i u podskupinama ispitanika sa šećernom bolešću, arterijskom hipertenzijom i ishemijskom bolešću srca nakon 12 godina praćenja [101]. Studije na animalnim modelima pokazale su da suplementacija selenija može spriječiti nastanak aterosklerotskih lezija. Ranija istraživanja pokazala su da suplementacija selenija, samog ili uz dodatak vitamina E, kod kunića 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 toga značajno je smanjena osjetljivost srca štakora na ishemiju [105].

### 1.11. Lutein

Lutein je jedan od preko 600 karotenoida koji postoje u prirodi. Karotenoidi su prirodni antioksidansi, a većinu sintetiziraju bakterije, gljive i biljke. Za karotenoide je uobičajen sustav konjugiranih dvostrukih veza koji može apsorbirati svjetlost u rasponu 400 do 550 nm, ali je također odgovoran i za nestabilnost tih spojeva. Lutein je jedan od najistraživanijih karotenoida u prehrani, a sintetiziraju ga samo biljke. Glavni izvor luteina jest zeleno lisnato povrće poput špinata, salate i brokule, ali je prisutan i u ribi, mesu i jajima, osobito žumanjku [106]. Lutein je dio makularnog pigmenta koji štiti makulu od fotooksidativnog oštećenja. On također 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 NF- $\kappa$ B 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 stvaranje 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 bila značajno niža 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-e i DHA-e. Proizvodnja takvih 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 jest 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 tom Znanstvenom centru formirana je Znanstvena jedinica za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane, a čini je tim istraživača s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti, Odjela za kemiju Osijek i Medicinskog fakulteta Osijek. Jedinica je započela s radom 2016. godine. Prvi oblik funkcionalne hrane koji je istraživao pri ZCI-u bila su jaja obogaćena n-3 PUFA. Dosadašnja istraživanja te skupine pokazala su da 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 skupini ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja u odnosu na skupinu koja je konzumirala obična jaja [116]. U

skupini ispitanika s koronarnom bolešću (i akutni i kronični koronarni sindrom) zabilježeno je povećanje n-3 PUFA (EPA) u serumu nakon konzumacije 3 kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA tijekom 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 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 obogaćenim jajima obogaćenima n-3 PUFA, skupina istraživača s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti prilagodila je prehranu kokoši nesilica kako bi se dobila jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom te su provedene dodatne studije. U studiji provedenoj na 30 zdravih ispitanika dobi 18 do 30 godina pokazano je kako je konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom dovela do značajnog porasta EPA-e u usporedbi s bazalnim vrijednostima [118]. Osim toga u istoj skupini 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 objašnjeno 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, 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 da konzumacija kokošnjih jaja nema štetan učinak na zdravlje niti na vrijednosti lipida u krvi.

### 3. HIPOTEZA

Hipoteza ovog istraživanja jest da će konzumacija kokošjih jaja obogaćenih četirima funkcionalnim elementima (n-3 PUFA, vitamin E, selenij, lutein) kod kroničnog koronarnog sindroma:

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

## 4. MATERIJALI I METODE

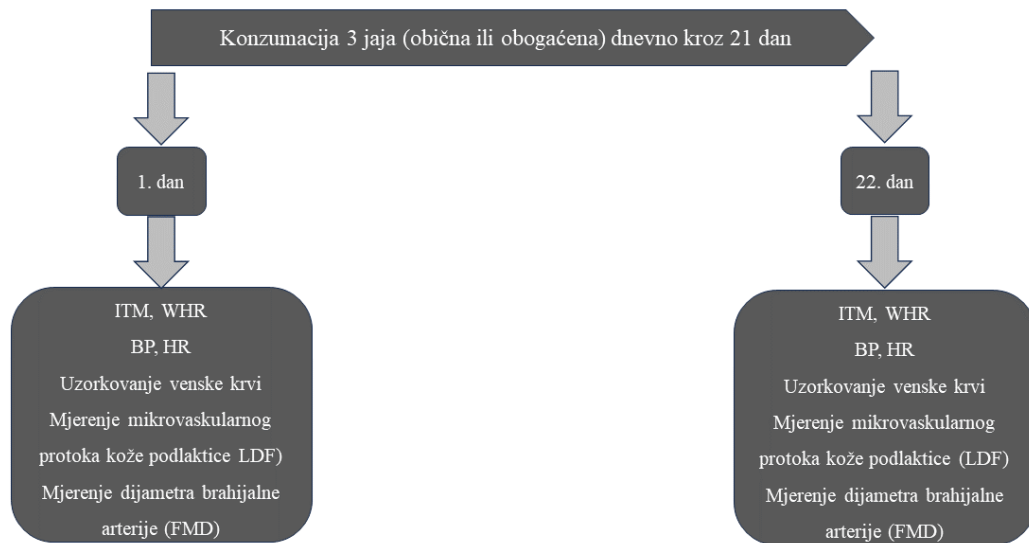
### 4.1. Ispitanici

U ovoj randomiziranoj, dvostruko slijepoj, placebo-kontroliranoj intervencijskoj studiji sudjelovalo je ukupno trideset ispitanika obaju spolova (devet žena i dvadeset jedan 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 s ST-elevacijom, akutni infarkt miokarda bez ST-elevacije ili nestabilnu anginu pektorisa) ili su imali anginu pektorisa, 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 sistemne bolesti, nedavni operativni zahvat (u protekla 3 mjeseca), nedavna teža traumatska ozljeda (u proteklih 6 mjeseci), cerebrovaskularni inzult u proteklih 6 tjedana, neurodegenerativne bolesti, epilepsija, značajna anemija (vrijednosti hemoglobina  $< 110$  g/L kod muškaraca i  $< 100$  g/L kod žena), stanje nakon reanimacije (u protekla 3 mjeseca), terapija koja značajno utječe na vaskularnu ili imunološku funkciju (npr. imunosupresivni lijekovi, sistemski kortikosteroidi), neregulirane bolesti štitnjače, konzumacija alkohola ili droga.

Tijekom trajanja studije ispitanici su redovito uzimali medikamentoznu terapiju koju im je propisao nadležni obiteljski liječnik i/ili specijalist, a koju i inače koriste, uključujući statine i ostalu terapiju prema smjernicama Europskog kardiološkog društva za liječenje kroničnog koronarnog sindroma (ACE-inhibitore, beta blokatore, antitrombocitnu terapiju). Neki ispitanici koristili su i ezetimib. Tijekom 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 funkcionalne hrane obogaćenu n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem niti luteinom.

Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a 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. Tijek studije s provedenim mjerenjima u svakom studijskom posjetu. (ITM – indeks tjelesne mase; WHR (engl. *waist-to-hip ratio*) – omjer struk bokovi; BP (engl. *blood pressure*) – krvni tlak; HR (engl. *heart rate*) – srčana frekvencija)

#### 4.2. Protokol istraživanja

Glavni istraživač regrutirao je ispitanike koji su dobrovoljno pristali sudjelovati u studiji. Prije uključenja 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

skupina) 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 konzumirali su tri tvrdo kuhana jaja na dan (ukupno 63 jaja), otprilike u isto doba dana (doručak). U svakoj od skupina bilo je ukupno 15 ispitanika. Eksperimentalna skupina konzumirala je 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 skupina konzumirala normalna kokošja jaja (n-3 PUFA 146 mg, vitamin E 0,595 mg, selenij 0,0183 mg, lutein 0,11 mg/ 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 učinjena su prvog dana protokola te nakon završetka 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 dijetnog protokola ispitanici su vodili dnevnik prehrane, a kako bi se osigurala što bolja suradnja pri konzumaciji jaja, ispitivač ih je kontaktirao telefonski nekoliko puta.

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

Jaja su proizvedena na peradarskoj farmi Marijančanka d. o. o. Marijanci prema protokolima istraživačke skupine Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek [114]. Ukupno 100 kokoši podijeljeno je u dvije skupine. Jedna skupina (kontrolna) hranjena je standardnom 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 skupina kokoši hranjena je 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 razdoblja koje je trajalo 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)              |                |             |
| $\Sigma$ SFA                     | 1566 ± 346     | 1442 ± 185  |
| $\Sigma$ MUFA                    | 1976 ± 189     | 2419 ± 139  |
| $\Sigma$ n-6 PUFA                | 1263 ± 148     | 747 ± 46    |
| LA                               | 1165 ± 140     | 702 ± 43    |
| AA                               | 89 ± 9         | 44 ± 4      |
| $\Sigma$ n-3 PUFA                | 146 ± 20       | 342 ± 25    |
| ALA                              | 71 ± 11        | 189 ± 16    |
| EPA                              | n.d.           | 19 ± 2      |
| DHA                              | 75 ± 11        | 135 ± 11    |
| $\Sigma$ n-6 / $\Sigma$ n-3 PUFA | 8,71           | 2,18        |

Podatci su iskazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

$\Sigma$ SFA – (engl. *saturated fatty acids*) – zasićene masne kiseline (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C23:0);  $\Sigma$ MUFA – (engl. *monounsaturated fatty acids*) – jednostruko zasićene masne kiseline (C14:1, C16:1, C18:1n9t, C18:1n9c, C20:1n9, C22:1n9);  $\Sigma$ n-6 PUFA (engl. *polyunsaturated fatty acids*) – višestruko nezasićene masne kiseline (C18:2n6c, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6, C22:2n6); LA – linolna kiselina (C18:2n6c); AA – arahidonska kiselina (C20:4n6);  $\Sigma$ n-3 PUFA – (C18:3n3, C20:3n3, C20:5n3, C22:6n3); ALA –  $\alpha$ -linolenska kiselina (C18:3n3); EPA – eikozapentaenska kiselina (C20:5n3); DHA – dokozahexaenska kiselina (C22:6n3).

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

#### 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 slobodnih masnih kiselina u serumu određen 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 utvrđivanje 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 metilnih estera masnih kiselina (FAME MIX) kao 30 mg/ml ukupne koncentracije masnih kiselina u diklormetanu od Supelca (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA). Na 20 µl uzorka seruma u Eppendorf epruveti, dodano je dodatnih 200 µl fiziološke otopine, 1 mL metanola i 2 mL kloroforma i miješano je 10 minuta na rotacijskoj miješalici. Potom je dodano 500 µl 1M NaCl i ponovno je miješano još 2 minute. Potom je uzorak centrifugiran na 3000 rpm tijekom 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 % metanolne otopine borova(III) fluorida u ispareni uzorak započeta je metilacija masnih kiselina. Uzorak je zatim stavljen na termoblok na 75 °C tijekom 45 minuta. Nakon hlađenja dodano je 1 ml visoko pročišćene vode i 1 ml heksana i miješano je tijekom 2 minute. Nakon odvajanja slojeva, 600 µl gornjeg heksanskog sloja upareno je 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 (500 µL) je dodan apsolutni alkohol (500 µL) kako bi se postigla denaturacija proteina. Potom je uzorku dodan ksilen (500

$\mu\text{L}$ ) i uzorak je centrifugiran na 3000 okretaja tijekom 10 minuta. Odvojen je supernatant (333  $\mu\text{L}$ ) i dodan je 2,2'-dipiridin (333  $\mu\text{L}$ ), a kako bi se dobila crvena boja uzorku je dodan željezov(II) klorid (100  $\mu\text{L}$ ). Nakon 2 minute inkubacije, uzeto je 200  $\mu\text{L}$  uzorka te je izmjerena apsorpcija koja je mjerena spektrometrom (PR 3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California) na 492 nm, a dobivena apsorbanija 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 (*engl. inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Svi uzorci analizirani su u tri primjerka koristeći uređaj ICP-MS, Agilent 7500a, Agilent Technologies Inc., California, USA. Uzorci seruma (50  $\mu\text{L}$ ) miješani su s ultračistom dušičnom kiselinom i vodikovim peroksidom (omjer 5 : 1) 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  $\mu\text{L}$  otopine etanola s 0,01 % askorbinske kiseline (Grammol, GRAM-MOL doo, Zagreb, Hrvatska) dodan je u uzorke seruma (200 $\mu\text{L}$ ). Smjesa je potom dobro promiješana. Potom je u smjesu dodano 2 mL heksana (Carlo Erba, CARLO ERBA Reagents GmbH, Milano, Italija) te je sve zajedno pomiješano i centrifugirano na 2500 rpm tijekom 20 min. Nakon centrifugiranja sloj heksana sakupljen je i uparen do suhog pod dušikom. Ostatak je otopljen u 100  $\mu\text{L}$  metilen klorida/metanola (45 : 55) i filtriran kroz membranski filter od 0,2  $\mu\text{m}$ . Dvadeset  $\mu\text{L}$  korišteno je za određivanje koncentracije luteina koristeći tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC). Korištena je *end-caped* HPLC kolona visoke rezolucije (Hypersil; veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6  $\times$  250 mm) i C18 analitička kolona (Shim-pack GIST; veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ; 250  $\times$  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 dijetnog protokola i dan nakon završetka dijetnog protokola, a koji su potom analizirani. Dio uzoraka seruma odvojen je i pohranjen u hladnjaku na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  za daljnje analize, a dio je odmah dostavljen u Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, Osijek, Hrvatska gdje su obavljene daljnje analize.

Vrijednosti kolesterola u serumu određene su enzimatskim testom. U prvoj reakciji najprije se hidroliziraju esteri kolesterola uz enzim kolesterol esterazu. Potom se dobiveni slobodni kolesterol i slobodni kolesterol iz krvi oksidira uz kolesterol oksidazu, pri čemu nastaju kolesten-2-on i vodikov peroksid. U trećoj reakciji dobiveni vodikov peroksid reducira se pomoću peroksidaze uz 4-aminoantipirin i fenol, te pritom nastaje crveno obojeni kinonimin. Mjeri se apsorpcija nastalog kinonimina bikromatski na 540/600 nm. LDL je određen enzimatskim testom pomoću enzima kolesterol esteraze, kolesterol oksidaze i katalaze, a apsorpcija je mjerena bikromatski na 540/600 nm. Trigliceridi se također određuju enzimatskim testom; lipazom se hidroliziraju u masne kiseline i glicerol koji se postupno razgrađuje do vodikovog peroksida. Vodikov peroksid reagira s 4-aminofenazonom i N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilinanilin dinatrijevom soli te nastaje plavo obojeni kromofora čija apsorpcija je mjerena bikromatski na 660/800 nm. HDL-vrijednosti određene su prema kalibracijskom pravcu.

Krvna slika određena je putem hematološkoga brojača Sysmex XN-1000 koji izravno 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 neizravnom 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) određene su imunoturbidimetrijskim testom. Aspartat transaminaza (AST) i alanin transaminaza (ALT)

određene su fotometrijom – IFCC-metodom (engl. *International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory medicine*), kao i GGT. Svi parametri određeni su na uređaju Olympus AU680, Beckman Coulter.

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

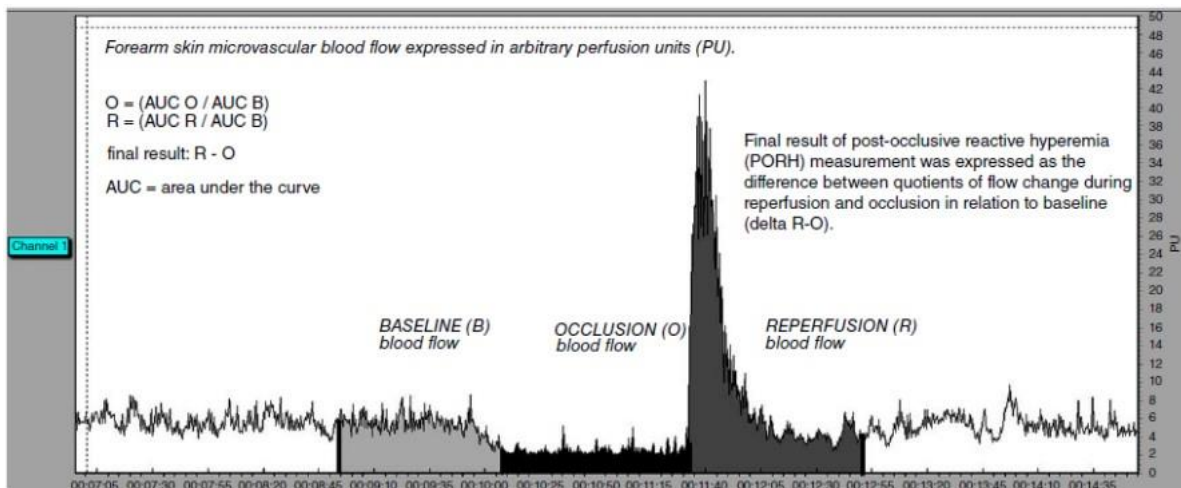
Mjerenje protoka u mikrocirkulaciji kože u odgovoru na vaskularnu okluziju (postokluzivna reaktivna hiperemija, PORH) i odgovoru na iontoforezu acetilkolina (ACh), koje se smatraju vazodilatacijom ovisnom o endotelu, te protok u odgovoru na iontoforezu natrijevog nitroprusida (SNP), koji se smatra vazodilatacijom neovisnom o endotelu, mjerene su laser-doplerskom floumetrijom (engl. *Laser Doppler flowmetry*, LDF) (MoorVMS-LDF, Axminster, UK) na koži podlaktice. Navedene metode koriste se u procjeni mikrovaskularne funkcije. Ta ispitivanja učinjena su prilikom obaju studijskih posjeta u prostoriji u kojoj je temperatura zraka bila  $23,5 \pm 0,5$  °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 postavljena je na volarnu stranu podlaktice, 13 – 15 cm od ručnog zgloba, na isto mjesto prilikom obaju 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 mjerene su prije (B), tijekom (O) i nakon otpuštanja okluzije. Protok krvi mikrocirkulacije izražen je u proizvoljnim perfuzijskim jedinicama (engl. *perfusion units*, PU), što je određeno softverom (MoorVMS-PC v4.0, Axminster, UK) 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-om i SNP-om neinvazivna je 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 %) primijenjen je pomoću iontoforeze (Iontophoresis Controller MoorVMS-ION) u sedam aplikacijskih intervala od 0,1 mA tijekom 30 sekundi s 30 sekundi stanke 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 s 90 sekundi 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. Rezultat je izražen 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-a 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. Određivanje postokluzivne reaktivne hiperemije (PORH) u mikrocirkulaciji kože mjerenjem laser-doplerskom floumetrijom (LDF). Protok u mikrocirkulaciji određen je kao površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC) tijekom bazalnoga protoka, okluzije i reperfuzije. Vrijednosti protoka tijekom okluzije i reperfuzije izražene su u obliku postotka u odnosu na bazalni protok, a rezultat je izražen 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 (eng. *perfusion units*, PU). (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 (engl. *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 učinjeno u ležećem položaju ispitanika. Navedena metoda korištena je za procjenu makrovaskularne funkcije.

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 tako da je manžeta napuhana najmanje 50 mmHg iznad izmjerene vrijednosti sistoličkog tlaka u trajanju 5 minuta. Nakon naglog ispuhivanja manžete, ponovno je izmjeren promjer brahijalne arterije. Deset 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 vazodilatacija neovisna o endotelu te su promjer brahijalne arterije i brzina protoka ponovno mjereni 5 minuta nakon primjene NTG-a. Zabilježene ultrazvučne snimke analizirane su softverom Brachial Analyzer for Research v.6 (Medical Imaging Applications, SAD). Protokom posredovana, kao i dilatacija brahijalne arterije uzrokovana NTG-om 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-a, iNOS-a, nNOS-a**

Koncentracije eNOS-a, iNOS-a i nNOS-a izmjerene su iz uzoraka seruma enzimatskim imunosorbentnim testom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) korištenjem komercijalno dostupnih kitova (–nN–S - CSB-E13872h, CUSABIO, Wuhan, Hubel Province, China), –eN–S - CSB-E08322h, CUSABIO, Wuhan, Hubel Province, China i –iN–S - CSB-E08148h, CUSABIO, Wuhan, Hubel Province, China), a analize su učinjene prema uputama proizvođača. Mjerenje intenziteta obojenja, odnosno apsorpcije mjereno je spektrometrom (PR

3100 TSC Microplate Reader, BioRad Laboratories, Hercules, California) uz korištenje standardne krivulje. Konačan 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 proupalnih i protuupalnih 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 reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substance assay*, TBARS), a u svrhu određivanja antioksidativnog odgovora mjerena je sposobnost reduciranja željeza u plazmi (engl. *ferric ion reducing antioxidant power*, FRAP). U ovom istraživanju učinjena su mjerenja serumske aktivnosti antioksidativnih enzima CAT, GPx i SOD.

#### **4.11.1. TBARS**

Metodom TBARS određuju se koncentracije produkata lipidne peroksidacije, prvenstveno malondialdehida (MDA) u uzorku. U 400  $\mu$ L uzorka dodano je 800  $\mu$ L trikloroetene kiseline i centrifugirano je 15 minuta na 5000 okretaja u minuti pri 4 °C. Potom je otpipetirano 750  $\mu$ L supernatanta i dodano je još 750  $\mu$ L tiobarbituratne kiseline. Smjesa je potom kuhana 10 minuta na 100 °C u vodenoj kupelji te je potom ohlađena na ledu. Reakcijom lipidnih produkata s tiobarbiturnom kiselinom nastaje ružičasta otopina čija se apsorpcija mjeri nanofotometrom P300 UV/VIS, IMPLEN na 572 i 532 nm, a izražava se kao mikromolarni MDA ekvivalenti ( $\mu$ M MDA) [128].

**4.11.2. FRAP**

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 potreban je reagens koji sadrži 25 ml natrij-acetatnog pufera (pH otopine = 3,6), 2,5 ml TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil-s-triazin; priprema se svježe na način da se 0,1561g TPTZ se otopi u 5 ml 40 mM klorovodične kiseline) i 2,5 ml 20 mM otopine željezova(III) klorida. Potom je otpipetirano 1,125 ml tako pripremljenog reagensa u 8 kiveta. U svaku je dodano 37,5  $\mu\text{L}$  uzorka s razmakom od 30 sekundi. Smjesa je zatim inkubirana 4 min te nastaje plavo obojeni željezo-tripiridiltriazinski kompleks, nakon čega je mjerena apsorpcija 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). Apsorpcija 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.

**4.11.3. Određivanje serumske aktivnosti antioksidativnih enzima**

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. Korištena je 0,036% otopina vodikovog peroksida (1450  $\mu\text{L}$ ) kao supstrata u reakcijskoj smjesi s 50  $\mu\text{L}$  uzorka. Uzorak je pripremljen kao smjesa seruma i natrij-fosfatnog pufera u omjeru 1 : 2 [130]. Apsorpcija je mjerena svakih 10 sekundi tijekom 2 minute na 240 nm. Jedna jedinica bila je definirana kao količina razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\mu\text{mol}$ ) po minuti po miligramu proteina. Aktivnost CAT izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina (U/ mg proteina).

Aktivnost glutacion peroksidaze (GPx) mjerena je neizravno mjerenjem brzine oksidacije nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) u  $\text{NADP}^+$  koju prati smanjenje apsorpcije (metoda po Wendelu). Pripremljen je reakcijski koktel koji se sastoji od NADPH (40  $\mu\text{L}$ ), otopine natrijeva azida (35,8 ml), otopine glutacion-reduktaze (400  $\mu\text{L}$ ) i otopine glutacion reduktaze (200  $\mu\text{L}$ ). 1500  $\mu\text{L}$  reakcijskog koktela pomiješano je s 25  $\mu\text{L}$  uzorka, ostavljeno na 2-3 minute i potom je dodano 25  $\mu\text{L}$  vodikovog peroksida. Mjerena je apsorpcija svakih 30 sekundi tijekom 3 minute na 340 nm. Jedna jedinica GPx-a katalizirala je oksidaciju 1  $\mu\text{mol}$ -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-a izmjerena je kao stupanj inhibicije redukcije citokroma C u sustavu ksantin-ksantin-oksida. Aktivnost je određena prema modifikaciji metode koju je opisao Flohé [131]. Ksantin uz ksantin oksidazu daje superoksidni radikal koji reducira citokrom C. Nasuprot tome SOD inhibira tu reakciju, a jedna jedinica SOD-a inhibirala je stopu redukcije citokroma C za 50 % u povezanom sustavu. Kako bi se odredila aktivnost SOD-a, 42,5 ml otopine citokroma C miješano je s 4,25 ml otopine ksantina, čime je dobiven reakcijski koktel. Reakcijskom koktelu dodano je 25  $\mu$ l uzorka, a nakon 3 minute dodano je i 25  $\mu$ l otopine ksantin oksidaze. Stopa redukcije pratila se pri 550nm. Aktivnost SOD-a 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 provedena pomoću Lambda 25 UV-Visspektrofotometra s UV WinLab 6.0 softverskim paketom (PerkinElmer for the Better, Waltham, MA, USA) 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 (engl. *advanced oxidation protein products*, 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 AOPP (MyBioSource, MyBioSource Inc., San Diego, CA, SAD) izmjereni su komercijalno dostupnim setovima za imunoenzimski test (ELISA) na kompaktnom čitaču apsorbancije za 96 jažica mikropločice (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-Smirnovljevi test normalnosti. Za procjenu razlika unutar skupina (mjerenja provedena prije i nakon odgovarajućeg protokola

#### 4. MATERIJALI I METODE

prehrane) korišten je upareni t-test. Razlike između skupina 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 značajke ispitanika, antropometrijska mjerenja i mjerenja krvnog tlaka

Opće značajke bolesnika koji su 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 skupini bila je 59 godina. Sudionici koji su bili uključeni u studiju u objema skupinama bili su pretili (određeno kao indeks tjelesne mase (ITM) iznad  $30 \text{ kg/m}^2$  i omjer struk-bokovi (engl. *Waist-to-hip ratio*,  $\text{WHR} > 0,90$ ). 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-u, WHR-u i vrijednostima arterijskog tlaka te da nije bilo značajnih odstupanja u navedenim varijablama kao ni drugim biokemijskim pokazateljima (Tablice 4 i 8) prilikom ulaska u studiju između kontrolne i Nutri4 skupine.

Nakon konzumacije jaja niti u Nutri4 skupini niti u kontrolnoj skupini nije bilo statistički značajne razlike u ITM-u, WHR-u, vrijednostima sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka kao niti srednjeg arterijskog tlaka i frekvencije pulsa u usporedbi s inicijalnim mjerenjima. Također nije bilo razlike između skupina u navedenim mjerenjima nakon konzumacije jaja normaliziranih 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) |             |       | †p    |
|--------------------------|-------------------|-------------|-------|-----------------|-------------|-------|-------|
|                          | Prije             | Poslije     | p     | Prije           | Poslije     | p     |       |
| 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  | 0,438 | 32,1 ± 6,5      | 32,1 ± 6,6  | 0,313 | 0,661 |
| WHR                      | 0,93 ± 0,08       | 0,93 ± 0,08 | 0,750 | 0,93 ± 0,07     | 0,94 ± 0,07 | 0,250 | 0,972 |
| SBP (mmHg)               | 125 ± 21          | 123 ± 16    | 0,612 | 122 ± 17        | 123 ± 15    | 0,753 | 0,978 |
| DBP (mmHg)               | 82 ± 17           | 77 ± 10     | 0,326 | 78 ± 12         | 78 ± 10     | 0,955 | 0,936 |
| MAP (mmHg)               | 94 ± 14           | 92 ± 11     | 0,319 | 93 ± 13         | 93 ± 11     | 0,863 | 0,971 |
| HR (otkucaja u minuti)   | 68 ± 11           | 66 ± 10     | 0,227 | 65 ± 8          | 64 ± 9      | 0,577 | 0,782 |

Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

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

\* p < 0,05 prije vs. poslije unutar skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

† p < 0,05 razlika između skupina

## 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 dviju zasićenih masnih kiselina (miristinske i stearinske kiseline) u usporedbi s početnim mjerenjem (miristinska kiselina: kontrolna skupina 85,6 ± 5,5 prije vs. 98,5 ± 49,7 nakon konzumacije, p = 0,382, Nutri4 skupina 86,0 ± 27,6 prije vs. 69,1 ± 17,5 nakon konzumacije p = 0,038; stearinska kiselina: Kontrolna skupina 886 ± 192 prije vs. 815 ± 68, p = 0,514, Nutri4 skupina 887 ± 83 prije vs. 826 ± 77, p = 0,044). Štoviše nakon konzumacije jaja koncentracije miristinske kiseline bila je statistički značajno niža u Nutri4 u usporedbi s kontrolnom skupinom neovisno (normalizirano) o početnim vrijednostima (p = 0,033).

Što se tiče višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), serumska koncentracija palmitoleinske kiseline (n-7 PUFA) bila je statistički značajno niža nakon dijetnog protokola u Nutri4 nego u kontrolnoj skupini, neovisno o vrijednosti početnih mjerenja (Kontrola:  $311 \pm 113$  prije vs.  $257 \pm 135$ ,  $p = 0,644$ , Nutri4:  $218 \pm 121$  prije vs.  $196 \pm 105$ ,  $p = 0,121$ ,  $p$  između skupina =  $0,049$ ). Serumska koncentracija triju n-6 PUFA (gama-linolenska kiselina, eikozadienska kiselina, dihomo- $\gamma$ -linolenska 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 skupina nakon konzumacije jaja (analiza prilagođena početnim vrijednostima) ( $\gamma$ -linolenska kiselina: Kontrola  $53,8 \pm 10,8$  prije vs.  $59,6 \pm 15,4$ ,  $p = 0,338$ , Nutri4  $60,8 \pm 12,8$  prije vs.  $46,2 \pm 11,9$  nakon konzumacije,  $p = 0,011$ ; eikozadienska kiselina: Kontrola  $16,9 \pm 0,5$  prije vs.  $15,8 \pm 3,5$  nakon konzumacije,  $p = 0,390$ , Nutri4 skupina  $17,7 \pm 3,2$  prije vs.  $16,2 \pm 4,3$  nakon konzumacije,  $p = 0,039$ ; dihomo- $\gamma$ -linolenska kiselina: Kontrola  $89,6 \pm 21,8$  prije vs.  $99,9 \pm 22,4$  nakon konzumacije,  $p = 0,532$ , Nutri4 skupina  $187,2 \pm 74,8$  prije vs.  $140,8 \pm 71,5$  nakon konzumacije,  $p = 0,040$ ).

Nakon konzumacije Nutri4 jaja došlo je do povećanja serumske koncentracije svih triju mjerenih n-3 PUFA ( $\alpha$ -linolenska kiselina, eikozapentaenska kiselina, dokozaheksaenska kiselina), iako je samo porast eikozapentaenske 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 eikozapentaenske kiseline bila je statistički značajno viša nakon konzumacije jaja u Nutri4 skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom (analiza prilagođena početnim vrijednostima) (Kontrola  $20,7 \pm 9,0$  prije vs.  $25,0 \pm 13,0$  nakon konzumacije,  $p = 0,053$ ; Nutri4  $29,0 \pm 16,2$  prije vs.  $37,3 \pm 13,7$  nakon konzumacije,  $p = 0,030$ ).

Navedene promjene serumske koncentracije n-6 PUFA i n-3 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 skupina nakon konzumacije jaja (analiza prilagođena početnim vrijednostima) (Kontrola  $26,3 \pm 19,9$  prije vs.  $23,3 \pm 19,4$  nakon konzumacije,  $p = 0,367$ ; Nutri4  $26,7 \pm 24,8$  prije vs.  $17,5 \pm 17,1$  nakon konzumacije,  $p = 0,041$ ).

**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      | p     | Prije           | Poslije        | p     | †p    |
| SFA (μmol/L)   |                                                                    |                   |              |       |                 |                |       |       |
|                | C8:0 Kaprilna k.                                                   | N/F               | N/F          | NA    | 33,6            | 61,2           | NA    | NA    |
|                | C10:0 Kaprinska k.                                                 | < LOQ             | < LOQ        | NA    | 67,8 ± 34,2     | 70,8           | NA    | NA    |
|                | C12:0 Laurinska k.                                                 | 29,9 ± 10,5       | 92,8         | NA    | 27,7 ± 1,7      | 27,70          | NA    | NA    |
|                | C14:0 Miristinska k.                                               | 85,6 ± 5,5        | 98,5 ± 49,7  | 0,382 | 86,0 ± 27,6     | 69,1 ± 17,5 *† | 0,038 | 0,033 |
|                | C15:0 Pentadecilna k.                                              | 15,0 ± 3,2        | 15,9 ± 3,2   | 0,397 | 16,4 ± 4,7      | 15,0 ± 2,8     | 0,155 | 0,325 |
|                | C16:0 Palmitinska k.                                               | 1936 ± 324        | 1958 ± 372   | 0,945 | 2263 ± 446      | 2112 ± 443     | 0,183 | 0,071 |
|                | C17:0 Margarinska k.                                               | 21,0 ± 5,6        | 22,0 ± 3,0   | 0,701 | 22,2 ± 4,3      | 20,9 ± 3,9     | 0,214 | 0,052 |
|                | C18:0 Stearinska k.                                                | 886 ± 192         | 815 ± 68     | 0,514 | 887 ± 83        | 826 ± 77*      | 0,044 | 0,176 |
| PUFA (μmol/L)  |                                                                    |                   |              |       |                 |                |       |       |
| n-7            | C16:1[cis-9] Palmitoleinska k.                                     | 311 ± 113         | 257 ± 135    | 0,644 | 218 ± 121       | 196 ± 105†     | 0,121 | 0,049 |
|                | C17:1[cis-10] cis-10-heptadecenska k.                              | 14,0 ± 0,8        | < LOQ        | NA    | < LOQ           | 14,60          | NA    | NA    |
|                | C18:1[cis-9] Oleinska k.                                           | 930 ± 814         | 1421 ± 362   | 0,228 | 1550 ± 423      | 1554 ± 504     | 0,167 | 0,172 |
| n-9            | C20:1[cis-11] 11-eikozenska k.                                     | 18,6 ± 10,8       | 12,7 ± 4,1   | 0,588 | 14,1 ± 4,6      | 14,4 ± 4,9     | 0,807 | 0,081 |
|                | C24:1[cis-15] Nervonska k.                                         | < LOQ             | 9,73 ± 0,54  | 0,552 | 7,34 ± 0,96     | 6,86 ± 0,02    | NA    | NA    |
| n-6            | C18:2[cis-9.12] Linolna k.                                         | 1424 ± 359        | 1540 ± 205   | 0,672 | 1806 ± 407      | 1854 ± 906     | 0,845 | 0,059 |
|                | C18:3[cis-6.9.12] γ-linolenska k.                                  | 53,8 ± 10,8       | 59,6 ± 15,4  | 0,338 | 60,8 ± 12,8     | 46,2 ± 11,9*   | 0,011 | 0,195 |
|                | C21:2[cis-11.14] Eikozadienska k.                                  | 16,9 ± 0,5        | 15,8 ± 3,5   | 0,390 | 17,7 ± 3,2      | 16,2 ± 4,3*    | 0,039 | 0,300 |
|                | C20:3[cis-8.11.14] Dihomo-γ-linolenska k.                          | 89,6 ± 21,8       | 99,9 ± 22,4  | 0,532 | 187,2 ± 74,8    | 140,8 ± 71,5*  | 0,040 | 0,085 |
|                | C20:4[cis-5.8.11.14] Arahidonska k.                                | 647 ± 179         | 759 ± 104    | 0,161 | 683 ± 172       | 683 ± 211      | 1,000 | 0,066 |
| n-3            | C18:3[cis-9.12.15] α-linolenska k.                                 | 17,4 ± 3,5        | 19,5 ± 4,6   | 0,393 | 21,3 ± 6,9      | 28,8 ± 14,9    | 0,167 | 0,072 |
|                | 20:5[cis-5.8.11.14] Eikozapentaenska k.                            | 20,7 ± 9,0        | 25,0 ± 13,0  | 0,053 | 29,0 ± 16,2     | 37,3 ± 13,7 *† | 0,030 | 0,044 |
|                | C22:6[cis-4.7.10.13.16.19] cis-4.7.10.13.16.19-Dokozaheksaenska k. | 143,4 ± 132,2     | 165,3 ± 81,4 | 0,210 | 244,5 ± 90,5    | 296,0 ± 18,9   | 0,331 | 0,066 |
| n-6 / n-3 PUFA |                                                                    | 26,3 ± 19,9       | 23,3 ± 19,4  | 0,367 | 26,7 ± 24,8     | 17,5 ± 17,1*   | 0,041 | 0,047 |

Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

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

\* p < 0,05 prije vs. nakon unutar skupine (kontrolne i Nutri4 skupine) – upareni t-test

† p < 0,05 razlika među skupinama

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

U Nutri4 skupini nakon konzumacije obogaćenih jaja serumska koncentracija selenija bila je statistički značajno veća u usporedbi s koncentracijom selenija prije dijetnog protokola. U kontrolnoj skupini serumska koncentracija selenija nije se značajno mijenjala nakon konzumacije jaja. Vrijednosti koncentracija selenija nisu se razlikovale između skupina nakon završetka dijetnog protokola.

Nakon konzumacije običnih i Nutri4 jaja koncentracija luteina nije se 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 skupine nakon završetka 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) |               |       | †p    |
|-------------------|-------------------|-------------|-------|-----------------|---------------|-------|-------|
|                   | Prije             | Poslije     | p     | Prije           | Poslije       | p     |       |
| 82Se (µg/L)       | 70,0 ± 16,1       | 75,5 ± 15,9 | 0,154 | 71,1 ± 19,3     | 85,1 ± 27,3 * | 0,043 | 0,707 |
| Vitamin E (µg/mL) | 8,99 ± 4,17       | 8,88 ± 3,97 | 0,519 | 7,17 ± 4,40     | 9,36 ± 4,44 * | 0,001 | 0,896 |
| Lutein (µmol/L)   | 0,15 ± 0,06       | 0,13 ± 0,04 | 0,458 | 0,18 ± 0,06     | 0,16 ± 0,09   | 0,432 | 0,876 |

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

n-3 PUFA – n-3 višestruko nezasićene masne kiseline; Se – selenij

\* p < 0,05 prije vs. poslije unutar skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

† p < 0,05 razlika između skupina

### 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 dijetnog protokola statistički se značajno smanjila serumska koncentracija triglicerida (Kontrola:  $1,44 \pm 0,75$  prije vs.  $1,36 \pm 0,66$  nakon konzumacije,  $p = 0,389$ , Nutri4:  $1,58 \pm 0,80$  prije vs.  $1,30 \pm 0,60$  nakon konzumacije,  $p = 0,002$ ), 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 skupina u navedenim parametrima nakon dijetnog 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) |                   |       | †p    | Referentna vrijednost |
|-----------------------|-------------------|-----------------|-------|-----------------|-------------------|-------|-------|-----------------------|
|                       | Prije             | Poslije         | *p    | Prije           | Poslije           | *p    |       |                       |
| Kolesterol (mmol/L)   | $3,53 \pm 0,63$   | $3,55 \pm 0,62$ | 0,535 | $4,14 \pm 1,50$ | $3,81 \pm 0,87$   | 0,353 | 0,356 | < 5                   |
| Trigliceridi (mmol/L) | $1,44 \pm 0,75$   | $1,36 \pm 0,66$ | 0,389 | $1,58 \pm 0,80$ | $1,30 \pm 0,60^*$ | 0,002 | 0,983 | < 1,70                |
| HDL (mmol/L)          | $1,20 \pm 0,34$   | $1,13 \pm 0,34$ | 0,808 | $1,20 \pm 0,34$ | $1,24 \pm 0,40$   | 0,274 | 0,326 | > 1,20                |
| LDL (mmol/L)          | $2,01 \pm 0,50$   | $1,98 \pm 0,51$ | 0,701 | $2,52 \pm 1,16$ | $2,22 \pm 0,54$   | 0,252 | 0,218 | < 3,00                |

Podatci predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju (SD).

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

\*  $p < 0,05$  prije vs. poslije unutar skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

†  $p < 0,05$  razlika između skupina

U tablici 8 prikazani 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 skupina nakon završetka dijetnog 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 skupina ispitanika na kraju dijetnog protokola. Ni konzumacija običnih bi konzumacija 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 objema skupinama nakon dijetnog protokola u odnosu na početne vrijednosti (Tablica 8). Za navedene parametre nisu zabilježene značajne razlike u vrijednostima na kraju protokola između Nutri4 i kontrole skupine.

**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) |             |       | †p    | Referentna vrijednost |
|---------------------------|-------------------|-------------|-------|-----------------|-------------|-------|-------|-----------------------|
|                           | Prije             | Poslije     | *p    | Prije           | Poslije     | *p    |       |                       |
| E (x10 <sup>12</sup> /L)  | 4,8 ± 0,4         | 4,8 ± 0,5   | 0,881 | 5,0 ± 0,7       | 4,9 ± 0,6   | 0,952 | 0,901 | 3,86 – 5,08           |
| Hemoglobin (g/L)          | 142 ± 10          | 142 ± 13    | 0,710 | 143 ± 12        | 144 ± 1     | 0,514 | 0,622 | 119 – 157             |
| Hematokrit (%)            | 42 ± 3            | 42 ± 4      | 0,971 | 42 ± 4          | 42 ± 4      | 0,936 | 0,622 | 36 – 47               |
| L (x10 <sup>9</sup> /L)   | 7,3 ± 2,2         | 7,2 ± 1,8   | 0,528 | 7,0 ± 2,3       | 7,9 ± 2,4   | 0,054 | 0,373 | 3,4 – 9,7             |
| Trc (x10 <sup>9</sup> /L) | 210 ± 54          | 207 ± 58    | 0,723 | 229 ± 68        | 221 ± 50    | 0,791 | 0,386 | 158 – 424             |
| Urea (mmol/L)             | 5,8 ± 1,8         | 6,4 ± ,7    | 0,219 | 6,4 ± 2,1       | 6,7 ± 2,1   | 0,325 | 0,395 | 2,8 – 8,3             |
| Kreatinin (μmol/l)        | 74,1 ± 20,1       | 76,3 ± 27,4 | 1,00  | 80,7 ± 18,4     | 80,3 ± 13,1 | 0,870 | 0,078 | 49 – 90               |
| Natrij (mmol/l)           | 139,7 ± 2,2       | 139,6 ± 2,1 | 0,836 | 139,5 ± 3,1     | 139,7 ± 2,6 | 0,744 | 0,879 | 137 – 146             |
| Kalij (mmol/l)            | 4,3 ± 0,3         | 4,4 ± 0,3   | 0,243 | 4,4 ± 0,3       | 4,3 ± 0,4   | 0,270 | 0,301 | 3,9 – 5,1             |
| Kalcij (mmol/L)           | 2,39 ± 0,09       | 2,40 ± 0,10 | 0,516 | 2,37 ± 0,07     | 2,36 ± 0,10 | 0,313 | 0,289 | 2,14 – 2,53           |
| Fibrinogen                | 3,2 ± 0,5         | 3,2 ± 0,4   | 0,858 | 3,1 ± 0,5       | 3,0 ± 0,5   | 0,319 | 0,271 | 1,8 – 3,5             |
| Željezo (μmol/L)          | 15,5 ± 4,7        | 14,3 ± 4,0  | 0,170 | 17,0 ± 5,8      | 15,1 ± 5,8  | 0,089 | 0,640 | 8,0 – 30,0            |
| Transferin (g/L)          | 2,50 ± 0,45       | 2,46 ± 0,38 | 0,303 | 2,53 ± 0,50     | 2,58 ± 0,37 | 0,847 | 0,373 | 2,0 – 3,6             |
| Feritin (μg/L)            | 161 ± 133         | 149 ± 136*  | 0,044 | 151 ± 117       | 138 ± 115   | 0,205 | 1,00  | 10 – 120              |
| Glukoza (mmol/L)          | 7,1 ± 2,4         | 6,5 ± 1,6   | 0,791 | 6,3 ± 1,9       | 6,2 ± 1,9   | 0,805 | 0,868 | 4,4 – 6,4             |
| HsCRP (mg/L)              | 1,56 ± 1,30       | 2,14 ± 2,81 | 0,389 | 1,28 ± 0,83     | 1,32 ± 1,26 | 0,804 | 0,663 | < 5                   |
| AST (U/L)                 | 29,0 ± 5,9        | 27,5 ± 6,3  | 0,377 | 28,8 ± 9,8      | 28,1 ± 7,9  | 0,529 | 0,839 | 8 – 30                |
| ALT (U/L)                 | 39,5 ± 29,0       | 3,1 ± 14,3  | 0,850 | 34,6 ± 14,7     | 35,1 ± 13,8 | 0,496 | 0,052 | 10 – 36               |
| GGT (U/L)                 | 27 ± 20           | 25 ± 17 *   | 0,044 | 25 ± 9          | 23 ± 8 *    | 0,009 | 0,877 | 9 – 35                |

Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

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

\* p < 0,05 prije vs. poslije unutar skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

† p < 0,05 razlika između skupina

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

PORH i vazodilatacija izazvana ACh-om predstavljaju jednostavan test za procjenu endotelne funkcije mjerenjem protoka krvi u mikrocirkulaciji kože pomoću LDF-a, dok iontoforeza SNP-



a predstavlja test za procjenu vazodilatacije neovisne o endotelu. Rezultati ove studije pokazali su kako je konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom (Nutri4 jaja) dovela do poboljšanja PORH-odgovora ( $106 \pm 26$  prije vs.  $126 \pm 48$  nakon konzumacije,  $p = 0,049$ ), dok u skupini ispitanika koji su konzumirali obična jaja nije zabilježena promjena protoka krvi kao odgovora na vaskularnu okluziju ( $107 \pm 31$  prije vs.  $115 \pm 38$  poslije,  $p = 0,438$ ). Nije bilo razlike u PORH-odgovoru nakon odgovarajućeg dijetnog protokola između kontrolne i Nutri4 skupine ( $p = 0,675$ ) (slika 5A).

Zatim, u skupini ispitanika koji su konzumirali obogaćena jaja (Nutri4), nakon konzumacije obogaćenih jaja značajno se poboljšala dilatacija mikrocirkulacije kože podlaktice izazvana acetilkolinom (AchID) u usporedbi s bazalnim mjerenjem (slika 5B;  $11,1 \pm 3,6$  prije vs.  $13,3 \pm 3,8$  nakon konzumacije,  $p = 0,008$ ). U skupini ispitanika koji su konzumirali obična (Kontrola) jaja, nije zabilježena promjena u AchID-u između početnog mjerenja i mjerenja nakon konzumacije običnih kokošnjih jaja ( $10,7 \pm 6,3$  prije vs.  $10,6 \pm 3,2$  poslije konzumacije,  $p = 0,639$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u AchID-u periferne mikrocirkulacije između kontrolne i Nutri4 skupine nakon odgovarajućih dijetnih protokola (prilagođeno početnom mjerenju).

Konzumacija jaja (običnih i Nutri4 jaja) nije uzrokovala promjene u dilataciji periferne mikrocirkulacije izazvanoj spojem SNP (SNPID) u usporedbi s početnim mjerenjima. Nadalje nije bilo razlike u SNPID-u između skupina nakon provedenog odgovarajućeg dijetnog protokola (prilagođena početnoj vrijednosti (slika 5C).

**Tablica 9. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na vaskularnu reaktivnost u mikrocirkulaciji kože ovisnu o endotelu i neovisnu o endotelu u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom**

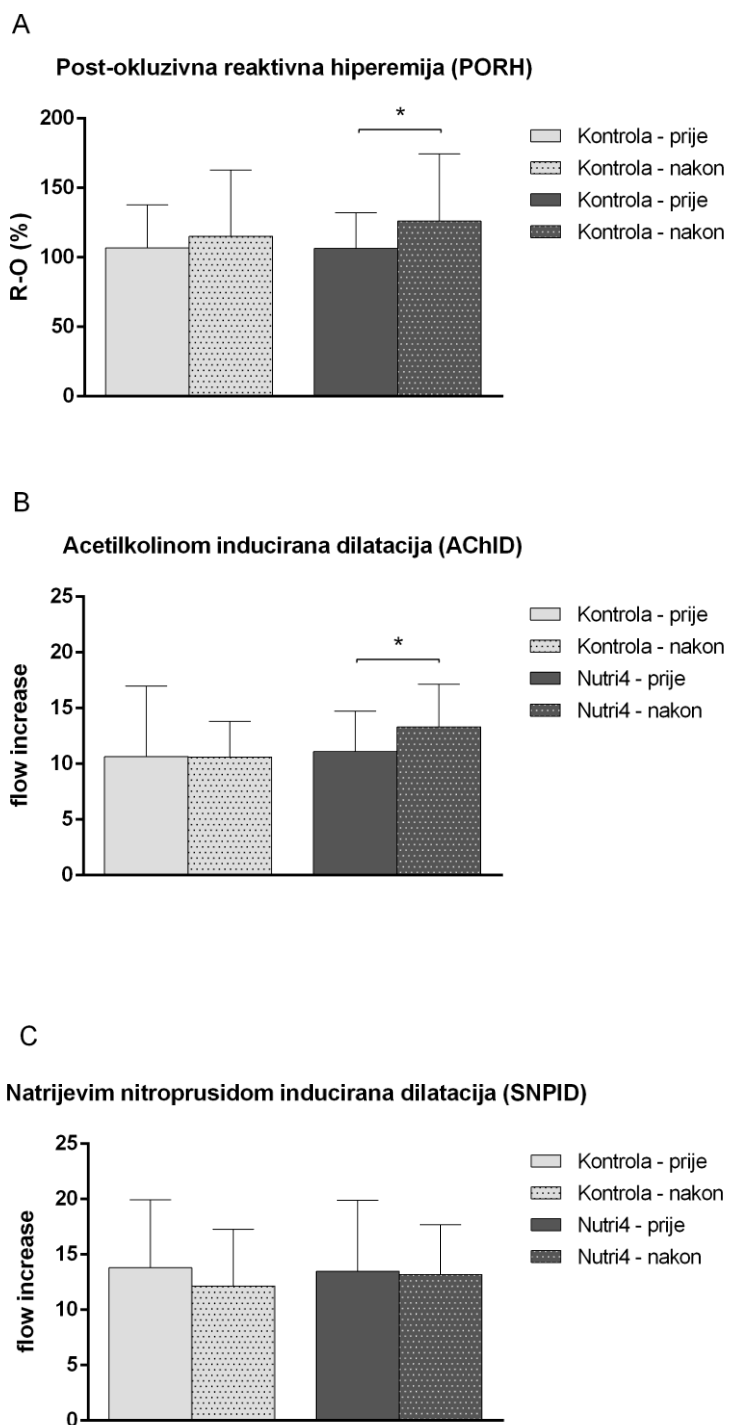
| Parametri | Kontrola (N = 15) |                |       | Nutri4 (N = 15) |                |        | †p    |
|-----------|-------------------|----------------|-------|-----------------|----------------|--------|-------|
|           | Prije             | Poslije        | *p    | Prije           | Poslije        | *p     |       |
| PORH      | $107 \pm 31$      | $115 \pm 38$   | 0,438 | $106 \pm 26$    | $126 \pm 48$   | 0,049* | 0,675 |
| Ach       | $10,7 \pm 6,3$    | $10,6 \pm 3,2$ | 0,639 | $11,1 \pm 3,6$  | $13,3 \pm 3,8$ | 0,008* | 0,050 |
| SNP       | $13,8 \pm 6,1$    | $12,2 \pm 5,1$ | 0,244 | $13,5 \pm 6,4$  | $13,2 \pm 4,5$ | 0,871  | 0,497 |

Podatci predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju (SD).

PORH – postokluzivna reaktivna hiperemija; Ach – acetilkolin, SNP (engl. *Sodium nitropruside*) – natrijev nitroprusid

\*  $p < 0,05$  prije vs. poslije unutar skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

†  $p < 0,05$  razlika između skupina



Slika 5. Utjecaj konzumacije običnih (Kontrola) i obogaćenih (Nutri4) jaja na vaskularnu reaktivnost mikrocirkulacije kože podlaktice ovisnu o endotelu i neovisnu o endotelu procijenjeno laser-doplerskom floumetrijom (LDF). (A) Postokluzivna reaktivna hiperemija (PORH), (B) Dilatacija izazvana acetilkolinom (AChID), (C) Dilatacija inducirana natrijevim nitroprusidom (SNPID). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD); \*  $p < 0,05$  prije vs. poslije unutar skupine – upareni t-test.

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

FMD brahijalne arterije je neinvazivna metoda za procjenu arterijske vazodilatacije ovisne o endotelu koja je dominantno posredovana NO te danas predstavlja referentnu metodu za procjenu endotelne funkcije velikih krvnih žila. Slika 6 prikazuje FMD brahijalne arterije u kontrolnoj i Nutri4 skupini prije i nakon provedenog odgovarajućeg dijetnog protokola. U ovoj studiji u skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom koja je konzumirala obogaćena (Nutri4) jaja zabilježeno je značajno poboljšanje FMD-a brahijalne arterije nakon provedenog dijetnog 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 dijetnog 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-u brahijalne arterije između kontrolne i Nutri4 skupine nakon dijetnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju) (slika 6A).

Dilatacija posredovana nitroglicerinom (NTG-MD) brahijalne arterije predstavlja metodu za procjenu dilatacije velikih krvnih žila neovisne o endotelu. Ni u Nutri4 skupini ni u kontrolnoj skupini nije bilo značajne promjene u NTG-MD-u nakon provedenog dijetnog protokola u odnosu na bazalna mjerenja (Nutri4: NTG % dilatacija prije  $13,70 \pm 7,19$  vs. nakon  $12,38 \pm 6,12$ ,  $p = 0,502$ ; Kontrola: NTG % dilatacija prije  $14,42 \pm 6,40$  vs. nakon  $14,46 \pm 5,95$ ,  $p = 0,985$  (slika 6B). Nije bilo značajne razlike u NTG-MD-u između kontrolne i Nutri4 skupine na kraju dijetnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju).

**Tablica 10. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na dilataciju posredovanu protokom (engl. *flow mediated dilatation*, FMD) brahijalne arterije u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom**

| Parametri             | Kontrola (N = 15) |              |       | Nutri4 (N = 15) |              |        | †p    |
|-----------------------|-------------------|--------------|-------|-----------------|--------------|--------|-------|
|                       | Prije             | Poslije      | *p    | Prije           | Poslije      | *p     |       |
| FMD (% dilatacije)    | 9,67 ± 3,60       | 9,89 ± 3,29  | 0,850 | 6,84 ± 3,60     | 9,14 ± 4,79  | 0,015* | 0,831 |
| NTG-MD (% dilatacije) | 14,42 ± 6,40      | 14,46 ± 5,95 | 0,985 | 13,70 ± 7,19    | 12,38 ± 6,12 | 0,502  | 0,812 |

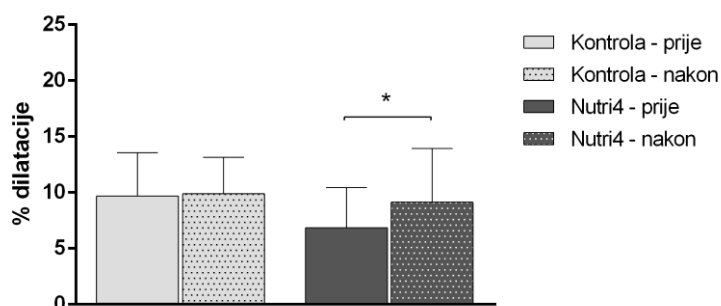
Podatci predstavljaju srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (SD).

FMD (engl. *flow-mediated dilatation*) – dilatacija posredovana protokom; NTG-MD – dilatacija posredovana nitroglicerinom

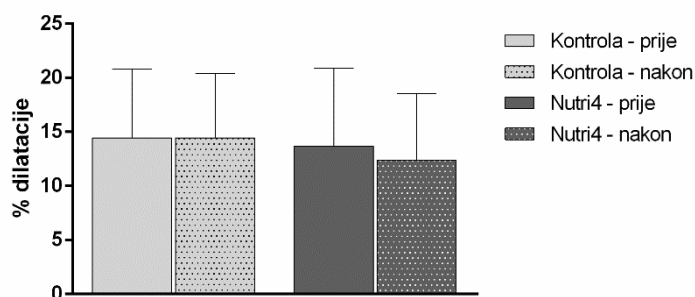
\* p < 0,05 prije vs. poslije unutar skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

† p < 0,05 razlika između skupina

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



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



Slika 6. 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-a. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD); \* p < 0,05 prije vs. Poslije unutar skupine, upareni t-test.

### 5.6. Koncentracija eNOS-a, iNOS-a i nNOS-a

Tablica 11 prikazuje utjecaj konzumacije običnih i obogaćenih jaja na koncentracije triju izoformi 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 7 C), dok se koncentracije nNOS-a i eNOS-a nisu statistički značajno mijenjale u usporedbi s početnim mjerenjem (s7 A i B). U kontrolnoj skupini nisu zabilježene statistički značajne razlike u koncentraciji tih enzima nakon konzumacije jaja u usporedbi s početnim mjerenjem. Nisu zabilježene značajne razlike u koncentracijama eNOS-a, nNOS-a i iNOS-a između skupina nakon odgovarajućeg dijetnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju).

**Tablica 11. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na koncentracije izoformi NOS-a u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom**

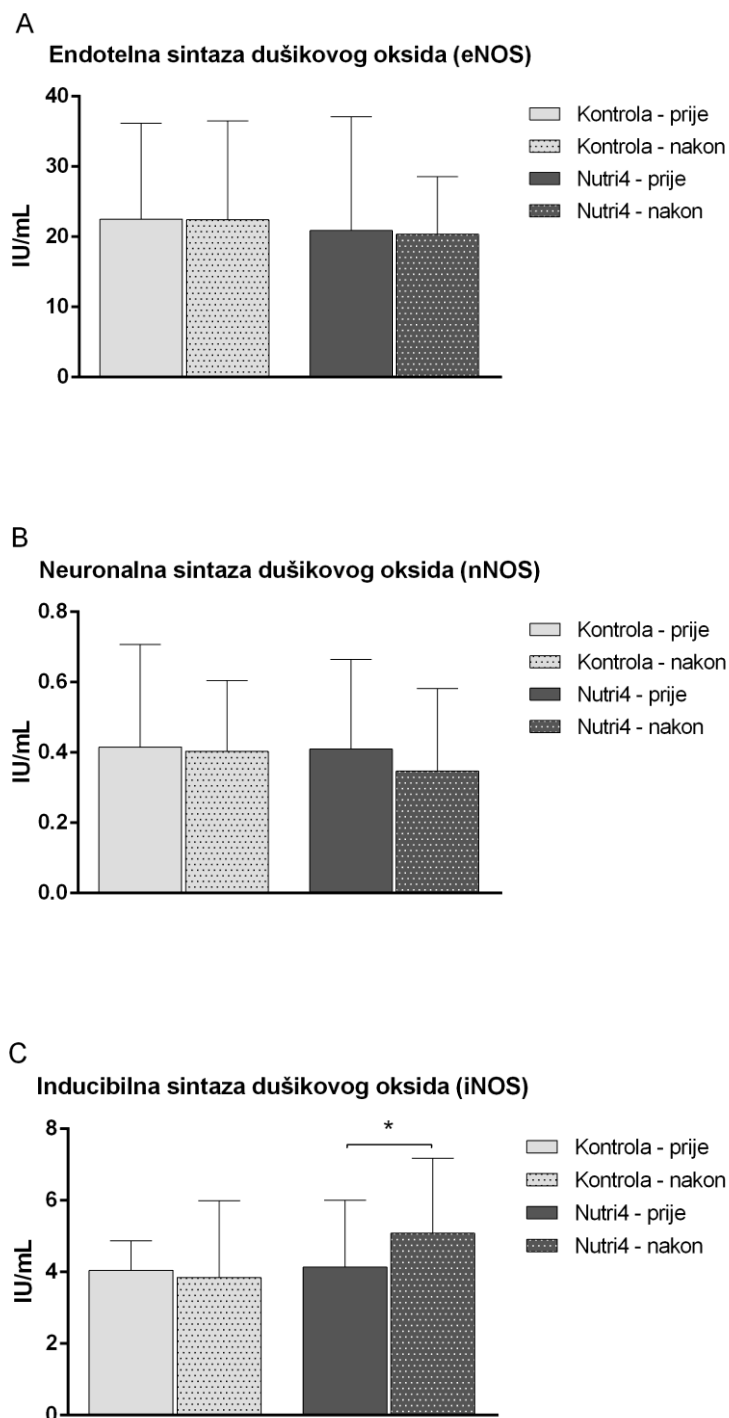
| Parametri   | Kontrola (N = 15) |                   |       | Nutri4 (N = 15)   |                   |        | †p    |
|-------------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|--------|-------|
|             | Prije             | Poslije           | *p    | Prije             | Poslije           | *p     |       |
| eNOS(IU/ml) | $22,5 \pm 13,7$   | $22,4 \pm 14,1$   | 0,975 | $20,9 \pm 16,3$   | $20,3 \pm 8,2$    | 0,938  | 0,756 |
| nNOS(IU/ml) | $0,316 \pm 0,291$ | $0,404 \pm 0,201$ | 0,639 | $0,410 \pm 0,255$ | $0,347 \pm 0,235$ | 0,361  | 0,366 |
| iNOS(IU/ml) | $4,053 \pm 0,816$ | $3,853 \pm 2,139$ | 0,753 | $4,136 \pm 1,867$ | $5,084 \pm 2,162$ | 0,028* | 0,360 |

Podatci predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  standardnu devijaciju (SD).

iNOS – inducibilna sintaza dušikovog(II) oksida, eNOS – endotelna sintaza dušikovog(II) oksida, nNOS – neuralna sintaza dušikovog(II) oksida

\*  $p < 0,05$  prije vs. poslije unutar skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

†  $p < 0,05$  razlika između skupina



Slika 7. Učinak konzumacije običnih (Kontrola) i obogaćenih (Nutri4) jaja na serumske koncentracije triju izoformi sintaze dušikovog(II) oksida. (A) endotelni NOS (eNOS), (B) neuralna NOS (nNOS), (C) inducibilni NOS (iNOS). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD); \*  $p < 0,05$  prije vs. poslije unutar skupine, upareni t-test.

### 5.7. Mjerenje koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina u serumu

U tablici 12 prikazan je utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na serumsku koncentraciju proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina. U Nutri4 skupini značajno se smanjila koncentracija TGF-1 $\beta$  (Nutri4:  $2497 \pm 1344$  pg/mL vs.  $1556 \pm 531$  pg/mL,  $p = 0,0473$ ; Kontrola:  $2845 \pm 867$  pg/mL vs.  $3181 \pm 587$  pg/mL,  $p = 0,2758$ ) i IL-17A (Nutri4:  $9,04 \pm 0,25$  pg/mL prije vs.  $7,73 \pm 1,37$  pg/mL,  $p=0,0174$  poslije, Kontrola:  $9,0 \pm 0,23$  pg/mL vs.  $8,69 \pm 0,83$  pg/mL,  $p = 0,8633$  poslije) 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 nakon završetka dijetnog 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 12). Mjerene koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina nisu se značajno razlikovale između skupina nakon završetka odgovarajućeg dijetnog protokola (prilagođeno početnom mjerenju).

**Tablica 12. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na serumsku koncentraciju proupalnih i protuupalnih citokina i kemokina**

| Parametri             | Kontrola (N = 15) |                 |        | Nutri4 (N = 15)  |                  |        | †p    |
|-----------------------|-------------------|-----------------|--------|------------------|------------------|--------|-------|
|                       | Prije             | Poslije         | *p     | Prije            | Poslije          | *p     |       |
| TNF- $\alpha$ (pg/mL) | 3,42 $\pm$ 0,66   | 3,55 $\pm$ 0,5  | 0,5911 | 3,47 $\pm$ 0,52  | 3,3 $\pm$ 0,46   | 0,2145 | 0,294 |
| TGF-1 $\beta$ (pg/mL) | 2845 $\pm$ 867    | 3181 $\pm$ 587  | 0,2758 | 2497 $\pm$ 1344  | 1556 $\pm$ 531*  | 0,0473 | 0,829 |
| C3a (pg/mL)           | 4232 $\pm$ 2639   | 4243 $\pm$ 2685 | 0,9919 | 4548 $\pm$ 2296  | 4635 $\pm$ 1946  | 0,8851 | 0,348 |
| INF- $\gamma$ (pg/mL) | 9,86 $\pm$ 1,73   | 9,55 $\pm$ 1,34 | 0,7131 | 9,83 $\pm$ 1,50  | 9,36 $\pm$ 1,16  | 0,5478 | 0,931 |
| IL-6 (pg/mL)          | 18,1 $\pm$ 0,6    | 18,0 $\pm$ 0,8  | 0,6152 | 17,7 $\pm$ 0,8   | 17,4 $\pm$ 1,3   | 0,4213 | 0,681 |
| IL-10 (pg/mL)         | 0,86 $\pm$ 0,28   | 0,87 $\pm$ 0,45 | 0,9485 | 0,77 $\pm$ 0,09  | 0,77 $\pm$ 0,17  | 0,8881 | 0,988 |
| IL-17A (pg/mL)        | 9,0 $\pm$ 0,23    | 8,69 $\pm$ 0,83 | 0,8633 | 9,04 $\pm$ 0,25  | 7,73 $\pm$ 1,37* | 0,0174 | 0,024 |
| IL-23 (pg/mL)         | 9,89 $\pm$ 0,69   | 9,85 $\pm$ 0,58 | 0,8682 | 10,24 $\pm$ 0,54 | 10,29 $\pm$ 0,92 | 0,8923 | 0,138 |
| MCP-1 (pg/mL)         | 37,4 $\pm$ 16,3   | 36,7 $\pm$ 22,6 | 0,9008 | 24,6 $\pm$ 15,4  | 31,2 $\pm$ 2,45  | 0,3996 | 0,619 |

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 skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

† p < 0,05 razlika između skupina

### 5.8. Biljezi oksidativnog stresa i biomarkeri antioksidativnog odgovora

U tablici 12 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 običnih ili obogaćenih jaja nije utjecalo na razine oksidativnog stresa ni na antioksidativni kapacitet u ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom. Nakon konzumacije jaja nisu zabilježene značajne razlike u razini oksidativnog stresa (određenog kao TBARS) niti je bilo značajne razlike u izmjerenim vrijednostima antioksidativnog kapaciteta određenog kao FRAP ni u kontrolnoj ni u Nutri4 skupini ispitanika u usporedbi s osnovnim mjerenjima prije konzumacije jaja. Također nisu zabilježene razlike između ispitivanih skupina na početku bi na završetku dijetnog protokola.

Antioksidativni enzimi predstavljaju važne markere oksidativnog stresa, a njihova se aktivnost generalno povećava tijekom oksidativnog stresa. Nakon provedenog dijetnog protokola u skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom aktivnosti CAT-a i SOD-a u serumu nisu



se značajno mijenjale niti u kontrolnoj niti u Nutri4 skupini. Osim toga aktivnosti tih dvaju enzima nisu se razlikovale između skupina ni na početku dijetnog protokola ni nakon njegova završetka. Aktivnost GPx-a bila je znatno niža u skupini Nutri4 u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali na nju nije utjecala konzumacija obogaćenih jaja.

Analizom ELISA nisu utvrđene promjene serumske koncentracije oksidiranog lipoproteina niske gustoće (OxLDL), 8-izo prostaglandina F2 $\alpha$  ni AOPP-a ni u kontrolnoj ni u Nutri4 skupini nakon konzumacije jaja.

**Tablica 13. Utjecaj konzumacije običnih jaja (Kontrola) i obogaćenih jaja (Nutri4) na biomarkere oksidativnog stresa i antioksidativni kapacitet**

| Parametri                                       | Kontrola (N = 15) |               |       | Nutri4 (N = 15) |               |       | †p     |
|-------------------------------------------------|-------------------|---------------|-------|-----------------|---------------|-------|--------|
|                                                 | Prije             | Poslije       | *p    | Prije           | Poslije       | *p    |        |
| <b><i>Biljezi oksidativnog stresa</i></b>       |                   |               |       |                 |               |       |        |
| TBARS (mM/L TE)                                 | 0,249 ± 0,137     | 0,305 ± 0,153 | 0,234 | 0,314 ± 0,147   | 0,310 ± 0,130 | 0,706 | 0,233  |
| 8-iso-PGF2 $\alpha$ (pg/mL)                     | 140 ± 58          | 129 ± 48      | 0,168 | 223 ± 266       | 227 ± 282     | 0,652 | 0,069  |
| AOPP ( $\mu$ mol/L)                             | 0,056 ± 0,003     | 0,055 ± 0,003 | 0,623 | 0,056 ± 0,004   | 0,055 ± 0,003 | 0,923 | 0,084  |
| OxLDL (pg/mL)                                   | 103 ± 10          | 102 ± 9       | 0,872 | 111 ± 7         | 110 ± 5       | 0,688 | 0,512  |
| <b><i>Biljezi antioksidativnog odgovora</i></b> |                   |               |       |                 |               |       |        |
| FRAP ( $\mu$ m/MDA)                             | 0,213 ± 0,02      | 0,246 ± 0,03  | 0,725 | 0,397 ± 0,166   | 0,355 ± 0,128 | 0,149 | 0,794  |
| CAT (U/mg protein)                              | 4,716 ± 1,464     | 4,022 ± 1,054 | 0,198 | 5,138 ± 1,462   | 4,507 ± 1,873 | 0,502 | 0,422  |
| GPx (U/mg protein)                              | 0,021 ± 0,003     | 0,022 ± 0,002 | 0,064 | 0,017 ± 0,003   | 0,017 ± 0,003 | 0,131 | 0,594  |
| SOD (U/mg protein)                              | 5,073 ± 0,400     | 5,287 ± 0,259 | 0,121 | 5,400 ± 0,343   | 5,387 ± 0,233 | 0,940 | 0,023* |

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

TBARS – engl. *thiobarbituric acid reactive substances*; 8-iso-PGF2 $\alpha$  – 8-iso prostaglandin F2 $\alpha$ ; AOPP – engl. *advanced oxidation protein products*; OxLDL – engl. *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 skupine (Kontrola ili Nutri4) – upareni t-test

† p < 0,05 razlika između skupina

## 6. RASPRAVA

Istraživanje koje je dio ove disertacije prva je prospektivna, randomizirana, intervencijska, dvostruko slijepa studija koja je ispitala utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih četirima nutrijentima (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 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 Nutri4 jaja poboljšala je vazodilataciju ovisnu o endotelu na razini mikrocirkulacije i makrocirkulacije (tj. mikrovaskularni PORH i AChID (Tablica 9; PORH Nutri4:  $106 \pm 26$  prije vs.  $126 \pm 48$  nakon konzumacije,  $p = 0,049$ ; PORH Kontrola:  $107 \pm 31$  prije vs.  $115 \pm 38$  poslije konzumacije,  $p = 0,438$ ; AChID Nutri4:  $11,1 \pm 3,6$  prije vs.  $13,3 \pm 3,8$  nakon konzumacije,  $p = 0,008$ ; AChID Kontrola:  $10,7 \pm 6,3$  prije vs.  $10,6 \pm 3,2$  poslije konzumacije,  $p = 0,639$ ) te FMD brahijalne arterije (Tablica 10; Nutri4: FMD % dilatacija prije  $6,84 \pm 3,60$  vs. nakon  $9,14 \pm 4,79$ ,  $p = 0,015$ ; Kontrola: FMD % dilatacija prije  $9,67 \pm 3,60$  vs. nakon  $9,89 \pm 3,29$ ,  $p = 0,850$ ) te je povećala koncentraciju iNOS-a u serumu (Tablica 11; ( $4,62 \pm 2,68$  prije vs.  $5,39 \pm 4,57$  IU/ml,  $p = 0,028$ ))
- b) konzumacija Nutri4 jaja smanjila je razinu triglicerida u serumu (Tablica 7; Kontrola:  $1,44 \pm 0,75$  prije vs.  $1,36 \pm 0,66$  nakon konzumacije,  $p = 0,389$ ; Nutri4:  $1,58 \pm 0,80$  prije vs.  $1,30 \pm 0,60$  nakon konzumacije,  $p = 0,002$ )
- c) konzumacija Nutri4 jaja smanjila je serumske koncentracije proupalnih citokina IL-17A i TGF-1 $\beta$  (Tablica 12; TGF-1 $\beta$  Nutri4:  $2497 \pm 1344$  pg/mL vs.  $1556 \pm 531$  pg/mL,  $p = 0,0473$ ; Kontrola:  $2845 \pm 867$  pg/mL vs.  $3181 \pm 587$  pg/mL,  $p = 0,2758$  i IL-17A; Nutri4:  $9,04 \pm 0,25$  pg/mL prije vs.  $7,73 \pm 1,37$  pg/mL,  $p = 0,0174$  poslije; Kontrola:  $9,0 \pm 0,23$  pg/mL vs.  $8,69 \pm 0,83$  pg/mL,  $p = 0,8633$  poslije)
- 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) (Tablica 13) u ispitanika s CCS-om.

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 modificiranih jaja povećava koncentraciju n-3 PUFA u serumu, mijenja profil višestruko nezasićenih masnih kiselina u povoljniji omjer n-6/n-3 te ostvaruje blage protuupalne učinke [117].

### **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 značajan porast serumske koncentracije n-3 PUFA (eikozapentaenske kiseline), dok se koncentracija n-6 PUFA u serumu smanjila ( $\gamma$ -linolenska kiselina, eikozapentaenska kiselina, dihomo- $\gamma$ -linolenska kiselina), što je rezultiralo smanjenjem i povoljnijim omjerom n-6/n-3 PUFA (Tablica 5).

U protekla 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/n-3 PUFA u prehrani sada oko 20 : 1, dok je u prošlosti taj omjer bio oko 1 : 1, a s porastom tog 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 ispitivala 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/n-3 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 pokazano je kako se malim modifikacijama prehrane, odnosno konzumacijom jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom 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 Kolar i suradnika koji su proučavali utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA u skupini od 23 sportaša koji su konzumirali obogaćena jaja tijekom 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 n-6/n-3 PUFA [117], što je u skladu s rezultatima ove studije. S obzirom na navedeno, može se zaključiti kako konzumacija nutritivno obogaćenih jaja omogućava izmjenu lipidnog statusa te povoljno djeluje na n-6/n-3 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 tijekom duljeg razdoblja.

## **6.2. Utjecaj konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na serumske koncentracije vitamina E, selenija i luteina**

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 udjelom selenija u tlu zamijećena povećana učestalost Kešanske bolesti. Kešanska bolest je bolest koju odlikuje 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 s većim rizikom kardiovaskularne smrti kod ispitanika s akutnim koronarnim sindromom [99]. Poznata je, a i brojne studije potvrdile su je, povezanost između nedostatka selenija u organizmu i povećanog rizika od nastanka aterosklerotskih plakova [48]. Odgovarajući unos selenija može spriječiti nastanak ateroskleroze na više različitih mehanizama, inhibirajući oksidativni stres, djelujući na upalu, 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]. Naprimjer, 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 bolešću, arterijskom hipertenzijom i ishemijskom bolešću srca nakon 12 godina praćenja, međutim mehanizam nije u potpunosti razjašnjen [101]. Osim suplementacije selenija u obliku kapsula ili tableta, jedan je od načina svakako i konzumacija hrane bogate selenijem ili funkcionalne hrane. Naprimjer, Thomson i suradnici pokazali su kako konzumacija 2 brazilska oraščića dnevno tijekom 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 tijekom 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 navedenog može se zaključiti kako selenij, odnosno dodatak selenija prehrani, ima važnu ulogu u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti, a funkcionalna hrana omogućava jednostavan unos 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 istraživani su na eksperimentalnim životinjskim modelima; konzumacija vitamina E u miševa pokazala se povezanom s redukcijom aterosklerotskih lezija aorte (144). U miševa koji su primali vitamin E i koenzim Q10 pokazana je sporija progresija ateroskleroze aorte [139]. Metaanaliza 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 da je viša koncentracija vitamina E u plazmi povezana s nižom stopom smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti te da bi se rizik od ishemijske bolesti srca smanjio ako bi koncentracija vitamina E u plazmi bila  $> 27,5 - 30,0$  mmol/L [141]. U istraživanju koje su proveli Rimm i suradnici sudjelovalo je ukupno 39 910 ispitanika muškog spola 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 34 486 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]. Studija ARIC koja je provedena na više od 10 000 ispitanika dobi 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 dobi 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 skupinom koja je konzumirala placebo. Nakon 2 godine koronarografijom je dokazana sporija progresija lezija koronarnih arterija [145, 146]. Međutim, klinička ispitivanja nisu potvrdila pozitivne učinke vitamina E na kardiovaskularni rizik: studija koju su proveli Sesso i suradnici obuhvatila je 14 641 ispitanika muškog spola dobi 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 ni konzumacija vitamina E ni vitamina C nije umanjila rizik od kardiovaskularnih bolesti [147]. Studija koja je proučavala primjenu vitamina E kod ispitanika s jednim ili više kardiovaskularnih rizika (4495 ispitanika obaju spolova prosječne dobi 64,6 godine) nije pokazala razlike između učestalosti kardiovaskularne smrtnosti, infarkta miokarda ili cerebrovaskularnog inzulta 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 bolešću ili sa šećernom bolešću, dugotrajna primjena vitamina E nije spriječila veće kardiovaskularne događaje [149]. Za sada nije moguće u potpunosti objasniti takve kontradiktorne rezultate različitih studija. S obzirom na to da postoji više različitih izoformi vitamina E, moguć je i njihov različit učinak. Osim toga moguć je različit učinak sintetskog, odnosno prirodnog oblika vitamina E. Naime, ranije studije proučavale su 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 preporučuje 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, orašasti plodovi) [91].

Poznato je kako žumanjak kokošnjeg jaja obiluje luteinom. Jedno je istraživanje pokazalo kako konzumacija jednog jaja dnevno tijekom 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) tijekom 90 dana povećava serumsku koncentraciju luteina [151]. Međutim, rezultati te 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 jest da koncentracija u jajima nije bila povećana u takvom omjeru da bi utjecala na serumske razine luteina ili da protokol nije trajao dovoljno dugo da bi utjecao na razine luteina u serumu. S obzirom na to da nisu zabilježene značajne razlike u serumskim koncentracijama luteina nakon konzumacije običnih i obogaćenih kokošnjih jaja, potrebno je utvrditi koja je koncentracija luteina u žumanjku potrebna kako bi se konzumacijom obogaćenih jaja postigli pozitivni učinci.

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

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

U ovom istraživanju konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom rezultirala je značajnim smanjenjem serumske koncentracije triglicerida (Tablica 7; Kontrola:  $1,44 \pm 0,75$  prije vs.  $1,36 \pm 0,66$  nakon konzumacije,  $p = 0,389$ ; Nutri4:  $1,58 \pm 0,80$  prije vs.  $1,30 \pm 0,60$  nakon konzumacije,  $p = 0,002$ ), 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 kontradiktorne su. Općeprihvaćeno je mišljenje da jaja sadrže kolesterol i da se zbog utjecaja na koncentraciju lipida u krvi njihova konzumacija kod kardiovaskularnih bolesnika ne preporučuje. Ipak rezultati provedenih istraživanja nisu jednoznačni. Studija EVIDENT II 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 tih poremećaja bio čak i bolji kada su konzumirali više jaja [153]. Istraživanje koje su proveli Drouin-Chatier i suradnici, koje je pratilo 14 806 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 29 000 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 13 078 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 preporučuje 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 pokazalo je da 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 (Tablica 7). Važno je naglasiti da su svi ispitanici, s obzirom na to da se radi o pacijentima s od ranije poznatim kroničnim koronarnim sindromom, imali terapiju prema smjernicama koja je uključivala statine te su vrijednosti lipidograma, uključujući trigliceride na početku protokola bile unutar referentnih vrijednosti preporučenih za tu skupinu. Ipak u skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom ciljna vrijednost LDL-a jest  $< 1,4$  mmol/l, a nakon konzumacije obogaćenih jaja, vrijednosti LDL-a bile su niže, iako ne statistički značajno. Također konzumacija obogaćenih jaja dodatno je snizila koncentraciju triglicerida te se može zaključiti da su n-3 PUFA u obogaćenim jajima imale pozitivan učinak na koncentraciju lipida u serumu. Važno je istaknuti kako, unatoč konzumaciji 3 jaja dnevno tijekom 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 zatajenjem, aritmijama te općenito s mortalitetom uzrokovanim kardiovaskularnim bolestima [160]. Jedna retrospektivna studija koju su proveli Kim i suradnici analizirala je 5120 asimptomatskih pojedinaca koji u anamnezi nisu imali ni koronarnu bolest niti su konzumirali alkohol, a koji su u sklopu sistematskog pregleda učinili CT-koronarografiju. U toj skupini ispitanika utvrđeno je 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 tom 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 kroz tri tjedna. Osim toga vrijednosti lipidograma nisu se 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 (Tablice 7 i 8).

#### 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 tj. mikrovaskularni PORH i AChID (Tablica 9; PORH Nutri4:  $106 \pm 26$  prije vs.  $126 \pm 48$  nakon konzumacije,  $p = 0,049$ ; PORH Kontrola:  $107 \pm 31$  prije vs.  $115 \pm 38$  poslije konzumacije,  $p = 0,438$ ; AChID Nutri4:  $11,1 \pm 3,6$  prije vs.  $13,3 \pm 3,8$  nakon konzumacije,  $p = 0,008$ ; AChID Kontrola:  $10,7 \pm 6,3$  prije vs.  $10,6 \pm 3,2$  poslije konzumacije,  $p = 0,639$ ) te FMD brahijalne arterije (Tablica 10; Nutri4: FMD % dilatacija prije  $6,84 \pm 3,60$  vs. nakon  $9,14 \pm 4,79$ ,  $p = 0,015$ ; Kontrola: FMD % dilatacija prije  $9,67 \pm 3,60$  vs. nakon  $9,89 \pm 3,29$ ,  $p = 0,850$ ).

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 vazokonstrikcije 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 lako su dostupne za analizu te su izvrstan model za mjerenja endotelne funkcije. Ultrazvučna procjena FMD-a brahijalne arterije i LDF-a predstavljaju jednostavne, dostupne i neinvazivne metode za procjenu endotelne funkcije mjerenjem promjera brahijalne arterije pomoću ultrasonografije, odnosno određivanjem protoka u mikrocirkulaciji kože podlaktice. 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 vazodilataciju neovisnu o endotelu. 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 dnevno) tijekom 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 1053 mg dnevno) tijekom 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 mikrovaskularnu i na

makrovaskularnu endotelnu funkciju. Ta razlika u rezultatima može se tumačiti sinergističkim djelovanjem n-3 PUFA, vitamina E, selenija i luteina na endotelnu funkciju. Iako postoji razlika u izmjerenom FMD-u između kontrolne i Nutri4 skupine na početku istraživanja, neovisno o početnoj razlici, u Nutri4 skupini je zabilježeno značajno poboljšanje FMD-a, dok se FMD u kontrolnoj skupini nije mijenjao. Ovo značajno poboljšanje u Nutri4 skupini ukazuje na korisni učinak obogaćenih jaja u odnosu na kontrolna. Osim u početnim vrijednostima FMD-a, nije bilo razlike između grupa u izmjerenim početnim vrijednostima LDF-a ili NTG-MD.

Postoje istraživanja koja su pokazala da povećana koncentracija vitamina E u serumu djeluje na poboljšanje mikrovaskularne i makrovaskularne reaktivnosti potaknute vazodilatatorima te da 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 da je u skupini pušača koja je uzimala suplemente vitamina E tijekom 4 tjedna 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 bogatog  $\gamma$ -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 da 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 (s n-3 PUFA, selenijem i luteinom) ima značajan povoljan učinak na vaskularnu relaksaciju ovisnu o endotelu u pacijenata s 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 vazodilataciju ovisnu o endotelu, 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 placeboom zabilježeno je značajno 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 načina; one pridonose upali, što uzrokuje povećanu propusnost endotela te smanjuju proizvodnju NO 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. Naprimjer, studija Stirban i suradnika pokazala je da suplementacija n-3 PUFA tijekom 6 tjedana u 34 ispitanika sa šećernom bolešću poboljšava postprandijalno 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 tijekom ukupno 3 mjeseca. U skupini koja je konzumirala n-3 PUFA zabilježeno je značajno 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 tijekom 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 i 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 četirima nutrijentima značajno poboljšava mikrovaskularnu reaktivnost ovisnu o endotelu te ima značajan utjecaj na poboljšanje mikrovaskularne funkcije kod pacijenata s 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 izoformi sintaze dušikovog(II) oksida**

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 (Tablica 11;  $(4,62 \pm 2,68$  prije vs.  $5,39 \pm 4,57$  IU/ml,  $p = 0,028$ )), dok se koncentracije eNOS-a i nNOS-a nisu promijenile, a niti su se mijenjale razine tih triju izoformi NOS-a u skupini koja je konzumirala obična jaja.

Dušikov(II) 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 važna u sprječavanju nepovoljnog strukturnog preoblikovanja u zatajivanju srca kod štakora [171]. Na modelu eksperimentalnih životinja pokazano je kako miševi kojima nedostaju 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 svih triju izoformi NOS-a 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 endotelnih 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 n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom tijekom ukupno 3 tjedna, zabilježeno je povećanje koncentracije enzima nNOS u serumu [175]. U ovom istraživanju u kojem je sudjelovalo ukupno 30 ispitanika podijeljenih u dvije skupine, u skupni koja je konzumirala jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom pronađene su statistički značajne razlike u koncentraciji iNOS-a 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 posljedično tome i boljoj bioraspoloživosti NO, što bi trebalo blagotvorno djelovati na endotelnu funkciju. Iako je prekomjerna ekspresija tog 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 važan je za normalni upalni odgovor, dok su poremećaji u regulaciji iNOS-a 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 mortem* modelima humanog srca pokazala je povećanu ekspresiju iNOS-a u srcu nakon infarkta miokarda, ali isto tako i u regijama srca koje nisu zahvaćene infarkt, što ukazuje na oštećenje kardiomiocita i prije nego što se može histološki otkriti [176]. Studije na animalnim modelima pokazuju kako n-3 PUFA (EPA) može povećati razinu NO aktivirajući eNOS, što potiče vazodilataciju koronarnih arterija ovisnu o endotelu u 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, povišenim krvnim tlakom kod ET<sup>+/+</sup> iNOS<sup>-/-</sup> miševa [179]. S druge strane primjena vitamina C i  $\alpha$ -tokoferola u ispitanika s pojačanom ekspresijom eNOS-a i iNOS-a induciranom visokom razinom glukoze uzrokovala je smanjenje ekspresije obiju izoformi [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 pak pridonosi pojavi kardiogenog šoka kod ispitanika s infarktom srca. Međutim inhibitor NOS-a nije se pokazao učinkovitim u prevenciji nastanka kardiogenog šoka. Naime u studiji TRIUMPH u kojoj je sudjelovalo 398 ispitanika s infarktom miokarda s refraktornim kardiogenim šokom primjena tilarginina, inhibitora NOS-a nije imala učinka na smrtnost u toj skupini ispitanika [181].

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

### **6.6. Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom na serumske koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina**

Važan rezultat ove studije predstavlja smanjenje serumske koncentracije proupalnih citokina IL-17A (IL-17A; Nutri4:  $9,04 \pm 0,25$  pg/mL prije vs.  $7,73 \pm 1,37$  pg/mL,  $p=0,0174$  poslije; Kontrola:  $9,0 \pm 0,23$  pg/mL vs.  $8,69 \pm 0,83$  pg/mL,  $p = 0,8633$  poslije) i TGF-1 $\beta$  (Nutri4:  $2497 \pm 1344$  pg/mL vs.  $1556 \pm 531$  pg/mL,  $p = 0,0473$ ; Kontrola:  $2845 \pm 867$  pg/mL vs.  $3181 \pm 587$  pg/mL,  $p = 0,2758$ ) u kroničnom koronarnom sindromu nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom (Tablica 12). Prethodno istraživanje pri Znanstvenom centru izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju ispitalo je učinak konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA u ispitanika s koronarnom bolešću. Pokazalo se kako njihova konzumacija može smanjiti serumsku koncentraciju IL-6 u akutnom koronarnom sindromu i koncentraciju IL-1a kod svih ispitanika s koronarnom bolešću [117]. Međutim u ovom istraživanju koncentracije TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-23 nisu se značajno mijenjale. Ova razlika može se tumačiti različitim upalnim odgovorom u akutnom koronarnom sindromu u odnosu na kronični koronarni sindrom, obzirom da su u prethodnom istraživanju sudjelovali i ispitanici s akutnim koronarnim sindromom. 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 njezinom nastanku. 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 lijekova koji blokiraju receptore za IL-1 kao što je anakinra u miševa značajno smanjuje veličinu aterosklerotskih lezija [182]. Studija CANTOS provedena je na ukupno 10 061 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 placeboom [182, 183].

IL-6 je jedan od citokina čija se pojačana ekspresija smatra rizičnim čimbenikom za koronarnu bolest, međutim istraživanja o njegovoj ulozi različita su, 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 naglašava 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 da je koncentracija IL-23 bila viša u ispitanika s aterosklerotskim promjenama karotidnih arterija ( $n = 177$ ) nego u zdravih ispitanika ( $n = 24$ ), a veće koncentracije IL-23 u kasnijem praćenju pokazale su se povezanim s višom smrtnošću. [185]. Međutim u ovom istraživanju ni konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja ni konzumacija običnih kokošnjih jaja nije utjecala na serumske koncentracije IL-6 i IL-23 (Tablica 12).

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 proteklih se godina intenzivno istražuje [186]. IL-17A luče pretežito Th17 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 protuupalni 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 s refrakternom hipertenzijom u usporedbi s ispitanicima čija je hipertenzija bila bolje kontrolirana [191]. Osim navedenog, angiotenzin II (koji ima važnu ulogu u nastanku arterijske 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 (Tablica 12; IL-17A; Nutri4:  $9,04 \pm 0,25$  pg/mL prije vs.  $7,73 \pm 1,37$  pg/mL,  $p=0,0174$ ; Kontrola:  $9,0 \pm 0,23$  pg/mL vs.  $8,69 \pm 0,83$  pg/mL,  $p = 0,8633$ ).

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 mogu 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 $^{-/-}$  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, što je dokazano na uzorcima 26 koronarnih arterija *post mortem*. Naime Panutsopoulos i suradnici imunohistokemijskim metodama utvrdili su da je koncentracija TGF- $\beta$ 1 bila viša u skupini ispitanika s prisutnim plakom na koronarnim arterijama i u skupini s kompleksnijim lezijama koronarnih arterija nego u skupinama koji su imale 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 je smanjila 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-1 $\beta$ , 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 tih 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 navedeni citokini igraju važnu ulogu – moguće je da bi konzumacija 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 ni u kontrolnoj ni u Nutri4 skupini ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom (Tablica 13).

Oksidativni stres, kako je 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 dovodi do ateroskleroze. Istraživanje koje su proveli su Varadhan i suradnici provedeno je na 100 ispitanika s poznatom koronarnom bolešću dobi 35 do 70 godina i 60 kontrolnih ispitanika, a mjerene su koncentracije prooksidativnog i proupalnog enzima mijeloperoksidaze (MPO), antioksidativnog 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 bolešću zabilježena povećana razina oksidativnog stresa i snižen antioksidativni kapacitet u usporedbi s kontrolnom skupinom te su zaključili kako su potrebne prilagodbe načina života kako bi se smanjio oksidativni stres i poboljšao antioksidativni status tih 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 pojavnosti određenih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti (uključujući i koronarnu

bolest), maligne bolesti i druge, što može biti povezano s brojnim antioksidansima koje ta 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 utvrđeno je kako je suplementacija selenija smanjila razinu oksidativnog stresa (smanjio se MDA, povisile su se koncentracije glutationa te totalnog antioksidativnog kapaciteta) [203]. Također studija koju su proveli Barić i suradnici pokazala je 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 dijeta s visokim udjelom soli u usporedbi s ispitanicima koji nisu koristili suplemente vitamina C i vitamina 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 bolešću 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 bolešću nego u zdravih ispitanika. I ti rezultati još jednom sugeriraju kako su kod ispitanika s poznatom koronarnom bolešću povišene razine oksidativnog stresa, a snižen je antioksidativni kapacitet [201]. U ovoj studiji konzumacija kokošnjih jaja nije značajno utjecala na koncentraciju oxLDL-a ni u skupini koja je konzumirala obična jaja ni 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 promatranoj skupini ispitanika bile unutar referentnih vrijednosti, što bi moglo utjecati na razinu oxLDL-a kao mogućeg markera razine oksidativnog stresa u promatranih ispitanika. Statini su lijekovi koji djeluju na lipidogram i jedna su osnovnih skupina lijekova koji se primjenjuju u kroničnom koronarnom sindromu, ali oni ne samo da djeluju na razine kolesterola i LDL-a već ostvaruju i druge pozitivne učinke. Studija koju su u Iranu proveli Shahsvari G. i suradnici na ukupno 83 ispitanika s poznatom koronarnom bolešću, dokazanom koronarografijom, pokazala je kako primjena atorvastatina kod tih ispitanika smanjuje serumske razine TBARS-a, a povećava razine FRAP-a prilikom dugotrajne primjene lijeka, što ukazuje na smanjenje razine oksidativnog stresa kod promatranih 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 bolešću 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 3 tjedna, koliko je trajao naš protokol, prekratko da bi antioksidansi ostvarili svoje učinke. Osim toga treba naglasiti kao je kronični koronarni sindrom kronična bolest koja traje najčešće 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 tom području kako bi se utvrdilo može li konzumacija 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 tijek bolesti, a time i na kardiovaskularne incidente u promatranoj populaciji.

### **6.8. Ograničenja**

Istraživanje koje čini ovu doktorsku disertaciju ima nekoliko ograničenja. Jedno od ograničenja je kratko trajanje studije kao i mali broj ispitanika uključenih u istu, stoga nije moguće zaključiti radi li se doista o dugotrajnim benefitima ovakve prehrane. Potrebno je provesti istraživanja s duljim praćenjem kako bi se istražilo ima li ovakva prehrana utjecaj i na ishode ispitanika s kroničnim koronarnim sindromom što bi bila definitivna potvrda pozitivnog učinka obogaćenih jaja. Svi ispitanici tijekom trajanja studije koristili su terapiju koju im je preporučio i/ili prepisao specijalist kardiolog prema smjernicama za liječenje kroničnog koronarnog sindroma, a zbog toga nije moguće isključiti moguće učinke te terapije na rezultate studije. Međutim razlike između dviju promatranih skupina ispitanika ipak pokazuju pozitivne učinke konzumacije jaja, bez obzira na medikamentoznu terapiju. Ispitanicima je na početku protokola objašnjeno da tijekom istraživanja ne konzumiraju hranu bogatu n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom da ona ne bi utjecala na rezultate istraživanja. Osim toga kako bi se postigla što bolja suradnja i kako bi ispitanici uistinu i konzumirali dana 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 obogaćenih jaja.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, vitaminom E, selenijem i luteinom tijekom tri tjedna uzrokovala je značajno poboljšanje vazodilatacije ovisne o endotelu u mikrocirkulaciji i makrocirkulaciji. U skupini ispitanika koja je konzumirala obogaćena jaja zabilježeno je povećanje serumske koncentracije iNOS-a.

2. Konzumacija obogaćenih jaja utjecala je na značajno sniženje serumske koncentracije triglicerida u serumu ispitanika, no nije imala utjecaja na ukupni kolesterol, LDL-kolesterol i HDL-kolesterol. U skupini ispitanika koja je konzumirala obična kokošja jaja nisu zabilježene promjene u serumskim koncentracijama lipidograma.

3. Ni konzumacija običnih kokošnjih jaja ni konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja ne utječu na razine oksidativnog stresa. Međutim, konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja smanjila je koncentracije proupalnih citokina IL-17A i TGF-1 $\beta$ .

4. Navedeni rezultati ukazuju na moguće dodatne korisne učinke konzumacije obogaćenih jaja u pacijenata s kroničnim koronarnim sindromom, jer su se zapaženi pozitivni učinci javili neovisno o standardnoj terapiji koju su ispitanici uzimali. Pokazano je kako konzumacija kokošnjih jaja tijekom tri tjedna nije imala negativne učinke na lipidni profil kao niti na jetrenu funkciju kako u eksperimentalnoj tako ni u kontrolnoj skupini.

**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. Klingler 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, Sigris 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. *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, Patoulas 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-Cardena 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, Stoes 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, 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, Giaipaoli 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. Schmözl 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, Matic 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, 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.
117. Čurić ŽB, Masle AM, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Stupin A, Mihaljević Z, Jukić I, Stupin M, Matic 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, Matic 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, Tokgozoglu L, 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, Tokgozoglu L, 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, Postadzhayan 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>2 $\alpha$</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, Oliviero 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, Matić 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, Goerdts 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 vazodilataciju ovisnu o endotelu 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 skupinu (N = 15) 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) tijekom 3 tjedna. Mikrovaskularna i makrovaskularna vazodilatacija ovisna o endotelu određene su mjerenjem postokluzivne reaktivne hiperemije i vazodilatacije inducirane acetilkolinom (AChID) u koži podlaktice i mjerenjem vazodilatacije posredovane protokom (FMD) brahijalne arterije. Učinjena su mjerenja lipidnog profila u serumu, koncentracije protuupalnih i proupalnih citokina, koncentracije izoformi sintaza dušikovog(II) oksida (NOS) te biomarkera oksidativnog stresa prije i nakon dijetnog protokola.

**Rezultati:** Obogaćena, ali ne i obična kokošja jaja, značajno su poboljšala mikrovaskularni PORH i AChID te makrovaskularni FMD, povećala su serumsku koncentraciju inducibilnog NOS-a, snizila koncentraciju triglicerida te su snizila koncentraciju proupalnih citokina IL-17A i TGF-1 $\beta$  u odnosu na početna mjerenja. Konzumacija obogaćenih jaja nije imala značajan učinak na razinu oksidativnog stresa.

**Zaključak:** Ispitanici s kroničnim koronarnim sindromom mogu imati koristi od konzumacije obogaćenih kokošnjih jaja poboljšanjem lipidnog profila, stvarajući povoljniji protuupalni milje i poboljšavajući vaskularni odgovor ovisan o endotelu na mikrovaskularnoj 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 0.11 mg/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. Nakon završetka studija odradila je pripravnički staž u KBC-u Osijek, a nakon položenog stručnog ispita 2015. stekla je odobrenje 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, a specijalistički ispit položila je u siječnju 2024. 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. Ivana Lukić, Ivana; Mihić, Damir, Canetski Varzić, Silvija; Selthofer Relatić, Kristina; Zibar, Lada, Loinjak, Domagoj; Breškić Ćurić, Željka; klobičar, Lucija; Maričić, Lana; Septic Cardiomyopathy. *Rev. Cardiovasc. Med.* 2024, 25(1), 23. <https://doi.org/10.31083/j.rcm2501023>
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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.

## Poster

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 od 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 Univerzitetu 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 Acids-enriched Chicken Eggs Consumption on the Microcirculatory Function and Blood Biochemical Markers in Patients with Known Atherosclerotic Coronary Artery Disease - Preliminary Results // 13th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation - Abstract Book, 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, što 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.