Utjecaj konzumacije kokošjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA) na izražaj biljega upale i aktivacije endotela kod mladih zdravih ispitanika

Travančić, Anita

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:401815

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

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

Anita Travančić

UTJECAJ KONZUMACIJE KOKOŠJIH JAJA OBOGAĆENIH N-3 POLINEZASIĆENIM MASNIM KISELINAMA (PUFA) NA IZRAŽAJ BILJEGA UPALE I AKTIVACIJE ENDOTELA KOD MLADIH ZDRAVIH ISPITANIKA

Završni rad

Osijek, 2020.

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

Anita Travančić

UTJECAJ KONZUMACIJE KOKOŠJIH JAJA OBOGAĆENIH N-3 POLINEZASIĆENIM MASNIM KISELINAMA (PUFA) NA IZRAŽAJ BILJEGA UPALE I AKTIVACIJE ENDOTELA KOD MLADIH ZDRAVIH ISPITANIKA

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Osijek.

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

Rad ima 28 listova, 6 tablica i 4 slike.

SADRŽAJ

I. Popis kratica ..... **II**
1. UVOD **1**
1.1. Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija 1
1.2. Značaj n-3 i n-6 polinezasićenih masnih kiselina 3
1.3. Proizvodnja kokošjih jaja obogaćenih n-3 PUFA 5
1.4. Utjecaj n-3 PUFA na biljege upale i aktivacije endotela 6
2. HIPOTEZA **7**
3. CILJ **8**
4. ISPITANICI I METODE **9**
4.1. Populacija ispitanika 9
4.2. Protokol istraživanja 9
4.3. n-3 PUFA obogaćena jaja 10
4.4. Određivanje biljega upale i aktivacije endotela 11
4.5. Biokemijska mjerenja 14
4.6. Statističke metode 14
5. REZULTATI **15**
5.1. Karakteristike ispitanika 15
5.2. Biljezi upale i aktivacije endotela u mladih ispitanika 16
6. RASPRAVA **19**
7. ZAKLJUČAK **22**
9. ABSTRACT **24**
10. LITERATURA **25**
11. ŽIVOTOPIS **28**

I. Popis kratica

AA (engl. *arachidonic acid*) – arahidonska kiselina

ALA (engl. *α-linolenic acid*) – alfa-linolenska kiselina

BMI (engl. *body mass index*) – indeks tjelesne mase

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

DHA (engl. *docosahexaenoic acid*) – dokosaheksaenoična kiselina

EPA (engl. *eicosapentaenoic acid*) – eikosapentaenoična kiselina

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

HR (engl. *heart rate*) – brzina otkucaja srca

hsCRP (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*) – visokoosjetljivi C reaktivni protein

IFN-γ (engl. *interferon gamma*) – interferon gama

IL-10 (engl. *interleukin-10*) – interleukin-10

IL-17A (engl. *interleukin-17A*) – interleukin-17A

IL-21 (engl. *interlukin-21*)– interleukin-21

IL-22 (engl. *interluekin-22*) – interleukin-22

IL-23 (engl. *interlukin-23*) – interleukin-23

IL-6 (engl. *interleukin-6*) – interleukin-6

IL-9 (engl. *interleukin-9*) – interleukin-9

KONTROLNA – kontrolna skupina

KONTROLNA M – muški ispitanici kontrolne skupine

KONTROLNA Ž – ženske ispitanice kontrolne skupine

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

LAP (engl. *latency-associated peptide*) – peptid povezan s latencijom

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

MAP (engl. *mean arterial pressure*) – srednji arterijski tlak

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

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

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

NF-κB (engl. *nuclear factor κB*) – jezgreni čimbenik κB

n-3 PUFA – eksperimentalna skupina

n-3 PUFA M – muški ispitanici eksperimentalne skupine

n-3 PUFA Ž – ženske ispitanice eksperimentalne skupine

PGI2 (engl. *prostaglandin I2*) – prostaglandin serije 2

PGI3 (engl. *prostaglandin I3*) – prostaglandin serije 3

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

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

SD (engl. *standard deviation*) – standardna devijacija

SDF-1α (engl. *stromal cell-derived factor-1α*) – faktor-1α deriviran iz stromalnih stanica

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

sICAM-1 (engl. *soluble intercellular adhesion molecule-1*) – međustanična topiva adhezijska molekula-1

sVCAM-1 (engl. *soluble vascular cell adhesion molecule-1*) – vaskularna stanična topiva adhezijska molekula-1

TNF-α (engl. *tumor necrosis factor-α*) – tumor-nekrotizirajući faktor-α

UFA (engl. *unsaturated fatty acids*) – nezasićene masne kiseline

VEGF-A (engl. *vascular endothelial growth factor-A*) – vaskularni endotelni faktor rasta-A

VEGF-D (engl. *vascular endothelial growth factor-D*) – vaskularni endotelni faktor rasta-D

xMAP (eng. *multianalyte profilling*) – višeanalitičko profiliranje

ELISA (engl. *the enzyme-linked immunosorbent assay*) – enzimsko vezani imunoapsorbirajući esej

1. UVOD

1.1. Endotel, endotelna funkcija i disfunkcija

Endotel je svojom strukturom jednostavan, no funkcionalno vrlo složen organ. Prekriva unutarnje stijenke svih cirkulacijskih šupljina površine od 4000 do 7000 m^2 u sloju debljine od 0,5 do 1 μm, te ukupnog broja od 1 do 6 x 10^{13} endotelnih stanica. To je heterogena epitelna struktura visoke biološke dinamike i raznovrsnih metaboličkih aktivnosti s posebno naglašenim sposobnostima prilagodbe (1). U osnovi, endotelna stanica ima iste karakteristike kao i sve stanice ljudskog tijela. Njezinu strukturu čine citoplazma i organele koje okružuju jezgru, te stanična membrana koja je izgrađena od dvostrukog sloja fosfolipida odvojenih odjeljcima vode. U dvosloju ili na njemu nalaze se složeni proteini koji djeluju kao receptorski ili ionski kanali. Kroz citoplazmu prolaze različiti kontraktilni proteini: aktin, miozin, tropomiozin, α-aktin i drugi koji omogućuju motoričku aktivnost. Neki su organizirani kao strukture poput kortikalne mreže, aktinski filamentni sustav te prugasti snopovi vlaknastih miofibrila ili stresnih vlakana (2).

Uz općeprihvaćenu ulogu endotela u selektivnoj kontroli prometa tvari, proizvodnji strome međustaničnog matriksa i prevenciji zgrušavanja, endotelne stanice imaju čitav niz drugih važnih funkcija. Prepoznaju humoralne, mehaničke i hemodinamičke događaje te se na njih prilagođavaju akutnim i kroničnim promjenama. Endotel iskazuje sposobnosti moćne enzimatske barijere, uspješno regulira tonus i proliferacijski status arterijske mišićnice, kontrolira izlučivanje citokina, te stvaranje i ekspresiju adhezijskih molekula. U endotelnim se stanicama odvija i niz drugih važnih bioloških procesa – sintetiziraju se čimbenici rasta i agregacijsko-koagulacijskog puta, nastaju receptori za lipoproteine i inzulin, održavaju aktivnosti lipoproteinske lipaze i angiotenzin-konvertaze, metaboliziraju noradrenalin i serotonin, te stvaraju produkti arahidonske kiseline. Endotelne stanice tako posjeduju značajne mehaničke, metaboličke i sintetske funkcije. Također, svojim autokrinim, parakrinim i endokrinim lučenjem, one djeluju na niz staničnih linija – trombocite, leukocite i glatke mišićne stanice, ali i na druga, različito udaljena tkiva. Kao dio upravljačkog sustava sistemske homeostaze, endotelni sustav svojim značajem uvelike nadilazi izolirane, prostorno specifične uloge koje su mu dugi niz godina jedine pripisivane (1, 2).

S druge strane, poremećaj endotela obuhvaća niz patofizioloških stanja, u rasponu od početne lokalizirane mehaničke ozljede žilne intime do neprimjerene, perzistentne endotelne aktivacije važne za razvoj brojnih klinički manifestnih patoloških stanja. Endotelna disfunkcija razvija se pod djelovanjem mehaničkih podražaja brojnih bioloških medijatora poput interleukina-1 (IL-1), interleukina-2 (IL-2), tumor-nekrotizirajućeg faktora-α (TNF-α), ali i kao izravni odgovor na većinu poznatih kardiovaskularnih rizičnih čimbenika (3 – 7). Uz već spomenutu aktivaciju citokina u inflamatornim procesima, u kardiovaskularne rizične čimbenike ubrajaju se slobodni radikali kisika i/ili oksidativni stres te glikozilacija metabolita prisutnih u dijabetesu i procesu starenja, također, pušenje i hipertenzija, kronična hiperhomocisteinemija i/ili hiperkolesterolemija, te povišena koncentracija plazmatskih okisdiranih lipoproteina male gustoće i njihova akumulacija u zidu krvne žile. Osnovu endotelne disfunkcije čini njegova neprimjerena aktivacija. Termin „aktivacija" potječe iz rezultata *in vitro* istraživanja koja su utvrdila da različiti štetni podražaji mogu izazvati nespecifičnu ekspresiju endotelnih aktivacijskih antigena (8). Endotelne stanice izražavaju integriranu reakciju na ozljedu. Fenotip je kod neaktivirane, „mirne" endotelne stanice antikoagulantni i vazodilatacijski, a aktivacija je povezana s istodobnim izražavanjem upalnih, prokoagulantnih i vazokonstrikcijskih svojstava (4, 9, 10).

Budući da u svijetu, pa tako i u Republici Hrvatskoj, vodeći uzrok smrtnosti predstavljaju upravo kardiovaskularna oboljenja, za procjenu statusa endotelne funkcije zainteresirani su brojni stručnjaci i istraživači. Iz tog razloga istraživači proučavaju promjene endotela, koje u konačnici vode k razvitku kardiovaskularnih bolesti. Klinička saznanja i rad rezultirali su razvojem različitih dijagnostičkih postupaka kojima se omogućuje uvid u status endotela. Najčešće korištene skupine postupaka usmjerene su definiranju vaskularne reaktivnosti, kao i analizi bazalnih vrijednosti cirkulirajućih endotelnih biljega. Dva izrazito bitna faktora pri odabiru testa jesu njegova dostupnost i neinvazivnost, te jedna od analitičkih tehnika koja se već duži niz godina upotrebljava i koja zadovoljava dva ranije navedena faktora – imunoanaliza slična klasičnoj enzimsko vezanoj imunoapsorbirajućoj analizi. Svrha te imunoanalize jest detekcija širokog spektra proteinskih biomolekula koje su vrlo važne za karakterizaciju upalnog stanja endotela. Iako se velik broj istraživanja vezanih uz povezivanje utjecaja određene funkcionalne hrane u svrhu poboljšanja funkcije endotela ispituje kod već zabilježenih bolesnika, nastoji se sve više istraživati utjecaj na poboljšanje funkcije endotela kod mladih zdravih ispitanika kako bi se u budućnosti pokušao reducirati broj oboljelih u kradiovaskularnoj skupini (11, 12).

1.2. Značaj n-3 i n-6 polinezasićenih masnih kiselina

Masne kiseline u prirodnim mastima i uljima kemijski su građene od ugljikova lanca, s terminalnom metilnom grupom na jednom i karboksilnom grupom na drugom kraju lanca. Prema strukturi razlikuju se zasićene (engl. *saturated fatty acids*) i nezasićene masne kiseline (engl. *unsaturated fatty acids*), odnosno u molekuli zasićenih masnih kiselina svi atomi ugljika međusobno su povezani jednostrukim vezama, a na svakom ugljikovu atomu nalazi se maksimalno mogući broj vodikovih atoma. Takva je struktura stabilna te manje podložna kemijskim reakcijama. U drugom slučaju, masnim kiselinama može nedostajati jedan par vodikovih atomu u lancu, odnosno masna kiselina sadrži jednu dvostruku vezu te se još naziva i mononezasićena (engl. *monounsaturated fatty acids*). Višestruko nezasićene ili polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*) u ugljikovu lancu sadrže više od jedne nezasićene ili dvostruke veze. Nezasićene masne kiseline nestabilnije su zbog mogućnosti pucanja dvostrukih veza, a reaktivnost im raste s porastom broja dvostrukih veza (13).

Klasifikacija PUFA (engl. *polyunsaturated fatty acids*) vrši se temeljem dužine ugljikova lanca, broja dvostrukih veza i lokacije prve dvostruke veze u ugljikovu lancu. N-broj u nomenklaturi PUFA uveden je radi njihove identifikacije, a označava položaj prve dvostruke veze u ugljikovu lancu brojeno od metilne skupine (14). Osnovni je predstavnik skupine n-6 PUFA (engl. n-*6 polyunsaturated fatty acids*) linolna kiselina (LA (engl. *linoleic acid*), C 18 : 2 n-6), a skupine n-3 PUFA (engl. n-*3 polyunsaturated fatty acids*) α-linolenska kiselina (ALA (engl. *α-linolenic acid*), C 18 : 3 n-3). Čovjek i drugi sisavci ne mogu sintetizirati LA i ALA zbog nepostojanja potrebnih enzima, te ih moraju unositi u organizam putem hrane, što i uvjetuje njihovu esencijalnost (15).

U organizmu LA i ALA mogu se metabolizirati u više polinezasićene masne kiseline djelovanjem desaturacijskih i elongacijskih enzima (16). U jetri, procesima elongacije i desaturacije iz LA nastaju ostale polinezasićene masne kiseline n-6 serije, poput arahidonske kiseline (AA (engl. *arachidonic acid*), 20 : 4 n-6), dok iz ALA u organizmu nastaju polinezasićene masne kiseline n-3 serije, kao što su eikosapentaenoična (EPA (engl. *eicosapentaenoic acid*), 20 : 5, n-3) i dokosaheksaenoična (DHA (engl. *docosahexaenoic acid*), 22 : 6, n-3) kiselina (15). PUFA obje n-skupine dolaze u sastavu fosfolipida svih staničnih membrana gdje imaju značajnu ulogu u održavanju elastičnosti membrana. U nedostatku PUFA u membrane se ugrađuje više zasićenih masnih kiselina, čime se smanjuje fluidnost i stabilnost membrana. To može rezultirati povećanom propusnošću tkiva uz gubitak vode i hranjivih tvari,

promjenama u aktivnosti enzima, prijenosu hormonskih signala i drugim funkcijama staničnih membrana (17).

Arahidonska i eikosapentaenoična kiselina imaju važnu funkciju u sintezi eikosanoida. To su tkivni hormoni s lokalnim nastajanjem i djelovanjem, koji u različitim tkivima reguliraju brojne fiziološke procese, primjerice upalne procese i imunološki odgovor. Eikosanoidi koji nastaju u krvožilnome sustavu su: tromboksani u membranama krvnih pločica (trombocita) i prostaglandini koje proizvodi endotel stijenki krvnih žila (15). Iz AA, nastaju prostaglandini i tromboksani serije-2 i leukotrieni serije-4, dok iz EPA nastaju prostaglandini i tromboksani serije-3 i leukotrieni serije-5. Spoznaje o ulozi PUFA u razvoju kardiovaskularnih bolesti i upalnim procesima proizlaze iz razlika u djelovanju eikosanoida na potencijal nakupljanja trombocita i stvaranja ugrušaka u krvnim žilama te iz razlika u djelovanju na intenzitet upalnog procesa (15). Ukratko, iz AA nastaje tromboksan A2, koji je snažan vazokonstriktor te izaziva nakupljanje trombocita i hemostazu, što fiziološki izaziva grušanje krvi, a u patološkim okolnostima trombozu. Suprotno tomu, iz EPA nastaje trombogeno neaktivni tromboksan A3. Uz to, iz AA nastaje prostaglandin PGI2 (engl. *prostaglandin I2*) , a iz EPA prostaglandin PGI3 (engl. *prostaglandin I3*). Oba djeluju vazodilatacijski i iskazuju antiagregatni učinak na krvne pločice. Također, iz AA u neutrofilima nastaje leukotrien B4, koji ima snažno djelovanje u izazivanju upalne reakcije, dok iz EPA nastaje leukotrien B5, čije je proupalno djelovanje slabo. Prehrana bogata EPA-om snižava sadržaj AA u membranama svih tjelesnih stanica, umanjuje sintezu tromboksana A3 i prostaglandina PGI2 u krvnim pločicama i stijenkama krvnih žila, a u neutrofilima sintezu leukotriena B4, istovremeno povećavajući sintezu tromboksana A3, prostaglandina PGI3 i leukotriena B5. U takvim okolnostima u krvnim žilama prevladava djelovanje prostaglandina PGI3 koji ne potiče nastanak krvnih ugruška te djeluje preventivno na razvitak patoloških promjena na krvnim žilama (15, 19).

Razine spomenutih eikosanoida u organizmu generalno ovise o relativnim količinama n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina u prehrani. U proteklih se nekoliko desetljeća globalna zamjena zasićenih životinjskih masti u prehrani nezasićenim biljnim uljima odvijala kroz povećanje unosa LA – osnovne esencijalne PUFA n-6 skupine, koja se u velikim količinama nalazi u uljima suncokreta te drugim jestivim uljima (15, 18). Pored toga, proizvodnja mesa, temeljena na intenzivnom tovu žitaricama koje su također bogat izvor LA, dovodi do mesa bogatog n-6 PUFA, uz istovremeno smanjenje sadržaja n-3 PUFA. Slične promjene dogodile su se i u sastavu PUFA konzumnih jaja i ribe iz intenzivnoga uzgoja (15). Ove promjene u relativno kratkom vremenskom razdoblju dovele su do toga da se unos n-6 PUFA u prehrani

stanovništva, posebice u razvijenim zemljama, jako povećao u odnosu na unos n-3 PUFA. Procjenjuje se da je prapovijesni razvoj roda Homo i kasniji razvoj modernog čovjeka kao vrste tekao uz prehranu koja je sadržavala podjednaku količinu esencijalnih n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (n-6 : n-3 odnos 1 – 2 : 1), dok je u prehrani današnjih ljudi taj odnos znatno promijenjen u korist n-6 kiselina i iznosi 10 do 20 i više : 1 (15, 18). Gubitak ravnoteže n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina u prehrani ljudi u posljednjih 100 – 150 godina može dijelom objasniti uzroke pojave i stalnog porasta tipičnih bolesti moderne civilizacije kao što su krvožilno-srčane bolesti, alergije i različita maligna oboljenja (18, 20).

1.3. Proizvodnja kokošjih jaja obogaćenih n-3 PUFA

Najvažnije masne kiseline u obrocima peradi su α-linolenska (ALA), eikosapentaenska (EPA) i dokosaheksaenska (DHA). Lan, orasi, repica i zeleno lisnato povrće najbogatiji su izvori ALA masne kiseline, dok su riba i ulja morskih organizama najbogatiji izvori EPA i DHA. Kokoši lako apsorbiraju i prenose n-3 PUFA iz hrane i akumuliraju ih u žumanjak. U prosjeku je potrebno 2 tjedna hranidbe kokoši posebno dizajniranim smjesama da bi one počele nesti jaja s povećanim sadržajem n-3 PUFA (21). Povećanje količine n-3 PUFA u jajima ostvaruje se hranjenjem nesilica krmivom biljnoga i životinjskog podrijetla. Shodno tome, profil masnih kiselina u žumanjcima jaja ovisi o krmivima koja se upotrebljavaju za obroke nesilica, podrijetlu i dobi nesilica te razdoblju nesivosti. Najkvalitetniji profil masnih kiselina u jajima obogaćenima n-3 PUFA postiže se upotrebom različitih kombinacija životinjskih i biljnih krmiva (22).

Kralik i suradnici s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku uspostavili su proizvodnju kokošjih jaja prirodno obogaćenih n-3 PUFA. Proveli su istraživanje na 80 nesilica starih 50 tjedana. Kokoši su podijeljene u dvije jednake skupine, kontrolnu i eksperimentalnu. Kokošima u kontrolnoj skupini prehrana je dopunjena suncokretovim uljem (6 %), dok su kokoši u eksperimentalnoj grupi dobile kombinaciju ulja uljane repice (4 %) i ribljega ulja (2 %). Smjesa kojom je hranjena eksperimentalna skupina sadržavala je 1,52 % EPA i 2,91 % DHA od ukupnoga sadržaja masnih kiselina, a one potječu iz ribljega ulja. Smjesa kojom je hranjena kontrolna skupina kokošiju nije sadržavala n-3 PUFA. Rezultati istraživanja pokazali su da žumanjci jaja nesilica iz kontrolne skupine sadržavaju značajno veću koncentraciju n-6 PUFA u usporedbi sa žumanjcima jaja nesilica iz eksperimentalne skupine. Žumanjci jaja kokošiju iz eksperimentalne skupine imali su 2,79 puta veći sadržaj α-linolenske kiseline nego žumanjci kontrolne skupine. Najznačajnije povećana

masna kiselina u žumanjcima eksperimentalne skupine bila je DHA, čiji je sadržaj bio 2,02 puta veći od sadržaja α-linolenske kiseline. Prisutnost DHA u žumanjcima jaja nesilica kontrolne skupine nije zamijećena. Naposljetku, postignuti omjer n-6 PUFA : n-3 PUFA u njihovim jajima bio je 1 : 11,5, a svako pojedino jaje s povećanim udjelom n-3 PUFA sadržavalo je 155 mg polinezasićenih masnih kiselina. Nisu utvrđene razlike s obzirom na proizvodna obilježja (težina nesilica, konzumacija hrane, nesivost) i kakvoću jaja (težina jaja, bjelanjka, žumanjka, ljuske, debljinu ljuske, omjer bjelanjak : žumanjak i relativni udjeli osnovnih dijelova jaja) između kontrolne i eksperimentalne skupine (23).

1.4. Utjecaj n-3 PUFA na biljege upale i aktivacije endotela

Upala se danas smatra glavnim čimbenikom koji doprinosi mehanizmima u podlozi ateroskleroze, a terapije n-3 polinezasićenim masnim kiselinama povezuju se sa smanjenjem razine TNF-alfa i interleukina-1 u plazmi, što ukazuje na protuupalno djelovanje. Hrana bogata n-3 polinezasićenim masnim kiselinama spada u imunomodulacijsku prehranu. Unos različitih vrsta polinezasićenih masnih kiselina prehranom uvjetuje sastav masnih kiselina membranskih fosfolipida u imunološkim stanicama i stanicama ciljnih tkiva na koje djeluju citokini. Djelovanjem fosfolipaza, koje se aktiviraju kao dio odgovora na traumu ili infekciju, proizvode se prostaglandini i leukotrieni. Iz toga slijedi široka lepeza fizioloških i metaboličkih promjena. Davanje različitih masnih kiselina rezultira različitim profilima oslobođenih prostaglandina i leukotriena, koji će u stanovitoj mjeri utjecati na jačinu upalnog odgovora. Masti bogate n-3 masnim kiselinama, jednostruko nezasićene masne kiseline ili pak one siromašne n-6 masnim kiselinama smanjuju stopu odgovora na citokine i upalu (24).

2. HIPOTEZA

Prehrana koja uključuje kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama blagotvorno utječe na izražaj biljega upale i aktivacije endotela, odnosno na promjene u vaskularnom endotelu i vaskularnoj funkciji mladih zdravih ispitanika koji su konzumirali navedena jaja u usporedbi s istim mjerenjem prije navedenog studijskog protokola.

3. CILJ

Cilj je ovoga istraživanja utvrditi izražaj proinflamatornih biljega i biljega aktivacije endotela (IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23, IL-9, IL-10, SDF-1α, LAP, VEGF-A,VEGF-D, sICAM-1 i sVCAM-1) u serumu mladih zdravih ispitanika prije i nakon konzumacije jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama u usporedbi s grupom koja će konzumirati obična, kontrolna jaja.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Populacija ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo 40 zdravih mladih osoba, 20 žena i 20 muškaraca, studenata Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, koji su regrutirani preko oglasa na Medicinskome fakultetu Osijek. Kriteriji za isključivanje ispitanika iz istraživanja bile su od ranije poznate bolesti poput hipertenzije, koronarnih bolesti, šećerne bolesti, hiperlipidemije, oštećenja bubrega te cerebrovaskularne bolesti perifernih krvnih žila. Nijedan od ispitanika nije uzimao lijekove koji bi mogli utjecati na njihov kardiovaskularni sustav. Svi su ispitanici bili obavješteni o ispitivanju te su potpisali informirani pristanak. Protokol i postupak istraživanja zadovoljili su standarde najnovijega izdanja Helsinške deklaracije, a istraživanje je odobreno od strane Etičkoga povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku (klasa: 602-04/20-08/07, broj: 2158-61-07-20-99).

4.2. Protokol istraživanja

To je bilo randomizirano, dvostruko slijepo, placebo kontrolirano istraživanje. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, kontrolnu (KONTROLNA) i eksperimentalnu (n-3 PUFA) skupinu. Eksperimentalna se skupina sastojala od 19 ispitanika, 10 žena (n-3 PUFA Ž) i 9 muškaraca (n-3 PUFA M). Kontrolna se skupina sastojala od 21 ispitanika, 10 žena (KONTROLNA Ž) i 11 muškaraca (KONTROLNA M). Ni istraživač ni ispitanici nisu znali kojoj skupini pripada koji ispitanik sve do završetka protokola. Protokol je trajao 3 tjedna. Tijekom ta tri tjedna ispitanici su jeli 3 kokošja jaja dnevno. Ispitanici u n-3 PUFA skupini dobili su kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA-om, dok su ispitanici KONTROLNE skupine dobili uobičajena kokošja jaja, proizvedena na istoj peradarskoj farmi Marijančanka d.o.o. Marijanci. I n-3 PUFA obogaćena jaja i uobičajena kokošja jaja bila su iste M komercijalne veličine, kako se ne bi uočila razlika. Mjerenja su izvedena prvoga i posljednjega dana trotjednoga protokola. Koncentracije upalnih biljega (IL-1α, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-α...) izmjerene su u serumu putem ProcartaPlex Multiplex Immunoassay sustava prvog i posljednjeg dana protokola. Uzorci krvi za određivanje krvne slike ispitanika prikupljeni su prvoga i posljednjega dana trotjednoga protokola nakon što su ispitanici 30 minuta mirovali u polusjedećem položaju. Arterijski je tlak, također, mjeren prvoga i posljednjega dana protokola nakon što su ispitanici 15 minuta mirovali u sjedećem položaju. Pri mjerenju arterijskoga tlaka ispitanicima rabljen je poluautomatski tlakomjer. Također, prvog i posljednjega dana protokola ispitanicima su

izmjerene tjelesna visina i tjelesna težina, iz čega je izračunat indeks tjelesne mase (BMI (engl. *body mass index*)).

4.3. n-3 PUFA obogaćena jaja

Jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama proizvedena su na temelju patenta Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta J. J. Strosmmayera u Osijeku. U njihovu je protokolu suncokretovo ulje iz uobičajene smjese za prehranu nesilica zamijenjeno uljem uljane repice (4 %) i ribljim uljem (2 %). Ta je zamjena imala vrlo značajan utjecaj na profil masnih kiselina u jajima nesilica. Ovakav način prehrane nesilica doveo je do smanjenja koncentracije n-6 PUFA i povećanja sadržaja n-3 PUFA te povoljnijeg omjera n-6 : n-3 PUFA, što je omogućilo proizvodnju kokošjih jaja s izrazito povoljnijim profilom masnih kiselina za zdravlje čovjeka. Svako je jaje sadržavalo 585,2 mg n-3 PUFA (Tablica 1.) (23).

Tablica 1. Profil masnih kiselina smjese za hranjenje kokoški i jestivih dijelova jaja

	Smjesa za hranjenje (n = 3) (g/100 g ukupnih masnih kiselina)		**Jaja (n = 10) (mg/100 g jajeta[1])**	
Masna kiselina	**Kontrolna**	**n-3 PUFA**	**Kontrolna**	**n-3 PUFA**
∑SFA	16,6 (0,2)	16,8 (0,2)	2082,6 (83,1)	2162,1 (52,6)
∑MUFA	26,5 (0,1)	25,9 (0,1)	2669,6 (84,8)	2917,5 (137,9) *
∑n-6 PUFA	51,9 (0,1) *	23,4 (0,2)	1417,7 (119,3) *	1182,6 (111,9)
LA	51,9 (0,1) *	23,2 (0,2)	1274,4 (127,3)	1106,6 (108,6)
AA	n.d.	0,17 (0,01)	125,4 (6,1) *	67,1 (3,6)
∑N-3 PUFA	5,05 (0,04)	33,9 (0,3) *	138,2 (28,4)	585,2 (77,1) *
ALA	5,05 (0,04)	28,5 (0,2) *	59,9 (16,1)	384,2 (64,0) *
EPA	n.d.	1,87 (0,03)	n.d.	25,2 (3,2)
DHA	n.d.	3,54 (0,07)	78,3 (13,8)	175,8 (25,9) *
∑n-6/n-3 PUFA	10,3 *	0,69	10,3 *	2,02

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

n - broj analiza; ∑SFA - zasićene masne kiseline; ∑MUFA - mononezasićene masne kiseline; ∑n-6 PUFA - polinezasićene masne kiseline; LA - linolna kiselina; AA - arahidonska kiselina; ∑n-3 PUFA - polinezasićene masne kiseline; ALA - alfa-linolenska kiselina; EPA - eikosapentaenoična kiselina; DHA - dokosaheksaenoična kiselina; n.d. - nije detektabilno.

[1]jestivi dio; * $p < 0,05$ kontrolna vs. n-3 PUFA.

4.4. Određivanje biljega upale i aktivacije endotela

Ispitanicima je prvoga i posljednjega dana trotjednoga protokola uzorkovana venska krv uvođenjem braunile u svrhu dobivanja seruma. Uzorak venske krvi uzorkovan je nakon pola sata mirovanja u mirnoj i tihoj prostoriji. Vrijednosti biljega upale i aktivacije endotela, odnosno interferon gama (INF-γ), tumor-nekrotizirajući faktor alfa (TNF-α), interleukini 6, 9, 10, 17A, 21, 22, 23, međustanična adhezijska molekula 1 (sICAM-1), krvožilna adhezijska molekula 1 (sVCAM-1), faktor-1 alfa deriviran iz stromalnih stanica (SDF-1α), peptid povezan s latencijom (LAP), vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGF-A), te vaskularni endotelni faktor rasta D (VEGF-D) izmjereni su putem ProcartaPlex Multiplex Immunoassay sustava. Invitrogen ProcartaPlex Multiplex (Slika 1.) imunološki testovi koriste tehnologiju Luminex xMAP (eng. *multianalyte profilling*) kako bi omogućili istodobno detekciju i kvantifikaciju više proteina u jednom uzorku od 25 µL seruma. Kombinira se efikasnost višestruke kvantifikacije s preciznošću, osjetljivošću, ponovljivošću i jednostavnošću ELISA (engl. *the enzyme-linked immunosorbent assay*) testa (25).

Slika 1. Humani ProcartaPlex™ kit

Izvor: original autorice rada

Humani ProcartaPlex kit sadrži: 2 bočice humane standardne smjese A (liofilizirane), 2 bočice humane standardne smjese B (liofilizirane), 2 bočice humane standardne smjese F (liofilizirane), 1 bočicu mješavine za hvatanje zrna, 1 bočicu biotinilirane smjese protutijela za detekciju, 1 bocu pufera za čitanje, 1 bocu pufera za pranje, 1 bočicu streptavidin-fikoeritrina,

1 bocu univerzalnog pufera za ispitivanje, 1 bočicu razrjeđivača protutijela za detekciju, traku od 8 cijevi, magnetnu podlogu, te crnu ploču s ravnim dnom s 96 jažica (Slika 2. i 3.) (25).

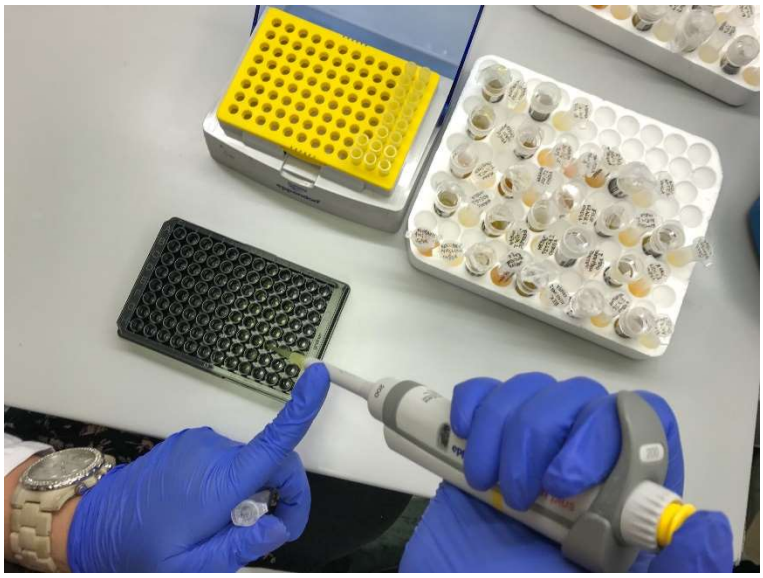
Slika 2. Sadržaj humanog ProcartaPlex™ kita

Izvor: original autorice rada

Slika 3. Magnetna podloga za crnu ploču s jažicama

Izvor: original autorice rada

ProcartaPlex Multiplex imunološki testovi za platformu Luminex izvode se na sličan način kao i tradicionalni ELISA testovi, ali s mogućnošću kvantifikacije do 65 ciljnih proteina iz jednog uzorka. Luminex zrnca u ProcartaPlex testu obojena su iznutra preciznim omjerima crvene i infracrvene fluorofore kako bi se stvorili spektralno jedinstveni potpisi koji se mogu prepoznati pomoću Luminex xMAP sustava za detekciju, a u ovome slučaju to je Luminex 200. Slično kao sendvič ELISA, test ProcartaPlex koristi podudarne parove antitijela za identifikaciju proteina od interesa. U višestrukom pokusu, svaka spektralno jedinstvena kuglica obilježena je antitijelima specifičnima za jedan ciljni protein, a vezani proteini identificirani su s biotiniliranim antitijelima i streptavidin-fikoeritrinom. Konjugacija protein-specifičnih antitijela na različitu kuglicu omogućuje analizu više ciljnih proteina u jednoj jažici. Najznačajnija je razlika između ProcartaPlex testa i ELISA u tome što je protutijelo za hvatanje u ProcartaPlex testu konjugirano na zrno i nije adsorbirano na mikroploči, pa reagensi ProcartaPlex testa slobodno plutaju u otopini. Za identifikaciju instrument Luminex 200 koristi dva lasera, jedan za razlikovanje spektralnog potpisa svake kuglice, a drugi za kvantificiranje količine fikoeritrin fluorescencije, koja je proporcionalna količini proteina prisutnog u uzorku. ProcartaPlex multiplex testovi mogu profilirati više ciljnih proteina koristeći znatno manje uzorka u istome vremenu koje je potrebno za izvođenje tradicionalnog ELISA sendviča (Slika 4.) (25).



Slika 4. Pipetiranje uzoraka seruma na crnu ploču s 96 jažica

Izvor: original autorice rada

4.5. Biokemijska mjerenja

U uzorcima krvi ispitanika standardnim su metodama određene vrijednosti eritrocita, hemoglobina, hematokrita, leukocita, trombocita, osim toga, izmjerene su koncentracije uree, kreatinina, natrija, kalija, kolesterola, triglicerida, lipoproteina niske gustoće (LDL kolesterol), lipoproteina visoke gustoće (HDL kolesterol), koncentracije glukoze u krvi natašte te visokoosjetljivi C reaktivni protein (hsCRP). Mjerenja su napravljena na Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Osijek.

4.6. Statističke metode

Veličina uzorka određena je pomoću Sigma Plot v11.0 programa. Za snagu testa od 0,8, p vrijednost manju od 0,05 i uz minimalnu očekivanu razliku od 0,25 broj ispitanika (uzoraka) po grupi iznosi 10. Svi rezultati prikazani su kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD). Za usporedbu rezultata mjerenja upotrijebljen je test za jednosmjernu analizu varijanci za nezavisne uzorke One-Way ANOVA, a u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka Holm-Sidak ili Kruskal-Wallisov test. Za statističku analizu upotrijebljen je Sigma Plot v12.0 (Systat Software, Inc, Chicago, USA). Statistička je značajnost određena na $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitanika

U istraživanju je sudjelovalo 40 zdravih mladih osoba, 20 žena i 20 muškaraca, srednje dobi od 24 godine, standardne devijacije za žene 3, a za muškarce 2. Tablica 2 prikazuje početne karakteristike ispitanika u pojedinoj skupini.

Tablica 2. Početne kliničke karakteristike ispitivane populacije

	Kontrolna	**n-3 PUFA**
N (Ž/M)	21 (10/11)	19 (10/9)
starost (godine)	24 (3)	24 (2)
BMI (kg/m2)	24,3 (3,1)	23,3 (3,6)
SBP (mmHg)	117 (10)	115 (11)
DBP (mmHg)	77 (8)	77 (8)
MAP (mmHg)	90 (7)	90 (7)
HR (otkucaji u minuti)	77 (11)	78 (13)
eritrociti (x10E^{12}/L)	4,8 (0,3)	4,7 (0,4)
hemoglobin (g/L)	140 (11)	142 (13)
hematokrit (%)	41,0 (2,8)	41,5 (3,4)
leukociti (x10E^{9}/L)	6,2 (1,4)	6,3 (1,4)
trombociti (x10E^{9}/L)	256 (66)	225 (36)
urea (mmol/L)	5,3 (1,3)	5,7 (1,3)
kreatinin (µmol/L)	79 (17)	83 (18)
natrij (mmol/L)	138 (2)	138 (2)
kalij (mmol/L)	4,1 (0,2)	4,2 (0,2)
glukoza (mmol/L)	4,8 (0,6)	4,6 (0,8
hsCRP (mg/L)	1,6 (2,2)	1,3 (1,2)
kolesterol (mmol/L)	5,2 (0,9)	4,6 (0,9)
trigliceridi (mmol/L)	1,1 (0,5)	1,3 (1,0)
HDL kolesterol (mmol/L)	1,5 (0,4)	1,3 (0,2)
LDL kolesterol (mmol/L)	3,1 (0,7)	2,7 (0,6)

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

N - broj sudionika; Ž - žene; M - muškarci; BMI – indeks tjelesne mase; SBP - sistolički arterijski tlak; DBP - dijastolički arterijski tlak; MAP - srednji arterijski tlak; HR - brzina otkucaja srca; hsCRP - visokoosjetljivi C-reaktivni protein; HDL - lipoprotein visoke gustoće; LDL - lipoprotein niske gustoće.

5.2. Biljezi upale i aktivacije endotela u mladih ispitanika

Nakon provedenog protokola uočene su određene promjene vrijednosti koncentracije serumskih proteina unutar iste grupe te između n-3 PUFA i KONTROLNE grupe. Tablica 3 prikazuje promjene vrijednosti serumskih koncentracija proupalnih i protuupalnih citokina, u ovom slučaju interleukina. Statistički značajna razlika uočena je u n-3 PUFA grupi prije i nakon konzumacije n-3 PUFA obogaćenih kokošjih jaja za izmjerenu vrijednost protuupalnog citokina interleukina-10. Vrijednost se statistički značajno povećala u odnosnu na izmjerenu vrijednost prije konzumacije n-3 PUFA kokošjih jaja te je uočena, također, statistički značajna razlika istog interleukina između KONTROLNE i n-3 PUFA grupe. Koncentracija proupalnog interleukina-17A statistički se značajno povećala unutar KONTROLNE grupe nakon konzumacije uobičajenih kokošjih jaja, kao i vrijednost koncentracije interleukina-10 unutar iste grupe.

Tablica 3. Utjecaj konzumacije uobičajenih (KONTROLNA) i n-3 PUFA kokošjih jaja (n-3 PUFA) na serumske koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina (interleukina)

	KONTROLNA		**n-3 PUFA**	
	prije	poslije	prije	poslije
IL-17A (pg/mL)	7,26 (4,77)	9,73 (4,68) †	6,63 (2,57)	9,22 (8,89)
IL-6 (pg/mL)	32,4 (12,9)	38,8 (17,1)	32,6 (13,3)	45,8 (28,5)
IL-21 (pg/mL)	42,3 (30,1)	46,8 (30,5)	51,6 (48,2)	80,7 (47,4)
IL-22 (pg/mL)	31,6 (21,8)	41,2 (34,3)	36,5 (47,3)	76,2 (59,2)
IL-23 (pg/mL)	3,58 (0,50)	3,67 (0,54)	3,50 (0,31)	3,98 (1,08)
IL-9 (pg/mL)	4,93 (4,66)	5,90 (5,22)	3,95 (2,10)	7,61 (11,68)
IL-10 (pg/mL)	2,60 (1,14)	3,23 (1,29) †	2,74 (1,49)	6,73 (4,60) *†

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

IL-17A - interleukin 17A; IL-6 - interleukin 6; IL-21 - interleukin 21; IL-22 - interleukin 22; IL-23 - interleukin 23; IL-9 - interleukin 9; IL-10 - interleukin 10.

* $p < 0.05$ razlika između KONTROLNE i n-3 PUFA grupe; † $p < 0.05$ razlika između mjerenja prije i poslije unutar iste grupe.

Iz Tablice 4 vidljiva je promjena unutar n-3 PUFA grupe za izmjerene vrijednosti proupalnog interferona-γ prije i nakon konzumacije n-3 PUFA obogaćenih kokošjih jaja. Koncentracija se statistički značajno smanjila nakon trotjedne konzumacije n-3 PUFA obogaćenih kokošjih jaja. Iz Tablice 5 nije vidljiva statistički značajna razlika ni unutar iste grupe ni između KONTROLNE i n-3 PUFA grupe.

Tablica 4. Utjecaj konzumacije uobičajenih (KONTROLNA) i n-3 obogaćenih kokošjih jaja (n-3 PUFA) na serumske koncentracije proupalnih i protuupalnih citokina (kemokina i interferona)

	KONTROLNA		**n-3 PUFA**	
	prije	poslije	prije	poslije
IFN-γ (pg/mL)	14,3 (8,7)	16,6 (9,9)	31,9 (31,9) †	12,2 (5,5)
TNF-α (pg/mL)	11,10 (4,39)	13,78 (6,11)	9,14 (2,97)	17,91 (16,43)
SDF-1α (ng/mL)	0,95 (0,21)	0,83 (0,32)	1,27 (0,58)	0,76 (0,41)

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

IFNγ - interferon gama; TNF-α - faktor tumorske nekroze alfa; SDF-1α – faktor 1 alfa dobiven iz stromalnih stanica

* $p < 0.05$ razlika između KONTROLNE i n-3 PUFA grupe; † $p < 0.05$ razlika između mjerenja prije i poslije unutar iste grupe.

Tablica 5. Utjecaj konzumacije uobičajenih (KONTROLNA) i n-3 obogaćenih kokošjih jaja (n-3 PUFA) na serumske koncentracije proupalnih i protuupalnih topivih adhezijskih molekula

	KONTRLNA		**n-3 PUFA**	
	prije	poslije	prije	poslije
sICAM-1 (ng/mL)	91,5 (51,2)	95,2 (50,2)	103,2 (46,5)	107,0 (49,6)
sVCAM-1 (ng/mL)	50,7 (17,7)	48,2 (18,7)	53,0 (23,1)	55,1 (21,9)

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

sICAM-1 - međustanična topiva adhezijska molekula 1; sVCAM-1 - vaskularna stanična topiva adhezijska molekula 1.

* $p < 0.05$ razlika između KONTROLNE i n-3 PUFA grupe; † $p < 0.05$ razlika između mjerenja prije i poslije unutar iste grupe.

Iz Tablice 6 vidljiva je statistički značajna razlika vrijednosti koncentracije proupalnog faktora rasta VEGF-A unutar KONTROLNE grupe prije i nakon konzumacije uobičajenih kokošjih jaja. Vrijednost VEGF-A statistički se značajno povećala. Nadalje, između n-3 PUFA i KONTROLNE grupe statistički je značajna razlika za vrijednost koncentracije proupalnog VEGF-D faktora rasta.

Tablica 6. Utjecaj konzumacije uobičajenih (KONTROLNA) i n-3 obogaćenih kokošjih jaja (n-3 PUFA) na serumske koncentracije proupalnih i protuupalnih faktora rasta

	KONTROLNA		**n-3 PUFA**	
	prije	poslije	prije	poslije
LAP (ng/mL)	32,5 (16,8)	27,4 (11,1)	30,3 (11,8)	29,4 (15,9)
VEGF-A (pg/mL)	611,5 (480,9)	684,3 (465,9) †	527,8 (331,9)	705,1 (602,6)
VEGF-D (pg/mL)	0,43 (0,12)	0,44 (0,14)	0,53 (0,13) *	0,50 (0,30)

Podatci su prikazani kao aritmetička sredina i standardna devijacija (SD).

LAP - peptid povezan s latencijom; VEGF-A - vaskularni endotelni faktor rasta A; VEGF-D - vaskularni endotelni faktor rasta D.

* $p < 0.05$ razlika između KONTROLNE i n-3 PUFA grupe; † $p < 0.05$ razlika između mjerenja prije i poslije unutar iste grupe.

6. RASPRAVA

Najvažniji je rezultat ove studije da je već tri tjedna konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja značajno povećalo koncentraciju protuupalnog interleukina-10 u odnosu na vrijednost koncentracije prije konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja kod mladih zdravih ispitanika. Vrijednost interlekuina-10 u n-3 PUFA skupini nakon istraživanja povećala se približno dva i pol puta u odnosu na izmjerenu vrijednost prije konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja. Vrijednost interleukina-10 kod n-3 PUFA skupine nakon provedenog istraživanja dvostruko je veća nego izmjerena vrijednost kod KONTROLNE skupine. Također, zanimljiv je rezultat da se koncentracija proupalnog interleukina-17A značajno povećala kod KONTROLNE skupine u odnosu na vrijednost prije trotjedne konzumacije uobičajenih kokošjih jaja. Vrijednost proupalnog interferona-γ značajno se smanjila kod n-3 PUFA skupine nakon konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja. Vrijednost proupalnog faktora rasta VEGF-A povećala se nakon trotjedne konzumacije kod KONTROLNE skupine. Budući da je faktor rasta VEGF-D proupalni medijator, pojavio se i neočekivani rezultat, vrijednost faktora rasta VEGF-D bila je veća kod n-3 PUFA, a manja kod KONTROLNE skupine.

Interes za istraživanje utjecaja prehrane na zdravlje, izričito vezan uz blagotvorno djelovanje n-3 masnih kiselina, posebice dugolančanih masnih kiselina EPA i DHA, pojavio se 70-ih godina prošloga stoljeća, a rezultat je epidemioloških istraživanja danskih znanstvenika Banga, Dyerbera i Nielsena, koji su otkrili da Eskimi s Grenlanda imaju izuzetno nisku učestalost kardiovaskularnih bolesti unatoč prehrani koja sadrži velike količine i zasićenih masnih kiselina i kolesterola. Ovaj fenomen objašnjen je visokim prehrambenim unosom dugolančanih n-3 masnih kiselina iz ribe i drugih plodova mora. Navedena istraživanja pokrenula su čitavu lavinu novih kliničkih istraživanja o potencijalno blagotvornom djelovanju n-3 masnih kiselina koja se provode i u današnje vrijeme (24).

Unazad nekoliko godina provedena su brojna istraživanja koja potvrđuju blagotvorno djelovanje n-3 masnih kiselina na mikrovaskularnu funkciju i upalno stanje endotela. Studija provedena na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku pokazala je, također, značajno sniženje proupalnog interferona-γ i povišenje protuupalnog interleukina-10 u ispitanika koji su konzumirali n-3 obogaćena kokošja jaja (26). Nadalje, još jedno istraživanja koje je provedeno na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskoga fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku pokazalo je da konzumacija smjese n-3 PUFA (ALA + EPA + DHA), osigurana putem obogaćenih kokošjih

jaja, izaziva promjene u mikrovaskularnoj reaktivnosti, krvnome tlaku i razini triglicerida u zdravih ispitanika koji su povezani s kardiovaskularnim benefitima, što sugerira da dnevna konzumacija jaja obogaćenih n-3 PUFA-om u zdravih osoba može potencijalno pridonijeti smanjenju čimbenika kardiovaskularnih rizika i prevenciji bolesti (31).

Istraživanje Philipa C. Caldera objašnjava mehanizme na kojima se temelji protuupalno djelovanje EPA i DHA, a ono uključuje izmijenjeni sastav fosfolipidnih masnih kiselina na staničnoj membrani, te inhibiciju aktivacije nuklearnog faktora κB proupalnog transkripcijskog faktora, smanjujući ekspresiju upalnih gena i aktivaciju protuupalnih gena (27). Još jedno istraživanje objašnjava način djelovanja n-3 polinezasićenih masnih kiselina, a nadovezuje se na ranije spomenute mehanizme djelovanja EPA i DHA iz istraživanja Philipa C. Caldera. Maria Alessandra Gammone i suradnici navode da, osim što mijenjaju proizvodnju eikosanoida, n-3 PUFA također mogu smanjiti aktivaciju NF-κB puta, smanjujući proizvodnju upalnih citokina u kontrastu s n-6 masnom kiselinom AA, koja je poznati stimulator aktivnosti NF-κB. Sprječavaju razgradnju i naknadnu translokaciju NF-κB kompleksa u jezgru gdje inducira transkripciju upalnih citokina. Između ostalog, primijećeno je smanjenje koncentracije TNF-α, kao i ekspresije upalnih citokina i adhezijskih molekula na staničnoj površini (28, 29, 30, 32).

Metaboličko djelovanje n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina u organizmu antagonističko je i kompetitivno. Povećani unos n-3 PUFA u hrani u odnosu na unos n-6 PUFA umanjuje desaturaciju LA, a time i sintezu AA i ostalih n-6 PUFA u organizmu što, kako pokazuju brojna istraživanja, može imati preventivni učinak na krvožilno-srčane i druge bolesti (14 – 18). Za postizanje preventivnog učinka n-3 masnih kiselina liječnici danas savjetuju individualni unos dugolančanih n-3 PUFA u količini od 200 mg/dnevno. Buduće preporuke dnevnog unosa EPA + DHA u prehrani vjerojatno će biti i veće (450 mg/dnevno). Povećanje unosa dugolančanih n-3 masnih kiselina u ljudskoj prehrani može se ostvariti putem uzimanja dijetetskih dodataka, npr. u vidu kapsula ribljeg ulja, putem povećanja konzumacije plave morske ribe ili posredno, obogaćivanjem animalnih namirnica (mesa, mlijeka i jaja) dugolančanim n-3 PUFA putem hranidbe životinja krmivima bogatima n-3 PUFA-om. Zdravstveno preporučeni omjer n-6 : n-3 PUFA u prehrani iznosi 4 i manje. Izračunava se kao suma svih n-6 : suma svih n-3 masnih kiselina. Prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije udio ukupnih n-6 PUFA u ukupnom unosu energije u prehrani trebao bi se kretati od 5 do 8 %, a udio ukupnih n-3 PUFA od 1 do 2 % (13).

Ova je studija pokazala da dovoljna količina n-3 PUFA u svakodnevnim namirnicama koje konzumiramo može zadovoljiti dnevne potrebe ovih esencijalnih masnih kiselina te ostvariti blagotvorni učinak na endotelni sustav. Dodatni unos n-3 PUFA, pored uobičajenih namirnica koje su bogate njima, danas se uglavnom ostvaruje u obliku uljnih kapsula, no ovom je studijom pokazano da je moguće u svakodnevnim namirnicama prirodnim putem povećati količinu n-3 polinezasićenih masnih kiselina, kao što je učinjeno u n-3 PUFA jajima korištenim u ovom istraživanju. Također, ova studija nastoji dodatno rasvijetliti mehanizme kojima n-3 PUFA djeluju na vaskularnu funkciju, arterijski tlak te imunološki sustav u populaciji zdravih mladih ispitanika.

7. ZAKLJUČAK

- Tri tjedna konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja po 3 jaja dnevno značajno je povećalo koncentraciju protuupalnog interleukina-10 u odnosu na vrijednost koncentracije prije konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja kod mladih zdravih ispitanika te su potvrdile blagotvorni učinak n-3 PUFA na biljege upale i aktivacije endotela.
- Zanimljiv je nalaz da je 3 tjedna konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja po 3 jaja dnevno značajno snizila razinu proupalnog čimbenika interferona-γ, što ukazuje na mogući mehanizam djelovanja n-3 PUFA na endotelnu funkciju, odnosno n-3 PUFA smanjuje upalnu aktivnost koja može biti povezana s posljedično smanjenom aktivacijom endotela praćenom poboljšanom reaktivnošću krvnih žila.
- Zanimljiv je rezultat da se koncentracija proupalnog interleukina-17A značajno povećala kod KONTROLNE skupine u odnosu na vrijednost prije trotjedne konzumacije uobičajenih kokošjih jaja. Vrijednost proupalnog faktora rasta VEGF-A povećala se, također nakon trotjedne konzumacije uobičajenih jaja kod KONTROLNE skupine.
- Rezultat koji nije u skladu s očekivanjima jest da je vrijednost faktora rasta VEGF-D veća kod n-3 PUFA, a manja kod KONTROLNE skupine, jer je to prouplani medijator.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj je studije odrediti utjecaj konzumacije n-3 PUFA obogaćenih kokošjih jaja na izražaj proinflamatornih biljega i biljega aktivacije endotela u mladih zdravih ispitanika.

Materijali i metode: Ispitanici su bili podijeljeni u kontrolnu (KONTROLNA, 10 ženskih i 11 muških ispitanika) i eksperimentalnu skupinu (n-3 PUFA, 10 ženskih i 9 muških ispitanika) te su tijekom 3 tjedna jeli 3 kokošja jaja dnevno. n-3 PUFA skupina konzumirala je n-3 PUFA obogaćena kokošja jaja, dok je KONTROLNA skupina konzumirala uobičajena kokošja jaja. Prije i poslije protokola ispitanicima je uzeta venska krv u svrhu određivanja koncentracija upalnih biljega (IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-α, INF-γ...).

Rezultati: Koncentracija protuupalnog interleukina-10 značajno se povećala nakon protokola kod n-3 PUFA skupine. Vrijednost interleukina-10 kod n-3 PUFA skupine dvostruko je veća nego izmjerena vrijednost kod KONTROLNE skupine. Koncentracija proupalnog interleukina-17A značajno se povećala kod KONTROLNE skupine nakon protokola. Vrijednost proupalnog interferona-γ značajno se smanjila kod n-3 PUFA skupine nakon protokola. Vrijednost proupalnog faktora rasta VEGF-A povećala se nakon trotjedne konzumacije kod KONTROLNE skupine. Rezultat koji nije u skladu s očekivanjima jest da je vrijednost faktora rasta VEGF-D veća kod n-3 PUFA, a manja kod KONTROLNE skupine, jer je to prouplani medijator.

Zaključak: Studija je u konačnici pokazala pozitivan učinak n-3 PUFA obogaćenih kokošjih jaja na izražaj proinflamatornih biljega i biljega aktivacije endotela u mladih zdravih osoba, upućujući na moguću pozitivnu ulogu n-3 PUFA obogaćene hrane u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti.

Ključne riječi: endotel; omega-3; vaskularna funkcija; biljezi upale; funkcionalna hrana

9. ABSTRACT

The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) chicken eggs consumption on expression of inflammatory markers and endothelial activation markers in young healthy individuals

Aim: This study aims to determine the effect of n-3 PUFA enriched chicken eggs consumption on expression of inflammatory markers and endothelial activation markers in young healthy individuals.

Materials and methods: Subjects were divided into two groups: the control group (CONTROL) consisting of 10 female and 11 male subjects, and the experimental group (n-3 PUFA) consisting of 10 female and 9 male subjects. During the period of 3 weeks, the subjects consumed 3 chicken eggs daily. The n-3 PUFA group consumed n-3 PUFA enriched chicken eggs, while the CONTROL group consumed regular chicken eggs. Samples of venous blood were taken from the subjects before and after the protocol with the aim of determining concentrations of inflammatory markers (IL-6, IL-10, IL-17A, TNF-α, INF-γ...).

Results: Anti-inflammatory marker interleukin-10 concentration has significantly increased after the protocol in the n-3 PUFA group. The value of interleukin-10 concentration was, in fact, twice as high as the value measured in the CONTROL group. The pro-inflammatory interleukin-17A concentration has significantly increased in the CONTROL group after the protocol. The value of pro-inflammatory interferon-γ has significantly decreased in the n-3 PUFA group after the protocol. The value of pro-inflammatory growth factor VEGF-A has increased in the CONTROL group after the three-week consumption. The result which is not in line with expectations is that the value of the growth factor VEGF-D is higher in n-3 PUFA and lower in the CONTROL group, since it is a pro-inflammatory mediator.

Conclusion: The study has shown a positive effect of n-3 PUFA enriched chicken eggs on expression of inflammatory markers and endothelial activation markers in young healthy individuals, indicating that n-3 PUFA enriched diet could play a positive role in the prevention and treatment of cardiovascular diseases.

Key words: endothelium; omega-3; vascular function; inflammatory markers; functional food

10. LITERATURA

1) Ruzic A, Miletic B, Noal AI, Persic V, Razov Radas M, Vcev A, i sur. Endotelna disfunkcija u "enigmatskoj slagalici" kardiovaskularnih bolesti. Med Glas. 2009;6(1):2-15.
2) Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. Cardiovasc Diabetol. 2006 Feb 23;5:4.
3) Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer, 1997, 1-26.
4) Ewenstein MG. Vascular biology of von Willebrand factor. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer, 1997, 107-22.
5) Cruz K, Hollenberg SM. Modifing leukocyte endothelial interactions in acute inflammatory models. Crit Care Med 2002; 30:1924-5.
6) Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. J Mol Cell Cardiol 1999; 31:23- 37.
7) Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Cabazas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. Biochem Soc Trans 2007; 35:466-9.
8) Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. Ann Med 2000; 32: 293-304.
9) Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science 1991; 315:1046-51.
10) Haller H. Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities. Stuttgart: Schattauer, 1997, 273-98.
11) Storch AS, Mattos JD, Alves R, Galdino IS, Rocha HNM. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. Int. J. Cardiovasc. Sci. [Internet]. 2017 June [cited 2020 July 10] ; 30(3): 262-273. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-56472017000300262&lng=en.

12) Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Lüscher TF, Shechter M, Taddei S, Vita JA, Lerman A. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. Circulation. 2012 Aug 7;126(6):753-67.
13) Karolyi D. Polinezasićene masne kiseline u prehrani i zdravlju ljudi. MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu [Internet]. 2007 [pristupljeno 10.07.2020.];IX(3):151-158. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/21310.
14) Holman RT. Nutritional and metabolic interrelationships between fatty acids. Federation Proceedings. 1964; 23, 1062- 1067.
15) Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. American Journal of Clinical Nutrition, 1991; 54, 438-463.
16) Pereira SL, Leonard AE, Mukerji P. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2020; 68, 97-106.
17) Wan JMF, Haw MP, Blackburn GL. Nutrition, immune function, and inflammation: an overview. Proceedings of the Nutrition Society. 1988; 48, 315-335.
18) Newton IS. Long-chain fatty acids in health and nutrition. In: Omega -3 Fatty Acids: Chemistry, Nutrition and Health Effects. Edited by: F. Shahidi and J. W. Finley, ACS Symposium Series 788, American Chemical Society, Washington, DC. 2001; 14-27.
19) Needelman P, Raz A, Minkes MS, Ferrendelli JA, Sprecher H. Triene prostaglandins: Prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. Proceedings of the National Academy of Science. 1979; 76, 944-948.
20) Johnson M, Bradford C (2014) Omega-3, Omega-6 and Omega-9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases. J Glycomics Lipidomics 4: 123.
21) Grune T, Krämer K, Hoppe PP, Siems W. Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: effects of vitamin E supplementation. Lipids. 2001;36(8):833-8.
22) Alagawany M, Elnesr SS, Farag MR, Abd El-Hack ME, Khafaga AF, Taha AE, Tiwari R, Yatoo MI, Bhatt P, Khurana SK, Dhama K. Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Poultry Nutrition: Effect on Production Performance and Health. Animals (Basel). 2019 Aug 18;9(8):573.
23) Škrtić Z, Kralik G, Gajčević Z, Bogut I, Hanžek D. The increase of the n-3 PUFA content in eggs. Poljoprivreda. 2007;2:47-52.

24) Vranešić Bender D. Omega-3 masne kiseline – svojstva i djelovanje. KBC Zagreb, Centar za kliničku prehranu i Vitaminoteka d.o.o. 2011; 236-240.
25) ThermoFisher Scientific. Inflammation 20-Plex Human ProcartaPlex™ Panel. 2016. Dostupno na adresi: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EPX200-12185-901#/EPX200-12185-901. Datum pristupa: 1. 8. 2020.
26) Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z, Matić A, Stupin M, Jukić I, Kralik Z, Grčević M, Kralik G, Šerić V, Drenjančević I. Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals-Clinical Trial. Int J Mol Sci. 2020 Jun 10;21(11):4149.
27) Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. Biochemical Society Transactions. September 2017; 45(5):BST20160474.
28) Gammone MA, Riccioni G, Parrinello G, D'Orazio N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport. Nutrients. 2018 Dec 27;11(1):46.
29) Andersen CJ. Bioactive Egg Components and Inflammation. Nutrients. September 2015; 7(9):7889-7913.
30) Drenjančević I, Kralik G, Kralik Z, Mihalj M, Stupin A, Novak S, Grčević M. Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health: Revealing Potentials of Functional Food. InTechOpen. 2017-02-22. Dostupno na adresi: https://www.intechopen.com/books/superfood-and-functiona. Datum pristupa: 1. 8. 2020.
31) Stupin A, Rasic L, Matic A, Stupin M, Kralik Z, Kralik G, Grcevic M, Drenjancevic I. Omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs consumption enhances microvascular reactivity in young healthy individuals. Appl Physiol Nutr Metab. 2018 Oct;43(10):988-995.
32) Gutiérrez S, Svahn SL, Johansson ME. Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. Int J Mol Sci. 2019 Oct 11;20(20):5028.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Anita Travančić
Datum rođenja: 31. siječnja 1998.
Adresa: Željeznička 8, 32281 Ivankovo, Republika Hrvatska
Email adresa: travancicanita@gmail.com

Obrazovanje:

- rujan 2013. do lipanj 2017.: Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci (opći smjer)
- listopad 2017. do danas: Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Tečajevi trajnoga usavršavanja:

- rujan 2005. do lipanj 2015.: „Linguapax“, škola stranih jezika (položen FCE ispit)