

# Učinak dijete s povećanim unosom n-3 polinezasićenih masnih kiselina na udio Foxp3 regulatornih T limfocita u perifernoj krvi zdravih mladih ispitanika

---

Pavlović, Ana

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:371383>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ana Pavlović**

**UČINAK DIJETE S POVEĆANIM  
UNOSOM N-3 POLINEZASIĆENIH  
MASNIH KISELINA NA UDIO FOXP3  
REGULATORNIH T LIMFOCITA U  
PERIFERNOJ KRVI ZDRAVIH MLADIH  
ISPITANIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

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

**Ana Pavlović**

**UČINAK DIJETE S POVEĆANIM  
UNOSOM N-3 POLINEZASIĆENIH  
MASNIH KISELINA NA UDIO FOXP3  
REGULATORNIH T LIMFOCITA U  
PERIFERNOJ KRVI ZDRAVIH MLADIH  
ISPITANIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.

Rad ima 27 listova, 1 tablicu i 4 slike.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med. na pomoći, strpljenju i vođenju tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem i asistentici Nikolini Kolobarić, mag. prot. nat. et amb. na pomoći i svim korisnim savjetima tijekom provedbe praktičnog dijela istraživanja i pisanja diplomskog rada.*

*Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji, posebno roditeljima, koji su me uvijek poticali na napredak, omogućili mi diplomski studij i bili najveća potpora tijekom studiranja.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Zdrava prehrana.....	1
1.2. Polinezasićene masne kiseline .....	1
1.2.1. N-3 polinezasićene masne kiseline .....	2
1.3. Regulatorni T-limfociti .....	3
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJ .....	6
4. MATERIJALI I METODE .....	7
4.1. Ustroj studije .....	7
4.2. Ispitanici .....	7
4.3. Metode.....	8
4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi.....	9
4.3.2. Protočna citometrija .....	9
4.4. Statističke metode .....	10
5. REZULTATI.....	11
5.1. Opće karakteristike ispitanika .....	11
5.2. Antropometrijski, hemodinamički i biokemijski parametri ispitanika.....	11
5.3. Protočna citometrija .....	12
5.4. Udio regulatornih T-limfocita .....	14
5.5. Korelacija regulatornih T-limfocita s vrijednostima hsCRP-a i ukupnog kolesterola.....	15
6. RASPRAVA .....	17
7. ZAKLJUČCI .....	19
8. SAŽETAK.....	20
9. SUMMARY .....	21
10. LITERATURA.....	22
11. ŽIVOTOPIS .....	27

## Popis kratica

AKS – akutni koronarni sindrom

ALA –  $\alpha$ -linolenska kiselina (engl. *Alpha linolenic acid*)

APC – alofikocijanin (engl. *Allophycocyanin*)

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

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

DT – dijastolički tlak

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

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

FITC – fluoresceinski izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)

FSC – engl. *forward scatter*

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

hsCRP – visoko osjetljivi C-reaktivni protein (engl. *high sensitive C- reactive protein*)

IL – interleukin

iTreg – inducirani Treg limfociti (engl. *inducible Treg cells*)

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

MHC – glavni histokompatibilni kompleks (engl. *major histocompatibility complex*)

nTreg – prirodni Treg limfociti (engl. *natural Treg cells*)

PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

PE – fikoeritrin (engl. *Phycoerythrin*)

PerCP – peridinin-klorofil proteinski kompleks (engl. *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*)

PE-Cy 7 – konjugat fikoeritrin-cijanin 7 (engl. *Phycoerythrin-Cyanin 7*)

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

SAT – srednji arterijski tlak

SSC – engl. *side scatter*

ST – sistolički tlak

Th17 – pomočnícke T stanice tipa 17 (engl. *T helper 17 cells*)

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

Treg – regulatorne T-stanice (engl. *regulatory T cells*)



Popis tablica

**Tablica 1.** Utjecaj konzumacije standardnih (kontrolna skupina) i n-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja (omega-3 skupina) na antropometrijske, hemodinamičke i biokemijske parametre (str. 12)

## Popis slika

**Slika 1.** Reprezentativna strategija analize regulatornih T-limfocita u ukupnim mononuklearnim stanicama periferne krvi ispitanika (str. 13)

**Slika 2.** Udjeli regulatornih T-limfocita (CD25+Foxp3+) prije i nakon dijetnog protokola u kontrolnoj (A) i omega-3 (B) skupini ispitanika (str. 14)

**Slika 3.** Korelacija udjela regulatornih T-limfocita (CD25+Foxp3+) u perifernoj krvi i serumske koncentracije visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (hsCRP, engl. *High Sensitive C Reactive Protein*) kontrolne skupine nakon dijetnog protokola (str. 15)

**Slika 4.** Korelacija udjela regulatornih T-limfocita (CD25+Foxp3+) u perifernoj krvi i serumske koncentracije ukupnog kolesterola kontrolne skupine nakon dijetnog protokola (str. 16)

## 1. UVOD

### 1.1. Zdrava prehrana

Zdrava prehrana podrazumijeva konzumiranje hrane koja osigurava optimalan unos makronutrijenata (ugljikohidrati, proteini i masti) i mikronutrijenata (vitamini i minerali) potrebnih organizmu za normalan fizički i intelektualan razvoj pojedinca. Tri su glavna principa pravilne prehrane, a to su uravnoteženost, umjerenost i raznolikost. Kao dva najvažnija čimbenika koji utječu na izbor hrane i način prehrane pojedinca, ističu se dostupnost hrane i kupovna moć stanovništva. Neki od čimbenika koji imaju bitnu ulogu u načinu prehrane jesu kulturološki (ekonomija, okoliš, stil života, kultura i tradicija) senzorski i kognitivni (navike, socijalni čimbenici, vjerovanja, reklamiranje) te zdravstveni status i genetika (1).

Kako bi se smanjila sve češća pojavnost poremećaja vezanih za prehranu (pretilost, bolesti metabolizma, pothranjenost) iznimno je važno započeti usvajanje pravilnih prehrambenih obrazaca već od najranije životne dobi (2). Primjena zdrave i uravnotežene prehrane u kombinaciji s fizičkom aktivnošću pozitivno utječe na zdravlje pojedinca te između ostalog stvara preduvjete za suzbijanje mnogih kroničnih oboljenja u odrasloj dobi poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, hipertenzije i karcinoma (3 – 5). Mlada odrasla dob presudno je razdoblje za potpuno usvajanje pravilnih prehrambenih obrazaca, prije ulaska u dob s visokim rizikom od posljedičnog razvoja prethodno spomenutih kroničnih bolesti (6). Neki od razloga koji potvrđuju činjenicu da su upravo mlade odrasle osobe jedna od kritičnih skupina, brojni su životni izazovi s kojima se susreću prilikom prelaska iz adolescencije u odraslu dob, negativan utjecaj medija i društvenih mreža u reklamiranju nezdrave hrane te sjedilački način života (7 – 10).

### 1.2. Polinezasićene masne kiseline

Polinezasićene masne kiseline ubrajamo u zdrave masti, o čijem povoljnom utjecaju i važnosti unosa u organizam govore mnoga istraživanja (11, 12). Masne kiseline u prirodnim uljima i mastima kemijski su građene iz ugljikovog lanca s terminalnom metilnom skupinom na jednom kraju i karboksilnom skupinom na drugom kraju lanca. Polinezasićene masne kiseline (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acid*) u ugljikovom lancu sadrže više od jedne nezasićene ili dvostruke veze. Zbog mogućnosti pucanja dvostrukih veza, nezasićene masne

kiseline nestabilnije su od zasićenih. Omega ( $\omega$ ) ili n-broj u nomenklaturi polinezasićenih masnih kiselina uveden je radi njihove identifikacije, a označava položaj prve dvostruke veze u ugljikovom lancu brojeno od metilne skupine (13).

### 1.2.1. N-3 polinezasićene masne kiseline

Osnovni predstavnik n-3 PUFA je  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA) iz koje u organizmu putem desaturacije i elongacije nastaju i druge n-3 polinezasićene masne kiseline poput eikosapentaenoične (EPA) i dokosaheksaenoične kiseline (DHA). Esencijalne polinezasićene masne kiseline dijele se u dvije skupine: omega-3 i omega-6 masne kiseline, a za normalno funkcioniranje ljudskog organizma važan je omjer njihova unosa (14). Optimalan omjer omega-6 i omega-3 polinezasićenih masnih kiselina u prehrani trebao bi biti 4 : 1, međutim, u zapadnim zemljama, kao posljedica povećane potrošnje biljnih ulja, on iznosi 10 : 1, pa čak i 20 : 1, što rezultira stvaranjem dodatnih preduvjeta za razvoj upalnih bolesti (15, 16).

Bogat su izvor n-3 polinezasićenih masnih kiselina u hrani morska riba (skuša, losos, tuna, haringa, srdele) te određene biljne sjemenke (soja, uljana repica, lan, chia sjemenke) i orašasti plodovi (17). Osim hrane, važan izvor n-3 PUFA su i brojni farmakološki suplementi koji sadrže riblje ulje, ulje račića krila, ulje jetre bakalara (18). Funkcionalna hrana obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama još je jedan važan izvor tih zdravih masti. Funkcionalnom hranom nazivamo hranu, koja osim svoje osnovne, nutritivne funkcije, ima i dokazane zdravstvene prednosti koje smanjuju rizik od pojave određenih kroničnih bolesti (19). Od hrane obogaćene omega-3 masnim kiselinama, na današnjem tržištu, nude se proizvodi od mesa i peradi, pekarski proizvodi, namazi, kokošja jaja, mlijeko i mliječni proizvodi, sokovi i bezalkoholna pića (14).

Studije pokazuju brojne prednosti unosa n-3 polinezasićenih masnih kiselina poput smanjenja razina triglicerida u serumu (20), povoljnog utjecaja na kardiovaskularno zdravlje (21 – 24), protuupalnog djelovanja (25) te povoljnog utjecaja na mentalno zdravlje i raspoloženje (26).

Protuupalna i imunomodulacijska svojstva n-3 PUFA predmet su mnogih znanstvenih istraživanja jer su upravo ta svojstva odgovorna za regulaciju brojnih bioloških funkcija u ljudskom organizmu. Jedan od primjera protuupalnog djelovanja n-3 PUFA je smanjena proizvodnja proupalnih medijatora poput čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina

1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i interleukina 6 (IL-6) koji potiču oslobađanje drugih upalnih čimbenika i proteina akutne faze upale (27). Nadalje, istraživanja pokazuju da konzumacija hrane bogate n-3 PUFA-om snižava i razine upalnog biljega, visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (hsCRP, engl. *high sensitive C-reactive protein*) (28, 29).

### 1.3. Regulatorni T-limfociti

Istraživanja upalnih bolesti na animalnim modelima pokazala su da povećan unos n-3 polinezasićenih masnih kiselina (n-3 PUFA) obnavlja ravnotežu pomoćničkih T stanica tipa 17 (Th17) i regulatornih T-limfocita (Treg) (30, 31).

Treg limfociti čine manju populaciju pomoćničkih T-limfocita (5 – 10 %) i podskupina su CD4<sup>+</sup> stanica T. Većina Treg limfocita izražava velik broj površinskog receptora CD25 i transkripcijskog čimbenika Foxp3, koji posreduje razvoj i funkciju većine Treg stanica. Jedna od najvažnijih uloga Treg limfocita je supresija imunskog odgovora, koja može biti izravna (izravna stanica ili međureakcijom s dendritičkim stanicama) ili neizravna (lučenjem citokina transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- $\beta$ , engl. *Transforming Growth Factor beta*) i interleukina 10 (IL-10)) (32, 33). Osim supresivne aktivnosti, ističe se još jedna važna odlika Treg limfocita, a to je anergija – nereaktivnost prema stimulaciji antigenom (34).

Regulatorni T-limfociti dijele se na dvije subpopulacije: urođeni ili prirodni Treg limfociti (nTreg, engl. *natural Treg cells*) te adaptivni ili inducirani Treg limfociti (iTreg, engl. *inducible Treg cells*) (35).

Urođeni Treg limfociti čine 5 – 10 % perifernih CD4<sup>+</sup> T-limfocita, a razvijaju se u timusu kao limfociti predodređeni za obavljanje supresivnih funkcija. Njihova glavna funkcija je održavanje samotolerancije te održavanje periferne homeostaze unutar imunološkog sustava. Bitna značajka nTreg limfocita jest povećana ekspresija  $\alpha$ -lanca receptora za IL-2 (CD25) i transkripcijskog čimbenika Foxp3 (35).

Inducirani Treg limfociti nastaju na periferiji iz CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> T limfocita nakon podražaja antigenom. Specifični su za antigen koji je potaknuo njihovo stvaranje, ali mogu suprimirati i ciljne stanice koje ne dijele tu specifičnost (36).

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je deset funkcija Treg stanica u imunološkom sustavu:

- 1) prevencija autoimunih bolesti uspostavljanjem i održavanjem imunološke samotolerancije (37)
- 2) supresija alergije i astme (38)
- 3) indukcija oralne tolerancije (39)
- 4) indukcija majčine tolerancije na fetus (40)
- 5) supresija patogenom inducirane imunopatologije (41)
- 6) regulacija cjelokupnog izvršnog odgovora (42)
- 7) supresija odgovora slabo aktiviranih T stanica (43)
- 8) kontrola jačine imunskog odgovora uzrokovana aktivacijom T stanica (44)
- 9) zaštita simbiotskih bakterija od prepoznavanja i uništavanja od strane imunskog sustava (45)
- 10) sprječavanje prekomjerne reakcije aktiviranih T stanica u slučaju kada su aktivirane jakim vezanjem i šire svoj napadački ustroj prema onim stanicama koje imaju čak i slične MHC molekule bez potrebnog prepoznavanja (46).

**2. HIPOTEZA**

Povećan unos omega-3 polinezasićenih masnih kiselina povećava udio regulatornih Foxp3+ T-limfocita u perifernoj krvi zdravih mladih osoba.

### 3. CILJ

Cilj je ovog diplomskog rada odrediti udjele regulatornih T-limfocita u krvi mladih zdravih ispitanika nakon konzumacije funkcionalne hrane obogaćene n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (3 kokošja jaja dnevno).



### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao istraživanje parova (engl. *case-control study*) (47). Praktični dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/20-08/07, Ur.br.:2158-61-07-20-135) i dio je projekta „Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama na kardiovaskularnu funkciju, imunološki sustav i razinu oksidativnog stresa kod zdravih mladih ispitanika“ koji je proveden na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

#### 4.2. Ispitanici

Istraživanje je provedeno na 40 mladih, zdravih, sedentarnih ispitanika obaju spolova, od 19 do 28 godina. Ispitanici koji se 12 mjeseci prije uključivanja u studiju nisu bavili redovitim tjelesnim aktivnostima smatrali su se sedentarnima. Isključni čimbenici za ispitanike bili su povijest bolovanja od hipertenzije, koronarne arterijske bolesti srca, dijabetesa, hiperlipidemije, bolesti bubrega i perifernih krvnih žila. Prije početka provođenja istraživanja svi ispitanici na uvid dobili su obrazloženje studije, detaljne upute i informirani pristanak na potpis.

Ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine:

- 1) kontrolna skupina – ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 standardna kokošja jaja (249 mg n-3 PUFA dnevno)
- 2) omega-3 skupina – ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (1053 g n-3 PUFA dnevno)

### 4.3. Metode

Protokol je trajao 3 tjedna. Svaki ispitanik na prvom je mjerenju dobio tri identična obrasca za praćenje konzumacije namirnica u protekla 24 sata. Obrazac ishrane bio je sastavljen na temelju standardnog upitnika za praćenje konzumacije u 24 sata (48), a modificiran je kako bi odgovarao prehranbenim navikama u istraživanom području. Ispunjene obrasce ispitanik je predao istraživaču na zadnjem mjerenju. Dva obrasca ispunjavala su se za vrijeme radnog tjedna (npr. ponedjeljak i četvrtak), a treći za vrijeme vikenda (npr. nedjelja). Istraživač je ispitanika obavijestio porukom ili e-mailom kada treba popuniti obrazac dan ranije. Obrazac je bio sastavljen u obliku tablice koja je sadržavala četiri glavne podjele: doručak, ručak, večera i međuobrok. Svaki obrok podrazumijevao je hranu i piće. Obroci su bili podijeljeni na: voće, povrće, mliječne proizvode, meso, ugljikohidrate, žitarice, piće, grickalice, orašaste plodove. Uzimao se u obzir način pripreme te veličina porcija ovisno o kojoj namirnici se radilo. Ispitanik je popunjavao tablicu stavljanjem pluseva na mjesta predviđena za to, a u skladu s onim što je toga dana konzumirao i na koji način je bilo pripremljeno. Nakon svakog obroka, obrazac je sadržavao odjeljak pod nazivom komentar gdje je bilo potrebno naglasiti ako je ispitanik uzimao nekakav dodatak prehrani koji bi mogao značajnije utjecati na unos nutrijenata taj dan ili ako je konzumirao nešto što nije bilo navedeno u tablici. Prilikom preskakanja obroka, ispitanik je bio dužan isto naznačiti.

Ni istraživači ni ispitanici nisu znali kojoj skupini prehrane pripada koji ispitanik sve do završetka protokola. Standardna kokošja jaja i n-3 PUFA obogaćena kokošja jaja proizvedena su na istoj farmi (49) i bila su iste veličine (M komercijalna veličina).

Ispitanicima se živinim manometrom mjerio krvni tlak (prosjek tri mjerenja) i puls prije početka protokola te dan nakon završetka protokola, nakon 10 minuta mirovanja u sjedećem položaju. Također su izmjereni tjelesna masa, visina te opseg struka i bokova, za utvrđivanje antropometrijskih mjera i indeksa tjelesne mase (BMI).

Uzorci venske krvi uzeti su na tašte tijekom prvog (prije početka dijetnog protokola) i posljednjeg (nakon završetka dijetnog protokola) posjeta laboratoriju radi analize krvne slike. Primjenom standardnih laboratorijskih metoda na Odjelu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek iz seruma su određeni biokemijski parametri hsCRP, kolesterol, trigliceridi, HDL i LDL kolesterol.

Iz uzoraka pune krvi određeni su udjeli regulatornih T-limfocita uz pomoć protočne citometrije.

#### 4.3.1. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi

Prije analize na protočnom citometru bilo je potrebno izolirati stanice od interesa. Iz uzoraka pune krvi prikupljene u vakuntajneru s EDTA izolirane su mononuklearne stanice periferne krvi (PBMC, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) na gradijentu fikola (Ficoll–Paque PLUS Cytiva, GE17-1440-02).

#### 4.3.2. Protočna citometrija

Protočna citometrija brza je i visokoosjetljiva metoda koja ima sposobnost istovremenog mjerenja više svojstava pojedine stanice. Ona omogućava uočavanje, analizu ili razdvajanje različitih vrsta stanica na temelju fenotipa (veličina i granuliranost) ili funkcionalnog stanja (žive/mrtve). Tri su glavne komponente protočnog citometra: protočna, optička i elektronička. Protočnu komponentu čine pokretačka tekućina, stanična suspenzija i tlak u sustavu, a ona osigurava usmjeravanje stanica iz stanične suspenzije prema snopu laserske svjetlosti. Glavna je značajka protočne komponente hidrodinamičko fokusiranje, odnosno formiranje toka pojedinačnih stanica kako bi se osigurala analiza svake stanice, a to se postiže na temelju razlike u tlakovima stanične suspenzije i pokretačke tekućine. Optička komponenta sastoji se od ekscitacijskog sustava (laser, leća, filtri) i sustava za prikupljanje svjetlosnih signala (fotodetektor). Nakon što su stanice obasjane laserskim svjetlom, dolazi do raspršenja svjetlosti koje je pokazatelj fizikalnih osobina stanice – veličine (svjetlost raspršena pod malim kutom, FSC, engl. *forward scatter*) i granuliranosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom, SSC, engl. *side scatter*). Manje stanice uzrokuju manje raspršenje (manji FSC), dok veće uzrokuju veće raspršenje (veći FSC). Budući da SSC ovisi o celularnosti stanice, limfociti će imati manji SSC (veliki nukleus, tanak sloj citoplazme) u odnosu na granulocite (mnogo citoplazme). Obilježavanje stanica fluorescentnim bojama (fluorokromima), izravno ili češće vezanjem za monoklonska protutijela, osigurava se uočavanje ključnih stanica. Najčešće korišteni fluorokromi su fluoresceinski izotiocijanat (FITC, engl. *Fluorescein Isothiocyanate*), alofikocijanin (APC, engl. *Allophycocyanin*), fikoeritrin (PE, engl. *Phycoerythrin*), peridinin-klorofil proteinski kompleks (PerCP, engl. *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*) i konjugat fikoeritrin-cijanin 7 (PE-Cy7, engl. *Phycoerythrin-Cyanin 7*). Fluorokrome pobuđuje laserska svjetlost jedne valne duljine (ekscitacija) dok emitiraju svjetlost druge, veće valne duljine (emisija). Detektori hvataju emitiranu svjetlost u obliku svjetlosnih signala, koji se uz pomoć elektroničke komponente protočnog citometra pretvaraju u digitalne signale, pohranjuju i analiziraju na računalu uz pomoć specijaliziranih programa (50, 51).

Izolirane mononuklearne stanice periferne krvi označene su FITC anti-CD3 (klon OKT3, eBioscience), PE anti-Foxp3 (klon 236A/E7, eBioscience), PerCP anti-CD4 (klon SK3 (SK-3), eBioscience), PE-Cy7 anti CD127 (klon eBioRDR3, eBioscience) i APC anti-CD25 (klon BC96, eBioscience) protutijelima prema standardnom protokolu za bojenje površinskih staničnih i nuklearnih antigena uz pomoć „Foxp3 staining“ seta pufera (eBioscience). Mrtve stanice isključene su na temelju bojanja fiksabilnom bojom za vijabilnost stanica (LIVE/DEAD®Fixable Near-IR stain, Thermo Fisher), a dvostruke (tzv. *doublets*) stanice analizom FSC-A i FSC-H parametara. 20,000 živih, jednostrukih CD4 pozitivnih stanica analizirano je pomoću BD FACS Canto II protočnog citometra (FACS Canto II, Becton Dickinson, SAD) te FlowLogic programa (Inivai Technologies, Australija).

### 4.4. Statističke metode

Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama, a numeričke varijable srednjim vrijednostima i standardnim devijacijama. Normalnost distribucije podataka procijenjena je Shapiro–Wilkovim testom, a homogenost varijanci Levenovim testom. Za omjerne varijable koje su slijedile normalnu razdiobu i homogenu varijancu, statistička značajnost razlike između neovisnih skupina testirala se Studentovim *t*-testom; u ostalim slučajevima koristio se neparametrijski Mann–Whitneyev test. Razlike u kategorijskim varijablama između ispitivanih skupina analizirane su Fisherovim egzaktnim testom. Povezanost kontinuiranih varijabli procijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije ( $\rho$ ). Sve *p* vrijednosti bile su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Svi testovi napravljeni su primjenom računalnog programa SigmaPlot (ver. 11, Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Opće karakteristike ispitanika

Istraživanje je provedeno na 40 zdravih, mladih ispitanika koji su bili podijeljeni u dvije skupine. Kontrolna skupina (ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 standardna kokošja jaja; 249 mg n-3 PUFA dnevno) sadržavala je 21 ispitanika, od kojih je bilo 10 (47,62 %) žena i 11 (52,38 %) muškaraca. Omega-3 skupina (ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 kokošja jaja obogaćena s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama; 1053 g n-3 PUFA dnevno) sadržavala je 19 ispitanika, od kojih je bilo 10 (52,63 %) žena i 9 (47,36 %) muškaraca. Prosječna dob obje skupine ispitanika bila je ista, a iznosila je  $24 \pm 3$  godine.

### 5.2. Antropometrijski, hemodinamički i biokemijski parametri ispitanika

Vrijednosti svih antropometrijskih, hemodinamičkih i biokemijskih parametara koji su određivani prije i nakon dijetnog protokola za obje ispitivane skupine, navedene su u Tablici 1. Usporedbom vrijednosti sistoličkog tlaka prije i nakon dijetnog protokola, u kontrolnoj skupini, uočena je statistički značajna razlika (parni t-test,  $p = 0,008$ , Tablica 1). Statistički značajna razlika uočena je i usporedbom vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka prije i nakon dijetnog protokola, u kontrolnoj skupini (parni t-test,  $p = 0,002$ , Tablica 1). Usporedbom vrijednosti biokemijskih parametara nakon provedenog dijetnog protokola između kontrolne i omega-3 skupine (Tablica 1) uočena je statistički značajna razlika u vrijednostima kolesterola (t-test,  $p = 0,039$ ) i HDL (lipoproteini visoke gustoće) kolesterola (t-test,  $p = 0,020$ ). Naime koncentracije kolesterola i HDL kolesterola bile su veće u kontrolnoj skupini u odnosu na omega-3 skupinu, ali i dalje unutar referentnih intervala.

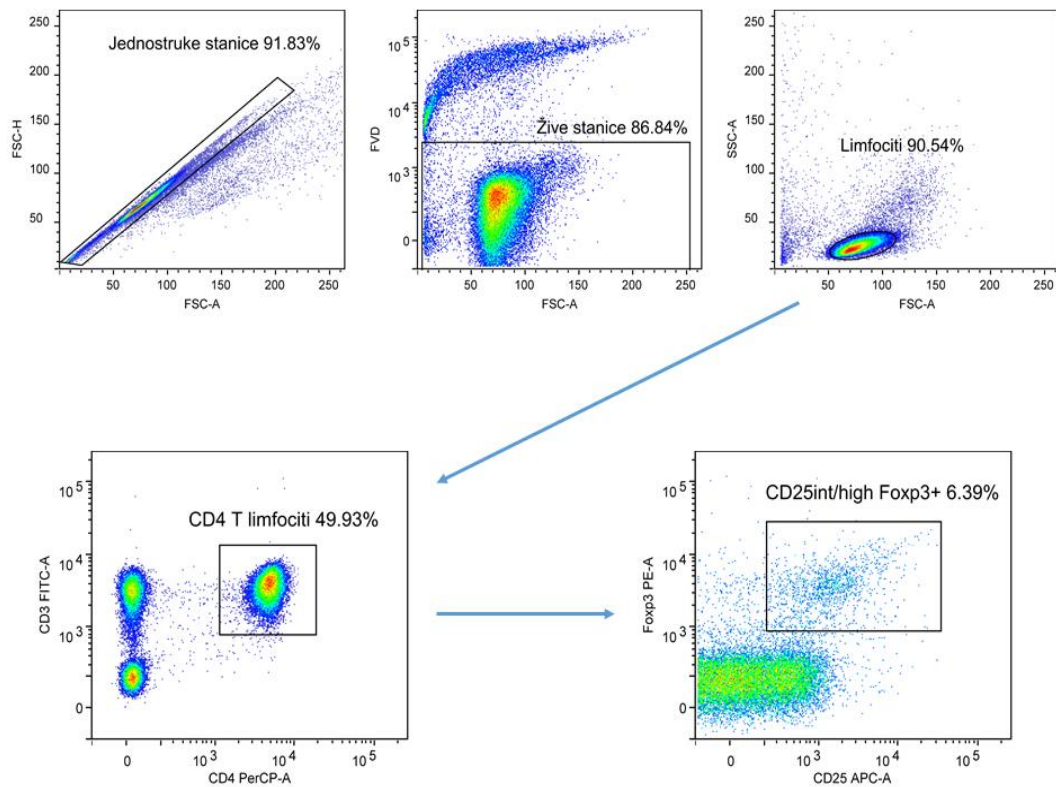
**Tablica 1.** Utjecaj konzumacije standardnih (kontrolna skupina) i *n*-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja (omega-3 skupina) na antropometrijske, hemodinamičke i biokemijske parametre

Parametar (mjerna jedinica)	Kontrolna skupina		Omega-3 skupina	
	Prije protokola	Nakon protokola	Prije protokola	Nakon protokola
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	24,3 ± 3,1	23,0 ± 6,1	23,3 ± 3,6	21,9 ± 6,8
ST (mmHg)	117 ± 10 ‡	112 ± 11	115 ± 11	112 ± 11
DT (mmHg)	77 ± 8	73 ± 8	77 ± 8	74 ± 8
SAT (mmHg)	90 ± 7 ‡	86 ± 8	90 ± 7	87 ± 8
P (otkucaja u minuti)	77 ± 11	73 ± 11	78 ± 13	76 ± 11
hsCRP (mg/L)	1,6 ± 2,2	1,8 ± 2,6	1,3 ± 1,2	1,8 ± 2,1
Kolesterol (mmol/L)	5,2 ± 0,9	5,3 ± 1,0 *	4,6 ± 0,9	4,7 ± 0,7
Trigliceridi (mmol/L)	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,4	1,3 ± 1,0	1,2 ± 0,6
HDL kolesterol (mmol/L)	1,5 ± 0,4	1,5 ± 0,4 *	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2
LDL kolesterol (mmol/L)	3,1 ± 0,7	3,1 ± 0,8	2,7 ± 0,6	2,8 ± 0,4

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). ITM – indeks tjelesne mase; ST – sistolički tlak; DT – dijastolički tlak; SAT – srednji arterijski tlak; P – puls; hs-CRP – visoko osjetljivi C-reaktivni protein; HDL – lipoproteini visoke gustoće; LDL – lipoproteini niske gustoće. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci u slučaju usporedbe 4 mjerenja ili t testom za zavisne uzorke u slučaju usporedbe unutar skupine. \*  $p < 0,05$  razlika između kontrolne i omega-3 skupine; ‡  $p < 0,05$  razlika unutar skupine, prije i nakon protokola

### 5.3. Protočna citometrija

Slika 1 prikazuje primjer analize (specijaliziranim računalnim programom Flow Logic) rezultata regulatornih T-limfocita u ukupnim mononuklearnim stanicama periferne krvi ispitanika dobivenih metodom protočne citometrije.

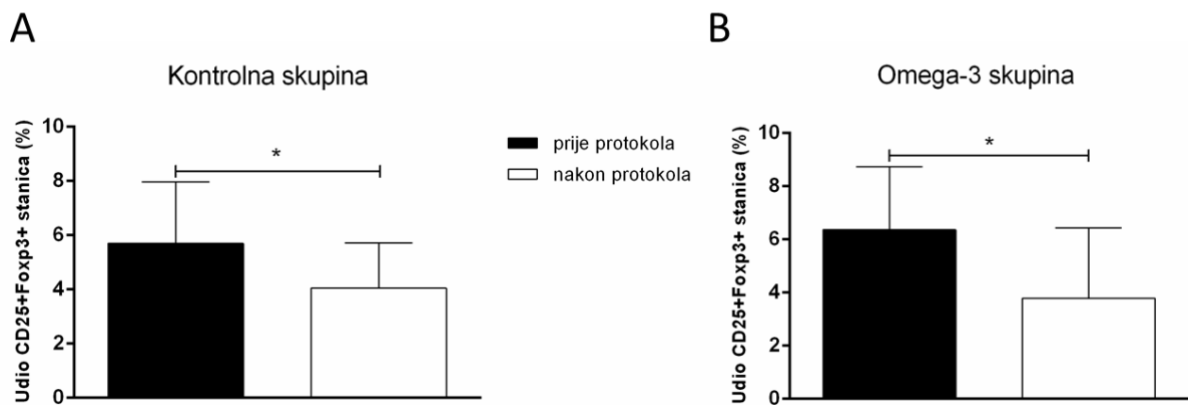


**Slika 1. Reprezentativna strategija analize regulatornih T-limfocita u ukupnim mononuklearnim stanicama periferne krvi ispitanika**

*Iz uzoraka periferne krvi ispitanika najprije su na gradijentu fikola izolirane mononuklearne stanice koje su potom pomoću specifičnih fluorokromom obilježenih protutijela analizirane na protočnom citometru FACS Canto II (BD Pharmingen, USA). Analiza dobivenih rezultata učinjena je pomoću specijaliziranog računalnog programa FlowLogic, a strategija je analize najprije uključivala izuzimanje dvostrukih i mrtvih stanica te potom definiranje populacije limfocita na temelju FSC (engl. forward scatter) i SSC (engl. side scatter) parametara. Nakon toga pomoću specifičnih biljega definirani su pomoćnički T-limfociti (CD3+CD4+), koji su potom analizirani za izražaj CD25 i Foxp3 biljega.*

#### 5.4. Udio regulatornih T-limfocita

Prosječan udio regulatornih T-limfocita u kontrolnoj skupini bio je veći prije dijetnog protokola ( $5,69 \pm 2,27$  %) u odnosu na vrijednosti nakon provedenog protokola ( $4,05 \pm 1,67$  %). Usporedbom udjela regulatornih T-limfocita unutar kontrolne skupine (Slika 2A), prije i nakon dijetnog protokola, uočena je statistički značajna razlika (t-test za zavisne uzorke,  $p = 0,0004$ ). Kao i u kontrolnoj skupini, prosječan udio regulatornih T-limfocita u omega-3 skupini bio je veći ( $6,33 \pm 2,37$  %) prije dijetnog protokola u odnosu na udio nakon ( $3,79 \pm 2,63$  %). Statistički značajna razlika uočena je i usporedbom udjela regulatornih T-limfocita unutar omega-3 skupine (Slika 2B), prije i nakon protokola (t-test za zavisne uzorke,  $p = 0,03$ ).



**Slika 2. Udjeli regulatornih T-limfocita (CD25+Foxp3+) prije i nakon dijetnog protokola u kontrolnoj (A) i omega-3 (B) skupini ispitanika**

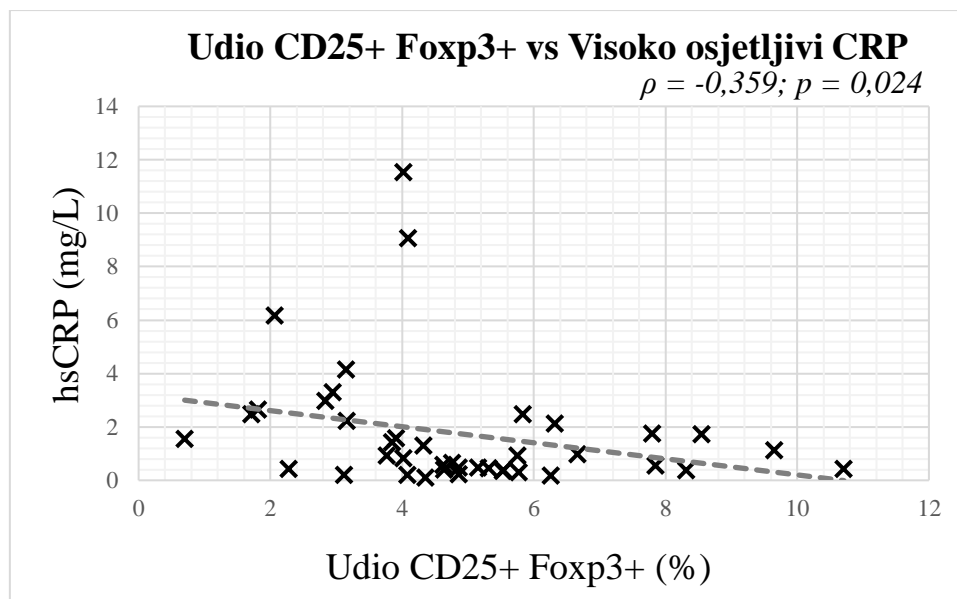
Razlike su testirane t-testom za zavisne uzorke, a  $p$  vrijednost jednaka ili manja od 0,05 smatrala se statistički značajnom (\*). Kontrolna skupina – mladi zdravi ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 standardna kokošja jaja; Omega-3 skupina – mladi zdravi ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 kokošja jaja obogaćena  $n-3$  polinezasićenim masnim kiselinama.



### 5.5. Korelacija regulatornih T-limfocita s vrijednostima hsCRP-a i ukupnog kolesterola

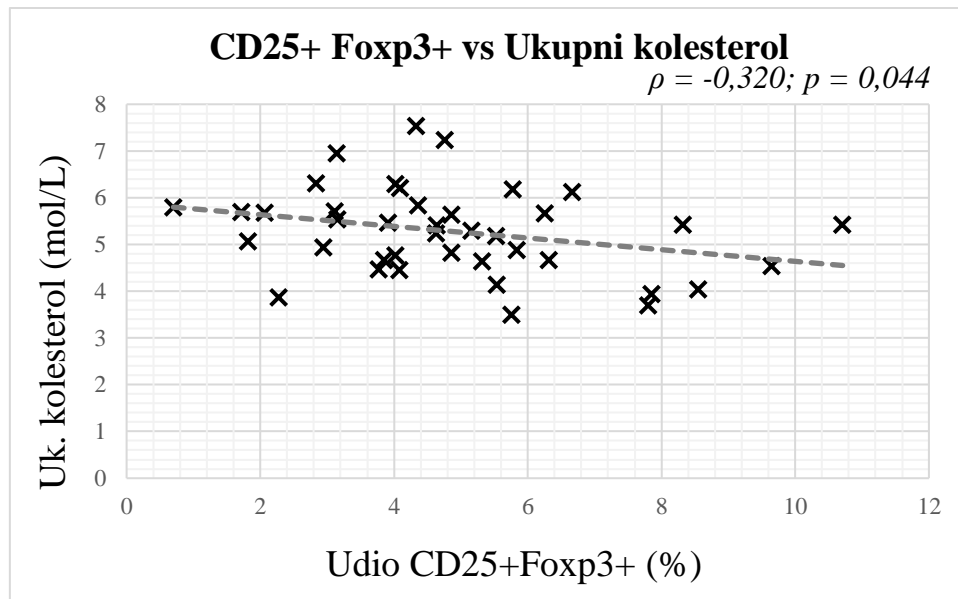
Kod ispitanika kontrolne skupine uočena je statistički značajna negativna korelacija udjela regulatornih T-limfocita i koncentracije visoko osjetljivog CRP-a (Pearsonov koeficijent korelacije,  $\rho = -0,359$ ;  $p = 0,024$ ), što znači da porastom koncentracije hsCRP-a pada broj regulatornih T-limfocita (Slika 3).

Kod ispitanika kontrolne skupine također je primijećena i statistički značajna negativna korelacija udjela regulatornih T-limfocita i koncentracije ukupnog kolesterola (Pearsonov koeficijent korelacije  $\rho = -0,320$ ,  $p = 0,044$ ), što znači da porastom koncentracije ukupnog kolesterola pada broj regulatornih T-limfocita (Slika 4).



**Slika 3. Korelacija udjela regulatornih T-limfocita (CD25+Foxp3+) u perifernoj krvi i serumske koncentracije visokoosjetljivog C-reaktivnog proteina (hsCRP, engl. *High Sensitive C-Reactive Protein*) kontrolne skupine nakon dijetnog protokola**

*Povezanost između zadanih varijabli testirana je Pearsonovim koeficijentom korelacije, a p vrijednost manja ili jednaka 0,05 smatrala se statistički značajnom.*



**Slika 4. Korelacija udjela regulatornih T-limfocita (CD25+Foxp3+) u perifernoj krvi i serumske koncentracije ukupnog kolesterola kontrolne skupine nakon dijetnog protokola**

*Povezanost između zadanih varijabli testirana je Pearsonovim koeficijentom korelacije, a p vrijednost manja ili jednaka 0,05 smatrala se statistički značajnom.*

## 6. RASPRAVA

Povećan unos n-3 polinezasićenih masnih kiselina (prehrambenim namirnicama, suplementima ili funkcionalnom hranom obogaćenom tim esencijalnim masnim kiselinama) i njihov povoljan utjecaj na zdravlje predmet je mnogih dosadašnjih istraživanja (52 – 55).

Nakon provedenog dijetnog protokola, vrijednosti ukupnog kolesterola i HDL kolesterola bile su statistički, ali ne i klinički značajno više u kontrolnoj skupini u usporedbi s omega-3 skupinom jer su vrijednosti obaju parametra i dalje bile unutar normalnih referentnih intervala, što je u korelaciji s rezultatima prethodno provedenog istraživanja. Naime, Stupin i suradnici u svom istraživanju, istražujući protuupalni potencijal konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama na zdravim ispitanicima utvrdili su da konzumacija 3 kokošja jaja dnevno, bilo standardnih ili n-3 PUFA obogaćenih, ne predstavlja rizik za nepovoljne promjene u lipidnom profilu zdravih ispitanika (56). Blago povišene koncentracije HDL kolesterola nakon dijeta s povećanim unosom n-3 PUFA obogaćenih jaja, kakve su bile i u ovom istraživanju, mogu pozitivno utjecati na sprječavanje razvoja kardiovaskularnih bolesti jer su visoke koncentracije HDL kolesterola jedan od zaštitnih mehanizama u razvoju kardiovaskularnih bolesti (57).

Suprotno očekivanjima, prosječan udio regulatornih T-limfocita značajno se smanjio nakon trodnevne svakodnevne konzumacije n-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja. Potencijalno objašnjenje dobivenih rezultata izlazak je regulatornih T-limfocita iz krvi i infiltracija tkiva, jer Treg stanice posjeduju to svojstvo (58). Također, povećan unos n-3 polinezasićenih masnih kiselina može utjecati na stvaranje eikozanoida, važnih lipidnih medijatora koji reguliraju brojne funkcije Treg stanica, o čemu govori istraživanje Lonea i suradnika (59). U svom istraživanju ukazuju na činjenicu kako se povećanim unosom n-3 PUFA smanjuje omjer n-6/n-3 PUFA, što može utjecati na stvaranje eikozanoida koji imaju sposobnost promjene svojih svojstava iz proupalnih u protuupalna i posljedično promijeniti očekivana svojstva Treg stanica.

Zanimljiv je nalaz statistički značajne negativne korelacije udjela regulatornih T-limfocita u perifernoj krvi i serumske koncentracije visoko osjetljivog CRP-a u kontrolnoj skupini nakon provedenog dijetnog protokola, koji ukazuje na moguću pojavu upale. Naime, Liu i suradnici u svom istraživanju o promjenama cirkulirajućih Treg stanica u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (AKS) zaključili su da statistički značajna negativna korelacija udjela Treg stanica u perifernoj krvi bolesnika s AKS-om i koncentracije hsCRP-a može

poremetiti ravnotežu tolerancije perifernog imunološkog sustava i aktivirati upalu, te tako sudjelovati u nastanku i razvoju patoloških procesa ateroskleroze (60). Također, u istraživanju o utjecaju pretilosti na smanjenje cirkulirajućih Treg stanica i načinima na koji, uz pomoć Treg stanica, identificirati osobe s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti, Wagner i suradnika, negativna korelacija udjela Treg stanica i hsCRP-a ukazivala je na moguću pojavu upale i povećan rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (61). Uočena je i statistički značajna negativna korelacija udjela Treg limfocita i serumske koncentracije ukupnog kolesterola kontrolne skupine nakon provedenog dijetnog protokola koja može ukazivati na razvoj upale jer kolesterol doprinosi tome (62). Zanimljivo, vrijednosti hsCRP-a i ukupnog kolesterola kod svih su ispitanika unutar referentnih vrijednosti, a ipak i u tom rasponu upućuju na postupan razvoj upale koji daljnjim porastom vjerojatno vodi ka razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Osim toga, ti parametri mogu potaknuti razvoj i doprinijeti pogoršanju drugih autoimunih i upalnih bolesti.

## 7. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Povećan unos kokošnjih jaja, neovisno o dodatku n-3 polinezasićenih masnih kiselina, kod zdravih mladih ispitanika dovodi do pada udjela regulatornih CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-limfocita u perifernoj krvi.
- Udio regulatornih CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-limfocita u perifernoj krvi kontrolne, ali ne i omega-3 skupine ispitanika, pokazuje negativnu korelaciju s razinom ukupnog kolesterola i visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (hsCRP).

## 8. SAŽETAK

**Cilj:** Odrediti udjele regulatornih T-limfocita u krvi mladih zdravih ispitanika nakon konzumacije funkcionalne hrane obogaćene n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (3 kokošja jaja dnevno).

**Ustroj studije:** Studija je ustrojena kao istraživanje parova.

**Materijali i metode:** 40 mladih, zdravih, sedentarnih ispitanika obaju spolova, od 19 do 28 godina podijeljeno je u dvije skupine: kontrolna (ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 standardna kokošja jaja; 249 mg n-3 PUFA dnevno) i omega-3 skupina (ispitanici koji su 3 tjedna svakodnevno konzumirali 3 kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama; 1053 g n-3 PUFA dnevno). Udio regulatornih T-limfocita određen je iz pune krvi ispitanika metodom protočne citometrije.

**Rezultati:** Udio regulatornih CD25+Foxp3+ T-limfocita statistički je značajno niži u obje ispitivane skupine, u kontrolnoj skupini nakon povećanog unosa standardnih kokošnjih jaja te u omega-3 skupini nakon povećanog unosa n-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja.

**Zaključak:** Povećan unos kokošnjih jaja, neovisno o dodatku n-3 polinezasićenih masnih kiselina, kod zdravih mladih ispitanika dovodi do pada udjela regulatornih CD25+Foxp3+ T-limfocita u perifernoj krvi.

**Ključne riječi:** n-3 polinezasićene masne kiseline; protočna citometrija; regulatorni T-limfociti

## 9. SUMMARY

**Objectives:** The aim of this study was to determine the level of regulatory T lymphocytes in the blood of young healthy individuals after consumption of functional food enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids (3 hen eggs per day).

**Study Design:** case-control study

**Material and Methods:** Forty young, healthy, sedentary individuals, both male and female, aged 19 to 28 were divided into two groups: control group (individuals who consumed 3 standard hen eggs per day for 3 weeks; 249 mg n-3 PUFA/day) and omega-3 group (individuals who consumed 3 hen eggs enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids per day for 3 weeks; 1053 g n-3 PUFA/day). The level of regulatory T lymphocytes was determined from the individual's whole blood by flow cytometry.

**Results:** The proportion of regulatory CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T lymphocytes was statistically significantly lower in both groups, the control group after increased intake of regular hen eggs and in the omega-3 group after diet with increased intake of n-3 PUFA enriched hen eggs.

**Conclusion:** Increased intake of hen eggs, regardless of the n-3 polyunsaturated fatty acids addition, in healthy young individuals leads to a decrease in the proportion of regulatory CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T lymphocytes.

**Key words:** n-3 *polyunsaturated fatty acid*; *flow cytometry*; *Regulatory T cells*

**10. LITERATURA**

1. Alibabić V, Mujić I. *Pravilna prehrana i zdravlje*. Rijeka: Veleučilište u Rijeci; 2016.
2. Alebić IJ. Prehrambene smjernice i osobitosti osnovnih skupina namirnica. *Medicus*. 2008; 17(1):37-46.
3. Lim S. Eating a Balanced Diet: A Healthy Life through a Balanced Diet in the Age of Longevity. *J Obes Metab Syndr*. 2018;27(1):39-45.
4. Biesalski HK. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?. *Meat Sci*. 2005;70(3):509-524.
5. Bartsch H, Nair J, Owen RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for the role as risk modifiers. *Carcinogenesis*. 1999;20:2209-2218.
6. Lupi S, Bagordo F, Stefanati A, Grassi T, Piccinni L, Bergamini M, i sur. Assessment of lifestyle and eating habits among undergraduate students in northern Italy. *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51(2):154-161.
7. Allman-Farinelli MA, King L, Bauman AE. Overweight and obesity from childhood to adulthood: a follow-up of participants in the 1985 Australian Schools Health and Fitness Survey. *Comment. Med J Aust*. 2007;187(5):314–315.
8. Kelly B, Baur LA, Bauman AE, King L, Chapman K, Smith BJ. Restricting unhealthy food sponsorship: attitudes of the sporting community. *Health Policy*. 2012;104(3):288-295.
9. Chau MM, Burgermaster M, Mamykina L. The use of social media in nutrition interventions for adolescents and young adults-A systematic review. *Int J Med Inform*. 2018;120:77-91.
10. Stok FM, Renner B, Clarys P, Lien N, Lakerveld J, Deliëns T. Understanding Eating Behavior during the Transition from Adolescence to Young Adulthood: A Literature Review and Perspective on Future Research Directions. *Nutrients*. 2018;10(6):667.
11. Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr*. 2012;3(1):1-7.
12. Liu AG, Ford NA, Hu FB, Zelman KM, Mozaffarian D, Kris-Etherton PM. A healthy approach to dietary fats: understanding the science and taking action to reduce consumer confusion. *Nutr J*. 2017;16(1):53.



13. Karolyi D. Polinezasićene masne kiseline u prehrani i zdravlju ljudi. MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu. 2007;9(3):151-158.
14. Vranešić Bender D. Omega-3 masne kiseline – svojstva i djelovanje. Medix. 2011;17(92/93):234-240.
15. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother. 2002;56(8):365-379.
16. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. J Nutr Metab. 2012;2012:539426.
17. Lewis NM, Seburg S, Flanagan NL. Enriched eggs as a source of N-3 polyunsaturated fatty acids for humans. Poult Sci. 2000;79(7):971-974.
18. Gammone MA, Riccioni G, Parrinello G, D'Orazio N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport. Nutrients. 2018;11(1):46.
19. Serafini M, Peluso I. Functional Foods for Health: The Interrelated Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Fruits, Vegetables, Herbs, Spices and Cocoa in Humans. Curr Pharm Des. 2016;22(44):6701-6715.
20. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. Arterioscler Thromb. 1992;12(8):911-919.
21. Robinson JG, Stone NJ. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. Am J Cardiol. 2006;98(4A):39i-49i.
22. Jacobson TA. Beyond lipids: the role of omega-3 fatty acids from fish oil in the prevention of coronary heart disease. Curr Atheroscler Rep. 2007;9(2):145-153.
23. 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;134:131-140.
24. Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, Barlera S, Franzosi MG, Latini R, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2008;372(9645):1223-1230.
25. Molfino A, Amabile MI, Monti M, Muscaritoli M. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both?. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:5987082.
26. Lin PY, Su KP. A meta-analytic review of double-blind, placebo-controlled trials of antidepressant efficacy of omega-3 fatty acids. J Clin Psychiatry. 2007;68(7):1056-1061.

27. Jouris KB, McDaniel JL, Weiss EP. The effect of Omega-3 fatty acid supplementation on the inflammatory response to eccentric strength exercise. *J Sports Sci Med.* 2011;10:432–438.
28. Reinders I, Virtanen JK, Brouwer IA, Tuomainen TP. Association of serum n-3 polyunsaturated fatty acids with C-reactive protein in men. *Eur J Clin Nutr.* 2012;66(6):736–741.
29. Kubota Y, Higashiyama A, Imano H, Sugiyama D, Kawamura K, Kadota A, i sur. Serum Polyunsaturated Fatty Acid Composition and Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Healthy Japanese Residents: The KOBE Study. *J Nutr Health Aging.* 2015;19(7):719-728.
30. Chilton FH, Dutta R, Reynolds LM, Sergeant S, Mathias RA, Seeds MC. Precision Nutrition and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Case for Personalized Supplementation Approaches for the Prevention and Management of Human Diseases. *Nutrients.* 2017;9(11):1165.
31. Kim JY, Lim K, Kim KH, Kim JH, Choi JS, Shim SC. N-3 polyunsaturated fatty acids restore Th17 and Treg balance in collagen antibody-induced arthritis. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194331.
32. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartail B, Corsi A, Lauretani F, i sur. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:439-446.
33. Barbi J, Pardoll D, Pan F. Treg functional stability and its responsiveness to the microenvironment. *Immunol Rev.* 2014;259(1):115-139.
34. Kondělková K, Vokurková D, Krejsek J, Borská L, Fiala Z, Ctírad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2010;53(2):73-77.
35. Pevec B, Pevec MR, Marković AS, Batišta I. Patofiziološki mehanizmi u nastanku i liječenju alergijskih bolesti. *Acta Med Croatica.* 2011;65:391-403.
36. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133:775-87.
37. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, i sur. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS–ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002;8(9):1024–1032.

38. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM, et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med*. 2002;8(9):625–629.
39. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994;265(5176):1237-1240.
40. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004;5(3):266–271.
41. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1282-1291.
42. Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. ‘Educated’ dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol*. 2004;5(6):615–622.
43. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol*. 2002;169(11):6210-6217.
44. Corthay A. How do regulatory T cells work?. *Scand J Immunol*. 2009;70(4):326-336.
45. Chai JN, Zhou YW, Hsieh CS. T cells and intestinal commensal bacteria-ignorance, rejection, and acceptance. *FEBS Lett*. 2014;588(22):4167–4175.
46. Anderson CC. Placing regulatory T cells into global theories of immunity: an analysis of Cohn's challenge to integrity (Dembic). *Scand J Immunol*. 2009;69(4):306-309.
47. Setia MS. Methodology Series Module 2: Case-control Studies. *Indian J Dermatol*. 2016;61(2):146-151.
48. FAO. Dietary Assessment: A resource guide to method selection and application in low resource settings. Rome 2018.
49. Škrtić Z, Kralik G, Gajčević Z, Bogut I, Hanžek D. THE INCREASE OF THE N-3 PUFA CONTENT IN EGGS. *Poljoprivreda*. 2007;13(2):47-52.
50. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163-176.
51. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1-5.1.11.
52. Wan X, Gao X, Bi J, Tian F, Wang X. Use of n-3 PUFAs can decrease the mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2015;14:23.

53. Li D, Wahlqvist ML, Sinclair AJ. Advances in n-3 polyunsaturated fatty acid nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2019;28(1):1-5.
54. Manuelli M, Della Guardia L, Cena H. Enriching Diet with n-3 PUFAs to Help Prevent Cardiovascular Diseases in Healthy Adults: Results from Clinical Trials. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1552.
55. Stupin M, Kibel A, Stupin A, Selthofer-Relatić K, Matić A, Mihalj M, i sur. The Physiological Effect of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (n-3 PUFAs) Intake and Exercise on Hemorheology, Microvascular Function, and Physical Performance in Health and Cardiovascular Diseases; Is There an Interaction of Exercise and Dietary n-3 PUFA Intake?. *Front Physiol.* 2019;10:1129.
56. Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z, i sur. Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals-Clinical Trial. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):4149.
57. Superko HR, Pendyala L, Williams PT, Momary KM, King SB 3rd, Garrett BC. High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease. *J Clin Lipidol.* 2012;6(6):496-523.
58. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490–500.
59. Lone AM, Taskén K. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. *Front Immunol.* 2013;4:130.
60. Liu M, Xu LJ, Wu JX. Changes of circulating CD4(+)CD25(+)CD127(low) regulatory T cells in patients with acute coronary syndrome and its significance. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):15930-15936.
61. Wagner NM, Brandhorst G, Czepluch F, Lankeit M, Eberle C, Herzberg S, i sur. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(3):461-468.
62. Wang HH, Garruti G, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances In reverse Cholesterol Transport. *Ann Hepatol.* 2017;16:27-42.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

Ime i prezime: Ana Pavlović

Datum rođenja: 12. lipnja 1995.

Mjesto rođenja: Našice

Adresa: J. J. Strossmayera 4a, 31530 Podravska Moslavina

E-pošta: ana.pavlovic.06@gmail.com

### **Obrazovanje:**

2002. – 2010. Osnovna škola Ante Starčevića, Viljevo

2010. – 2014. I. gimnazija, Osijek

2014. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

2018. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera, Osijek