

# Izražaj mRNA antioksidativnih enzima kod sportaša koji konzumiraju kokošja jaja obogaćena n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E

---

Lagator, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:152:905953>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Maja Lagator**

**IZRAŽAJ mRNA ANTIOKSIDATIVNIH  
ENZIMA KOD SPORTAŠA KOJI  
KONZUMIRAJU KOKOŠJA JAJA  
OBOGAĆENA n-3 POLINEZASIĆENIM  
MASNIM KISELINAMA, LUTEINOM,  
SELENOM I VITAMINOM E**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

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

**Maja Lagator**

**IZRAŽAJ mRNA ANTIOKSIDATIVNIH**  
**ENZIMA KOD SPORTAŠA KOJI**  
**KONZUMIRAJU KOKOŠJA JAJA**  
**OBOGAĆENA n-3 POLINEZASIĆENIM**  
**MASNIM KISELINAMA, LUTEINOM,**  
**SELENOM I VITAMINOM E**

**Završni rad**

**Osijek, 2022.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Zavod za fiziologiju i imunologiju

Mentorica rada: prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med., predsjednica Katedre za fiziologiju i imunologiju

Neposredni voditelj: asistent-doktorand Petar Šušnjara, mag. med. lab. diag.

Rad ima 21 list, 0 tablica i 4 slike.

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ines Drenjančević, dr. med. na vođenju i pomoći prilikom pisanja ovog rada.

Također veliko hvala asistentu Petru Šušnjari, mag. med. lab. diag. na pomoći tijekom izvođenja eksperimenta i na strpljenju i savjetima.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i roditeljima koji su mi omogućili studiranje i bili podrška.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Slobodne kisikove vrste .....	1
1.1.1. Stvaranje slobodnih kisikovih vrsta .....	1
1.2. Oksidativni stres .....	2
1.2.1. Oksidativni stres i tjelovježba .....	2
1.3. Antioksidansi .....	2
1.3.1. Endogeni antioksidansi .....	2
1.3.2. Egzogeni antioksidansi .....	3
2. HIPOTEZA .....	5
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	6
4. ISPITANICI I METODE .....	7
4.1. Ustroj studije .....	7
4.2. Ispitanici .....	7
4.3. Metode .....	7
4.3.1. Izolacija RNA .....	7
4.3.2. PCR u stvarnom vremenu .....	8
4.4. Statističke metode .....	10
5. REZULTATI .....	11
5.1. mRNA izražaj antioksidativnih enzima u kontrolnoj skupini .....	11
5.2. mRNA izražaj antioksidativnih enzima u NUTRI4 skupini .....	12
6. RASPRAVA .....	13
7. ZAKLJUČCI .....	14
8. SAŽETAK .....	15
9. SUMMARY .....	16
10. LITERATURA .....	17
11. ŽIVOTOPIS .....	21

## POPIS KRATICA I AKRONIMA

AA – engl. *arachidonic acid*, arahidonska kiselina

ALA – engl. *alpha-linolenic acid*, alfa-linolenska kiselina

CAT – katalaza

COX – ciklooksigenaze

CYP – citokrom P450

DHA – engl. *docosahexaenoic acid*, dokosaheksaenoična kiselina

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EPA – engl. *eicosapentaenoic acid*, eikosapentanoična kiselina

GAPDH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza

GPx – glutation peroksidaza

GSH – glutation

GSSG – glutation disulfid

LA – engl. *linoleic acid*, linolna kiselina

LDL – engl. *low-density lipoproteins*, lipoproteini niske gustoće

LOX – lipooksigenaze

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

OS – oksidativni stres

PBMC – engl. *peripheral blood mononuclear cell*, mononuklearne stanice periferne krvi

PUFAs – engl. *polyunsaturated fatty acids*, polinezasićene masne kiseline

RNS – engl. *reactive nitrogen species*, slobodne dušikove vrste

ROS – engl. *reactive oxygen species*, slobodne kisikove vrste

SOD – superoksid dismutaza

## 1. UVOD

### 1.1. Slobodne kisikove vrste

Kisik je potreban za različite metaboličke procese kao što je proizvodnja energije u mitohondrijima gdje je kisik posljednji primatelj elektrona u oksidativnoj fosforilaciji. Međutim, kisik može biti toksičan za organizam ako je njegova koncentracija veća od 21%. Toksičnost kisika uglavnom potječe od proizvodnje slobodnih kisikovih vrsta (1). Slobodne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) su derivati kisika koji su reaktivniji od njega samog (2). Mogu se svrstati u dvije skupine: ROS slobodni radikali u koje se ubrajaju superoksidni ion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ), dušikov oksid ( $NO\bullet$ ), dušikov dioksid ( $NO_2\bullet$ ), karbonat ( $CO_3^{\bullet-}$ ), peroksil ( $RO_2\bullet$ ) i aloksil ( $RO\bullet$ ), te neslobodni radikali kao što su ozon ( $O_3$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipoklorasta kiselina ( $HOCl$ ) i dušikasta kiselina ( $HNO_2$ ). Slobodni radikal je derivat kisika koji posjeduje jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali (1).

#### 1.1.1. Stvaranje slobodnih kisikovih vrsta

ROS mogu nastati iz endogenih i egzogenih izvora. Endogeni ROS nastaju kao produkti metabolizma iz mitohondrija, mikrosoma, peroksisoma te ostalih enzimskih izvora (1). Kao što je prethodno spomenuto, značajno se stvaranje ROS-a odvija u mitohondriju u elektronskom transportnom lancu, a pretežno otpuštanjem elektrona iz kompleksa I, II i III koji posreduju redukciju kisika u superoksidni ion (3). Međutim, mitohondrij nije jedini izvor ROS-a. Mikrosomi posjeduju NADPH oksidazu koja posreduje u reakciji oksidacije NADPH kisikom gdje nastaju  $NAD^+$  i vodikov peroksid. Osim mikrosoma, peroksisomi imaju visoku oksidacijsku aktivnost te također sadrže oksidaze koje reduciraju kisik u vodikov peroksid. Fagociti, kao i mikrosomi, posjeduju NADPH oksidazu te stvaraju vodikov peroksid koji u ovom slučaju nije nusproizvod nego primarna funkcija enzimskog sustava (4). Suprotno od endogenih izvora, egzogeni ROS uključuju okolišne čimbenike kao što su teški metali, UV te ionizirajuće zračenje (1).



## 1.2. Oksidativni stres

Oksidativni stres (OS) predstavlja neuravnoteženost između slobodnih radikala i antioksidansa u korist radikala. Spojevi kao što su ROS i slobodne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) otklanjaju se pomoću antioksidativnih mehanizama. Kada se pretjerano stvaraju takvi spojevi dolazi do oksidativnog stresa što može uzrokovati oštećenje stanice, staničnu smrt te različite bolesti kao što su ateroskleroza, kronična opstruktivna pluća bolest, rak te Alzheimerova bolest (5, 6). Osim stvaranja ROS-a i RNS-a koji oksidiraju makromolekule te tako dovode do oštećenja stanice, postoji još jedan mehanizam kojim oksidativni stres pridonosi razvitku bolesti. Naime, slobodne kisikove vrste, osobito  $H_2O_2$ , mogu djelovati kao sekundarni glasnici u procesu redoks signalizacije. U oksidativnom stresu dolazi do nefiziološke proizvodnje  $H_2O_2$  što može dovesti do poremećene signalizacije. Oba mehanizma se mogu odvijati u jednoj bolesti kao što je dijabetes (6).

### 1.2.1. Oksidativni stres i tjelovježba

Glavni izvor proizvodnje ROS-a tijekom tjelovježbe su skeletni mišići, točnije mitohondriji, fosfolipaza  $A_2$  i NADPH oksidaze mišićnih vlakana (7). Produženo aerobno vježbanje visokog intenziteta može dovesti do povećanog oksidativnog stresa te do oštećenja DNA. Međutim takvo se oštećenje najčešće popravljaju unutar tri dana vjerojatno zbog povećane aktivnosti mehanizama za popravak DNA koji su također potaknuti vježbom (8).

## 1.3. Antioksidansi

Antioksidansi su molekule koje sprječavaju ili uklanjaju oksidativnu štetu, odnosno smanjuju oksidaciju i štetne učinke ROS-a (1,2). Postoji nekoliko klasifikacija antioksidansa kao što su podjela po liniji obrane te podjela po molekularnoj masi. Također se mogu dijeliti po podrijetlu na endogene i egzogene antioksidanse (1).

### 1.3.1. Endogeni antioksidansi

Endogeni antioksidativni sustav sastoji se od enzimskih antioksidansa kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT) te od neenzimskih antioksidansa u koje pripadaju urati, bilirubin, glutation (GSH) i melatonin (9). Djelovanje enzimskih antioksidansa temelji se na neutralizaciji ili stabilizaciji reaktivnih vrsta (1). SOD

sudjeluje u prvoj liniji obrane protiv ROS-a. Postoje tri vrste ovog enzima ovisno o ionu metala kojeg sadrži: Cu/ZnSOD (nalaze se u citoplazmi i izvan stanice) i MnSOD (eksprimira se samo u mitohondrijima) (10). SOD2 ili MnSOD važan je enzim u uklanjanju ROS-a, a najviše superoksidnog radikala koji nastaje tijekom stanične respiracije, te tako može smanjiti vaskularnu kalcifikaciju odnosno taloženje minerala u tunicu mediu ili tunicu intimu krvnih žila (11, 12). Glutation peroksidaze (GPx) su skupina enzima koji se dijele na citosolne (GPx1), gastrointestinalne (GPx2), plazmatske (GPx3), fosfolipid-hidroperoksidne (GPx4) te GPx5 i GPx6. Sve glutacion peroksidaze mogu reducirati vodikov peroksid, ali neke mogu reducirati i organske hidroperoksidge te time sprječavaju razgradnju proteina i lipida i oksidativno oštećenje. GPx također sudjeluju u staničnoj signalizaciji i apoptozi neoplastičnih stanica, te imaju ulogu u infekciji HIV-om (13). Katalaza (CAT) je također enzim koji reducira vodikov peroksid na vodu i kisik. Nedostatak ovog enzima povezan je s različitim bolestima kao što su hipertenzija, vitiligo i dijabetes. Osim što uklanja štetni vodikov peroksid, katalaza se može vezati na određene proteine i zaštititi ih od oksidativnog oštećenja te spriječiti proliferaciju tumorskih stanica (14). Neenzimski antioksidansi također smanjuju oksidativnu štetu prekidajući lančane reakcije slobodnih radikala (1). Glutation (GSH) je tripeptid koji se sastoji od aminokiselina cistein, glicin i glutamin. Ima mnogo uloga u stanicama sisavaca kao što su uklanjanje endogenih i egzogenih oksidansa te održavanje stanične signalizacije. Postoji u dva oblika: reducirani (GSH) i oksidirani (GSSG) oblik. GSH sudjeluje u reakciji sa glutacion peroksidazom gdje GPx reducira vodikov peroksid, a GSH se oksidira u GSSG. Nakon toga, GSSG ponovno prelazi u GSH uz pomoć glutacion reduktaze i uz prisutnost NADPH (15). Melatonin je derivat triptofana koji također sudjeluje u uklanjanju ROS-a i stabilizaciji stanične membrane te može povećati mRNA izražaj antioksidativnih enzima kao što su SOD i CAT (16). Melatonin ima mogućnost neutralizacije i uklanjanja nekoliko vrsta radikala te se može vezati za teške metale što ga čini jakim represorom oksidativnog stresa (17). Osim GSH i melatonina, bilirubin i urati mogu djelovati kao antioksidansi.

### 1.3.2. Egzogeni antioksidansi

Egzogeni antioksidansi se u organizam unose prehranom, posebice konzumacijom povrća i voća te pomoću dodataka prehrani (1). Polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) se dijele u dvije skupine ovisno o poziciji dvostruke veze: n-3 i n-6. U n-3 skupinu pripadaju  $\alpha$ -linolenska kiselina (engl. *alpha-linolenic acid*, ALA), eikosapentanoična

kiselina (engl. *eicosapentaenoic acid*, EPA) i dokosaheksaenoična kiselina (engl. *docosahexaenoic acid*, DHA), a u n-6 skupinu pripadaju linolna kiselina (engl. *linoleic acid*, LA) i arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*, AA). ALA i LA nije moguće sintetizirati u organizmu pa se stoga nazivaju esencijalne masne kiseline, a optimalni omjer n-6 i n-3 je 1:1 do 1:4 jer je organizmu potrebno više n-3 PUFA (18). Ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze (LOX) i citokrom P450 (CYP) oksidiraju PUFA u oksilipine koji sudjeluju u upali. Kada se oksidiraju n-6 PUFA nastaju proupalni posrednici kao što su prostaglandini, leukotrieni i tromboksani, dok su derivati n-3 PUFA manje proupalni oksilipini (19). n-3 PUFA smanjuju sintezu triglicerida u jetri, imaju ulogu u sprječavanju nastanka kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa mellitusa te pozitivno djeluju na endotelnu funkciju (18). Selen je esencijalni element u tragovima te nužan dio strukture selenoproteina kao što je GPx, stoga ima ulogu u imunološkoj funkciji i antioksidativnoj zaštiti. Za odrasle dnevni preporučeni unos iznosi 55 - 70 µg, a može se naći u plodovima mora, ribi i mesu, ali i žitaricama i jajima (20, 21). Lutein je karotenoid prisutan u jajima i štiti organizam od oksidativnog stresa. Štoviše, lutein čini makularni pigment koji štiti makulu ili žutu pjegu od propadanja. Osim toga može štiti kosti od osteoporoze, sniziti upalne citokine i trigliceride u serumu te tako imati ulogu u sprječavanju ateroskleroze. Također može prevenirati oksidativnu štetu nastalu ultraljubičastim zračenjem, stoga je važan za održavanje zdravlja i funkcije kože (22). Vitamin E također ima ulogu u smanjenju razine oksidativnog stresa. Dugotrajna se nadoknada vitaminom E zajedno s niskim udjelom masti i kolesterola u prehrani pokazala korisnom u smanjenju aterosklerotskih lezija kod miševa (23). Vitamin E je topljiv u masti i jak antioksidans koji može donirati vodikove atome slobodnim radikalima koji zatim prelaze u stabilniji oblik što posljedično štiti stanicu od oštećenja. Često se koristi među sportašima kao dodatak prehrani, a nerijetko i u kombinaciji s vitaminom C (24). Pokazalo se kako navedeni nutrijenti pozitivno utječu na endotelnu funkciju i zaštitu od oksidativnog stresa kroz različite studije, pa možemo pretpostaviti kako će konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih istim nutrijentima također imati pozitivan učinak na mRNA ekspresiju antioksidativnih enzima kod populacije mladih zdravih sportaša.

## **2. HIPOTEZA**

Svakodnevna konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E kroz tri tjedna povećat će izražaj mRNA antioksidativnih enzima kod sportaša u eksperimentalnoj skupini u usporedbi sa sportašima koji će konzumirati obična kokošja jaja.

### **3. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je ispitati hoće li konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama, luteinom, selenom i vitaminom E tijekom tri tjedna imati utjecaj na izražaj mRNA antioksidativnih enzima Gpx1, Gpx4, SOD2 i CAT kod mladih zdravih sportaša i usporediti sa sportašima koji konzumiraju obična kokošja jaja.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Studija je provedena kao randomizirana, dvostruko slijepa, kontrolirana intervencijska studija (klinički pokus ID: NCT04564690) (25). Za uključivanje u ovu studiju sudionici su morali biti od 18 do 29 godina starosti te aktivno sudjelovati u sportu i pohađati najmanje 5 treninga tjedno tijekom prethodnih 12 mjeseci s fokusom na osobe koje se bave treninzima izdržljivosti. Kriteriji isključenja uključivali su pušenje, arterijsku hipertenziju ili hipotenziju, koronarnu bolest, dijabetes, hiperlipidemiju, kroničnu bubrežnu bolest, cerebrovaskularne poremećaje, periferne vaskularne bolesti, korištenje antihipertenzivnih lijekova, protuupalnih nesteroidnih lijekova, steroida te lijekova i dodataka prehrani koji mogu utjecati na endotel. Jednostavna randomizacija provedena je uz pomoć kocke za jamb (26).

### 4.2. Ispitanici

U istraživanju je sudjelovalo 14 zdravih sportaša. Svi sudionici su potpisali obrazac informiranog pristanka prije početka studije nakon što su bili upoznati s metodama i postupcima istraživanja.

Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine:

1. eksperimentalnu ili NUTRI4 skupinu (N=8) koja konzumira kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenom i luteinom
2. kontrolnu skupinu (N=6) koja konzumira obična kokošja jaja.

Sudionici su zamoljeni da konzumiraju 3 kuhana jaja svaki dan tijekom trajanja studije, otprilike u isto vrijeme svaki dan, uz preporuku da se konzumiraju ujutro. Istraživanje je provedeno tijekom 21 dana i uključivalo je 2 mjerenja ispitanika koja su provedena prvog i zadnjeg dana istraživanja.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Izolacija RNA

Vakuumska epruveta koja sadrži etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA) korištena je za prikupljanje uzoraka venske krvi. Korištenjem gradijenta gustoće (Ficoll - Paque TM PLUS),

mononuklearne stanice periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) su odvojene od venske krvi. Prikupljanje i obrada RNA visoke čistoće i integriteta preduvjet je za analize ekspresije gena i veličine transkripta (mRNA). Ekstrakcija fenol-kloroformom i izolacija kiselog gvanidin-tiocijanata po Chomczynski i Sacchi konvencionalne su tehnike za izolaciju mRNA iz PBMC (27). Centrifugiranjem su odvojene stanice, a supernatant je odbačen. Nakon toga, u uzorak je dodan 1 mL trizola, smjese gvanidin-tiocijanata i fenola koji služi za odvajanje DNA i RNA od ostalih staničnih elemenata. Za odvajanje slojeva koristi se 1-brom-3-klor-propan, te je uzorak vorteksiran i inkubiran na sobnoj temperaturi osam minuta nakon čega je slijedilo centrifugiranje 15 minuta na 12 000 okretaja. Supernatant je odvojen u sterilne Eppendorf tubice, u koje je dodan izopropanol i uzorci su tijekom osam minuta inkubirani na sobnoj temperaturi. Ponovljeno je centrifugiranje i ispiranje 75%-tnim etanolom i taj postupak je učinjen još dva puta. Naposljetku je dodana čista voda (NFW, engl. *Nuclease-Free Water*) i mjerena koncentracija RNA pomoću nanofotometra IMPLENA (Slika 1).

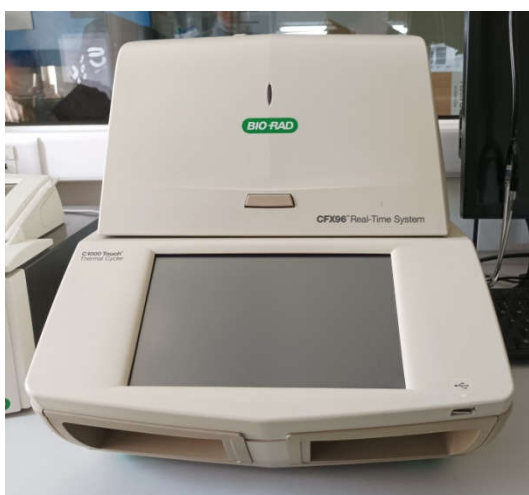


**Slika 1.** IMPLENA (izvor: original autorice rada)

#### 4.3.2. PCR u stvarnom vremenu

Primjenom PCR-a u stvarnom vremenu (BioRad, CFX96 Real-Time System) (Slika 2) identificiran je izražaj mRNA antioksidativnih enzima glutation peroksidaze 1 (sekvenca:

forward: 5'-TATCGAGAATGTGGCGTCCC-3';, i reverse 5'-TCTTGGCGTTCTCCTGATGC-3'), glutation peroksidaze 4 (sekvenca: forward: 5'-TTCCGGTGTAACCAGTTCGG-3', i reverse 5'-GTGGAGAGACGGTGTCCAAA-3'), superoksid dismutaze (sekvenca: forward: 5'-GGCCTACGTGAACCTGA-3', i reverse 5'-CAGGTTTGATGGCTTCCAGC-3') i katalaze. Pomoću GAPDH housekeeping gena postavljeni su rezultati u normalan raspon. Sredinom 1990-ih razvijen je PCR u stvarnom vremenu, tehnika za umnožavanje relativno kratkih (100-5000 parova baza) segmenata DNA u brojne kopije. Kombinira fluorescenciju s konvencionalnim PCR-om. Svaka smjesa PCR reakcije sadrži kalup (DNA, cDNA ili RNA), oligonukleotidne početnice, sva četiri deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), Taq DNA polimerazu, Mg<sup>2+</sup> ione, PCR pufer, fluorescentnu boju ili fluorescentno označene oligonukleotidne probe. Enzimsko kopiranje omogućuje ciljanoj nukleinskoj kiselini da se eksponencijalno umnoži u ponavljajućim ciklusima. U svakom ciklusu, roditeljska DNA se odvaja denaturacijom (na 95 °C tijekom 15 s), zatim se hlađenjem na 55 °C omogućuje hibridizacija (vezanje početnica s komplementarnim sekvencama), a zatim elongacijom dolazi do sinteze novonastale DNA. Elongacija Taq DNA polimeraze se događa na 72 °C, što je idealna temperatura za taj enzim. Svaki ciklus sada sadrži dva puta više molekula DNA, a novi lanci DNA koji se formiraju u svakom ciklusu nakon toga služe kao predlošci za vezanje početnica i sintezu nove DNA. PCR u stvarnom vremenu preferirani je pristup za umnažanje velikog broja kopija nukleotida zbog svoje brzine (PCR amplifikacija i rezultati mogu se dobiti za samo približno 30 minuta) i točne kvantifikacije proizvedenih PCR proizvoda tijekom umnažanja.



**Slika 2.** PCR BioRad, CFX96 Real-Time System (izvor: original autorice rada)



#### 4.4. Statističke metode

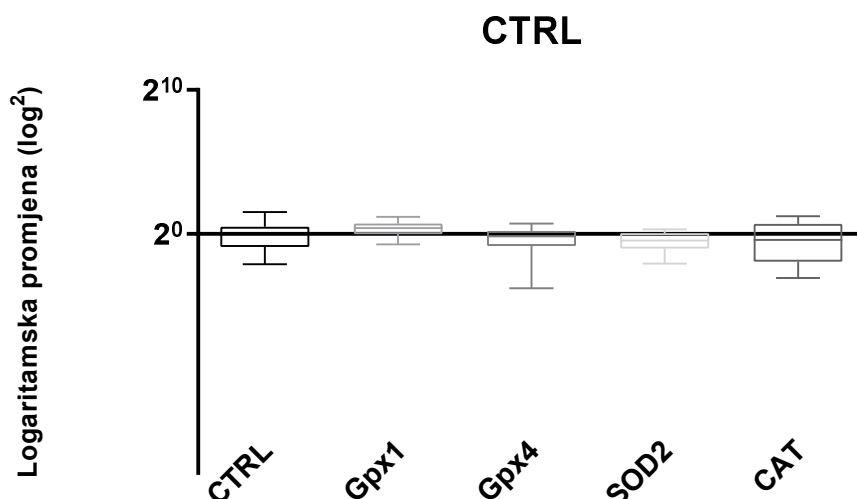
Sigma Plot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago, USA) korišten je za statističku analizu. Rezultati su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Normalna raspodjela varijabli testirana je Shapiro-Wilk testom normalnosti. Razlike normalno raspodijeljenih varijabli unutar obje skupine ispitanika testirane su pomoću t-testa (engl. paired t-test), a razlike između skupina testirane su analizom kovarijance (ANCOVA). Rezultati su normalizirani na GAPDH housekeeping gen i prikazani kao preklopna promjena ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Statistička značajnost postavljena je na  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI

Izolacija ukupne RNA iz mononuklearnih stanica sportaša provedena je na početku eksperimenta i nakon tri tjedna protokola. Nakon izolacije, genski je izražaj antioksidativnih enzima određen RT-PCR-om. Rezultati su dobiveni  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodom, a  $p < 0,05$  je razina statističke značajnosti.

### 5.1. mRNA izražaj antioksidativnih enzima u kontrolnoj skupini

Kontrolna skupina nije pokazala statistički značajnu promjenu u mRNA izražaju niti jednog antioksidativnog enzima nakon trojtjedne konzumacije običnih kokošnjih jaja u usporedbi s početnim mjerenjem (Slika 3).

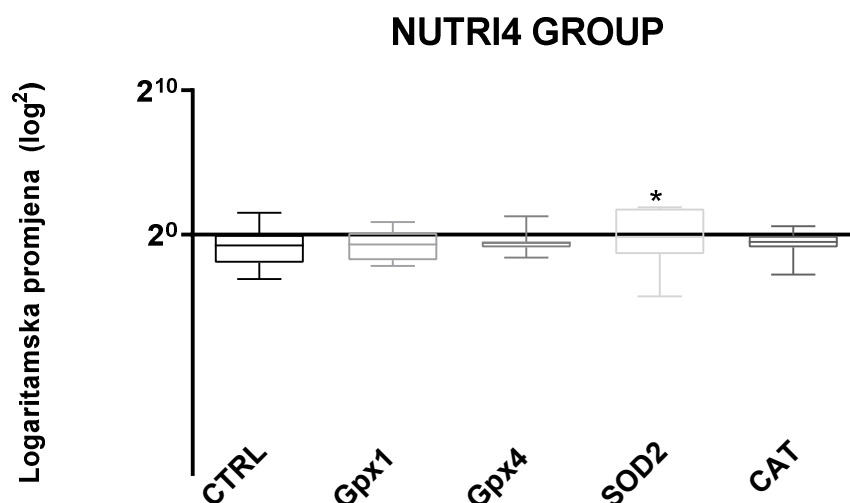


**Slika 3.** mRNA izražaj antioksidativnih enzima u kontrolnoj skupini

Genski se izražaj antioksidativnih enzima glutation peroksidaze 1 (Gpx1), glutation peroksidaze 4 (Gpx4), superoksid dismutaze 2 (SOD2) i katalaze (CAT) nije se statistički značajno promijenio u kontrolnoj skupini nakon trojtjednog dijetetskog protokola  $p > 0,05$ . Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina prikazana kao kutija i standardna devijacija prikazana kao barovi.

## 5.2. mRNA izražaj antioksidativnih enzima u NUTRI4 skupini

Eksperimentalna ili NUTRI4 skupina konzumirala je obogaćena kokošja jaja. Nakon završetka protokola, drugo mjerenje pokazalo je statistički značajan porast u mRNA izražaju superoksid dismutaze 2 dok ostali antioksidativni enzimi nisu pokazali značajnu razliku (Slika 4).



**Slika 4. mRNA izražaj antioksidativnih enzima u NUTRI4 skupini**

Genski se izražaj antioksidativnih enzima glutation peroksidaze 1 (Gpx1), glutation peroksidaze 4 (Gpx4) i katalaze (CAT) statistički se značajno promijenio nakon trotjednog dijetetskog protokola u eksperimentalnoj skupini (NUTRI4). Statističkom metodom ANOVA utvrđena je značajna razlika genskog izražaja enzima superoksid dismutaze (SOD) ( $p=0,0091$ ), dok kod genskog izražaja ostalih antioksidativnih enzima nije došlo do statističke promjene nakon trotjednog dijetetskog protokola u NUTRI4 skupini ispitanika. Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina prikazana kao kutija i standardna devijacija prikazana kao barovi.

## 6. RASPRAVA

Antioksidansi kao što su n-3 PUFA, selen, lutein i vitamin E mogu imati pozitivan utjecaj na mikrocirkulaciju. Prijašnja istraživanja pokazala su kako konzumacija hrane obogaćene n-3 PUFA poboljšava perifernu mikrovaskularnu reaktivnost, ali smanjuje aktivnost antioksidativnih enzima u serumu što može ukazati na nisku razinu oksidativnog stresa (28, 29). n-3 PUFA također povećavaju antioksidativni kapacitet kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2 (30). Svojim djelovanjem na endotel, n-3 PUFA mogu smanjiti rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti (31). Pozitivno djelovanje na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti ima i vitamin E koji ublažuje oksidativni stres što posljedično dovodi do smanjene oksidacije lipoproteinskih čestica niske gustoće (engl. *low-density lipoproteins*, LDL) i samim time sprječava nastanak ateroskleroze (32). Kao što je već spomenuto u uvodnom dijelu, selen je sastavni dio antioksidativnih enzima te ima veliku ulogu u smanjenju oksidativnog stresa samim time i kardiovaskularnog rizika. Pokazalo se kako ispitanici koji imaju koncentraciju selena u serumu manju od 45  $\mu\text{G/L}$  imaju i dva do tri puta veći rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti (33). Nadalje, istraživanje provedeno na miševima pokazalo je kako oralna primjena luteina povećava ukupni antioksidativni kapacitet (engl. *total antioxidant capacity*, TAC), glutation i aktivnost GPx i SOD u serumu. Osim toga povećao je i mRNA izražaj Cu/Zn SOD, MnSOD i GPx (34). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su s dosadašnjim istraživanjima. Ispitanici koji su tri tjedna konzumirali obična kokošja jaja nisu imali značajan statistički porast mRNA antioksidativnih enzima Gpx1, Gpx4, SOD2 i CAT u odnosu na prvo mjerenje prije konzumacije istih. Nadalje, ispitanici koji su konzumirali NUTRI4 ili kokošja jaja obogaćena n-3 PUFA, vitaminom E, selenom i luteinom imali su značajan porast mRNA izražaja SOD2 u usporedbi s početnim mjerenjem i kontrolnom skupinom dok ostali enzimi nisu pokazali značajan porast. Razlog tome može biti kratko vrijeme konzumacije obogaćenih jaja. Sportaši su svakodnevno pod fiziološkim stresom koji može biti popraćen upalom i povećanim oksidativnim stresom. Zapadnjački način prehrane nema dovoljan udio n-3 PUFA te ih je stoga potrebno koristiti kao dodatak prehrani ili u obliku funkcionalne hrane. Pokazalo se kako dodatak n-3 PUFA prehrani može dovesti do boljih rezultata kod sportaša, povećanog oporavka i smanjenja rizika od bolesti (35). Funkcionalna hrana sadrži tvari koje pokazuju pozitivan učinak na zdravlje i tjelesne funkcije te smanjuju rizik od nastanka bolesti. Funkcionalna hrana je stvarna hrana koja se može preporučiti sportašima za optimalni performans i poboljšanje zdravlja (18).

## 7. ZAKLJUČCI

- 1) Konzumacija običnih kokošnjih jaja nije dovela do statistički značajne promjene mRNA izražaja antioksidativnih enzima u odnosu na prvo mjerenje.
- 2) Konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PUFA, selenom, luteinom i vitaminom E uzrokovala je značajno povećanje mRNA izražaja SOD2 u odnosu na prvo mjerenje.
- 3) Eksperimentalna skupina je imala veći izražaj SOD2 u odnosu na kontrolnu skupinu.

## 8. SAŽETAK

**CILJ ISTRAŽIVANJA:** Cilj je bio odrediti mRNA izražaj antioksidativnih enzima GPx1, GPx4, SOD2 i CAT kod sportaša koji su konzumirali obična ili obogaćena kokošja jaja.

**NACRT STUDIJE:** Randomizirana, dvostruko slijepa, kontrolirana intervencijska studija (Clinical Trials ID: NCT04564690).

**ISPITANICI I METODE:** Ispitanici su zdravi, mladi sportaši podijeljeni u dvije skupine: kontrolna (N=6) i Nutri4 (N=8). Ispitanici u skupini "Nutri4" konzumirali su kokošja jaja obogaćena n3-PUFA (1026 mg/dnevno), luteinom (616 mg/dnevno), selenom (0,191 mg/dnevno) i vitaminom E (1098 mg/dnevno), a kontrolna grupa je konzumirala obična kokošja jaja (438 mg n-3 PUFA, 110 mg luteina, 0,181 mg selena i 595 mg vitamina E dnevno). Izražaj mRNA Gpx1, Gpx4, SOD2 i CAT određena je PCR-om u stvarnom vremenu (BioRad, CFX96 Real – Time System). Rezultati su normalizirani na GAPDH housekeeping gen i kontrolu i prikazani kao preklopna promjena ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Jednosmjerna ANOVA je provedena za statističku analizu s Tukey post hoc testom;  $p < 0,05$  smatra se statistički značajnim.

**REZULTATI:** Konzumacija obogaćenih kokošnjih jaja dovela je do značajnog povećanja mRNA izražaja SOD2, dok ostali enzimi nisu imali značajnu razliku u kontrolnoj, eksperimentalnoj niti između dvije skupine.

**ZAKLJUČAK:** Dosadašnji rezultati podupiru hipotezu da funkcionalna hrana može biti prirodni antioksidans.

**KLJUČNE RIJEČI:** Antioksidansi; Oksidativni Stres; RNA, Messenger; Sportaši

## 9. SUMMARY

### **mRNA EXPRESSION OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN ATHLETES CONSUMING ENRICHED HEN EGGS**

**OBJECTIVES:** The aim of this study was to assess mRNA expression of antioxidant enzymes Gpx1, Gpx4, SOD2 and CAT in athletes who consumed regular hen eggs or enriched eggs.

**STUDY DESIGN:** Randomized, double-blind, controlled interventional study (Clinical Trials ID: NCT04564690).

**PARTICIPANTS AND METHODS:** This study was conducted in young, healthy athletes divided to: control group (N=6) and Nutri4 group (N=8) who consumed 3 hen eggs per day for 3 weeks. Subjects in the "Nutri4" group consumed hen eggs enriched with n3-PUFAs (1026 mg/daily), lutein (616 mg/daily), selenium (0.191 mg/daily) and vitamin E (1098 mg/daily) and control subjects consumed regular hen eggs (438 mg of n-3 PUFAs, 110 mg of lutein, 0.181 mg of selenium and 595 mg of vitamin E daily). mRNA expression of Gpx1, Gpx4, SOD2 and CAT was determined with real time PCR (BioRad, CFX96 Real – Time System). Results were normalized to GAPDH housekeeping gene and control and presented as fold change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). One way ANOVA was conducted for statistical analysis with Tukey post hoc test;  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

**RESULTS:** Consumption of enriched hen eggs caused a significant increase in SOD2 mRNA expression, while other antioxidative enzymes' mRNA expression did not exhibit significant difference in control, NUTRI4 or between groups.

**CONCLUSION:** Current results support the hypothesis that functional food has a capacity to act as natural antioxidant.

**KEY WORDS:** Athletes; Antioxidants; Oxidative Stress; RNA, Messenger

**10. LITERATURA**

1. Hernández-Cruz EY, Arancibia-Hernández YL, Loyola-Mondragón DY, Pedraza-Chaverri J. Oxidative Stress and Its Role in Cd-Induced Epigenetic Modifications: Use of Antioxidants as a Possible Preventive Strategy. *Oxygen 2.2* (2022): 177-212.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, UK, 2015. ISBN 9780198717478.
3. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* 2020;37:101674. doi:10.1016/j.redox.2020.101674.
4. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:9829176. Published 2020 Apr 23. doi:10.1155/2020/9829176.
5. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(6):975-991. doi:10.1007/s00467-018-4005-44.
6. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(9):689-709. doi:10.1038/s41573-021-00233-1
7. Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe?. *J Sport Health Sci.* 2020;9(5):415-425. doi: 10.1016/j.jshs.2020.04.001.
8. Tryfidou DV, McClean C, Nikolaidis MG, Davison GW. DNA Damage Following Acute Aerobic Exercise: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Med.* 2020;50(1):103-127. doi:10.1007/s40279-019-01181-y
9. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(2):532-553. doi:10.1159/000485089.
10. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915-1928. doi:10.1083/jcb.201708007.



11. Tsai YT, Yeh HY, Chao CT, Chiang CK. Superoxide Dismutase 2 (SOD2) in Vascular Calcification: A Focus on Vascular Smooth Muscle Cells, Calcification Pathogenesis, and Therapeutic Strategies. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6675548. Published 2021 Feb 24. doi:10.1155/2021/6675548.
12. Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int*. 2013;93(4):365-373. doi:10.1007/s00223-013-9712-z.
13. Jurkovič S, Osredkar J, Marc J. Molekularni utjecaj glutation-peroksidaza u antioksidacijskim procesima. *Biochemia Medica* [Internet]. 2008 [pristupljeno 02.07.2022.];18(2):162-174. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/24139>.
14. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med*. 2015;87:84-97. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017.
15. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod*. 2018;22(1):61-66. Published 2018 Mar 1. doi:10.5935/1518-0557.20180003.
16. Wang M, Zhang S, Ding F. Melatonin Mitigates Chilling-Induced Oxidative Stress and Photosynthesis Inhibition in Tomato Plants. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(3):218. Published 2020 Mar 6. doi:10.3390/antiox9030218.
17. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Zhou XJ, Xu B. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules*. 2018;23(2):509. Published 2018 Feb 24. doi:10.3390/molecules23020509.
18. Drenjančević, I, Kralik, G, Kralik, Z, Mihalj, M. , Stupin, A. , Novak, S. , Grčević, M. The Effect of Dietary Intake of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health: Revealing Potentials of Functional Food. In: Shiomi, N, Waisundara, V. Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine [Internet]. London: IntechOpen; 2017. doi: 10.5772/67033.
19. Liput KP, Lepczyński A, Ogłuszka M, et al. Effects of Dietary n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammation and Cancerogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(13):6965. Published 2021 Jun 28. doi:10.3390/ijms22136965.
20. Kielczykowska M, Kocot J, Paździor M, Musik I. Selenium - a fascinating antioxidant of protective properties. *Adv Clin Exp Med*. 2018;27(2):245-255. doi:10.17219/acem/67222.

21. Hariharan S, Dharmaraj S. Selenium and selenoproteins: its role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacology*. 2020;28(3):667-695. doi:10.1007/s10787-020-00690-x.
22. Ahn YJ, Kim H. Lutein as a Modulator of Oxidative Stress-Mediated Inflammatory Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(9):1448. Published 2021 Sep 13. doi:10.3390/antiox10091448.
23. Meydani M, Kwan P, Band M, et al. Long-term vitamin E supplementation reduces atherosclerosis and mortality in Ldlr<sup>-/-</sup> mice, but not when fed Western style diet. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):196-205. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.006.
24. Higgins MR, Izadi A, Kaviani M. Antioxidants and Exercise Performance: With a Focus on Vitamin E and C Supplementation. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(22):8452. Published 2020 Nov 15. doi:10.3390/ijerph17228452.
25. Bhide A, Shah PS, Acharya G. A simplified guide to randomized controlled trials. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018;97(4):380-387. doi:10.1111/aogs.13309.
26. Suresh K. An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research. *J Hum Reprod Sci*. 2011;4(1):8-11. doi:10.4103/0974-1208.82352.
27. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-159. doi:10.1006/abio.1987.9999.
28. Kolar L, Stupin M, Stupin A, Šušnjara P, Mihaljević Z, Matić A, Jukić I, Kolobarić N, Drenjančević I. Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs?. *Prev Nutr Food Sci*. 2021;26(4):388-399. doi:10.3746/pnf.2021.26.4.388.
29. Ćurić ŽB, Masle AM, Kibel A, Selthofer-Relatić K, Stupin A, Mihaljević Z, Jukić I, Stupin M, Matić A, Kozina N, Šušnjara P, Juranić B, Kolobarić N, Šerić V, Drenjančević I. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome-A Randomized Study. *Biology (Basel)*. 2021 Aug 14;10(8):774. doi: 10.3390/biology10080774.

30. Hajianfar H, Paknahad Z, Bahonar A. The effect of omega-3 supplements on antioxidant capacity in patients with type 2 diabetes. *Int J Prev Med*. 2013;4(Suppl 2):S234-S238.
31. Auger C, Said A, Nguyen PN, Chabert P, Idris-Khodja N, Schini-Kerth VB. Potential of Food and Natural Products to Promote Endothelial and Vascular Health. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016;68(1):11-18. doi:10.1097/FJC.0000000000000382.
32. Bozaykut P, Karademir B, Yazgan B, et al. Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia-induced atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:174-181. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.017.
33. Brigelius-Flohé, R. Selenium in Human Health and Disease: An Overview. In *Selenium. Molecular and Integrative Toxicology*; Michalke, B., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2018; pp. 3–26. doi:10.1007/978-3-319-95390-8\_1.
34. He RR, Tsoi B, Lan F, Yao N, Yao XS, Kurihara H. Antioxidant properties of lutein contribute to the protection against lipopolysaccharide-induced uveitis in mice. *Chin Med*. 2011;6(1):38. Published 2011 Oct 31. doi:10.1186/1749-8546-6-38.
35. Gammone MA, Riccioni G, Parrinello G, D'Orazio N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Benefits and Endpoints in Sport. *Nutrients*. 2018;11(1):46. Published 2018 Dec 27. doi:10.3390/nu11010046.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Maja Lagator**

Datum rođenja: 17. listopada 1998.

Adresa: K. Tomislava 36, 31401 Viškovci, Hrvatska

E-mail adresa: lagatormaja8@gmail.com

JMBAG: 0285007366

### **Obrazovanje:**

rujan 2013. – lipanj 2017.: I. gimnazija Osijek

rujan 2019. – danas: Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

### **Članstvo i aktivnost u udrugama:**

2020. – 2022.: član Udruge studenata Medicinsko laboratorijske dijagnostike

2021. – 2022.: Potpredsjednica Studenske sekcije za fiziologiju i imunologiju

2021. – 2022.: član Hrvatskog društva za hipertenziju

### **Nagrade:**

Dekanova nagrada za akademsku godinu 2020./2021.

Zahvala Akademika Bojana Jelakovića, predsjednika Hrvatskog društva za hipertenziju, na projektu „Lov na tihog ubojicu“ 2021.

### **Ostale aktivnosti:**

svibanj 2021.: sažetak „Moždani udar kao posljedica hipertenzije“ za Dan hipertenzije

2021. – 2022.: aktivno sudjelovanje na javnozdravstvenom projektu *Lov na tihog ubojicu*

travanj 2022.: aktivno sudjelovanje na RECOOP kongresu s radom „mRNA expression of antioxidant enzymes in athletes consuming enriched hen eggs“

svibanj 2022.: voditelj radionice „Otkucaji života“ na Festivalu znanosti