

Utjecaj suplementacije alfa-lipoičnom kiselinom na antioksidacijski status pacijentica s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom stupnja 1 i 2

Bilić, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:029382>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Paula Bilić

**Utjecaj suplementacije α -lipoičnom kiselinom na
antioksidacijski status pacijentica s cervikalnom
intraepitelnom neoplazijom stupnja 1 i 2**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fiziološki i biokemijski aspekti prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Dubravki Vitali Čepo što me zainteresirala za područje kemije prehrane, prihvatila kao svoju diplomandicu te usmjeravala i savjetovala tijekom izrade diplomskoga rada. Veliku zahvalnost zaslužuju i asistentice Kristina i Nikolina za svu pomoć pruženu tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskoga rada.

Hvala svim mojim kolegicama s fakulteta, koje su bile odlično društvo tijekom studentskih dana (a nadam se da će tako ostati i poslije) i uz čiju sam pomoć uspješno prešla sve prepreke studiranja . Hvala i mojim dugogodišnjim prijateljicama, koje su me uvijek razumjele, podržavale i bile tu za mene u svakom trenutku.

Najveća hvala mojoj obitelji. Hvala mojoj braći jer su uvijek bili uz mene, osobito Bartolu bez čije pomoći ovaj diplomski rad ne bi bio tehnički ispravan. Hvala mami i tati, koji su mi pomogli da pronađem sebe, naučili me da nikada ne odustajem i uvijek mi pružali apsolutnu podršku u svemu što radim.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Oksidacijski stres	1
1.2. Biomarkeri oksidacijskog stresa	3
1.3. Uloga oksidacijskog stresa u razvoju cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN).....	6
1.4. Utjecaj prehrane na oksidacijski stres	8
1.4.1. Antioksidansi.....	8
1.4.2. α -lipoična kiselina	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Plan istraživanja	14
3.2. Ispitanice.....	14
3.2.1. Kriteriji uključivanja/isključivanja	14
3.2.2. Uzimanje uzoraka krvi.....	15
3.3. Metode.....	15
3.3.1. Prehrambene navike pacijentica	15
3.3.2. Antioksidacijski potencijal seruma.....	15
3.4. Materijali	17
3.4.1. Kemikalije.....	17
3.4.2. Instrumenti i pribor	18
3.5. Statistička obrada podataka	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Karakteristike kontrolne i ispitivane skupine.....	19
4.1.1. BMI.....	19
4.1.2. Pušenje.....	20
4.1.3. Korištenje dodataka prehrani	21
4.2. Antioksidacijski potencijal seruma pacijentica prije suplementacije α -lipoičnom kiselinom	22
4.2.1. Utjecaj indeksa tjelesne mase na ukupni antioksidacijski potencijal seruma	23
4.2.2. Utjecaj pušenja na ukupni antioksidacijski potencijal seruma	24
4.2.3. Utjecaj suplementacije dodacima prehrani s antioksidativnim učinkom na ukupni antioksidacijski potencijal seruma	24
4.2.4. Utjecaj unosa voća i povrća na ukupni antioksidacijski potencijal seruma	25
4.3. Utjecaj suplementacije α -lipoičnom kiselinom na ukupni antioksidacijski potencijal seruma ...	26
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČCI	34
7. LITERATURA	36

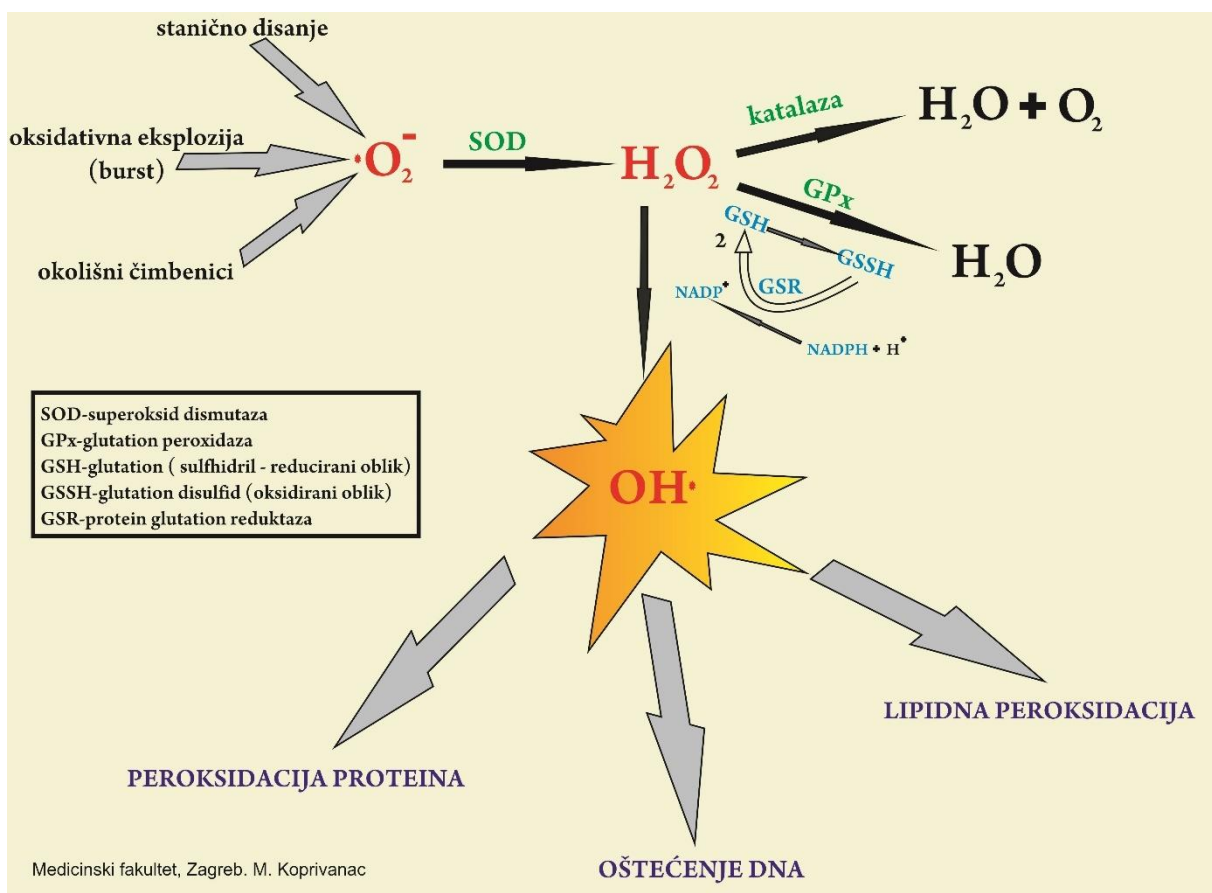
8. SAŽETAK.....	42
9. PRILOZI.....	44
Temeljna dokumentacijska kartica	

1. UVOD

1.1. Oksidacijski stres

Molekularni kisik nužan je za preživljavanje svih aerobnih organizama. Metabolizmom u mitohondrijima i peroksisomima te enzimatskom aktivnošću citokroma P-450, lipooksigenaza i drugih enzima stvaraju se reducirani metaboliti molekularnog kisika, poput superoksidnog aniona i vodikovog peroksida. Ti se metaboliti nazivaju reaktivne kisikove specije (ROS) jer su reaktivniji u odnosu na molekularni kisik i djeluju kao oksidansi. (Moini i sur., 2002).

Stvaranje takvih reaktivnih specija prikazano je Slikom 1.



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz oksidoredukcijskih procesa i stvaranja ROS

(<http://www.inpharma.hr/>)

Superoksidni anion formira se redukcijom molekularnog kisika posredovanom enzimima poput NAD(P)H oksidaze i ksantin oksidaze ili neenzimatski redoksreaktivnim

komponentama mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona. Superoksid dizmutaze (SOD) enzimatski konvertiraju superoksid u vodikov peroksid. U tkivima, superoksid se može neenzimatski pretvoriti u neradikalne specije vodikov peroksid i singletni kisik. U prisutstvu reduciranih prijelaznih metala (npr. iona željeza ili bakra), iz vodikova peroksida može nastati vrlo reaktivni hidroksilni radikal. Alternativno, vodikov se peroksid može pretvoriti u vodu pomoću katalaze ili glutation peroksidaze. (Dröge, 2002).

Dušikov oksid (NO) u visokim koncentracijama također može biti izvor oksidansa poznatih kao reaktivne dušikove specije (RNS), u koje se ubrajaju peroksinitrit, nitroksil i dušikov dioksid. (Moini i sur., 2002). NO radikal (NO[·]) u višim se organizmima stvara oksidacijom terminalnog gvanidinskog dušikova atoma L-arginina djelovanjem NO-sintaze (NOS). (Dröge, 2002).

Reaktivne kisikove i dušikove specije mogu biti slobodni radikali - reaktivne kemijske vrste s nesparenim elektronom (npr. superoksidni anion), ili čestice koje nisu slobodni radikali (npr. vodikov peroksid). (Štefan i sur., 2007).

Produkcija reaktivnih intermedijarnih specija (ROS i RNS) fiziološki je proces važan u regulaciji staničnog ciklusa i unutarstaničnoj signalizaciji. (Silva i sur., 2019). Vrlo je važna uloga ROS i RNS u imunološkom odgovoru. Djeluju kao toksični agensi koje otpuštaju makrofagi i neutrofilni s ciljem uništenja mikroba i drugih stranih molekula. Poznata je i uloga NO kao neurotransmitora i vazodilatatora. (Moini i sur., 2002).

Problem nastaje kada se takvih reaktivih specija stvori previše, zbog čega ih antioksidativni sustav organizma ne stiče neutralizirati i održati redoks homeostazu. Rezultat takve neravnoteže je oksidativni stres. (Silva i sur., 2019). Dakle, oksidacijski stres može se definirati kao neravnoteža između produkcije oksidansa i antioksidativnog kapaciteta stanice. Visoke razine ROS i RNS vrlo vjerojatno će dovesti do oštećenja staničnih makromolekula - lipida, proteina i DNA. (Moini i sur., 2002). Visoka koncentracija oksidiranih biomolekula povezana je s promjenama u aerobnom metabolizmu, upalnim odgovorom, izloženošću UV zračenju, hipoksijom, anomalnom staničnom proliferacijom i virusnim infekcijama. (Silva i sur., 2019). Smatra se da slobodni radikali i oksidacijski stres imaju veliku ulogu u patogenezi različitih bolesti: karcinoma, kardiovaskularnih bolesti, neuralnih poremećaja, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, ateroskleroze, ulceroznog kolitisa...

1.2. Biomarkeri oksidacijskog stresa

Biomarkeri oksidacijskog stresa mogu biti molekule koje se mijenjaju pri interakciji s ROS/RNS u svom mikrookolišu ili molekule antioksidativnog sustava koje se mijenjaju u odgovoru na redoks neravnotežu. Ključni kriterij validnosti pojedinog biomarkera je funkcionalna značajnost oksidativne modifikacije na stanicu, organ ili sustav u cjelini. U ostale faktore koji utječu na kliničku primjenjivost određivanja biomarkera ubrajaju se mogućnost prikupljanja prikladnog biološkog uzorka, stabilnost biomarkera u različitim uvjetima skladištenja i pripreme uzorka te specifičnost, osjetljivost i reproducibilnost metode mjerenja oksidativne modifikacije. (Ho i sur., 2013).

Lipidi su molekule vrlo podložne oksidaciji, a dva najproučavanija markera lipidne peroksidacije su izoprostani i malondialdehid. (Ho i sur., 2013). Lipidna peroksidacija je autokatalitički proces, čija je najčešća posljedica stanična smrt. To je proces koji može uzrokovati peroksidativna oštećenja tkiva pri upali, karcinomu i starenju. (Alam i sur., 2012).

Malondialdehid formira se kao jedan od krajnjih produkata slobodnih kisikovih radikala u procesu lipidne peroksidacije. (Alam i sur., 2012) Može se odrediti njegova razina u plazmi reakcijom s tiobarbiturnom kiselinom ili metodom ELISA. Metoda koja se zasniva na reakciji s tiobarbiturnom kiselinom naziva se TBARS metoda (*thiobarbituric acid reactive substances*) i nije specifična za malondialdehid, jer i drugi aldehidi mogu reagirati s ovom kiselinom. Međutim, TBARS metoda vrlo se često koristi kao indikator oksidacijskog stresa. (Ho i sur., 2013)

Izoprostani su molekule slične prostaglandinima, a stvaraju se peroksidacijom arahidonske kiseline u fosfolipidima stanične mebrane neovisno o enzimu ciklooksigenazi. Potom se otpuštaju u cirkulaciju pomoću fosfolipaza te se njihova razina može odrediti u tkivima, krvi i urinu, a zlatnim standardom za kvantifikaciju smatra se masena spektrometrija. Razine izoprostana u plazmi i urinu koreliraju s *in vivo* oksidacijskim stresom. (Ho i sur., 2013.; Czarska i sur., 2015).

Oksidacija kolesterola niske gustoće (LDL) reakcija je koja se može odvijati neenzimatski ili posredovano enzimima kao što su lipooksigenaze. Oksidirani LDL (oxLDL) zauzima središnju ulogu u patogenezi ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Originalno su se detektirala cirkulirajuća protutijela na različite oksidacijski-specifične epitope oksidiranog

LDL-a, a danas se sam oksidirani LDL detektira pomoću specifičnih monoklonskih protutijela koja direktno prepoznaju oksidacijski-specifične epitope. (Ho i sur., 2013)

Nitriranje tirozinskih ostataka u proteinima posredovano je reaktivnim dušikovim specijama, a rezultira adicijom nitro skupine na tirozin, čime nastaje nitrotirozin. Takva promjena na tirozinskim ostacima nekih enzima može utjecati na njihovu funkciju. Npr. formacija nitrotirozina na superoksid dizmutazi, prostaciklin sintazi ili tirozin hidroksilazi inhibira njihovu normalnu aktivnost, dok je kod fibrinogena povezana s povećanom enzimatskom aktivnošću. Mjerenje razine nitriranja tirozina koristi se kao indikator oksidacijskog stresa. (Ho i sur., 2013)

Formiranje disulfidnog mosta između reaktivnog cisteinskog ostatka i staničnog tripeptida glutationa reverzibilna je reakcija koja se naziva S-glutationilacija. Ova oksidativna modifikacija ima učinak na tercijarnu strukturu i funkciju proteina te sudjeluje u redoks regulaciji važnih enzima, npr. endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS), Ca²⁺-ATPaze sarkoplazmatskog retikuluma (SERCA) i Na⁺-K⁺ crpke. Istražuje se primjena određivanja S-glutationilacije hemoglobina u krvi kao biomarkera oksidacijskog stresa. (Ho i sur., 2013)

Alantoin je krajnji produkt neenzimatske oksidacije mokraćne kiseline. Obećavajući je biomarker prooksidativnih procesa u ljudi. Određuje u urinu, vrlo je stabilan i lako se detektira. (Czerska i sur., 2015)

Razina oksidacijskog stresa u organizmu može se procijeniti mjerenjem aktivnosti antioksidativnih enzima poput katalaze, glutation peroksidaze ili superoksid dizmutaze. (Ho i sur., 2013) ili mjerenjem ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC, eng. *total antioxidant capacity*), odnosno neenzimatskog antioksidativnog kapaciteta (NEAC, eng. *nonenzymatic antioxidant capacity*) seruma. Informacije o antioksidacijskom kapacitetu seruma dobivaju se *in vitro* metodama koje mjere ili sposobnost gašenja radikala antioksidansima ili redukcijski potencijal, a temelje se na reakcijskim mehanizmima transfera atoma vodika (HAT, eng. *hydrogen atom transfer*) ili transfera jednog elektrona (SET, eng. *single electron transfer*). Primjeri takvih metoda su FRAP, TRAP, TEAC, ORAC i dr. (Marrocco i sur., 2017).

Tablica 1. prikazuje najvažnije biomarkere oksidacijskog stresa razvrstane ovisno o oksidacijskim procesima u kojima nastaju, a neki od njih bili su detaljnije opisani u prethodnim odlomcima.

Tablica 1. Prikaz oksidacijskih procesa i biomarkera oksidacijskog stresa koji se u njima stvaraju (preuzeto i prilagođeno iz Czerska i sur., 2015)

PROCES	MARKER OKSIDACIJSKOG STRESA
lipidna peroksidacija	malondialdehid (MDA)
	F2-izoprostani
	oksidirani kolesterol niske gustoće (LDL)
	oksidirana protutijela na LDL
	produkti uznapredovale lipidne oksidacije (eng. <i>advanced lipid oxidation products</i>)
	akrolein
oksidacija proteina	4-hidroksinoneal
	spojevi koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS)
	produkti uznapredovale oksidacije proteina (eng. <i>advanced protein oxidation products</i>)
	krajnji produkti uznapredovale glikacije (eng. <i>advanced glycation end-products - AGEs</i>)
	nastajanje disulfidne veze
3-nitrotirozin	
oksidacija ugljikohidrata	formacija karbonila
oksidacija nukelinskih kiselina	reaktivni aldehidi
	reducirani šećeri (askorbat, riboza)
	8-oksi-2-deoksigvanozin

1.3. Uloga oksidacijskog stresa u razvoju cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN)

CIN je premaligna promjena epitelnih stanica vrata maternice koja se s vremenom može razviti u cervikalni karcinom, odnosno rak grlića maternice. Cervikalni karcinom četvrti je najčešći karcinom po incidenciji među ženama u svijetu. Procjenjuje se da je u 2018. godini 570 000 žena u svijetu dobilo dijagnozu cervikalnog karcinoma, a čak 311 000 ih je umrlo od te bolesti. (<https://www.who.int/>)

Više od 99% slučajeva raka grlića maternice i CIN-ova potaknuto je infekcijom humanim papiloma virusom (HPV). HPV-geotipovi 6, 11 i 42 povezani su s razvojem benignih genitalnih bradavica i CIN-om niskog stupnja (CIN1). HPV-geotipovi 16 i 18 tipovi su visokog rizika (HR-HPV), a perzistentna infekcija ovim geotipovima HPV-a često dovodi do razvoja premalighnih promjena visokog stupnja (CIN2 i CIN3) te u konačnici cervikalnog karcinoma. (Koshiyama i sur., 2019a)

Infekcija visokorizičnim HPV geotipovima sama po sebi nije dovoljna da bi došlo do razvoja karcinoma cerviksa. Taj proces zahtijeva vrijeme, kako bi se moglo akumulirati dovoljno promjena na molekularnoj razini koje će potaknuti i održati onkogenezu. To znači da su za karcinogenezu ključni oslabljeni imunosni odgovor i perzistirajuća infekcija HPV-om. (Silva i sur., 2019). Smatra se da je za izlječenje oko 90% HR-HPV infekcija dovoljan adekvatni imunosni odgovor domaćina (Ma i sur., 2017), a infekcija najčešće spontano nestane unutar nekoliko mjeseci te kod većine zaraženih ne dođe do razvoja raka (Silva i sur., 2019). Dakle, dodatni unutarstanični mehanizmi moraju se pokrenuti kako bi došlo do rasta malignog tumora, a za to trebaju biti prisutni i drugi karcinogeni čimbenici.

Uočena je korelacija između kronične upale, oksidacijskog stresa i karcinogeneze. (Koshiyama i sur., 2019a). Molekularne epidemiološke studije pokazale su da postoji pojačana ekspresija ciklooksigenaze tipa 2 (COX-2) kod cervikalnog karcinoma, što ima izravan utjecaj na upalni odgovor, inhibiciju apoptoze i angiogenezu. (Hiraku i sur., 2007). Upala uzrokovana HPV-om dovodi do otpuštanja različitih proupalnih čimbenika (interleukini IL-1 i IL-6, faktor nekroze tumora TNF- α i interferon γ) i do generiranja reaktivnih kisikovih specija. (Koshiyama i sur., 2019a). Također, kronični upalni odgovor uzrokuje produkciju reaktivnih dušikovih specija, kao što je dušikov (II) oksid (Hiraku i sur., 2007). Upala može

na još jedan način pridonijeti oksidacijskom stresu - smanjenjem razine antioksidanasa prirodno prisutnih u organizmu. (Koshiyama i sur., 2019a).

Postoji više mehanizama kojima oksidacijski stres može podržati proces transformacije stanica u tumorske stanice. ROS reguliraju aktivnost inflammasoma u odgovoru na onkogeni virusnu infekciju, kao što je HR-HPV infekcija. Inflammasomi su multiproteinski kompleksi koji se sklapaju u citosolu nakon izlaganja patogenu, a vode do aktivacije kaspaza. Posljedice aktivacije kaspaza su lučenje proupalnih citokina i programirana stanična smrt. Uz to, ROS mogu aktivirati ili inhibirati signalizaciju nuklearnog faktora κ B (NF- κ B), ovisno o smjeru signalnog puta (uzvodno ili nizvodno) i tipu stanica. NF- κ B ima središnju ulogu pri upali i imunom odgovoru, a sudjeluje i u staničnim procesima kao što su rast, preživljenje i proliferacija, te u patološkim procesima koji uključuju rast tumora i metastaziranje. Aktivacija NF- κ B signalnog puta slobodnim radikalima kompleksna je i može imati različite biološke učinke. (Silva i sur., 2019). Interferencija s regulacijom inflammasoma ili signalizacijom NF- κ B samo su neki od mehanizama kojima oksidacijski stres može doprinijeti razvoju karcinoma.

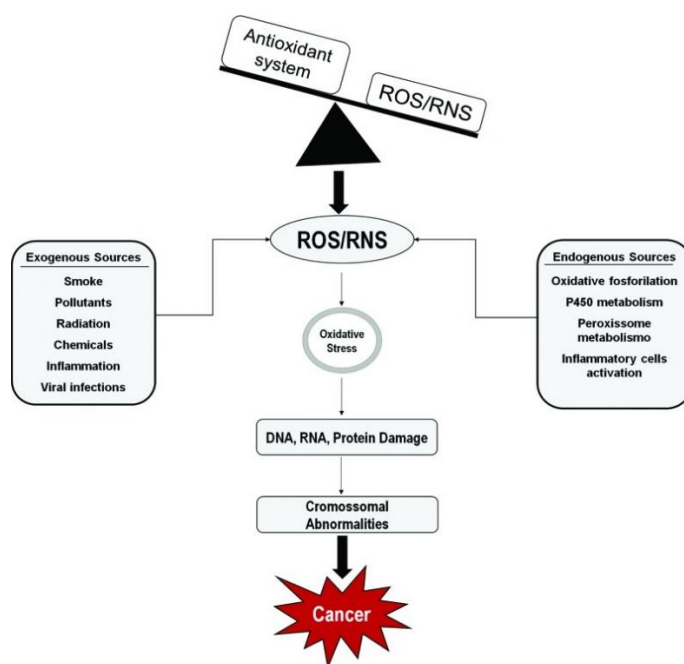
Generiranje ROS može uzrokovati dvolančane lomove DNA u stanicama HPV-a i u stanicama domaćina, čime je olakšana integracija HR-HPV genoma. (Mitra i sur., 2016).

Humani protoonkogeni (npr. c-Ha-ras gen) mogu se aktivirati uslijed oštećenja DNA kisikovim radikalima. 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksigvanozin (8-oxodG) indikator je oksidativnog oštećenja DNA, a njegova razina korelira sa stupnjem intraepitelne displazije. Dušikov oksid medijator je u stvaranju 8-nitrogvanina, markera nitrativnog oštećenja DNA i potencijalnog mutagena, koji je možda odgovoran za tumor-promotorske učinke. (Hiraku i sur., 2007). Oksidativna oštećenja genoma snažno su povezana s epigenetskim promjenama.

Neki egzogeni faktori poput pušenja, izloženosti zračenju i kemikalijama, zagađenja okoliša i prehrane induciraju produkciju slobodnih radikala i na taj način povećavaju oksidacijski stres, a time i mogućnost progresije CIN-a i nastanka karcinoma. (Silva i sur., 2019).

Iz svega navedenog može se zaključiti da oksidacijski stres, kronična upala, epigenetske promjene i infekcija HR-HPV djeluju sinergistički pri onkogenezi cerviksa. (Silva i sur., 2019). Osobito je važna uloga oksidacijskog stresa, a u brojnim dosad provedenim istraživanjima i objavljenim pregledanim člancima dokazani su relevantni učinci antioksidanasa iz hrane na sve stadije razvoja CIN-a do cervikalnog karcinoma.

Najvažniji faktori koji pridonose oksidacijskom stresu i njegova uloga u karcinogenezi sažeti su u shematskom prikazu na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz nastanka oksidacijskog stresa i mehanizma razvoja karcinoma djelovanjem oksidacijskog stresa (preuzeto iz Silva i sur., 2019)

1.4. Utjecaj prehrane na oksidacijski stres

1.4.1. Antioksidansi

Antioksidansi djeluju kao „sakupljači“ slobodnih radikala i oksidanasa, čime sprječavaju oksidativno oštećenje DNA, lipida i proteina. (Moini i sur., 2002; Koshiyama i sur., 2019a). Oni imaju učinak u vrlo malim koncentracijama (u odnosu na supstrat koji se može oksidirati) te dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata. Uklanjanje kisika, smanjenje koncentracije kisika, uklanjanje metalnih iona, uklanjanje ciljnih ROS, uklanjanje slobodnih radikala ili uklanjanje singletnog kisika, mehanizmi su kojima antioksidansi postižu svoj učinak. (Štefan i sur., 2007)

Stanični antioksidativni sustavi koji se mogu suprotstaviti štetnim učincima slobodnih radikala dijele se na enzimatske i neenzimatske. U enzimatske sustave ubrajaju se: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutathion peroksidaza (GPX) i glutathion-S-transferaza (GST). Neenzimatski sustavi su molekule poput vitamina C i E, lipoične kiseline, karotenoida,

flavonoida itd. (Silva i sur., 2019). Oni mogu biti endogeni, što znači da se stvaraju metabolizmom u organizmu, ili egzogeni, uneseni prehranom. Primjer endogenih neenzimatskih antioksidanasa su koenzim Q10, mokraćna kiselina, bilirubin... Primjer endogenih antioksidanasa su vitamini C i E, karotenoidi, flavonoidi... (Pham-Huy i sur., 2008).

Prehrana se smatra jednim od važnijih egzogenih etioloških čimbenika oksidacijskog stresa, bitne su njene karakteristike i kvaliteta, odnosno omjer unosa različitih nutrijenata - balans proteina, ugljikohidrata, masti, makroelemenata i elemenata u tragovima. (Rahal i sur., 2014). Upala i oksidacijski stres mogu biti direktne posljedice neuravnotežene prehrane, koja uključuje obroke bogate pretežito mastima i ugljikohidratima. (Serafini i Peluso, 2016). Nizak unos protektivnih antioksidanasa i fitokemikalija prehranom može umanjiti sposobnost antioksidativnih sustava organizma. (Vincent i Taylor, 2006). S druge strane, uočeni su povoljni učinci prehrane bazirane na voću i povrću na parametre oksidacijskog stresa. Zdravstveni benefiti takve prehrane mogu se povezati s protuupalnim i antioksidativnim mehanizmima širokog spektra fitokemikalija prisutnih u voću, povrću, bilju i začinima. (Serafini i Peluso, 2016). Osim prehrane bazirane na voću i povrću, i mediteranska je prehrana pokazala zaštitno djelovanje protiv oksidacijskog stresa. Tradicionalna mediteranska prehrana, koja uključuje visok unos povrća, cjelovitih žitarica, mahunarki, voća, orašastih plodova, sjemenki i ekstra djevičanskog maslinovog ulja, te umjeren unos crnog vina, vrlo je bogata antioksidativnim vitaminima, folatima, flavonoidima i mineralima. (Tosti i sur., 2018).

Vitamin A zapravo je skupina više spojeva topljivih u mastima, retinoida. Uključuje retinol, retinal i retinilne estere. Deficijencija vitamina A uzrokuje oksidativni stres, inhibira funkcije popravka stanica i uzrokuje oštećenje stanica. (Ono i sur., 2020). Aktivni oblik vitamina A prisutan je samo u namirnicama životinjskog porijekla, poput mlijeka, jetrice, ribljeg ulja ili žutanjka. Često se dodaje hrani kako bi se pojačala njena nutritivna vrijednost, npr. žitaricama, začinima, mastima i uljima. (WHO i FAO, 2004).

Prekursori vitamina A pripadaju skupini karotenoida, a u njih ubrajamo β -karoten (provitamin A), α -karoten, β -kriptoksantin i neke druge karotenoide. (Koshiyama, 2019b). Najistraživaniji je β -karoten, koji se smatra efektivnim u smanjenju lipidne peroksidacije te se ispituju njegova antioksidativna svojstva u stanicama imunološkog sustava. Provitamini A nalaze se u zelenom lisnatom povrću (npr. špinat), žutom povrću (mrkva, bundeva...) te narančastom i žutom necitrusnom voću (marelica, mango...). (WHO i FAO, 2004).

Karotenoidi su pigmenti koji daju žutu, narančastu ili crvenu boju raznim biljkama, voću i povrću. Postoji više od 600 vrsta karotenoida i nisu svi prekursori vitamina A. Neki od najpoznatijih su lutein, zeaksantin i likopen. (Ono i sur., 2020). Općenito se smatraju vrlo dobrim "hvatačima" slobodnih radikala, a likopen je osobito djelotvoran u uklanjanju singletnog kisika. (WHO i FAO, 2004).

Vitamin C (askorbinska kiselina) poznat je po svom povoljnom učinku na oksidativni stres i ulozu u imunom odgovoru. Vrlo je moćan antioksidans, "hvatač" slobodnih radikala, a djeluje na način da donira jedan vodikov atom i postaje stabilni askorbinilni anion (slobodni radikal). Prisutan je u brojnom voću i povrću, a osobito bogat izvor su citrusno voće i povrće poput brokule, kupusa i kelja. (WHO i FAO, 2004).

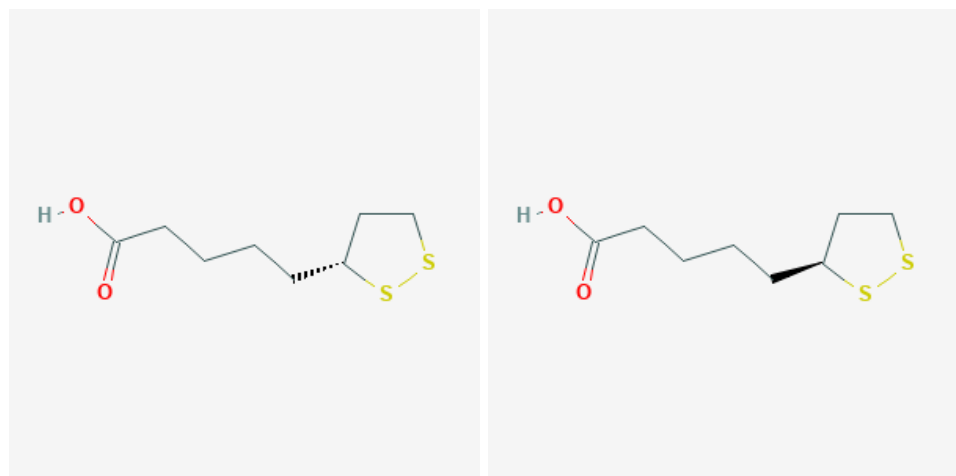
Vitamin D steroidni je hormon topljiv u mastima. Njegova je glavna uloga održavanje normalnih razina kalcija i fosfata u krvi kako bi se mogla odvijati normalna mineralizacija kostiju, mišićne kontrakcije, provođenje živčanih signala i općenite funkcije svih stanica u tijelu. Uz to, modulira transkripciju proteina važnih u staničnom ciklusu i ima imunomodulatorna svojstva. Sintetizira se u organizmu, prvi korak je u koži djelovanjem UV zračenja, a sinteza se nastavlja u jetri i bubrezima. (WHO i FAO, 2004). Kod osoba koje se ne izlažu dovoljno sunčevoj svjetlosti, važan je unos vitamina D prehranom iz namirnica poput masne ribe (tuna, morski pas, losos, haringa) ili hrane obogaćene ovim vitaminom. (Laktašić-Žerjavić i sur., 2011)

Vitamin E skupina je više spojeva topljivih u mastima, npr. α -tokoferol, γ -tokoferol i dr. Ima sposobnost zaustavljanja produkcije ROS pri oksidaciji lipida te na taj način štiti membrane od oksidacijskog stresa. Smatra se da zbog svog djelovanja može zaštititi stanice od oksidativnog oštećenja DNA i mutageneze, čime prevenira nastanak pojedinih tumora, a njegov protektivni učinak pokazao je relevantnost *in vivo*. (Silva i sur., 2019; Ono i sur., 2020). Vitamin E prisutan je u namirnicama biljnog i životinjskog porijekla te se njime često obogaćuju biljna ulja i procesuirana hrana. (WHO i FAO, 2004).

Cink i selen su minerali važni za funkcioniranje endogenih antioksidativnih mehanizama. Cink u kombinaciji s bakrom ili magnezijem sastavni je dio superoksid-dismutaze, a selen je komponenta glutation-peroksidaze. Količina selena u namirnicama vrlo je varijabilna jer na nju jako utječu okolišni uvjeti i način uzgoja poljoprivrednih kultura. Selen iz brazilskih oraha jako je dobro bioraspoloživ. Nemasno crveno meso, cjelovite žitarice i mahunarke najbogatiji su prirodni izvori cinka. (WHO i FAO, 2004).

1.4.2. α -lipoična kiselina

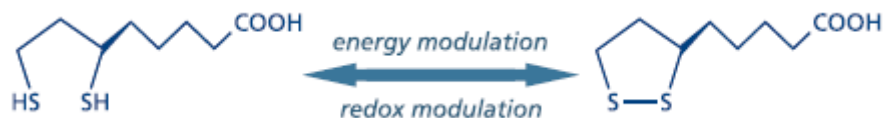
α -lipoična kiselina (1,2-ditiolan-3-pentanska kiselina) važan je biološki tiolni antioksidans. Ona postoji u obliku R- i S-enantiomera, a njihove strukture prikazuje Slika 3. Samo prirodno prisutan R-enantiomer α -lipoične kiseline esencijalan je u biološkim sustavima. Kofaktor je piruvat-dehidrogenaze i α -ketoglutarat-dehidrogenaze u mitohondrijima, zbog čega je neophodan u proizvodnji energije te regulaciji metabolizma ugljikohidrata i proteina. (Packer i Cadenas, 2010; Tóth i sur., 2021).



Slika 3. Struktura R- i S-enantiomera α -lipoične kiseline

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

α -lipoična kiselina lako prelazi krvno-moždanu barijeru i ulazi u stanice, gdje se reducira u dihidrolipoičnu kiselinu (Slika 4).



Slika 4. Redukcija α -lipoične u dihidrolipoičnu kiselinu – izmjena tiol/difulfid (preuzeto iz Packer i Cadenas, 2010)

I α -lipoična i dihidrolipoična kiselina pokazuju antioksidacijske učinke te su aktivne i u hidrofilnom i u lipofilnom mediju. Mogu djelovati direktno, neutralizirajući slobodne radikale, ili ulaziti u interakcije s drugim antioksidansima i regenerirati ih. (Tóth i sur., 2021).

α -lipoična kiselina sintetizira se u jetri. (Tóth i sur., 2021), zbog čega se smatra endogenim neenzimatskim antioksidansom. (Pham-Huy i sur., 2008). Međutim, može se i unijeti u organizam kao egzogeni antioksidans jer se nalazi u nekim namirnicama. Povrće i životinjska tkiva sadrže manje količine R- α -lipoične kiseline u obliku lipolizina. Najbogatiji prirodni izvor je špinat, a slijede brokula i rajčica. Što se tiče životinjskih tkiva, najveće koncentracije lipolizina pronađene su u bubrezima, srcu i jetri. (Moini i sur., 2002)

Više studija dokazalo je da suplementacija α -lipoičnom kiselinom smanjuje razinu oksidacijskog stresa i obnavlja reducirane zalihe drugih bioloških antioksidanasa u različitim fiziološkim i patofiziološkim uvjetima *in vivo*. (Moini i sur., 2002). Maksimalna dnevna doza α -lipoične kiseline koja se smatra sigurnom iznosi 1800 mg. Više doze ili intraperitonealna primjena u dozi od 5 do 10 g na dan mogu djelovati prooksidativno, povećavajući razine hidroperoksida u krvi. (Tóth i sur., 2021).

Uočen je velik potencijal α -lipoične kiseline u očuvanju zdravlja i terapiji određenih bolesti zbog njezinih antioksidacijskih i protuupalnih svojstava. Zasad je dokazan pozitivan učinak suplementacije α -lipoičnom kiselinom na redukciju tjelesne mase, reumatoidni artritis, kroničnu bol, dijabetičku neuropatiju, migrene i ulcerozni kolitis. Također, smatra se da bi mogla biti poželjan suplement u terapiji karcinoma.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Oksidacijski stres i upala važni su etiološki čimbenici u pojavnosti cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN). α -lipoična kiselina (ALA) prepoznata je kao potentni nutritivni antioksidans i molekula sa izraženim imunomodulatornim (protuupalnim) djelovanjem. U okviru ovog istraživanja po prvi će put biti istražen utjecaj suplementacije α -lipoičnom kiselinom na antioksidativni status pacijentica s dijagnozom CIN1 i CIN2. Analizom prehrambenih upitnika pacijentica utvrdit će se povezanost određenih karakteristika životnog stila (pušenje, obrasci prehrane, pretilost, uzimanje dodataka prehrani) s pojavnošću oksidacijskog stresa i učinkovitošću suplementacije α -lipoičnom kiselinom. Dobiveni rezultati doprinijet će trenutnim saznanjima o mogućim nutritivnim intervencijama vezanim uz prevenciju i smanjenje oksidacijskog stresa kod pacijentica s CIN1 i CIN2 te značajnosti α -lipoične kiseline kao dodatka prehrani s antioksidativnim učinkom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Plan istraživanja

Učinkovitost α -lipoične kiseline istražena je u okviru dvostruko-slijepa, placebo kontrolirane studije na oko 100 pacijentica (18-55 godina). Pacijentice su uključene u studiju nakon provjere kriterija za isključivanje i dobivanja informiranog pristanka. Sve ispitanice koje su sudjelovale u istraživanju imale su promjene u citološkom nalazu, što se utvrdilo rutinskim dijagnostičkim pregledom u ginekološko-kolposkopskoj ambulanti (CIN1 ili CIN2). Nakon ginekološkog pregleda, pacijenticama su iz kubitalne vene standardnim načinom uzete dvije epruvete krvi radi laboratorijskih analiza nužnih za istraživanje. Pacijentice su potom ispunile upitnik o prehranbenim i životnim navikama. Nasumična raspodjela pacijentica u tretiranu, odnosno kontrolnu skupinu provedena je metodom blok randomizacije, koju je provela educirana osoba. Pacijentice su zatim dobile pakiranje kapsula označeno šifrom u kojem se nalazi 180 kapsula te uputa o korištenju. Pakiranja označena različitim šiframa sadrže ili kapsule s 300 mg α -lipoične kiseline (tretirana skupina) ili pomoćnu tvar - rižin škrob (kontrolna skupina) (proizvodnja: Zada Pharmaceuticals, Tuzla, Bosna i Hercegovina). Pacijentice su kroz sljedećih 90 dana uzimale po dvije tablete dnevno; ujutro i navečer, uz obrok (kako je navedeno u uputi o korištenju) – ukupno 600 mg ALA/dne. Nakon isteka 90 dana pacijentice su ponovile dijagnostički pregled u ginekološko-kolposkopskoj ambulanti te su im ponovno iz kubitalne vene standardnim načinom uzete dvije epruvete krvi radi dobivanja laboratorijskih nalaza nužnih za istraživanje. Pacijentice su, prilikom ponovljenog posjeta ginekologu, vratile preostale tablete suplementa u originalnoj ambalaži te je utvrđena adherencija terapiji.

3.2. Ispitanice

3.2.1. Kriteriji uključivanja/isključivanja

Kriteriji za uključivanje pacijentica u studiju bili su: histološka potvrda niskog stupnja SIL-a, godine (18-55), seksualno aktivne žene. Kriteriji za isključivanje pacijentica iz studije bili su sljedeći: trudnoća, maligne bolesti, dijabetes, kronične upalne bolesti, histerektomija, destruktivna terapija cerviksa, abortus, HPV vakcinacija i menopauza.

Pacijentice koje su zadovoljile kriterije uključivanja u studiju upoznate su sa svrhom i načinom izvođenja studije i uključene u studiju.

3.2.2. Uzimanje uzoraka krvi

Uzorci krvi uzimaju se iz kubitalne vene, standardnim načinom. Za potrebe laboratorijskih analiza uzete su po dvije epruvete krvi (6 i 9 mL). Lipidni status (LDL kolesterol, HDL kolesterol, trigliceridi) te parametri upale (sedimentacija, visoko-osjetljivi CRP i fibrinogen) određeni su neposredno po uzimanju uzorka krvi. Preostali serum je alikvotiran i pohranjen na -20°C do analiza. Alikvotirani uzorci seruma korišteni su za određivanje parametara oksidacijskog stresa. Antioksidacijski potencijal seruma određen je modificiranim spektrofotometrijskim metodama (Re i sur., 1999).

3.3. Metode

3.3.1. Prehrambene navike pacijentica

Ispitivanje prehrambenih i životnih navika pacijentica provedeno je pomoću standardiziranog i validiranog prehrambenog upitnika (semikvantitativni upitnik o učestalosti konzumacije namirnica) uz pomoć educiranog osoblja. Prikupljeni podaci pružili su osnovne informacije o obrascima prehrane, unosu antioksidansa, korištenju dodatka prehrani, pušenju i fizičkoj aktivnosti pacijentica. Pacijenticama je savjetovano da ne mijenjaju način prehrane i stupanj fizičke aktivnosti tijekom trajanja studije.

3.3.2. Antioksidacijski potencijal seruma

Antioksidacijski potencijal seruma pacijentica određen je modificiranom TEAC metodom (eng. *Trolox equivalent antioxidant capacity*) (Re i sur., 1999). Tom metodom mjeri se ukupni antoksidativni kapacitet nekog uzorka. Otopina Trolox[®]-a, vodotopljivog analoga vitamina E, koristi se kao antioksidativni standard, po čemu je metoda dobila i ime. Otopina ABTS-a miješa se s otopinom kalijeva persulfata kako bi se generirao kromofor i radikalni kation $\text{ABTS}^{\cdot+}$, plavo-zelene boje. U prisutnosti antioksidanasa iz uzorka dolazi do redukcije $\text{ABTS}^{\cdot+}$ kationa, a uslijed toga i do dekolorizacije te pada apsorbancije. Apsorbancija se mjeri pri 750 nm, a iz mjerenja se mogu dobiti informacije o antioksidativnoj sposobnosti gašenja radikalnog kationa izraženo kao Trolox ekvivalenti.

Reagensi:

- 7 mM otopina ABTS-a priprema se otapanjem 10 mg (1 tableta) ABTS-a u 2,8 mL ultračiste vode.
- 2,45 mM otopina kalijeva persulfata ($K_2S_2O_8$) priprema se tako da se 6,62 mg $K_2S_2O_8$ izvaže u odmjernu tikvicu od 10 mL, otopi u manjoj količini ultračiste vode te dopuni istom do oznake.
- Stock otopina $ABTS^{\cdot+}$ radikala dobiva se miješanjem jednakih količina (2,8 mL) 7 mM otopine ABTS-a i 2,45 mM otopine $K_2S_2O_8$. Stvoreni ABTS kation nestabilan je, pa otopina mora stajati 12 sati u mraku kako bi se stabilizirao, nakon čega postaje spremna za upotrebu.
- Otopina $ABTS^{\cdot+}$ radikala koja se koristi u ispitivanjima treba biti razrijeđena 20x u odnosu na stock otopinu. Razrjeđivanje je potrebno kako bi maksimalna apsorbancija otopine ABTS kationa bila od 0,7 do 0,8. Dobiva se pipetiranjem 3 mL stock otopine i 57 mL ultračiste vode u lađicu te miješanjem pipetom, a apsorbancija se provjerava pri 750 nm i 30°C.

Prvi je korak mjerenja miješanje mikrotitarske ploče s reakcijskom smjesom u trajanju od 60 sekundi, a drugi je inkubacija mikrotitarske ploče na 30°C u trajanju od 90 sekundi.

Apsorbancija se mjeri na završetku inkubacije pri 750 nm.

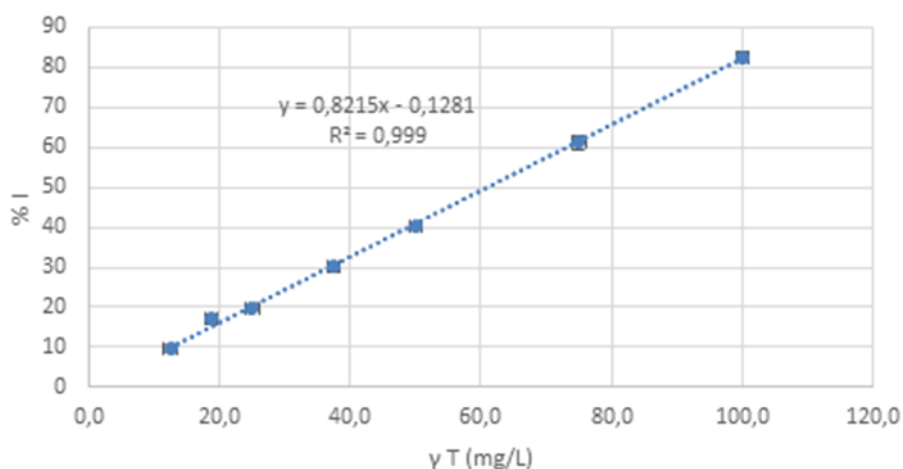
Reakcijska smjesa izrađuje se na način da se u svaku jažicu pipetira se 20 μ L razrijeđenog uzorka u kvadriplikatu, osim u zadnje 4 jažice zadnjeg reda ploče, gdje se pipetira slijepa proba (ultračista voda) u kvadriplikatu. Uzorak se razrjeđuje na način da se se jažicu ispipetira 4 μ L originalnog uzorka i doda 16 μ L ultračiste vode. U svaku se jažicu potom pomoću multikanalne pipete ispipetira 200 μ L razrijeđene otopine $ABTS^{\cdot+}$ radikala. Tada započinje mjerenje u uređaju čitaču mikrotitatskih pločica prema već opisanom protoklu.

U ispitivanju je sudjelovalo 100 ispitanica, kojima je vađena krv prije i nakon 90 dana suplementacije. Dakle, mjerenje se provodi za ukupno 200 uzoraka seruma u kvadriplikatu.

Antioksidativni kapacitet uzoraka računa se kao postotak inhibicije (%I) ABTS radikala pri 750 nm. Formula glasi:

$$\%I = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A_0 je apsorbancija kontrolne reakcije ABTS-a umanjena za apsorbanciju slijepe probe nakon 3 minute. A_1 je apsorbancija uzorka umanjena za apsorbanciju slijepe probe nakon 3 minute. Trolox ekvivalenti računaju se iz TEAC baždarnog dijagrama. Za izradu baždarnog dijagrama potrebno je pripremiti niz otopina Troloxa različitih razrjeđenja (100-3 mg/L) i izmjeriti njihove apsorbancije te izračunati postotak inhibicije za pojedinu koncentraciju Troloxa. Iz dobivenih vrijednosti crta se baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost postotka inhibicije ABTS radikala o koncentraciji Trolox standarda, a može se vidjeti na slici 5. Jednadžba pravca dobivena u ovom slučaju glasi: $y=0,8125x-0,1281$.



Slika 5. Baždarni dijagram ovisnosti gašenja apsorbancije reakcijske smjese (750 nm) o koncentraciji Trolox[®]-a

3.4. Materijali

3.4.1. Kemikalije

- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol – ABTS (Sigma, Missouri, SAD)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ultračista voda (MiliQ-H2O) (Merck, New Jersey, SAD)
- (±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina – Trolox (Sigma, Missouri, SAD)

3.4.2. Instrumenti i pribor

- Mikrotitarske ploče s 96 jažica ravnog dna kapaciteta 330 μ L, Thermo Scientific 130188 BioLite 96 1/Sleeve
- Multikanalna pipeta RaininPipet-Lite XLS (Mettler Toledo, SAD)
- Mikropipete
- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Vortex miješalica, VTX-3000L Mixer Uzusio (LMS, Tokio, Japan)
- pH-metar, 702 SM Titrino (Metrohm AG, Herisau, Švicarska)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VICTOR™ X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)
- Eppendorf epruvete
- Falcon kivete
- Lađice

3.5. Statistička obrada podataka

Srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja izračunate su u programu Excel (Microsoft Corporation, USA). Statistička obrada potom je nastavljena u programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Testirana je normalnost raspodjele dobivenih podataka te su na temelju dobivenih rezultata odabrani statistički testovi za daljnju obradu. Usporedba rezultata provedena je korištenjem Studentovog t-testa i/ili χ^2 testa pri čemu je $p < 0,05$ smatran statistički značajnom razlikom.

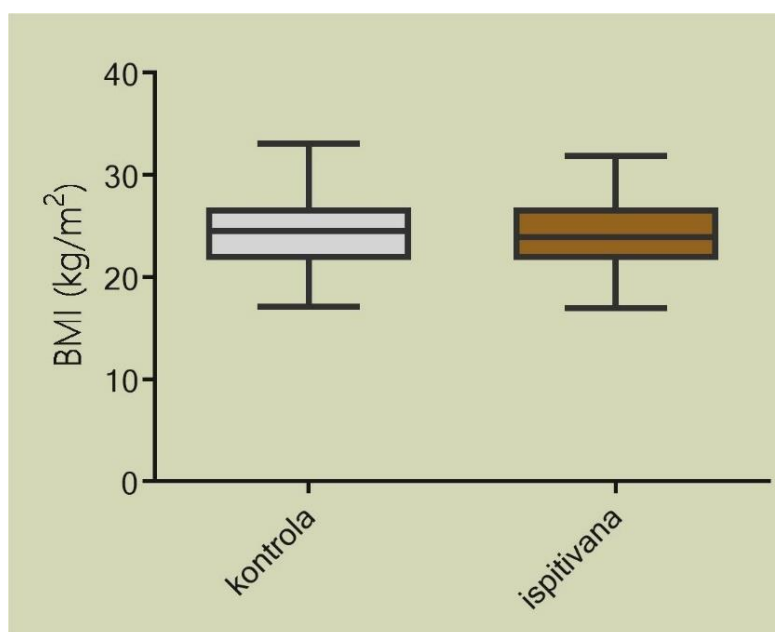
4. REZULTATI

4.1. Karakteristike kontrolne i ispitivane skupine

Uspoređene su pojedine karakteristike kontrolne (50 pacijentica) i ispitivane skupine (50 pacijentica) kako bi se utvrdilo ima li između dviju skupina statistički značajnih razlika koje bi mogle utjecati na antioksidacijski kapacitet seruma. Parametri koji su se uspoređivali su indeks tjelesne mase (BMI), pušenje i unos dodataka prehrani s antioksidansima (vitamini C, E i D; Se; CoQ). Svi navedeni podaci prikupljeni su iz prehrambenog upitnika (Prilog 1.).

4.1.1. BMI

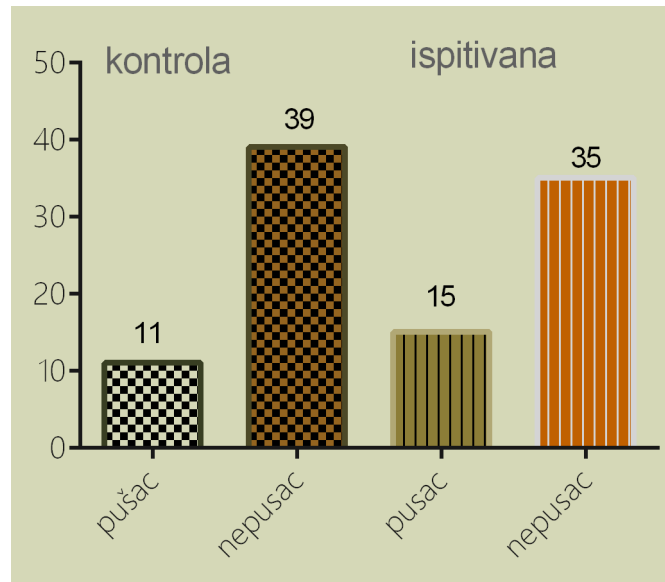
Minimalni BMI u kontrolnoj skupini iznosi 17,11, a maksimalni 33,06. Srednja vrijednost BMI-a je 24,53 za kontrolnu skupinu. U ispitivanoj je skupini minimalna vrijednost BMI-a 16,98, a maksimalna 31,89. Srednja vrijednost BMI-a u ispitivanoj skupini iznosi 24,12 (Slika 6). Raspodjela podataka prošla je test normalnosti te je t-testom utvrđena $p=0.5732$, što znači da između dviju skupina ne postoji statistički značajna razlika u prosječnom indeksu tjelesne mase.



Slika 6. Grafički prikaz raspona BMI kontrolne i ispitivane skupine

4.1.2. Pušenje

U kontrolnoj je skupini ukupno 11 pušačica i 39 nepušačica, a u ispitivanoj je skupini 15 pušačica i 35 nepušačica (Slika 7). Primjenom χ^2 testa utvrđena je vrijednost 0,8316 što znači da za vrijednosti $df=1$ i $p<0.05$ dvije skupine u tom kontekstu nisu značajno različite (Slika 8).



Slika 7. Grafički prikaz broja pušača i nepušača u kontrolnoj i ispitivanoj skupini

Table entries represent values from χ^2 distribution with upper tail area equal to α .

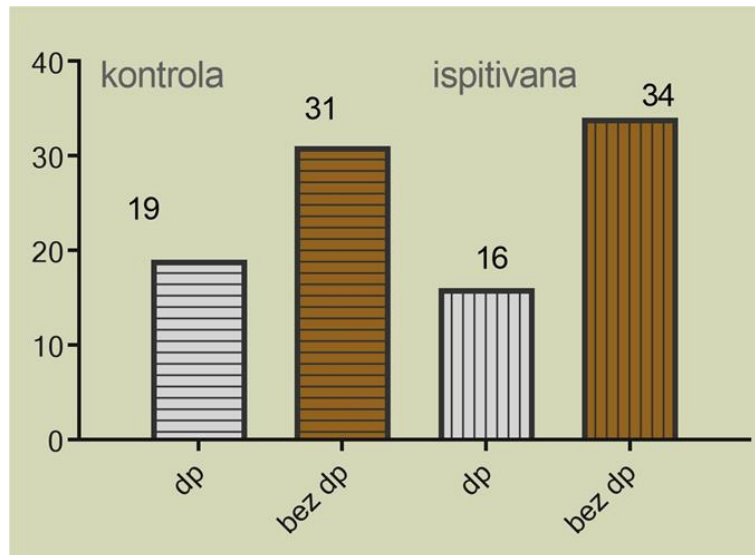
$$P(\chi^2 > \chi^2_{df}) = \alpha, \text{ e.g., } P(\chi^2_3 > 7.81) = 0.05$$

df	α				
	.10	.05	.025	.01	.005
1	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88
2	4.61	5.99	7.38	9.21	10.60
3	6.25	7.81	9.35	11.34	12.84
4	7.78	9.49	11.14	13.28	14.86
5	9.24	11.07	12.83	15.09	16.75
6	10.64	12.59	14.45	16.81	18.55
7	12.02	14.07	16.01	18.48	20.28
8	13.36	15.51	17.53	20.09	21.95
9	14.68	16.92	19.02	21.67	23.59
10	15.99	18.31	20.48	23.21	25.19
11	17.28	19.68	21.92	24.72	26.76
12	18.55	21.03	23.34	26.22	28.30
13	19.81	22.36	24.74	27.69	29.82
14	21.06	23.68	26.12	29.14	31.32
15	22.31	25.00	27.49	30.58	32.80

Slika 8. Granične vrijednosti χ^2 distribucije (<https://sphweb.bumc.bu.edu/>)

4.1.3. Korištenje dodataka prehrani

Slika 9. prikazuje broj ispitanica koje koriste dodatke prehrani s antioksidativnim učinkom i broj ispitanica koje ne koriste antioksidativne dodatke prehrani u kontrolnoj i ispitivanoj skupini.

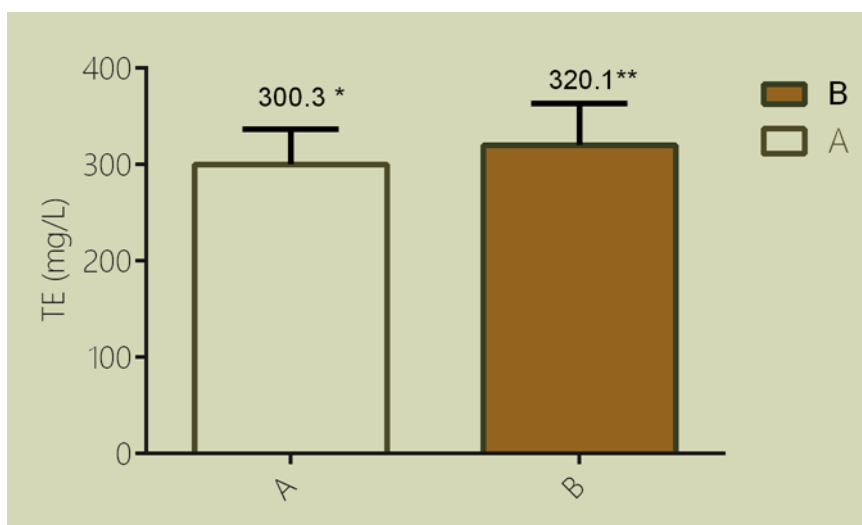


Slika 9. Grafički prikaz broja ispitanica koje koriste antioksidativne dodatke prehrani (dp) i onih koje ne koriste dodatke prehrani (bez dp) u kontrolnoj i ispitivanoj skupini

Dodatke prehrani s antioksidansima redovito koristi 19 ispitanica iz kontrolne skupine te 16 ispitanica iz ispitivane skupine. U kontrolnoj skupini je 31 ispitanica koja ne uzima dodatke prehrani, a u ispitivanoj njih 34. Primjenom χ^2 testa utvrđena je vrijednost 0,3955 što znači da za vrijednosti $df = 1$ i $p < 0.05$ dvije skupine u tom kontekstu nisu značajno različite (Slika 8).

4.2. Antioksidacijski potencijal seruma pacijentica prije suplementacije α -lipoičnom kiselinom

Ukupni antioksidacijski potencijal seruma određen je pacijenticama iz kontrolne i ispitivane skupine na samom početku kliničke studije, prije početka suplementacijom α -lipoičnom kiselinom. Mjerenje je provedeno TEAC metodom. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Srednje vrijednosti ukupnog antioksidacijskog potencijala (izraženog kao ekvivalenti Trolox-a (TE)) ispitivane (A) i kontrolne (B) skupine pacijentica prije suplementacije α -lipoičnom kiselinom

Iz grafičkog je prikaza vidljivo da je srednja vrijednost ukupnog antioksidacijskog potencijala ispitivane skupine bila 300.3 mg/L TE, a kontrolne 320.1 mg/L TE ($p=0.0202$). Utvrđene su statistički značajne razlike prosječne vrijednosti TEAC antioksidativnog potencijala između ispitivane i kontrolne skupine pri čemu je antioksidacijski potencijal kontrolne skupine bio viši.

Kako bi se istražio utjecaj karakteristika životnog stila i prehrane na početni antioksidacijski potencijal seruma, odnosno antioksidativni potencijal prije suplementacije α -lipoičnom kiselinom/placebom, sve pacijentice uključene u studiju podijeljene su u različite skupine s obzirom na

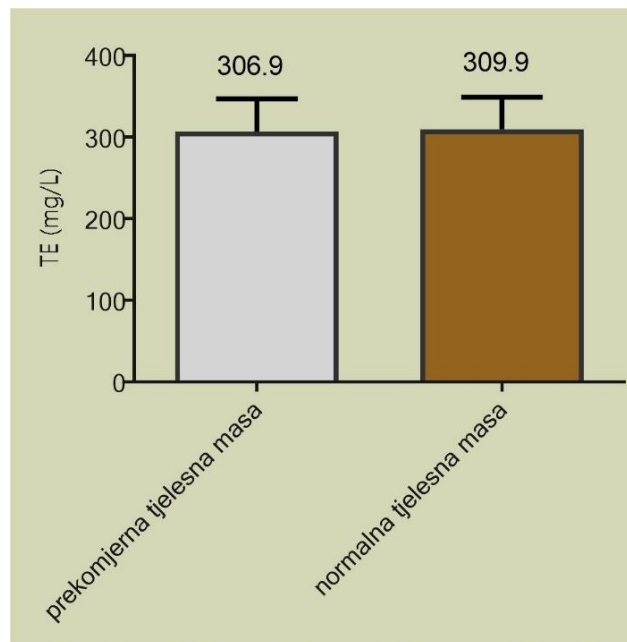
- pušački status (pušači i nepušači),
- BMI (≤ 25 i > 25),

- korištenje dodataka prehrani sa antioksidansima (koriste dodatke prehrane i ne koriste dodatke prehrani) i
- konzumaciju voća i povrća (pacijentice sa unosom <3 porcije voća i povrća dnevno i pacijentice sa unosom ≥ 3 porcije voća i povrća dnevno).

Dobiveni rezultati prikazani su u nastavku.

4.2.1. Utjecaj indeksa tjelesne mase na ukupni antioksidacijski potencijal seruma

Za potrebe istraživanja utjecaja prekomjerne tjelesne mase na antioksidativni potencijal seruma, ispitanice su podijeljene u dvije skupine: prvu skupinu čini 46 ispitanica s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih ispitanica ($BMI > 25$), a drugu 58 onih s normalnom tjelesnom masom ($BMI \leq 25$). Slika 11. prikazuje srednje vrijednosti TEAC antioksidacijskog potencijala prije suplementacije α -lipoičnom kiselinom za obje skupine.



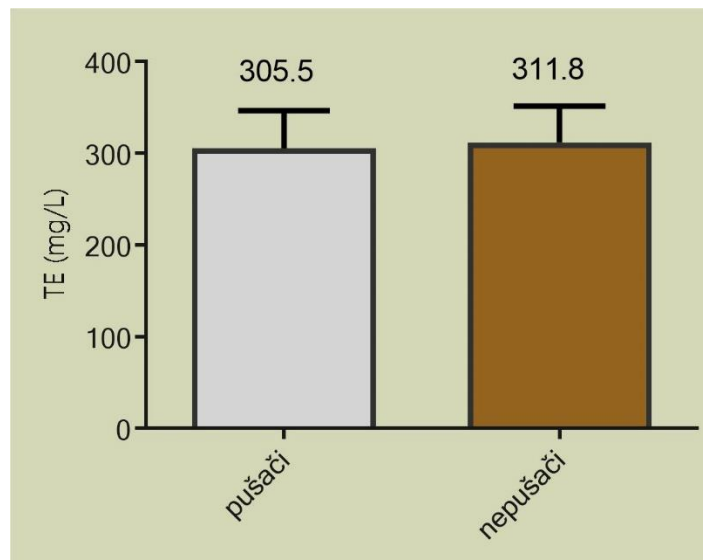
Slika 11. Grafički prikaz srednjih početnih vrijednosti antioksidacijskog potencijala (izraženog kao TE) u skupini ispitanica prekomjerne tjelesne mase i u skupini ispitanica normalne tjelesne mase

Izmjerena je srednja početna vrijednost antioksidacijskog potencijala plazme koja iznosi 306,9 mg/L TE za ispitanice prekomjerne tjelesne mase i pretile ispitanice te 309,9 mg/L TE za ispitanice normalne tjelesne mase. Dobiveni su rezultati uspoređeni korištenjem t-testa te je utvrđena vrijednost p koja iznosi 0,7011. Vrijednost $p > 0,05$ znači da ne postoji statistički

značajna razlika između dviju skupina, odnosno da na odabranom uzorku nije utvrđeno da indeks tjelesne mase značajno utječe na TEAC antioksidacijski potencijal seruma.

4.2.2. Utjecaj pušenja na ukupni antioksidacijski potencijal seruma

Među ispitanicama bilo je ukupno 26 pušačica i 73 nepušačice. Izmjerene srednje početne vrijednosti antioksidacijskog potencijala ovih dviju skupina prikazane su na Slici 12.



Slika 12. Grafički prikaz srednjih početnih vrijednosti antioksidacijskog potencijala (izraženog kao TE) u skupini ispitanica koje puše i u skupini ispitanica koje ne puše

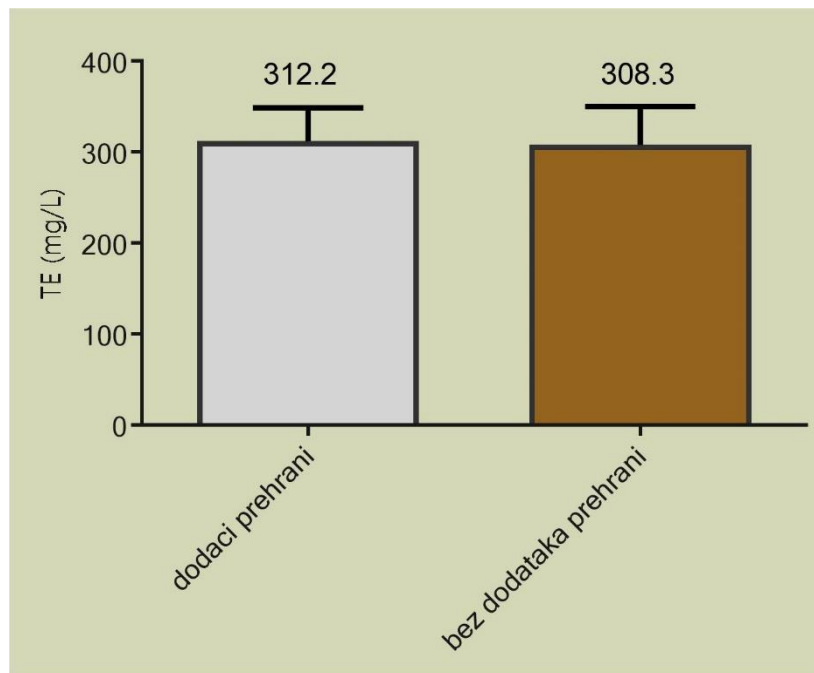
Srednja početna vrijednost antioksidacijskog potencijala u skupini pušačica iznosi 305,5 mg/L TE, dok u skupini nepušačica iznosi 311,8 mg/L TE. Vrijednost p dobivena t-testom iznosi 0,4931 ($p > 0,05$), što znači da pušenje ne utječe značajno na antioksidacijski potencijal seruma ispitanica.

4.2.3. Utjecaj suplementacije dodacima prehrani s antioksidativnim učinkom na ukupni antioksidacijski potencijal seruma

Od ukupnog broja pacijentica uključenih u studiju, 35 ispitanica uzimalo je dodatke prehrani s antioksidansima (vitamin C, vitamin D, vitamin E, beta-karoten, Se, CoQ), dok je 65 njih koristilo dodatke prehrani koji u svom sastavu ne sadrže potentne antioksidanse (crvena riža, vitamini B-kompleksa, Fe-sulfat) ili uopće nisu koristile dodatke prehrani. Na Slici 13.

prikazane su srednje početne vrijednosti antioksidacijskog potencijala plazme ispitanica iz obje skupine.

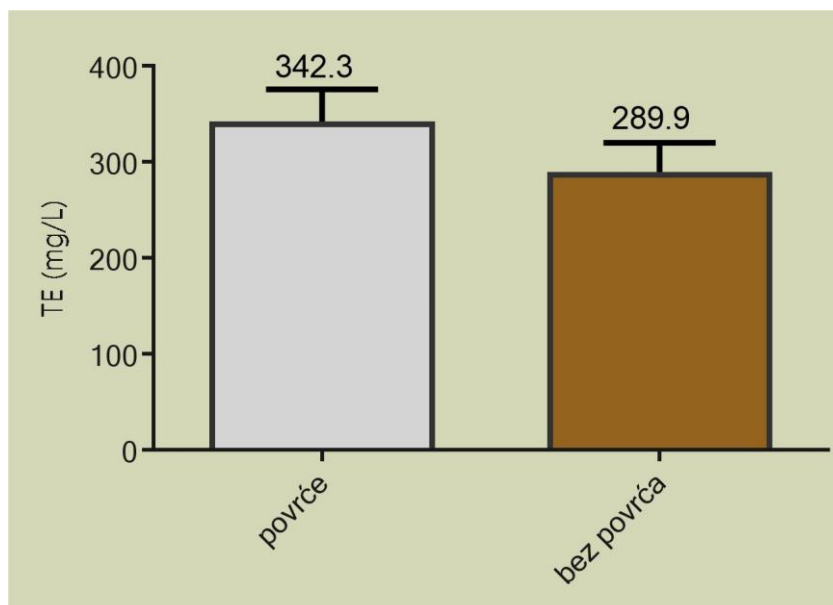
U skupini pacijentica suplementiranih antioksidansima srednja početna vrijednost antioksidacijskog potencijala iznosila je 312,2 mg/L TE, a u skupini pacijentica koje nisu unosile antioksidanse kao dodatke prehrani iznosila je 308,3 mgTE/L. Studentovim t-testom izračunata je p vrijednost u iznosu od 0,6430 ($p > 0,05$). Dakle, uzimanje dodataka prehrani sa sadržajem antioksidansa nije pokazalo značajan utjecaj na antioksidacijski kapacitet seruma.



Slika 13. Grafički prikaz srednjih početnih vrijednosti antioksidacijskog potencijala (izraženog kao TE) u skupini ispitanica koje koriste dodatke prehrani s antioksidansima i u skupini ispitanica koje ne koriste dodatke prehrani s antioksidansima

4.2.4. Utjecaj unosa voća i povrća na ukupni antioksidacijski potencijal seruma

Broj ispitanica koji su u prosjeku dnevno konzumirale 3 i više porcija voća i povrća iznosio je 35, dok su ostale ispitanice konzumirale manje količine voća i povrća. Srednja vrijednost antioksidacijskog potencijala plazme kod prve skupine iznosi 342,3 mgTE/L, dok kod druge skupine iznosi 289,9 mgTE/L. (Slika 14).



Slika 14. Grafički prikaz srednjih početnih vrijednosti antioksidacijskog potencijala u skupini ispitanica koje konzumiraju ≥ 3 porcije voća i povrća dnevno (povrće) i u skupini ispitanica koje konzumiraju < 3 porcije voća i povrća dnevno (bez povrća).

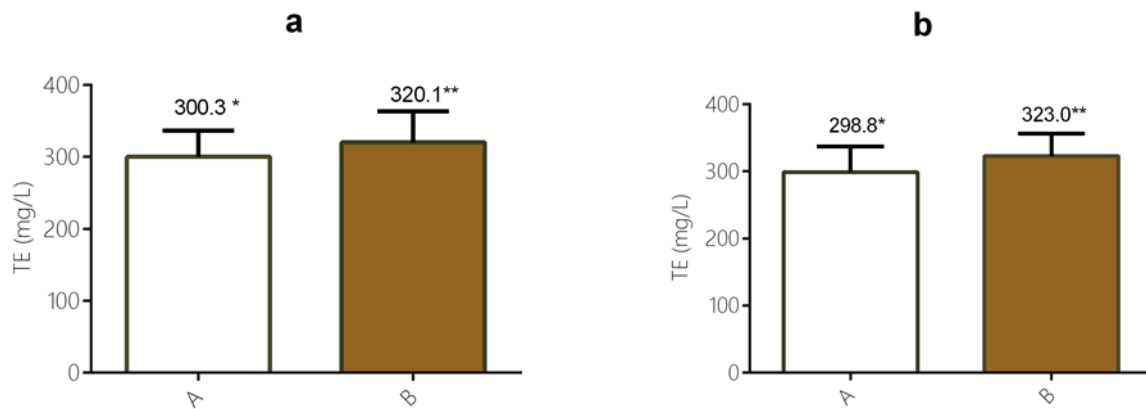
Provedbom studentovog t-testa dobivena je statistički značajna razlika između dvije promatrane skupine pa se može zaključiti da konzumacija 3 ili više porcija povrća dnevno značajno povećava vrijednost antioksidacijskog potencijala seruma ($p < 0,0001$).

4.3. Utjecaj suplementacije α -lipoičnom kiselinom na ukupni antioksidacijski potencijal seruma

Antioksidacijski potencijal seruma ispitanica izmjeren je prije i poslije suplementacije α -lipoičnom kiselinom u ispitivanoj skupini te prije i poslije suplementacije placeboom u kontrolnoj skupini.

Provedeno je testiranje normalnosti za svaku skupinu rezultata: ispitivana skupina prije i poslije suplementacije te kontrolna skupina prije i poslije suplementacije. Raspodjela podataka u svim skupinama prošla je test normalnosti te je upotrijebljen t-test za daljnju usporedbu.

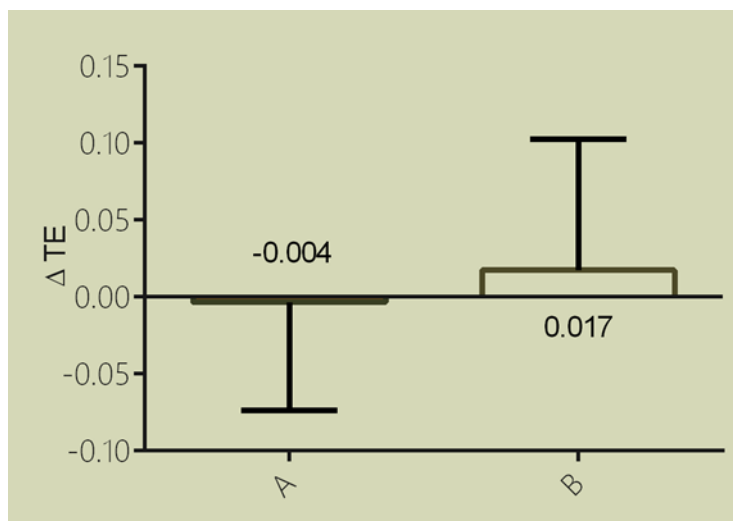
Na Slici 15. prikazane su vrijednosti srednjih antioksidacijskih potencijala seruma prije (a) i poslije suplementacije (b) u ispitivanoj i kontrolnoj skupini.



Slika 15. Srednje vrijednosti ukupnog antioksidacijskog potencijala (izraženog kao TE) ispitivane (A) i kontrolne (B) skupine pacijentica prije (a) i poslije (b) suplementacije ALA, odnosno placebo

Srednja vrijednost antioksidacijskog potencijala seruma za ispitivanu skupinu prije suplementacije iznosi 300,3 mgTE/L, a poslije suplementacije 298,8 mgTE/L. Srednja vrijednost antioksidacijskog potencijala za kontrolnu skupinu prije suplementacije iznosi 320,1 mgTE/L, dok nakon suplementacije iznosi 323,0 mgTE/L. Značajna razlika u vrijednosti antioksidacijskog potencijala seruma između ispitivane i kontrolne skupine postojala je već prije suplementacije ($p=0,0202$), a ostala je takva i nakon suplementacije ($p=0,2048$).

S obzirom na to da su se kontrolna i ispitivana skupina značajno razlikovale u vrijednosti ukupnog antioksidacijskog potencijala seruma prije i nakon suplementacije, jedini način utvrđivanja učinkovitosti suplementacije α -lipoičnom kiselinom jest mjerenjem promjene ukupnog antioksidacijskog potencijala koja se odvijala tijekom suplementacije u obje skupine. (Slika 16.).



Slika 16. Promjena antioksidacijskog potencijala seruma (Δ TE) pacijentica nakon suplementacije α -lipoičnom kiselinom (A) i placeboom (B)

Promjena TEAC antioksidacijskog potencijala seruma nakon suplementacije α -lipoičnom kiselinom u ispitivanoj je skupini negativna i iznosi -0,004, što znači da je došlo do smanjenja antioksidacijskog potencijala seruma tijekom suplementacije α -lipoičnom kiselinom.

Suprotno tome, u kontrolnoj je skupini promjena pozitivna i iznosi 0,017. Dakle, suplementacija placeboom dovela je do povećanja antioksidacijskog kapaciteta seruma. Ipak, nije utvrđena statistički značajna razlika u promjeni antioksidacijskog potencijala između dviju skupina ($p=0,2048$), a to znači da suplementacija α -lipoičnom kiselinom ne utječe na ukupni antioksidacijski potencijal seruma.

5. RASPRAVA

Kontrolna i ispitivana skupina u ovoj se kliničkoj studiji nisu razlikovale s obzirom na srednje vrijednosti BMI-a. To je važno, jer značajno različita zastupljenost pacijentica s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilih pacijentica u kontrolnoj i ispitivanoj skupini mogla je značajno utjecati na učinkovitost suplementacije α -lipoičnom kiselinom. Naime, prema dostupnim literaturnim podacima može se zaključiti da pretilost povećava parametre oksidacijskog stresa vezane uz lipidnu peroksidaciju (npr. malondialdehid) ili oksidaciju proteina. (Vincent i sur., 2007). Pretilost može inducirati sistemski oksidacijski stres različitim biokemijskim mehanizmima, poput generacije superoksida NADPH oksidazom, oksidativnom fosforilacijom, autooksidacijom gliceraldehida, aktivacijom protein kinaze C i dr. Ostali faktori koji pridonose oksidacijskom stresu kod pretilosti uključuju hiperleptinemiju, snižen potencijal antioksidativne obrane organizma, kroničnu upalu i postprandijalno nakupljanje ROS. (Manna i Jain, 2015). U ovom su radu uspoređene početne vrijednosti antioksidacijskog potencijala ispitanica normalne tjelesne mase ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) s vrijednostima ispitanica prekomjerne tjelesne mase ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) i pretilih pacijentica ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$), i rezultati su pokazali da između ovih dviju skupina nema statistički značajne razlike u početnom antioksidativnom kapacitetu seruma. To nije u skladu s brojnim drugim istraživanjima u kojima je uočena značajna pozitivna korelacija između BMI-a i biomarkera oksidacijskog stresa. (Vincent i Taylor, 2006). Sposobnost gašenja radikala antioksidansima iz plazme izražena kao FRAP ili kao ukupni antioksidacijski potencijal pokazala se značajno manjom kod pretilih pacijenata nego kod nepretilih u određenim studijama. Npr. Lopes i suradnici (2003.) uočili su FRAP vrijednosti koje su bile 22% niže u skupini pretilih ispitanika nego u skupini ispitanika koji nisu pretili. Također, Vincent i suradnici (2004.) TEAC metodom izmjerili su vrijednosti ukupnog antioksidacijskog potencijala umjereno niže u pretilih ispitanika nego u nepretilih (1.15 naspram 1.30 mmol/L), a u istoj su studiji vrijednosti bile niže u pretilih ispitanika i nakon aerobne tjelesne aktivnosti. U ovom diplomskom radu možda nije uočena razlika u antioksidacijskom potencijalu jer su se uspoređivale ispitanice normalne tjelesne mase ($BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) s onima prekomjerne tjelesne mase ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$), a ne s pretilima ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$). Potonja usporedba nije bila moguća s obzirom na premali broj pretilih pacijentica uključenih u studiju ($n=3$).

Prehrana i pušenje ubrajaju se u egzogene faktore koji mogu djelovati kao induktori produkcije slobodnih radikala. (Silva i sur., 2019). U dimu cigareta prisutno je više

komponentata koje djeluju kao oksidansi, zbog čega mogu dovesti do izravnih ili neizravnih oksidativnih oštećenja. Duhanski dim kojeg udišu pušači sastoji se od krute faze (katran) i plinovite faze (toksični plinovi, hlapljive organske komponente, slobodni radikali itd.). Katran sadrži vrlo visoke koncentracije stabilnih slobodnih radikala koji dugo preživljavaju u organizmu, a u njemu su prisutne sitne i vrlo sitne čestice koje su sposobne doprijeti duboko u alveole. Slobodni radikali i oksidansi plinovite faze u stabilnom su stanju, u kojem se konstantno stvaraju pa raspadaju. Iz nekih vodotopljivih komponentata katrana stvara se superoksidni anion ($O\bullet -$), te posljedično H_2O_2 i reaktivni hidroksilni radikal ($HO\bullet$).

(Valavanidis i sur., 2009). Prema tome, izloženost pušenju mogla bi dovesti do povećanog oksidacijskog stresa u organizmu. Utjecaj pušenja na parametre oksidacijskog stresa najčešće se istražuje kod pacijenata oboljelih od respiratornih bolesti. Tako su Emma i suradnici (2018.) uočili povišene biomarkere sustavnog oksidacijskog stresa kod pušača i bivših pušača oboljelih od teškog oblika astme, s naglaskom na trenutne pušače koji su imali vrlo visoke koncentracije izoprostana u urinu (u odnosu na bivše pušače i nepušače). Ahmed i suradnici (2020.) ispitali su utjecaj pušenja na oksidacijski stres kod zdravih ispitanika, a u rezultat njihove studije kaže da su koncentracije malondialdehida u serumu pušača i pasivnih pušača više nego u serumu nepušača. U ovom se diplomskom radu pušenje nije pokazalo kao važan faktor koji utječe na antioksidacijski potencijal, iako bi prema svemu dosad rečenom to trebao biti. Vjerojatan razlog tomu je relativno mali broj ispitanica u kliničkoj studiji i premala osjetljivost korištenog biomarkera antioksidacijskog statusa.

Što se tiče prehrane, uzimanje dodatka prehrani s antioksidansima u dnevnoj količini većoj od RDA također nije pokazalo značajan utjecaj na ukupnu vrijednost antioksidacijskog kapaciteta. Razlog tome je velika heterogenost pacijentica u skupini koja je uzimala suplemente s antioksidansima s obzirom na vrstu suplementa, doziranje i trajanje suplementacije. Ono što je važnije naglasiti jest da je parametar koji je pokazao utjecaj na početni antioksidativni kapacitet seruma pacijentica konzumacija voća i povrća. Ispitanice koje konzumiraju 3 ili više porcija voća i povrća dnevno imale su značajno više početne serumske vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na ispitanice koje jedu manje voća i povrća.

Dobiveni su rezultati u skladu s dostupnim literaturnim podacima. Naime, postoji velik broj epidemioloških i kliničkih dokaza koji potvrđuju zdravstvenu korist prehrane bazirane na voću i povrću, zahvaljujući sastavu bogatom bioaktivnim sastojcima poput vitamina i

flavonoida. Činjenica je da flavonoidi i njihovi metaboliti, uz sposobnost direktnog vezanja slobodnih radikala, smanjuju produkciju ROS i RNS u neutrofilima i drugim fagocitima inhibicijom NADPH-oksidge, MPO i inducibilne NO-sintaze (iNOS). Također, kulinarsko bilje i začini predstavljaju odličan izvor fitokemikalija. (Serafini i Peluso, 2016). Tri mjeseca suplementacije sokom mrkve snizilo je biomarkere lipidne peroksidacije i povećalo antioksidacijski kapacitet kod zdravih ispitanika u studiji Potter i suradnika (2011.). U nešto drugačijoj studiji Li i suradnika (2015.), uzimanje 280 mL soka od rajčice bogatog likopenom kroz 2 mjeseca snizilo je markere lipidne peroksidacije bez utjecaja na antioksidacijski potencijal kod generalno zdravih žena. U radu Basua i suradnika (2011.), 480 mL soka od brusnice (sa standardiziranim sadržajem polifenola) kroz 8 tjedana u pacijentica s metaboličkim sindromom smanjilo je biomarkere oksidacijskog stresa (oxLDL i MDA) i povisilo antioksidacijski kapacitet plazme (izmjereno TEAC metodom). Kada je brusnica korištena u obliku 1500 mg suhog praška kroz 6 mjeseci kod muškaraca s čestim infekcijama urinarnog trakta, nije pokazala utjecaj na oksidacijski status (Vidlar i sur., 2010). Pacijenti oboljeli od dijabetesa tipa 2 uzimali su 50 g koncentriranog soka od nara sa standardiziranim sadržajem polifenola 4 tjedna u studiji Shishehpora i suradnika (2016.), što je značajno povećalo antioksidacijski kapacitet njihove plazme. U ispitivanju Mellena i suradnika (2010.), 4 tjedna suplementacije kapsulama sa sjemenkama muscadine grožđa u dozi od 1300 mg kod ispitanika s povećanim kardiovaskularnim rizikom nije dovelo do značajnih promjena u biomerkerima lipidne peroksidacije i vrijednostima antioksidacijskog potencijala. Suplementacija pretilih pacijenata s hipertenzijom kapsulama s 379 mg ekstrakta zelenog čaja (standardiziranog na sadržaj epigalokatehin galata) kroz 3 mjeseca dovela je do povećanja antioksidacijskog kapaciteta (Bogdanski i sur., 2012). Zdravi ispitanici srednjih godina (40–60 g) primali su niske doze kurkumina (80 mg/dne) u ljekovitom obliku s očekivanom dobrom apsorpcijom u studiji Di Silvestra i suradnika (2012.), a rezultat je bio povećanje salivarnog antioksidacijskog kapaciteta. Utjecaj suplementacije polifenolima na parametre oksidacijskog stresa kod trkača na duge staze istraživao je u studiji Niemana i suradnika (2013.), a zaključak je da PSCP kompleks (polifenoli borovnice i ekstrakta zelenog čaja u kompleksu polifenolima proteina soje) nije pokazao utjecaj na razinu izoprostana i FRAP vrijednost tijekom 17 dana suplementacije.

Iz opisanih studija može se zaključiti da su rezultati ispitivanja utjecaja unosa antioksidansa (bilo iz prehranbenih namirnica ili dodataka prehrani) na parametre oksidacijskog stresa vrlo različiti. U ovom diplomskom radu ispitan je općeniti utjecaj antioksidativnih dodataka

prehrani na antioksidacijski kapacitet plazme. Za točnije rezultate vjerojatno bi bilo bolje podijeliti pacijentice u skupine ovisno o konkretnom nutrijentu (antioksidansu) kojeg uzimaju dodatkom prehrani, pa onda vidjeti ima li razlike u vrijednosti antioksidacijskog potencijala između takvih skupina i u odnosu na skupinu koja ne uzima dodatke prehrani. Takve podjele u našem slučaju nisu bile moguće zbog premalog broja ispitanica u spomenutim istraživanim podskupinama. Udjeli antioksidanasa u različitim vrstama povrća i voća jako su varijabilni, (Ono i sur., 2020), za razliku od dodataka prehrani, za koje se većinom deklarira sadržaj antioksidanasa. Ipak u ovom radu upravo je prehrana pokazala značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma, a dodaci prehrani ne. Mogući razlozi za navedno opažanje su kontinuiran unos antioksidansa prehranom (obrasci prehrane su stalna karakteristika životnog stila dok je uzimanje suplemenata uglavnom vremenski ograničeno). Nadalje, prehranom unosimo širok spektar sastavnica sa antioksidativnim učinkom koje

- mogu imati sinergističko djelovanje
- djeluju različitim mehanizmima na antioksidativni status što može rezultirati značajno većim kumulativnim učinkom
- mogu imati bolju bioraspoloživost jer ih kontinuirano unosimo u fiziološkim dozama pa je manja vjerojatnost zasićenja transportnih sustava

Nasuprot tome, dodaci prehrani sadrže jedan ili nekoliko (ograničen broj) antioksidansa. Također, s obzirom na to da dodaci prehrani ne podliježu strogim kontrolama kao lijekovi, moguće je da se u njima ne nalazi deklarirani sastojak ili je prisutan u manjoj dozi od deklarirane. Za relevantnije rezultate, ispitivanja bi trebalo provesti na većem broju ispitanica i mjerenjem više biomarkera oksidacijskog stresa.

Suplementacija α -lipoičnom kiselinom nije dovela do povećanja antioksidacijskog kapaciteta seruma. Kada se usporede promjene vrijednosti antioksidacijskog potencijala (razlika nakon i prije suplementacije) kontrolne i ispitivane skupine, vidi se da nema statistički značajne razlike među njima. Unatoč već ranije dokazanom antioksidativnom djelovanju α -lipoične kiseline, dobiveni rezultat u skladu je s rezultatima brojnih drugih istraživanja. Khabbazi i suradnici (2012.) zaključuju da suplementacija sa 600 mg ALA dnevno 8 tjedana nema utjecaja na razine malondialdehida i ukupni antioksidativni potencijal kod pacijenata sa zatajenjem bubrega. Zaključak studije Sharmana i suradnika iz 2004. glasi da 7 dana suplementacije ALA u dozi od 600 mg dnevno nije rezultiralo promjenama u razini biomarkera oksidacijskog stresa kod zdravih ispitanika. Također, 600 mg ALA dnevno kroz 6

mjeseci kod starijih pacijenata (60-74 godine) oboljelih od dijabetesa tipa 2 nije dovelo do značajnih promjena parametara oksidacijskog stresa, te prema Mendoza-Nunezu i suradnicima (2019.), ALA nije pokazala svoj antioksidativni učinak u ovom slučaju. U studiji Vidović i suradnika (2014.) koja je uključivala ispitivanu skupinu shizofernih pacijenata i kontrolnu skupinu neoboljelih, dokazano je povećanje ukupnog antioksidativnog potencijala seruma (izmjereno TEAC metodom) u kontrolnoj skupini nakon 90 dana suplementacije s 500 mg ALA dnevno, no isti učinak nije primijećen u ispitivanoj skupini. U ovoj studiji trajanje suplementacije duže je nego u većini drugih provedenih studija te je istraživanje vršeno na specifičnoj skupini pacijentica. S obzirom na to da α -lipoična kiselina ipak ima dokazanu *in vitro* antioksidativnu sposobnost, suplementacija njome ne bi trebala biti potpuno odbačena kao opcija za povećanje antioksidativnog potencijala seruma. Ona veže hidroksilni radikal, hipoklornu kiselinu i singletni kisik, formira stabilne komplekse s Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i keliranim Fe^{2+} te reagira s RNS, a također može regenerirati druge antioksidanse kao što su GSH, vitamin C, vitamin E i dr. (Moini i sur., 2002). Neka su istraživanja dobila rezultate koji podržavaju i *in vivo* antioksidativnu sposobnost α -lipoične kiseline, npr. Marangon i suradnici (1999.) kažu da 600 mg ALA dnevno kroz 2 mjeseca snižava vrijednost izoprostana u urinu i biomarkere lipidne peroksidacije u zdravih ispitanika. Suplementacija α -lipoičnom kiselinom u svrhu povećanja antioksidacijskog kapaciteta svakako bi se trebala još istražiti, pogotovo kod bolesti poput CIN-a, u čijoj patofiziologiji oksidacijski stres igra veliku ulogu. Ispitivanja bi trebalo provesti u većim skupinama ispitanica, mjereći više biomarkera oksidacijskog stresa. Bilo bi dobro da ispitivanje duže traje jer bi to možda pokazalo značajniji utjecaj na antioksidativni status. Alternativno dužem trajanju suplementacije, mogle bi se ispitati više doze jer je u ovoj studiji korišteno 600 mg ALA dnevno, a smatra se da su sigurne doze ALA do 1800 mg/dne (Tóth i sur., 2021).

6. ZAKLJUČCI

- Indeks tjelesne mase ne pokazuje značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica. Ipak, s obzirom na to da su poznati mehanizmi kojima pretilost doprinosi povećanju oksidacijskog stresa u organizmu, trebalo bi provesti dodatna istraživanja s većim brojem ispitanica i drugačijim biomarkerima oksidacijskog stresa i/ili većim brojem biomarkera.
- Pušenje cigareta ne pokazuje značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica. Brojna istraživanja ipak dokazuju da je pušenje egzogeni faktor koji može povećati oksidacijski stres u organizmu, tako da bi svakako trebalo provesti dodatna istraživanja koja će uključiti više ispitanica i mjeriti neke druge biomarkere oksidacijskog stresa i/ili više njih.
- Korištenje antioksidativnih dodataka prehrani ne pokazuje značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica. Antioksidansi prisutni u dodacima prehrani vrlo su raznoliki, a sastav dodataka prehrani nije najbolje zakonski reguliran, tako da bi trebalo provesti dodatna istraživanja na većem broju ispitanica i mjerenjem drugih biomarkera oksidacijskog stresa i/ili više njih. Također, bilo bi dobro dodatno istražiti utjecaj konkretnih nutrijenata s antioksidativnim učinkom iz dodataka prehrani na antioksidacijski kapacitet seruma.
- Konzumacija 3 ili više porcija voća i povrća na dan pokazuje značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica. Potrebna su dodatna istraživanja na većem broju ispitanica kako bi se dobiveni rezultati potvrdili i potencijalno iskoristili u terapijske i/ili preventivne svrhe.
- Suplementacija α -lipoičnom kiselinom u dozi od 600 mg/dne 90 dana ne pokazuje značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica. Djelovanje α -lipoične kiseline kao antioksidansa ipak je dokazano brojnim istraživanjima, tako da bi se dodatna ispitivanja trebala provesti na većem broju ispitanica i mjerenjem drugačijih biomarkera oksidacijskog stresa i/ili više njih. Uz to, valjalo bi ispitati utjecaj dugotrajnije suplementacije ili suplementacije višim dozama

α -lipoične kiseline na antioksidacijski potencial seruma pacientica s dijagnozom CIN1 i CIN2.

7. LITERATURA

Ahmed NJ, Husen AZ, Khoshnaw N, Getta HA, Hussein ZS, Yassin AK, Jalal SD, Mohammed RN, Alwan AF. The Effects of Smoking on IgE, Oxidative Stress and Haemoglobin Concentration. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21, 1069-1072.

Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*, 2013, 21, 143–152.

Basu A, Betts NM, Ortiz J, Simmons B, Wu M, Lyons TJ. Low energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with metabolic syndrome. *Nutr Res*, 2011, 31, 190-196.

Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, Stepień M, Pupek-Musialik D, Jablecka A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res*, 2012, 32, 421-427.

Cervical cancer, 2018, <https://www.who.int/>, pristupljeno 18.4.2021.

Chi-Squared Test, 2018, <https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/menu/>, pristupljeno 1.7.2021.

Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy*, 2015, 66(3), 393-405.

Di Silvestro RA, Joseph E, Zhao S, Bomser J. Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people. *Nutr J*, 2012, 11, 1-8.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82, 47-95.

Emma R, Bansal AT, Kolmert J, Wheelock CE, Dahlen S-E, Loza MJ, De-Meulder B, Lefaudeux D, Auffray C, Dahlen B, Bakke PS, Chanez P, Fowler SJ, Horvath I, Montuschi P, Krug N, Sanak M, Sandstrom T, Shaw DE, Fleming LJ, Djukanovic R, Howarth PH, Singer F, Sousa AR, Sterk PJ, Corfield J, Pandis I, Chung KF, Adcock IM, Lutter R, Fabbella L, Caruso M. Enhanced oxidative stress in smoking and ex-smoking severe asthma in the U-BIOPRED cohort. *PloS One*, 2018, 13, 1-16.

Hiraku Y, Tabata T, Ma N, Murata M, Ding X, Kawanishi S. Nitrate and oxidative damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci*, 2007, 98, 964-972.

Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 2013, 1, 483-491.

Khabbazi T, Mahdavi R, Safa J, Pour-Abdollahi P. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammation, oxidative stress, and serum lipid profile levels in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Journal of Renal Nutrition*, 2012, 22, 244–250.

Koshiyama M. The Effects of the Dietary and Nutrient Intake on Gynecologic Cancers. *Healthcare*, 2019, 7, 88, 1-23.

Koshiyama M., Nakagawa M, Ono A. The Preventive Effect of Dietary Antioxidants against Cervical Cancer versus the Promotive Effect of Tobacco Smoking. *Healthcare*, 2019, 7, 162, 1-6.

Laktašić-Žerjavić N, Koršić M, Crnčević-Orlić Ž, Anić B. Vitamin D: vitamin prošlosti, hormon budućnosti. *Liječ Vjesn*, 2011, 133, 194-204.

Li YF, Chang YY, Huang HC, Wu YC, Yang MD, Chao PM. Tomato juice supplementation in young women reduces inflammatory adipokine levels independently of body fat reduction. *Nutrition*, 2015, 31, 691-696.

Lipoic acid, 2021, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> , pristupljeno 21.6.2021.

Lopes HF, Martin KL, Nashar K, Morrow JD, Goodfriend TL, Egan BM. DASH diet lowers blood pressure and lipid-induced oxidative stress in obesity. *Hypertension*, 2003, 41, 422-430.

Ma W, Melief CJ, van der Burg SH. Control of immune escaped human papilloma virus is regained after therapeutic vaccination. *Curr Opin Virol*, 2017, 23, 16-22

Manna J, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord*, 2015, 13, 423-444

Marangon K, Devaraj S, Tirosh, O, Packer, L, Jialal I. Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biol Med*, 1999, 27, 1114–1121.

Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017, 1-32.

Mellen PB, Daniel KR, Brosnihan KB, Hansen KJ, Herrington DM. Effect of muscadine grape seed supplementation on vascular function in subjects with or at risk for cardiovascular disease: a randomized crossover trial. *J Am Coll Nutr*, 2010, 29, 469-475.

Mendoza-Núñez VM, García-Martínez BI, Rosado-Pérez J, Santiago-Osorio E, Pedraza-Chaverri J, Hernández-Abad VJ. The Effect of 600 mg Alpha-lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress, Inflammation, and RAGE in Older Adults with Type 2 Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019, 1-12

Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome*, 2016, 4: 58 , 1-15

Moini H, Packer L, Saris N.-E. L. Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, 182, 84-90.

Nieman DC, Gillitt ND, Knab AM, Knab AM, Shanely RA, Pappan KL, Jin F, Lila MA. Influence of a polyphenol-enriched protein powder on exercise-induced inflammation and oxidative stress in athletes: a randomized trial using a metabolomics approach. *PLoS One*, 2013, 8, 1-11

Ono A, Koshiyama M, Nakagawa M, Watanabe Y, Ikuta E, Seki K, Oowaki M. The Preventive Effect of Dietary Antioxidants on Cervical Cancer Development. *Medicina*, 2020, 56, 1-12.

Packer L, Cadenas E. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J Clin Biochem Nutr*, 2011, 48, 26-32.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, 2008, 4, 89–96.

Potter AS, Foroudi S, Stamatikos A, Patil BS, Deyhim F. Drinking carrot juice increases total antioxidant status and decreases lipid peroxidation in adults. *Nutr J*, 2011, 10, 1-6.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*, 2014, 2014, 1-19.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med*, 1999, 26, 1231-1237.

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, 6701-6715.

Sharman JE, Gunaruwan P, Knez WL, Schmitt M, Marsh SA, Wilson GR, Cockcroft JR, Coombes JS. Alpha-lipoic acid does not acutely affect resistance and conduit artery function or oxidative stress in healthy men. *Br J Clin Pharmacol*, 2004, 58, 243–248.

Shishehbor F, Mohammad Shahi M, Zarei M, Saki A, Zakerkish M, Shirani F, Zare M. Effects of concentrated pomegranate juice on subclinical inflammation and cardiometabolic risk factors for type 2 diabetes: a quasiexperimental study. *Int J Endocrinol Metab*, 2016, 14, 1-7

Silva GA, Nunes RA, Morale MG, Boccardo E, Aguayo F, Termini L. Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics*, 2019, 73(1), 1-10.

(S)-Lipoic acid, 2021, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> , pristupljeno 21.6.2021.

Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*, 2007, 43, 84-93.

Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2018, 73, 318-326.

Tóth F, Cseh KE, Vécsei L. Natural Molecules and Neuroprotection: Kynerunic Acid, Pantethine and α -Lipoic Acid. *Int J Mol Sci*, 2021, 22, 1-25

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco Smoke: Involvement of Reactive Oxygen Species and Stable Free Radicals in Mechanisms of Oxidative Damage, Carcinogenesis and Synergistic Effects with Other Respirable Particles. *Int J Environ Res Public Health*, 2009, 6, 445-462

Vidlar A, Vostalova J, Ulrichova J, Student V, Stejskal D, Reichenbach R, Vrbkova J, Ruzicka F, Simanek V. The effectiveness of dried cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) in men with lower urinary tract symptoms. *Br J Nutr*, 2010, 104, 1181-1189.

Vidović B, Milovanović S, Đorđević B, Kotur-Stevuljević J, Stefanović A, Ivanišević J, Miljković M, Spasić S, Stojanović D, Pantović M. Effect of Alpha-Lipoic Acid

Supplementation on Oxidative Stress Markers and Antioxidative Defense in Patients with Schizophrenia. *Psychiatria Danubina*, 2014, 26, 205–213.

Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*, 2007, 9, 813-839

Vincent HK, Morgan JW, Vincent KR. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2004, 36, 772–779.

Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes*, 2006, 30, 400-418.

WHO, FAO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edition. Bangkok, World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United States, 2004, str. 27, 100, 134, 150-151, 153, 204, 232

Zaštita kože iznutra, 2019, <http://www.inpharma.hr/> , pristupljeno 21.6.2021.

8. SAŽETAK

Oksidacijski stres rezultat je neravnoteže između stvaranja reaktivnih specija koje djeluju kao oksidansi i antioksidativnog kapaciteta stanica. Visoke razine reaktivnih specija u organizmu mogu uzrokovati oštećenja staničnih makromolekula i sudjelovati u patogenezi više bolesti. Oksidacijski stres ima osobitno značajnu ulogu u razvoju cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN). Unos neenzimatskih antioksidanasa prehranom može pridonijeti zaštiti organizma od oksidacijskog stresa, a primjer takvog antioksidansa je α -lipoična kiselina. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj suplementacije α -lipoičnom kiselinom na ukupni antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih žena, te povezati utjecaj određenih parametara životnog stila i prehrane s pojavnošću oksidacijskog stresa i učinkovitošću suplementacije α -lipoičnom kiselinom u ovoj specifičnoj skupini pacijentica. Antioksidacijski potencijal seruma pacijentica u ovom je istraživanju određen modificiranom TEAC metodom. Uočeno je da indeks tjelesne mase (BMI), pušenje cigareta i unos antioksidativnih dodataka prehrani ne utječu značajno na antioksidacijski potencijal seruma ispitanica. S druge strane, prosječan unos 3 ili više porcija voća i povrća dnevno povezan je sa značajnim povećanjem antioksidacijskog potencijala seruma. Suplementacija α -lipoičnom kiselinom u dozi od 600 mg dnevno kroz 90 dana nije pokazala značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih žena. U istraživanju je sudjelovao relativno mali broj pacijentica, a korišteni biomarker antioksidacijskog statusa nije jako osjetljiv pa su potrebna daljnja istraživanja kako bi se dobili relevantniji rezultati i bolji uvid u antioksidacijsku sposobnost α -lipoične kiseline.

SUMMARY

Oxidative stress results from an imbalance between the production of reactive species that act as oxidants and the cellular antioxidant capacity. High levels of reactive species have been considered to cause damage of cellular macromolecules and to participate in the pathogenesis of many diseases. Oxidative stress plays an especially important role in the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Dietary intake of non-enzymatic antioxidants (e.g. alpha lipoic acid) may contribute to systemic defense against oxidative stress. The goal of this master's thesis was to examine the influence of alpha lipoic acid supplementation on total serum antioxidant capacity of CIN1 and CIN2 positive women, and to associate the influence of certain lifestyle and dietary parameters with oxidative stress prevalence and efficiency of alpha lipoic acid supplementation in this specific group of patients. In this research, antioxidant potential of the serum has been determined by modified TEAC method. It has been shown that body mass index (BMI), cigarette smoking and intake of antioxidant dietary supplements doesn't have an important influence on serum antioxidant capacity of the research subjects. On the other hand, average intake of 3 or more fruit and vegetable portions per day has been associated with significant increase of serum antioxidant potential. Supplementation with 600 mg/day alpha lipoic acid for 90 days has not shown a significant effect on serum antioxidant potential of CIN1 and CIN2 positive women. This research included relatively small number of patients, and the biomarker of antioxidant status that has been used isn't very sensitive, so additional research should be conducted to obtain more relevant results and a better insight in alpha lipoic acid's antioxidant ability.

9. PRILOZI

Prilog 1. Prehrambeni upitnik

PREHRAMBENI UPITNIK ZA PROCJENU KVALITETE PREHRANE



Prehrambeni upitnik za procjenu kvalitete prehrane je dizajniran kako bi prikupio podatke o uobičajenom unosu (konzumaciji) hrane i pića ispitanika. Pitanja se odnose na specifične namirnice i vrstu hrane odnosno pića te veličine porcija hrane kako bi procijenili koliko često, u prosjeku se određena hrana odnosno piće konzumira u proteklih mjesec dana.

UPUTE ZA ISPUNJAVANJE UPITNIKA:

1. Odgovoriti na svako pitanje najtočnije moguće. Ukoliko niste sigurni, probajte procijeniti. Bolje je probati pogoditi nego ostaviti pitanje neodgovoreno.
2. Na neka pitanja je potrebno odgovoriti nadopunjavanjem, na neka zaokruživanjem slova ispred odgovora, a na neka stavljanjem križića u stupac ispod točnog dogovora.

Ukoliko Vaš točan odgovor nije ponuđen, molim Vas da upišete točan odgovor koji vrijedi za Vas na praznu crtu ispod određenog pitanja.

3. Prije prelaska na sljedeću stranicu, molim Vas da odgovorite na sva pitanja na prethodnoj stranici.

OPĆI UPITNIK

1. Ime i prezime/Inicijali(Šifra: _____)

2. Današnji datum: _____

3. Datum rođenja: _____

4. Spol: M Ž

5. Stupanj obrazovanja:

osnovna škola

fakultet, prvostupnik

3-godišnja srednja škola

fakultet, magistar struke

4-godišnja srednja škola

magistar / doktor znanosti

viša škola (veleučilište)

ostalo _____

6. Broj osoba u domaćinstvu:

0 1 2 3 4 5 _____

7. Da li ste trenutno na dijeti s ciljem smanjenja tjelesne mase? DA NE

8. Da li bolujete od neke bolesti? DA NE

9. Da li redovito uzimate lijekove? DA NE

Ako da, koje? _____

10. Da li ste alergični na neku hranu? DA NE

Ako da, na koju? _____

11. Da li pušite? DA NE

Ako da, koliko dnevno? _____

12. Da li konzumirate alkohol? DA NE

Ako da, koliko tjedno? _____

13. Da li se bavite tjelesnom aktivnosti? DA NE

Ako da, kojom? _____

Koliko puta tjedno? _____

Koliko prosječno traje? _____

14. Da li imate neki poseban način prehrane (npr. vegetarijanac, vegan...)? DA NE

Ako da, koji? _____

Koliko dugo slijedite taj način prehrane? _____

Zašto ste se odlučili za alternativan način prehrane?

15. Koju količinu vidljive mast uklonite sa mesa prije konzumacije?

- a) svu vidljivu mast b) većinu vidljive masti c) malu količinu vidljive masti
d) ne uklanjam vidljivu mast e) ne jedem meso

16. Koliko često koristite pojedinu vrstu masnoća za pečenje/prženje hrane?

	svaki dan	4-6x tjedno	2-3x tjedno	1x tjedno	4-6x mjesečno	2-3x mjesečno	nikad
Maslac							
Margarin							
Svinjska mast							
Maslinovo ulje							
Druga biljna ulja							

17. Koliko često koristite pojedinu vrstu biljnih ulja prilikom pripreme hrane (ukoliko koristite biljna ulja)?

	svaki dan	4-6x tjedno	2-3x tjedno	1x tjedno	4-6x mjesečno	2-3x mjesečno	nikad
Maslinovo ulje							
Suncokretovo ulje							
Laneno ulje							
Bučino ulje							
Druga biljna ulja							

18. Koliko često sami pripremate svoje obroke?

- a) svaki dan b) 4 – 6x tjedno c) 1 – 3x tjedno d) < 1x tjedno e) nikada

19. Koliko puta tjedno jedete hranu koja je pripremljena izvan vlastitog doma?

- a) > 1 obrok dnevno b) 1 obrok dnevno c) 5 – 7x tjedno d) 3 - 5x tjedno
 e) 1 – 3 x tjedno f) < 1 x tjedno g) nikada

20. Koliko čajnih žlica šećera dodajete u svoju hranu ili pića dnevno?

_____ čajnih žličica

21. Na koji način najčešće konzumirate doručak radnim danom?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

- | | | | |
|---|---|---|---|
| a) za stolom u kuhinji/blagovaoni polako | 1 | 2 | 3 |
| b) za stolom u kuhinji/blagovaoni u žurbi | 1 | 2 | 3 |
| c) u autu na putu do posla | 1 | 2 | 3 |
| d) u hodu | 1 | 2 | 3 |
| e) za radnim stolom na poslu | 1 | 2 | 3 |
| f) u fotelji, gledajući TV ili radeći nešto | 1 | 2 | 3 |
| g) u krevetu | 1 | 2 | 3 |

22. Na koji način najčešće konzumirate ručak radnim danom?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

- | | | | |
|---|---|---|---|
| a) za stolom u kuhinji/blagovaoni polako | 1 | 2 | 3 |
| b) za stolom u kuhinji/blagovaoni u žurbi | 1 | 2 | 3 |

c) u restoranu	1	2	3
d) u hodu	1	2	3
e) za radnim stolom na poslu	1	2	3
f) u fotelji, gledajući TV ili radeći nešto	1	2	3
g) u krevetu	1	2	3

23. Na koji način najčešće konzumirate večeru radnim danom?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

a) za stolom u kuhinji/blagovaoni polako	1	2	3
b) za stolom u kuhinji/blagovaoni u žurbi	1	2	3
c) u restoranu	1	2	3
d) u hodu	1	2	3
e) u fotelji, gledajući TV ili radeći nešto	1	2	3
f) u krevetu	1	2	3

24. Na koji način najčešće konzumirate doručak vikendom?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

a) za stolom u kuhinji/blagovaoni polako	1	2	3
b) za stolom u kuhinji/blagovaoni u žurbi	1	2	3
c) u restoranu	1	2	3
d) u hodu	1	2	3
e) u fotelji, gledajući TV ili radeći nešto	1	2	3
f) u krevetu	1	2	3

25. Na koji način najčešće konzumirate ručak vikendom?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

a) za stolom u kuhinji/blagovaoni polako	1	2	3
b) za stolom u kuhinji/blagovaoni u žurbi	1	2	3
c) u restoranu	1	2	3
d) u hodu	1	2	3
e) u fotelji, gledajući TV ili radeći nešto	1	2	3
f) u krevetu	1	2	3

26. Na koji način najčešće konzumirate večeru vikendom?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

- | | | | |
|---|---|---|---|
| a) za stolom u kuhinji/blagovaoni polako | 1 | 2 | 3 |
| b) za stolom u kuhinji/blagovaoni u žurbi | 1 | 2 | 3 |
| c) u restoranu | 1 | 2 | 3 |
| d) u hodu | 1 | 2 | 3 |
| e) u fotelji, gledajući TV ili radeći nešto | 1 | 2 | 3 |
| f) u krevetu | 1 | 2 | 3 |

27. Kojom brzinom najčešće konzumirate obroke (u prosjeku)?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

- | | | | |
|-----------------------------------|---|---|---|
| a) vrlo brzo (unutar 10 minuta) | 1 | 2 | 3 |
| b) brzo (10 – 20 minuta) | 1 | 2 | 3 |
| c) umjereno brzo (20 – 30 minuta) | 1 | 2 | 3 |
| d) sporo (preko 30 minuta) | 1 | 2 | 3 |

28. Koliko obroka najčešće konzumirate dnevno?

(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

- | | | | |
|-----------------------------------|---|---|---|
| a) jedan glavni obrok | 1 | 2 | 3 |
| b) dva obroka (bez međuobroka) | 1 | 2 | 3 |
| c) tri obroka (bez međuobroka) | 1 | 2 | 3 |
| d) 4 obroka (glavni i međuobroci) | 1 | 2 | 3 |
| d) 5 obroka (glavni i međuobroci) | 1 | 2 | 3 |
| e) više od 5 obroka dnevno | 1 | 2 | 3 |

29. Koliko redovito konzumirate doručak?

- a) nikada
- b) do 2 puta na tjedan
- c) 3-4 puta na tjedan
- d) 5-6 puta na tjedan
- e) svaki dan

30. Koliko redovito konzumirate ručak?

- a) nikada
- b) do 2 puta na tjedan
- c) 3-4 puta na tjedan
- d) 5-6 puta na tjedan
- e) svaki dan

31. Koliko redovito konzumirate večeru?

- a) nikada
- b) do 2 puta na tjedan
- c) 3-4 puta na tjedan
- d) 5-6 puta na tjedan
- e) svaki dan

ANTROPOMETRIJSKA MJERENJA

32. Tjelesna masa (kg): _____

33. Tjelesna visina (cm): _____

PREHRAMBENI UPITNIK

U posljednji mjesec dana koliko često ste konzumirali sljedeće namirnice?

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
ŽITARICE							
38. Zobena kaša							
39. Žitarice za doručak s vlaknima							
40. Žitarice za doručak (Cornflakes, Nesquik....)							
41. Kukuruzna krupica							
42. Tjestenina/riža od cjelovitog zrna							
43. Tjestenina/riža (bijela)							
44. Kukuruzni kruh							
45. Integralni kruh							
46. Bijeli kruh							
47. Lisnata tijesta/pekarski proizvodi*							
48. Ječam							
49. Proso							
50. Heljda							
51. Kokice							
POVRĆE							
52. Zeleno lisnato povrće*							
53. Rajčica, svježa							
54. Krastavci, svježi							
55. Luk, crveni							
56. Luk, bijeli (češnjak)							
57. Gljive, svježe							
58. Salata (zelena, kristal, endivija)							
59. Tikvice, zelene							
60. Patlidžani							
61. Rajčica, konzervirana							
62. Konzervirano povrće (krastavci, gljive, kukuruz)							
63. Smrznuto povrće (špinat, brokula, cvjetača...)							
64. Kupus, svježi							
65. Kupus, kiseli							
66. Krumpir, kuhani							

67.Krumpir, pečeni u pećnici							
-------------------------------------	--	--	--	--	--	--	--

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
68.Pommes frites							
VOĆE							
69.Citrusi (naranča, mandarina, grejp, limun)							
70.Jabuke, kruške							
71.Banane							
72.Jagode, grožđe, borovnice							
73.Bobičasto voće, svježe (borovnice, kupine, maline)							
74.Trešnje, višnje, šljive							
75.Ananas, svježi							
76.Konzervirano voće (ananas, marelice)							
77.Suhe šljive, suhe smokve							
78.Orašasti plodovi (bademi, orasi, lješnjaci)							
79.Lubenica, dinja							
MAHUNARKE I LEGUMINOZE							
80.Bob							
81.Grah							
82.Grašak, svježi							
83.Grašak, smrznuti							
84.Mahune							
MESO, RIBA, JAJA							
85.Perad, bez kože							
86.Bijela morska riba, svježa							
87.Plava morska riba, svježa							
88.Rakovi, svježi (škampi, jastog)							
89.Školjke, svježe							
90.Divljač							
91.Smrznuti morski plodovi							
92.Crveno meso							
93.Malo masni mesni naresci (pureća/pileća šunka)							
94.Kulen, vratina, pršut, suhe kobasice							
95.Hrenovke							
96.Pečene kobasice							
97.Iznutrice							

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
98. Tuna u konzervi							
99. Tuna, svježa							
100. Jaje, sa žumanjkom							
101. Jaje, samo bjelanjak							
MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI							
102. Mlijeko, 0.9% m.m.							
103. Mlijeko, 1.5% m.m.							
104. Mlijeko, 2.8% m.m.							
105. Mlijeko, punomasno (>3.5% m.m.)							
106. Jogurt, tekući							
107. Jogurt, punomasni							
108. Jogurt, voćni							
109. Kiselo vrhnje							
110. Svježi kravlji sir							
111. Sir, posni							
112. Sir, polomasni (ementaler, mozzarella, parmezan)							
113. Feta sir							
114. Sir, punomasni (cheddar, trapist, edamer, roquefort)							
115. Sirni namaz							
MASNOĆE							
116. Margarin							
117. Ulje (suncokret, soja, sezam)							
118. Majoneza							
119. Ulje, maslinovo							
120. Maslac							
SLATKO							
121. Čokolada, mliječna							
122. Čokolada, tamna							
123. Biskvit							
124. Keksi							
NAPITCI							
125. Kava, instant							
126. Kava, turska							
127. Čaj, biljni							
128. Čaj, voćni							
129. Gazirana pića							

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
130. Čokoladno mlijeko							
131. Sok od povrća, svježe iscjeđen							
132. Sok od voća, svježe iscjeđen							
133. Voćni sok, 50% voća							
134. Voćni sok, 100% voća							
135. Cedevita							
136. Mineralna, negazirana voda							
137. Mineralna, gazirana voda							
138. Izotonični napitci							

139. Da li uzimate multivitaminske preparate?

Ako da, koje? _____

Koliko tjedno?

- A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

140. Ne uključujući multivitaminske preparate, da li uzimate jedan od niže navedenih dodataka prehrani?

i) Vitamin A DA NE

Ako da, koliko dugo?

- A) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

- A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

- A) < 8000 IU B) 8000-12000 IU C) 13000-22000 IU D) > 23000 IU E) drugo _____

ii) Vitamin C DA NE

Ako da, koliko dugo?

- B) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____
U kojoj dozi?

A) < 400 mg B) 400-700 mg C) 750 – 1250 mg D) > 1300 mg E) drugo_____

iii) Vitamin B₆ DA NE

Ako da, koliko dugo?

C) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

A) < 10 mg B) 10-39 mg C) 40-79 mg D) > 80 mg E) drugo _____

iv) Vitamin E DA NE

Ako da, koliko dugo?

A) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

A) < 100 IU B) 100-250 IU C) 300-500 IU D) > 500 IU E) drugo_____

v) Vitamin D DA NE

Ako da, koliko dugo?

A) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

A) < 5 mcg B) 5 – 10 mcg C) 10 – 20 mcg D) > 20 mcg E) drugo_____

vi) Kalcij DA NE

Ako da, koliko dugo?

B) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

A) < 400 mg B) 400-900 mg C) 901-1300 mg D) > 1300 mg E) drugo _____

vii) Željezo DA NE

Ako da, koliko dugo?

C) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

A) < 51 mg B) 51 – 200 mg C) 201 – 400 mg D) > 401 mg E) drugo _____

viii) Magnezij DA NE

Ako da, koliko dugo?

D) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

A) < 200 mg B) 200-400 mg C) 401-900 mg D) > 900 E) drugo _____

ix) Cink DA NE

Ako da, koliko dugo?

E) 0-1 godine B) 2-4 godine C) 5 – 9 godina D) 10 ili više godina E) drugo _____

Ako da, koliko tjedno?

A) 2 ili manje B) 3 – 5 C) 6 – 9 D) 10 ili više E) drugo _____

U kojoj dozi?

A) < 25 mg B) 25 - 74 mg C) 75 – 100 mg D) > 101 mg E) drugo _____

141. Da li redovito uzimate neke druge suplemente/dodatke prehrani?

Ako da, koje? _____

Koliko dugo? _____

Koliko često (tjedno)? _____

U kojoj dozi? _____

Odaberite uobičajenu veličinu serviranja za 1 obrok:

142. ŽITARICE:



A) 35 g



B) 85g

C) _____

143. KUKURUZNA KRUPICA



A) 100 g



B) 200 g

C) _____

144. TJESTENINA/RIŽA



A) 100 g



B) 200 g



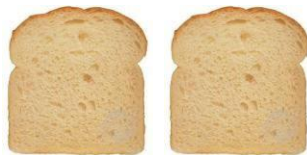
C) 350 g

D) _____

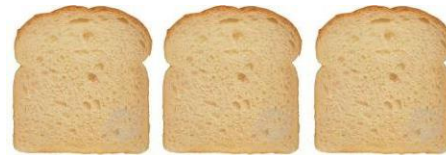
145. KRUH



A) 40 g



B) 80 g



C) 120 g

D) _____

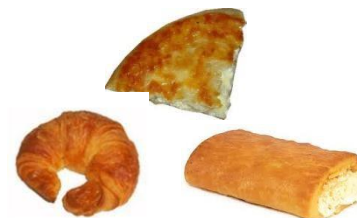
146. LISNATA TIJESTA / PEKARSKI PROIZVODI



A) 50 g



B) 120 g



C) 300 g

D) _____

147. JEČAM / PROSO / HELJDA



A) 100 g



B) 200 g

C) _____

148. KOKICE



A) 100 g



B) 200 g



C) 350

D) _____

149. ZELENO LISNATO POVRĆE



A) 46 g



B) 84 g



C) 146 g

D) _____

150. RAJČICA, SVJEŽA



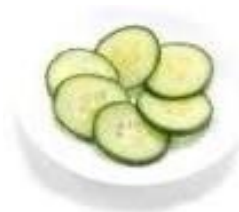
A) 80 g



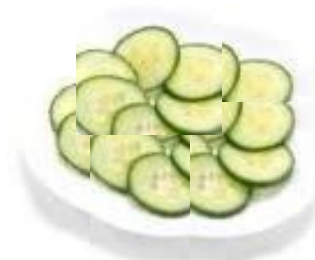
B) 180 g

C) _____

151. KRSTAVAC, SVJEŽI



A) 80 g



B) 180 g

C) _____

152. LUK, CRVENI



A) 80 g

B) 120 g

C) 200 g

D) _____

153. LUK, BIJELI



A) 15 g

B) 30 g

C) _____

154. GLJIVE, SVJEŽE



A) 100 g

B) 200 g

C) _____

155. SALATA, ZELENA, KRISTAL, ENDIVIJA



A) 15 g

B) 35 g

C) _____

156. TIKVICE, SVJEŽE



A) 100 g



B) 200 g

C) _____

157. PATLIDŽANI



A) 100 g



B) 200 g

C) _____

158. RAJČICA, KONZERVIRANA

A) ¼ paketa (125 ml)

B) ½ paketa (250 ml)

C) 1 pakiranje (500 ml)

D) drugo _____

159. KONZERVIRANO POVRĆE (krastavci, gljive, kukuruz.....)

A) ¼ konzerve (125 g)

B) ½ konzerve (250 g)

C) 1 konzerva (500 g)

D) drugo _____

160. KUPUS



A (100 g)



B (200 g)

C) _____

161. KRUMPIR



A) 150 g



B) 300 g



C) 500 g

D) _____

162. CITRUSI (naranča, mandarina, grejp, limun)

A) 1 komad

B) 2 komada

C) _____ komada

163. JABUKE, KRUŠKE

A) 1 komad

B) 2 komada

C) _____ komada

164. BANANE

A) 1 komad

B) 2 komada

C) _____ komada

165. JAGODE, GROŽĐE, BOROVNICE (1 šalice = 2,5 dl)

- A) $\frac{1}{2}$ šalice B) 1 šalice C) $1\frac{1}{2}$ šalice D) 2 šalice E) _____ šalice

166. BOBIČASTO VOĆE, SVJEŽE (borovnice, kupine, maline) (1 šalice = 2,5 dl)

- A) $\frac{1}{2}$ šalice B) 1 šalice C) $1\frac{1}{2}$ šalice D) 2 šalice E) _____ šalice

167. TREŠNJE, VIŠNJE, ŠLJIVE (1 šalice = 2,5 d)

- A) $\frac{1}{2}$ šalice B) 1 šalice C) $1\frac{1}{2}$ šalice D) 2 šalice E) _____ šalice

168. ANANAS, SVJEŽI

- A) 1 kriška B) 2 kriške C) $\frac{1}{2}$ ananasa D) 1 ananas E) ostalo _____

169. KONZERVIRANO VOĆE (ananas, marelice)

- A) $\frac{1}{4}$ konzerve B) $\frac{1}{2}$ konzerve C) 1 konzerva D) ostalo _____

170. SUHE ŠLJIVE, SUHE SMOKVE

- A) 2-3 komada B) 10 komada C) ostalo _____

171. ORAŠASTI PLODOVI (bademi, orasi, lješnjaci)

- A) 2-3 komada B) 10 komada C) ostalo _____

172. LUBENICA, DINJA

- A) 1 kriška B) 2 kriške C) 3 kriške D) $\frac{1}{2}$ komada E) ostalo _____

173. BOB, GRAH, GRAŠAK



A) 50 g



B) 125 g



C) 200 g)

D) _____

174. MAHUNE



A) 50 g



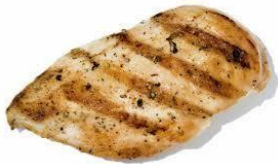
B) 125 g



C) 200 g

D) _____

175. MESO, PERAD, RIBA, IZNUTRICE



A) 100 g



B) 200 g

C) _____

176. RAKOVI, ŠKOLJKE



A) 100 g



B) 200 g

C) _____

177. MESNI NARESCI



A) 20 g



B) 75 g



C) 125 g

D) _____

178. HRENOVKE, KOBASICE

A) 1 hrenovka/kobasica

B) 2 hrenovke/kobasice

C) _____ hrenovke/kobasice

179. JAJA

A) 1 komad

B) 2 komada

C) 3 komada

D) _____ komada

180. MLIJEKO, JOGURT, KISELO VRHNJE

A) 1 dl

B) 2 dl

C) 1 šalica (2,5 dl)

D) ½ L

E) 1 L

F) _____

181. SVJEŽI KRAVLJI SIR, POSNI SIR



A) 25 g



B) 50 g



C) 100 g

D) _____

182. SIR, PUNOMASNI I POLUMASNI



A) 20 g



B) 50 g



C) 100 g

D) _____

183. SIRNI NAMAZ

A) 1 čajna žličica
žličice

B) 2 čajne žličice

C) _____ čajne

184. ULJE

A) _____ jušnih žlica

B) 1 šalica (2,5 dl)

C) _____

185. MASLAC, MARGARIN, MAJONEZA

A) 1 čajna žličica
žličice

B) 2 čajne žličice

C) _____ čajne

186. ČOKOLADA

- A) _____ redova B) ½ čokolade (50 g) C) 1 čokolada (100 g)
D) _____

187. BISKVIT

- A) 1 komad B) 2 komada C) _____ komada

188. KEKSI

- A) 1 komad B) 2 komada C) _____ komada

189. KAVA (žličica instant ili turske kave), KAKAO, ČAJ (u rinfuzi), CEDEVITA

- A) 1 čajna žličica B) 2 čajne žličice C) _____ čajnih žličica

190. ČAJ (u vrećicama)

- A) 1 vrećica B) 2 vrećice C) _____ vrećica

191. GAZIRANA PIĆA, SOKOVI, GAZIRANA I NEGAZIRANA VODA, ČOKOLADNO MLIJEKO

- A) 1 čaša (2,5 dl) B) 2 čaše (500 ml) C) _____

192. IZOTONIČNI NAPITAK

- A) ½ boce (2,5 dl) B) 1 boca (500 ml) C) _____

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija/Medicinska biokemija
Zavod za Kemiju prehrane
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ SUPLEMENTACIJE α -LIPOIČNOM KISELINOM NA ANTIOKSIDACIJSKI STATUS PACIJENTICA S CERVIKALNOM INTRAEPITELNOM NEOPLAZIJOM STUPNJA 1 I 2

Paula Bilić

SAŽETAK

Oksidacijski stres rezultat je neravnoteže između stvaranja reaktivnih specija koje djeluju kao oksidansi i antioksidativnog kapaciteta stanica. Visoke razine reaktivnih specija u organizmu mogu uzrokovati oštećenja staničnih makromolekula i sudjelovati u patogenezi više bolesti. Oksidacijski stres ima osobitno značajnu ulogu u razvoju cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN). Unos neenzimatskih antioksidanasa prehranom može pridonijeti zaštiti organizma od oksidacijskog stresa, a primjer takvog antioksidansa je α -lipoična kiselina. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj suplementacije α -lipoičnom kiselinom na ukupni antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih žena, te povezati utjecaj određenih parametara životnog stila i prehrane s pojavnošću oksidacijskog stresa i učinkovitošću suplementacije α -lipoičnom kiselinom u ovoj specifičnoj skupini pacijentica. Antioksidacijski potencijal seruma pacijentica u ovom je istraživanju određen modificiranom TEAC metodom. Uočeno je da indeks tjelesne mase (BMI), pušenje cigareta i unos antioksidativnih dodataka prehrani ne utječu značajno na antioksidacijski potencijal seruma ispitanica. S druge strane, prosječan unos 3 ili više porcija voća i povrća dnevno povezan je sa značajnim povećanjem antioksidacijskog potencijala seruma. Suplementacija α -lipoičnom kiselinom u dozi od 600 mg dnevno kroz 90 dana nije pokazala značajan utjecaj na antioksidacijski potencijal seruma CIN1 i CIN2 pozitivnih žena. U istraživanju je sudjelovao relativno mali broj pacijentica, a korišteni biomarker antioksidacijskog statusa nije jako osjetljiv pa su potrebna daljnja istraživanja kako bi se dobili relevantniji rezultati i bolji uvid u antioksidacijsku sposobnost α -lipoične kiseline.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 70 stranica, 16 grafičkih prikaza, 1 tablica i 50 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: oksidacijski stres, cervikalna intraepitelna neoplazija, antioksidans, α -lipoična kiselina

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lovorka Vujić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of food chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

THE EFFECT OF ALPHA LIPOIC ACID SUPPLEMENTATION ON ANTIOXIDANT STATUS OF PATIENTS WITH GRADE 1 AND 2 CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA

Paula Bilić

SUMMARY

Oxidative stress results from an imbalance between the production of reactive species that act as oxidants and the cellular antioxidant capacity. High levels of reactive species have been considered to cause damage of cellular macromolecules and to participate in the pathogenesis of many diseases. Oxidative stress plays an especially important role in the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Dietary intake of non-enzymatic antioxidants (e.g. alpha lipoic acid) may contribute to systemic defense against oxidative stress. The goal of this master's thesis was to examine the influence of alpha lipoic acid supplementation on total serum antioxidant capacity of CIN1 and CIN2 positive women, and to associate the influence of certain lifestyle and dietary parameters with oxidative stress prevalence and efficiency of alpha lipoic acid supplementation in this specific group of patients. In this research, antioxidant potential of the serum has been determined by modified TEAC method. It has been shown that body mass index (BMI), cigarette smoking and intake of antioxidant dietary supplements doesn't have an important influence on serum antioxidant capacity of the research subjects. On the other hand, average intake of 3 or more fruit and vegetable portions per day has been associated with significant increase of serum antioxidant potential. Supplementation with 600 mg/day alpha lipoic acid for 90 days has not shown a significant effect on serum antioxidant potential of CIN1 and CIN2 positive women. This research included relatively small number of patients, and the biomarker of antioxidant status that has been used isn't very sensitive, so additional research should be conducted to obtain more relevant results and a better insight in alpha lipoic acid's antioxidant ability.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 70 pages, 16 figures, 1 table and 50 references. Original is in Croatian language.

Keywords: oxidative stress, cervical intraepithelial neoplasia, antioxidant, alpha lipoic acid

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

