

# Antioksidacijski status pacijentica suplementiranih $\alpha$ -lipoičnom kiselinom s dijagnozom cervikalne intraepitelne neoplazije stupnja 1 i 2

---

Ivanko, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:917619>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Marta Ivanko**

**Antioksidacijski status pacijentica  
suplementiranih  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom s  
dijagnozom cervikalne intraepitelne neoplazije  
stupnja 1 i 2**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

*Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na iznimnoj susretljivosti, savjetima i pomoći prilikom pisanja ovog rada.*

*Zahvaljujem asistentici, dr. sc. Kristini Radić na pomoći, trudu i strpljenju tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem i svim djelatnicima i kolegama Zavoda za kemiju prehrane na ugodnom radnom okruženju i susretljivosti.*

*Posebno zahvaljujem svojim roditeljima na pruženoj mogućnosti studiranja te cijeloj obitelji, kolegama i prijateljima na neizmjernoj podršci tijekom cijelog studija.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. OKSIDATIVNI STRES.....	1
1.1.1. BIOMARKERI OKSIDATIVNOG STRESA .....	3
1.2. GLUTATION (GSH).....	7
1.3. UTJECAJ PREHRANE NA OKSIDATIVNI STRES .....	9
1.3.1. Antioksidansi u hrani .....	9
1.3.2. $\alpha$ -lipoična kiselina kao antioksidans .....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. MATERIJALI .....	15
3.1.1. Kemikalije .....	15
3.1.2. Instrumenti i pribor .....	15
3.2. ISPITANICI .....	15
3.3. ODREĐIVANJE REDUCIRANOG GLUTATIONA .....	16
3.3.1. Princip metode.....	16
3.3.2. Optimizacija metode kvantifikacije glutaciona pomoću MBCL fluorescentne probe .....	17
3.3.3. Metoda kvantifikacije GSH.....	18
3.4. ANALIZA UPITNIKA O UČESTALOSTI KONZUMACIJE NAMIRNICA .....	18
3.5. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. KARAKTERISTIKE KONTROLNE I ISPITIVANE SKUPINE .....	19
4.1.1. Indeks tjelesne mase (ITM).....	19
4.1.2. Korištenje suplemenata s antioksidansima i pušenje .....	20
4.2. ISPITIVANJE NORMALNOSTI RASPODJELE KONCENTRACIJA GSH U KONTROLNOJ I ISPITIVANOJ SKUPINI .....	22
4.3. UTJECAJ PARAMETARA ŽIVOTNOG STILA NA KONCENTRACIJE GSH U KRVI .....	23
4.4. UTJECAJ SUPLEMENTACIJE $\alpha$ -LIPOIČNOM KISELINOM NA VRIJEDNOSTI GSH U SERUMU .....	25
5. RASPRAVA .....	27
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. LITERATURA.....	33

8. SAŽETAK .....	37
9. PRILOZI .....	39
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

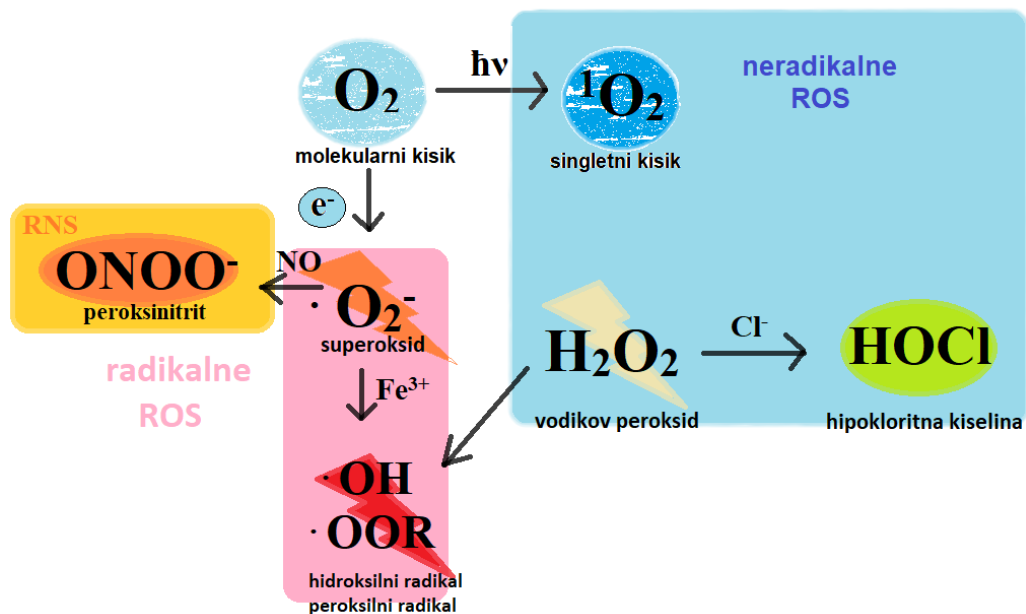
## 1.1. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres pojava je uzrokovana neravnotežom između proizvodnje i nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanicama i tkivima i sposobnosti biološkog sustava da detoksificira te reaktivne produkte (Pizzino i sur., 2017). Visoko reaktivne molekule mogu oduzeti elektron molekulama koje su prije bile stabilne, odnosno oksidirati ih. Posljedično nastaju nestabilne molekule, kao što su slobodni radikali. ROS i reaktivni dušikovi spojevi (RNS) mogu direktno djelovati na DNA, lipide i proteine, što dovodi do kidanja veza, mutacija, oksidacije lipoproteina niske gustoće te promjena u enzimskoj aktivnosti i signalnim putevima (Heber i sur., 2006). Kisik je bitan uvjet aerobnog života, a oksidativni metabolizam predstavlja glavni izvor energije. Smanjenje koncentracije kisika rezultira stvaranjem potencijalno opasnih ROS koji uključuju dvije glavne skupine: slobodne radikale i neradikalne molekule (Pourova i sur., 2009). Slobodni radikali nastaju kao posljedica fizioloških procesa, ali njihovo nastajanje može biti dodatno potaknuto nekim čimbenicima iz okoliša, kao što su dim cigarete, zračenje, ozon, teški metali i neki pesticidi. Također, određeni kemoterapeutici mogu proizvesti kisikove radikale u dozama koje se koriste za liječenje karcinoma (Heber i sur., 2006). Tri glavne vrste ROS-a, koje su od fiziološkog značaja, su superoksidni anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) i vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Birben i sur., 2012).

**Tablica 1.** Glavne vrste radikalnih i neradikalnih molekula (Preuzeto i prilagođeno od Ghosh, 2020).

Slobodni radikali	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Superoksidni anion
	$\text{OH}\bullet$	Hidroksilni radikal
	$\text{NO}\bullet$	Dušikov (II) oksid
	$\text{HOO}\bullet$	Hidroksilni radikal
Neradikalne molekule	$\text{H}_2\text{O}_2$	Vodikov peroksid
	$\text{HOCl}$	Hipokloritna kiselina
	$\text{ONOO}^-$	Peroksinitrit
	$^1[\text{O}_2]$	Singletni kisik

Nastajanje slobodnih radikala javlja se kontinuirano u stanicama kao posljedica enzimskih i neenzimskih reakcija. Pojednostavljeni prikaz oksido-redukcijskih procesa te nastanka ROS i RNS prikazan je Slikom 1. Enzimske reakcije, koje služe kao izvor slobodnih radikala, su one koje sudjeluju u respiratornom lancu, u fagocitozi, u sintezi prostaglandina i u sustavu citokroma P-450. Slobodni radikali također mogu nastati u neenzimskim reakcijama kisika s organskim spojevima kao i onih iniciranih ionizirajućim reakcijama (Lobo i sur., 2010). Superoksidni anion formira se redukcijom molekularnog kisika s jednim elektronom, posredovanom enzimima poput NAD(P)H oksidaze i ksantin oksidaze ili neenzimatski redoks reaktivnim komponentama mitohondrijskog lanca prijenosa elektrona (Patel i sur., 2017; Dröge, 2002). Superoksid se zatim pretvara u vodikov peroksid preko mitohondrijskog enzima superoksid dismutaze (SOD) ili u dvoatomni kisik. Vodikov peroksid je prilično nereaktivan, ali igra ulogu u Fentonovoj reakciji za stvaranje hidroksilnih radikala koji mogu biti štetni za stanične strukture i molekule. Hidroksilni radikali mogu nastati i reakcijom s hipoklornom kiselinom, koju proizvodi enzim mijeloperoksidaza. Proizvodnja hidroksilnih radikala u tkivu značajna je zbog svog doprinosa raznim patologijama, ali i zbog činjenice da se ne može enzimski ukloniti na isti način na koji se superoksid pretvara natrag u kisik putem SOD (Patel i sur., 2017). RNS sadrže atom dušika u svojim molekulama, a jedan dio njih ubrajamo u biološki važne reaktivne tvari. Oni su izvedeni iz jednostavne molekule dušikova (II) oksida (NO), sintetizirane *in vivo* tijekom pretvorbe L-arginina u L-citrulin pomoću sintaze dušikovog oksida (NOS). RNS uključuje slobodni radikal dušikov dioksid ( $\text{NO}_2\cdot$ ) i razne neslobodne radikale, kao što su peroksinitrit i njegov protonirani oblik peroksinitrozna kiselina (ONOOH), alkilperoksinitrit (ROONO) i nitrozil ( $\text{NO}^+$ ).



**Slika 1.** Pojednostavljeni prikaz oksido-redukcijskih procesa te nastanka ROS i RNS.

Pretpostavljena je uloga oksidativnog stresa u mnogim stanjima, uključujući aterosklerozu, upalna stanja, određene vrste raka i proces starenja. Smatra se da oksidativni stres danas značajno doprinosi svim upalnim bolestima (artritis, vaskulitis, glomerulonefritis, eritematozni lupus, sindrom respiratornih bolesti odraslih), ishemijskim bolestima (bolesti srca, moždani udar, crijevna ishemija), hemokromatozi, sindromu stečene imunodefijencije, transplantaciji organa, čiru na želucu, hipertenziji i preeklampsiji, neurološkim poremećajima (Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, mišićna distrofija), bolestima povezanih s pušenjem i mnogim drugim (Lobo i sur., 2010).

### 1.1.1. BIOMARKERI OKSIDATIVNOG STRESA

Svjetska zdravstvena organizacija definirala je biomarker kao bilo koju tvar, strukturu ili proces koji se može mjeriti u tijelu ili njegovim proizvodima i utjecati ili predvidjeti učestalost ishoda ili bolesti (WHO, 2001). Klinički koristan biomarker mora biti u stanju zadovoljiti jedan od sljedećih kriterija: (i) pokazati specifičnost za određenu bolest (dijagnostički), (ii) imati prognostičku vrijednost i (iii) korelirati s aktivnošću bolesti. To onda omogućuje procjenu učinkovitosti liječenja.



Kako bi bio klinički koristan, biomarker također mora biti razumno stabilan, prisutan u lako dostupnom tkivu i isplativ za reproducibilno mjerenje u velikim razmjerima (Frijhoff i sur., 2015). U ovom poglavlju navedeni su neki od najvažnijih biomarkera oksidativnog stresa korištenih u kliničkim istraživanjima.

Određivanje krajnjih produkata oksidacije lipida široko je korišten pristup procjene oksidativnog stresa. Oksidacija posredovana slobodnim radikalima uključuje autokatalitičku lančanu reakciju koju pokreću ROS, uglavnom HO• i ROO•. Malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) predstavljaju najviše istraživane krajnje produkte oksidacije lipida. Za mjerenje prisutnosti 4-HNE i MDA u biološkim uzorcima može se koristiti ELISA metoda, a razina MDA u plazmi može se odrediti i reakcijom s tiobarbiturnom kiselinom, tzv. TBARS metodom (thiobarbituric acid reactive substances) (Frijhoff i sur., 2015).

F2-izoprostani (F2-IsoPs), kemijski stabilni izomeri slični prostaglandinu nastali reakcijom polinezasićenih masnih kiselina u membranskim fosfolipidima i slobodnim radikalima ili ROS, predstavljaju još jedan pouzdan marker za procjenu statusa oksidativnog stresa *in vivo*.

Korisnost F2-IsoP kao biomarkera oksidativnog stresa vrlo je ograničena budući da je njihova pouzdana kvantifikacija skupa jer zahtijeva plinsku/tekućinu kromatografiju zajedno s tehnikama masene spektroskopije (HPLC/GC-MS) (Marrocco i sur., 2017).

Oksidacija kolesterola niske gustoće (LDL) reakcija je koja se može odvijati neenzimatski ili posredovano enzimima kao što su lipooksigenaze. Oksidirani LDL (oxLDL) se najčešće mjeri u plazmi ili izoliranim LDL imunološkim metodama korištenjem specifičnih protutijela. Utvrđeno je da je oxLDL povezan s patološkim stanjima povezanim s kardiovaskularnim bolestima, uključujući diabetes mellitus, pretilost i metabolički sindrom (Marrocco i sur., 2017).

Nitrotirozin (3-NO-Tyr) se često opisuje kao stabilan marker oksidativnog stresa kod upalnih bolesti. Nitracija tirozina uključuje zamjenu vodikovog atoma tirozinskog aromatskog prstena s nitro skupinom (Frijhoff i sur., 2015). Ova se modifikacija može generirati kroz nekoliko putova koji uključuju reakciju s ROS i RNS. Točno određivanje 3-NO-Tyr u biološkim uzorcima zahtijeva tehnike plinske ili tekućinske kromatografije povezane s masenom spektrometrijom. Dostupan je i ELISA test baziran na specifičnim antitijelima, ali je njihova upotreba ograničena različitim afinitetima antitijela za različite nitrirane proteine i niskom osjetljivošću.

S-glutationilacija stabilna je i reverzibilna je reakcija, a odnosi se na stvaranje disulfidnog mosta između reaktivnog ostatka cisteina i staničnog tripeptida glutationa (GSH). Pokazalo se da posreduje u redoks regulaciji brojnih ključnih staničnih proteina, uključujući endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS), rajanodinski receptor, SERCA i  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pumpu. S-glutationilacija hemoglobina je predložena kao marker oksidativnog stresa, a pojačana je u bolesnika s dijabetesom, hiperlipidemijom i zatajenjem bubrega (Ho i sur., 2013). Iako se S-glutationilacija može lako izmjeriti Western blot metodom u neredukcijskim uvjetima, za točnu kvantifikaciju potrebna je uporaba učinkovitijih pristupa. MS tehnike su valjane, ali zahtijevaju specijaliziranu instrumentaciju. Osim toga, razvijeni su ELISA testovi koji koriste monoklonsko anti-glutation antitijelo (Marrocco i sur., 2017).

Transkripcijski faktor Nrf-2 smatra se prognostičkim biomarkerom kod raka. Nalazi se konstitutivno i u vrlo visokim koncentracijama u biopsijama malignih tumora s visokim stopama proliferacije. Nrf-2 je glavni regulator antioksidativnog odgovora koji kontrolira ekspresiju oko 250 gena. Visoka i konstitutivna aktivnost Nrf-2 osigurava transformiranim stanicama obranu od ROS-a koji nastaju tijekom aktivne proliferacije, dok u isto vrijeme smanjuje učinkovitu dozu određenih lijekova protiv raka (Marrocco i sur., 2017).

Neki enzimi koji stvaraju ROS mogu biti pokazatelji oksidacijskog stresa, poput ksantin oksidaze (XOD), mijeloperkosidaze (MPO) čija je aktivnost povećana u širokom rasponu bolesti. Razina oksidacijskog stresa u organizmu također se može procijeniti mjerenjem aktivnosti antioksidativnih enzima poput katalaze, glutation peroksidaze ili superoksid dizmutaze čija se aktivnost može vrlo lako izmjeriti spektrofotometrijski uz uporabu specifičnih supstrata (Ho i sur., 2013).

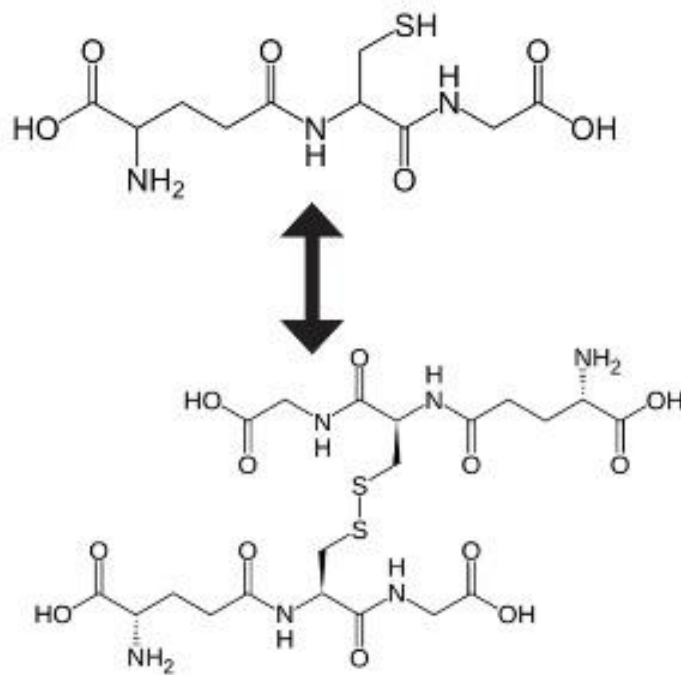
Proteini, lipidi i nukleinske kiseline glavne su mete ROS-a koje u stanju oksidativnog stresa stvaraju spektar molekula koji se može izmjeriti i procijeniti u plazmi, serumu, tkivima, u kondenzatu izdahnutog daha, a neke od njih navedene su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Prikaz oksidacijskih procesa i biomarkera oksidacijskog stresa koji se u njima stvaraju (preuzeto i prilagođeno iz Czerna 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
	4-hidroksinoneal
oksidacija proteina	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</i> - AGEs)
	nastajanje disulfidne veze
	3-nitrotirozin
oksidacija ugljikohidrata	formacija karbonila
oksidacija nukleinskih kiselina	reaktivni aldehidi
	reducirani šećeri (askorbat, riboza)
	8-oksi-2-deoksigvanozin

## 1.2. GLUTATION (GSH)

Tripeptid,  $\gamma$ -l-glutamil-l-cisteinil-glicin poznat kao glutation (GSH) najvažniji je antioksidans niske molekularne mase sintetiziran u stanicama (Forman i sur., 2009). U stanicama se nalazi u vrlo visokim koncentracijama, u milimolarnom rasponu. Postoji u dva stanja, reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Kao što se može vidjeti na Slici 2., oksidirani glutation zapravo predstavlja dva reducirana glutaciona međusobno povezana atomima sumpora.



**Slika 2.** Ravnoteža između GSH i GSSG (preuzeto iz Pizzorno i sur., (2014) uz dopuštenje izdavača).

Omjer GSH i GSSG određuje redoks status stanica. Zdrave stanice u mirovanju imaju omjer GSH/GSSG  $>100$ , dok omjer pada na 1 do 10 u stanicama izloženim oksidativnom stresu. GSH se u stanicama stvara na tri načina:

- De novo sinteza procesom u dva koraka koji kataliziraju enzimi glutamat cistein ligaza (GCL) i glutation sintetaza (zahtijeva ATP).
- Regeneracija oksidiranog GSSG u reducirani GSH pomoću glutation reduktaze (zahtijeva NADPH).
- Recikliranje cisteina iz konjugiranog glutaciona putem gama-glutamiltransferaze (GGT) (zahtijeva NADPH).

Glutation ima brojne uloge u stanicama, izravno uklanja različite oksidanse, kao što su superoksidni anion, hidroksilni radikal, dušikov oksid i ugljični radikal. Katalitički detoksificira hidroperokside, peroksnitrite i lipidne perokside. Drugi način na koji glutacion štiti stanice od oksidansa je recikliranje vitamina C i E. Nakupljanje GSSG-a zbog oksidativnog stresa je izravno toksično za stanice, izazivajući apoptozu aktivacijom SAPK/MAPK puta (Pizzorno i sur., 2014). GSH/GSSG je najvažniji redoks par i igra ključnu ulogu u antioksidativnoj obrani, metabolizmu nutrijenata i regulaciji puteva neophodnih za homeostazu cijelog tijela. Nedostatak glutaciona doprinosi oksidativnom stresu, te stoga može igrati ključnu ulogu u starenju i patogenezi mnogih bolesti od kojih su neke navedene u Tablici 3. (Wo i sur., 2003).

**Tablica 3.** Bolesti povezane sa smanjenjem GSH (preuzeto i prilagođeno iz Pizzorno i sur., 2014).

1. <b>Neurodegenerativne bolesti</b> (Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingtonova, amiotrofična lateralna skleroza, Friedreichova ataksija)
2. <b>Plućne bolesti</b> (KOPB, astma, sindrom akutnog respiratornog distresa)
3. <b>Imunološke bolesti</b> (HIV, autoimuna bolest)
4. <b>Kardiovaskularne bolesti</b> (hipertenzija, infarkt miokarda, oksidacija kolesterola)
5. <b>Kronične bolesti povezane sa starenjem</b> (katarakta, makularna degeneracija, oštećenje sluha i glaukom)
6. <b>Bolesti jetre</b>
7. <b>Cistična fibroza</b>
8. <b>Starenje</b>

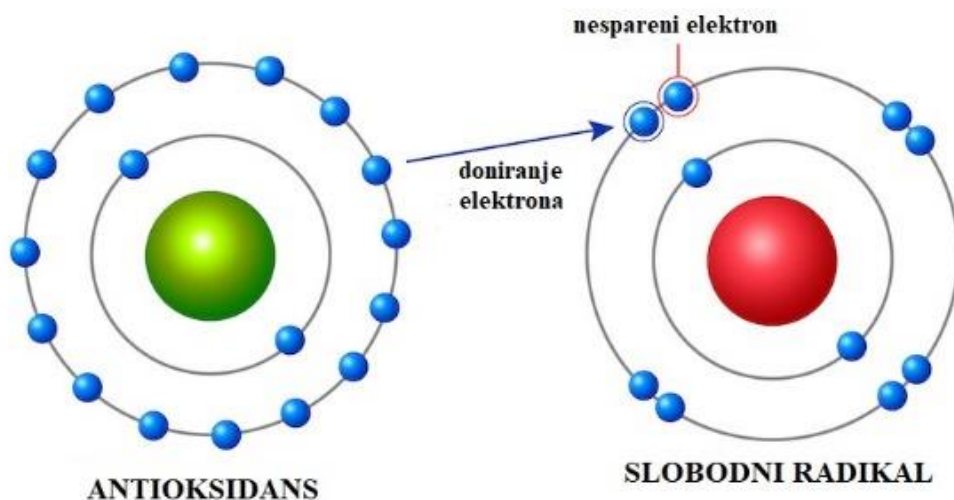
Za određivanje GSH u biološkim uzorcima koristi se nekoliko metoda kao što su spektrofotometrija, HPLC, kapilarna elektroforeza, nuklearna magnetska rezonancija i masena spektrometrija (Marrocco i sur., 2017).

### **1.3. UTJECAJ PREHRANE NA OKSIDATIVNI STRES**

Poznato je da molekule oštećene reaktivnim kisikovim vrstama aktiviraju upalni proces i da taj odgovor povećava proizvodnju slobodnih radikala. Promjene u prehrani mogu povisiti ili sniziti biomarkere oksidacijskog stresa. Nedavno je objavljen veliki pregled randomiziranih kontrolnih intervencijskih studija (RCT) koje su provedene na ispitanicima s pretilošću, hipertenzijom, dijabetesom ili dislipidemijom, s dijetalnom intervencijom, u kojima je istraživana utjecaj nutritivnih intervencija na biomarkere oksidativnog stresa. Zaključci su da antioksidansi u hrani, hipokalorična prehrana s gubitkom masnog tkiva, zamjena životinjskih proteina biljnim i promjene u mikrobioti poboljšavaju antioksidativni status kod osoba s kroničnim bolestima. Konzumacija hrane s visokim sadržajem antioksidansa i polifenola povećava antioksidativni kapacitet plazme i smanjuje markere oksidativnog stresa kod osoba s dijabetesom, pretilošću, hipertenzijom i hipertrigliceridemijom. Osim toga, gubitak tjelesne mase uzrokovan ograničenjem unosa kalorija sa ili bez uvođenja fizičke aktivnosti povećava endogeni antioksidativni kapacitet. Stoga je vjerojatno da će kombinacija hipokalorične prehrane s visokim udjelom antioksidansa i polifenola imati veći učinak. Druge promjene u prehrani s antioksidativnim učinkom, kao što je zamjena biljnih proteina životinjskim ili dodavanjem vlakana, mogu biti posredovane promjenama u mikrobioti. Međutim, ovaj aspekt zahtijeva daljnje proučavanje (Ávila-Escalante i sur., 2020).

#### **1.3.1. Antioksidansi u hrani**

Antioksidans je dovoljno stabilna molekula da donira elektron slobodnom radikalu i neutralizira ga, smanjujući tako njegovu sposobnost oštećenja (Slika 3). Antioksidansi odgađaju ili inhibiraju stanična oštećenja uglavnom zahvaljujući svojstvu uklanjanja slobodnih radikala. Antioksidansi niske molekularne mase mogu brzo reagirati sa slobodnim radikalima i prekinuti lančanu reakciju prije nego što se vitalne molekule oštete. Neki od takvih antioksidansa, uključujući glutation, ubikinol i mokraćnu kiselinu, proizvode se tijekom normalnog metabolizma u tijelu. Drugi niskomolekulski antioksidansi se nalaze u prehrani (Lobo i sur., 2010).



**Slika 3.** Prikaz neutralizacije slobodnog radikala antioksidansom.

Askorbinska kiselina ili vitamin C je monosaharidni antioksidans koji se nalazi u životinjama i biljkama. Kako se ne može sintetizirati u ljudi, mora se unositi hranom. Redukcijski je agens i može smanjiti i neutralizirati ROS kao što je vodikov peroksid (Lobo i sur., 2010). Pretvara slobodne radikale vitamina E natrag u vitamin E. Nalazi se u brojnom voću i povrću, a osobito bogat izvor su citrusno voće i povrće poput brokule, kupusa i kelja (WHO i FAO, 2004).

Vitamin E je skupni je naziv za skup od osam srodnih tokoferola i tokotrienola, koje ubrajamo u vitamine topljive u mastima s antioksidativnim svojstvima (Lobo i sur., 2010). Koncentrira se u hidrofobnom unutarnjem dijelu stanične membrane i glavna je obrana od oštećenja membrane izazvane oksidansima. Vitamin E donira elektron peroksil radikalu, koji nastaje tijekom peroksidacije lipida.  $\alpha$ -tokoferol je najaktivniji oblik vitamina E i glavni membranski vezan antioksidans u stanici. Vitamin E pokreće apoptozu stanica raka i inhibira stvaranje slobodnih radikala (Birben i sur., 2012). Zastupljen je u namirnicama biljnog i životinjskog porijekla, a njime se često obogaćuju biljna ulja i procesuirana hrana (WHO i FAO, 2004).

Karotenoidi su pigmenti koji se nalaze u biljkama. Razlikuju se  $\beta$ -karoten (provitamin A),  $\alpha$ -karoten, likopen, lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin,  $\alpha$ -kriptoksantin,  $\gamma$ -karoten, neurosporen,  $\zeta$ -karoten, fitofluen i fitoen. Utvrđeno je da prvenstveno  $\beta$ -karoten reagira s peroksilnim, hidroksilnim i superoksidnim radikalima.

Karotenoidi pokazuju svoje antioksidativne učinke pri niskom parcijalnom tlaku kisika, ali mogu imati prooksidativne učinke pri višim koncentracijama kisika (Birben i sur., 2012).  $\beta$ -karoten i  $\alpha$ -tokoferol mogu djelovati sinergistički kao učinkoviti “antioksidansi koji hvataju radikale” u biološkim membranama. Pokazalo se da je inhibicija peroksidacije lipida kombinacijom dva antioksidansa topiva u mastima veća od zbroja pojedinačnih inhibicija (Fiedor i sur., 2014). Izvršni izvori  $\beta$ -karotena su špinat i kelj, drugo zeleno lisnato povrće, brokula, mrkva, papaja, kao i žuto i narančasto voće (WHO i FAO, 2004).

Vitamin A skupni je naziv koji se odnosi na skupinu nezasićenih ugljikovodika topljivih u mastima, retinoida koji uključuju retinol, retinal i retinoičnu kiselinu (Quang Dao i sur., 2017). Koristeći *in vitro* peroksidacijski sustav, Das i suradnici (2014) su pokazali da su antioksidativne aktivnosti retinoida rangirane kao retinol  $\geq$  retinal  $>$  retinoična kiselina. Vitamin A svoje antioksidativne učinke ostvaruje na različite načine. Može djelovati kao antioksidans koji prekida lančane oksidacijske reakcije stupajući u interakcije s peroksil radikalima, prije nego što ti radikali mogu propagirati peroksidaciju u lipidnoj fazi stanice i stvoriti hidroperokside (Palace i sur., 1999). Glavni izvori vitamina A u hrani su karotenoidi provitamina A iz povrća i retinil esteri iz životinjskih tkiva. Najbogatiji izvori su mlijeko, meso, jetra i riblje ulje. Sisavci ne mogu sintetizirati vitamin A pa se on u obliku estera, najčešće retinil palmitata, unosi prehranom. Karotenoidi se smatraju provitaminima A jer se u organizmu mogu metabolizirati u retinal, a reakciju katalizira enzim  $\beta$ -karoten-15,15'-deoksigenaza (Quang Dao i sur., 2017).

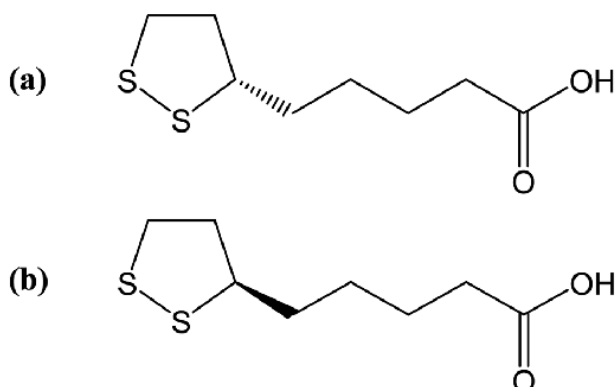
Cink (Zn) je esencijalni mineral kojeg naš organizam ne može sam sintetizirati, već ga je potrebno unositi putem hrane ili dodataka prehrani. Uključen je u brojne aspekte staničnog metabolizma, potreban je za katalitičku aktivnost oko 300 enzima, ima ulogu u imunološkoj funkciji, sintezi proteina, sintezi DNA, diobi stanica (<https://vitamini.hr>). Studije suplementacije cinkom u starijih osoba pokazale su smanjenu učestalost infekcija, smanjeni oksidativni stres i smanjeno stvaranje upalnih citokina. Cink je inhibitor NADPH oksidaze što rezultira smanjenim stvaranjem ROS. Kofaktor je enzima superoksid dismutaze (SOD) koji katalizira dismutaciju  $O_2\cdot^-$  u  $H_2O_2$  te potiče stvaranje metalotioneina, koji je vrlo bogat cisteinom i izvrstan je čistač  $OH\cdot$  (Prasad, 2014). Pronalazimo ga u školjkašima (kamenice), mesu (govedina, perad, svinjetina), mahunarkama, orašastim plodovima, sjemenkama, cjelovitim žitaricama (<https://www.hsph.harvard.edu>).



Selen (Se) je esencijalni mikronutrijent, a njegov nizak status kod ljudi povezan je s povećanim rizikom od raznih bolesti, poput raka i bolesti srca. Posljednjih godina, istraživanja se intenziviraju zbog njegove važne uloge u antioksidativnim selenoproteinima koji, između ostalog, sudjeluju u zaštiti od oksidativnog stresa. Najbogatiji nutritivni izvori Se su plodovi mora, žitarice i mesni proizvodi, dok se niske razine nalaze u mlijeku, povrću i voću (Tinggi, 2008).

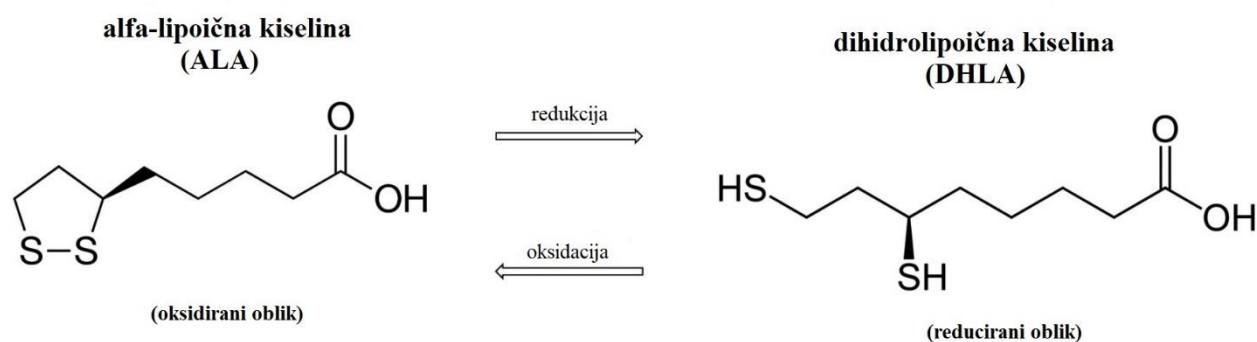
### 1.3.2. $\alpha$ -lipoična kiselina kao antioksidans

$\alpha$ -lipoična kiselina (1,2-ditiolan-3-pentanska kiselina; ALA) je prirodni spoj ditiola koji se enzimatski sintetizira u mitohondriju iz oktanske kiseline. Ima jedan kiralni centar i stoga postoji u R- i S- enantiomernom obliku (Slika 4). Fiziološka ALA je kofaktor kompleksa  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze za zaštitu mitohondrija od oksidativnog napada (Shay i sur., 2009).



**Slika 4.** Kemijske strukture enantiomera  $\alpha$ -lipoične kiseline: (a) S-(-)- $\alpha$ -lipoična kiselina i (b) R-(+)- $\alpha$ -lipoična kiselina (preuzeto od Le i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača).

ALA i dihidrolipoična kiselina (DHHLA) su oksidirani, odnosno reducirani oblik lipoične kiseline (Slika 5). Oni čine snažan redoks par koji može izravno hvatati ROS, kelirati metale i regenerirati druge antioksidanse, poput vitamina C i E, pokazujući tako značajna antioksidacijska svojstva.



**Slika 5.**  $\alpha$ -lipoična kiselina se može reducirati u dihidrolipoičnu kiselinu (preuzeto i prilagođeno od Kuban-Jankowska, (2017) uz dopuštenje izdavača).

Oksidirani i reducirani oblici ALA vežu niz metalnih iona. *In vitro* studije pokazuju da se ALA prvenstveno veže na ione Cu, Zn i Pb, ali ne može kelirati ione Fe, dok DHLA tvori komplekse s ionima Cu, Zn, Pb, Hg i Fe. Sve je više dokaza da ALA može djelovati neizravno na održavanje staničnog antioksidativnog statusa bilo induciranjem unosa ili povećanjem sinteze endogenih antioksidansa niske molekularne težine ili antioksidativnih enzima. Primjerice, brojne studije pokazuju kako ALA povećava unutarstanične razine vitamina C. U skladu s poboljšanjem statusa askorbinske kiseline, ALA značajno povećava intracelularni GSH (Petersen Shay, 2009). ALA je zamišljena kao biološki antioksidans koji je topiv i u vodi i u mastima i sposoban je neutralizirati ROS svugdje u tijelu, unutar i izvan stanica, te se iz tog razloga ALA naziva univerzalnim antioksidansom.

U plazmi i ljudskim stanicama količina ALA nije dovoljna za zadovoljavanje fizioloških potreba, osim ako je ne unosimo prehranom. Hrana je prirodni izvor R enantiomera, prirodno proizvedenog u živim organizmima i uglavnom je vezana na proteinsku frakciju hrane. Sintetski dodatak se sastoji od racemične smjese R i S enantiomera. Iako ih ljudsko tijelo sintetizira u malim količinama, proizvedene količine ALA nisu dovoljne za ispunjavanje energetskih potreba stanice. Kod životinja, ALA se nalazi u crvenom mesu, bubrezima, jetri i srcu životinja, dok se u biljkama nalazi u izobilju u špinatu, rajčicama, brokuli, prokulicama, grašku, krumpiru i rižinim mekinjama (Salehi i sur., 2019).

Na temelju svojih uvjerljivih antioksidativnih svojstava i dokazane sigurnosti, ALA se naširoko koristi i u dijetoterapiji bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kao što su dijabetes, neurološke bolesti i kardiovaskularne bolesti (Petersen Shay, 2009).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

$\alpha$ -lipoična kiselina (ALA) se zbog značajnog antioksidativnog potencijala i istražene sigurnosti primjene naširoko koristi u dijetoterapiji bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kao što su dijabetes, neurološke bolesti i kardiovaskularne bolesti.

Oksidativni stres jedan je od važnih etioloških čimbenika i u nastanku cervikalne intraepitelne neoplazije stupnja 1 ili 2 (CIN1 ili CIN2). Smjernice za oboljele pacijentice obično uključuju i savjet o poboljšanju obrazaca prehrane u kontekstu povećanog unosa namirnica bogatih antioksidansima (voćem i povrćem).

Stoga je cilj ovog istraživanja istražiti utjecaj obrazaca prehrane i životnog stila (pušenje, unos povrća, suplementacija antioksidansima, indeks tjelesne mase) ispitanica na biomarkere oksidacijskog stresa te utvrditi utjecaj suplementacije ALA na antioksidativni status seruma pacijentica. Rezultati istraživanja doprinjet će trenutnim saznanjima o mogućim nutritivnim intervencijama vezanih uz prevenciju i smanjenje oksidacijskog stresa kod pacijentica s CIN1 i CIN2. Sukladno tome, utvrdit će se značajnost  $\alpha$ -lipoične kiseline kao dodatka prehrani s antioksidacijskim učinkom.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Kemikalije

- Monoklorobiman (MBCL), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- Reducirani glutation (GSH), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)
- Ultra čista voda (18 MΩ) dobivena je iz SG ultra čistog vodenog sustava Ultra Clear UV Plus zajedno sa SG uloškom za demineralizator vode SG-2008 (Günzburg, Njemačka)
- Dimetil sulfoksid (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD)

#### 3.1.2. Instrumenti i pribor

- Mikrotitarska ploča s 96 jažica, crna, ravnog dna, Thermo Scientific™, Nunc™, F96 MicroWell™ (Waltham, Massachusetts, SAD)
- Analitička vaga, AB265-S (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Vortex miješalica, VTX-3000L Mixer Uzusio (LMS, Tokio, Japan)
- Čitač mikrotitarskih ploča, VICTOR X3 (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD)

### 3.2. ISPITANICI

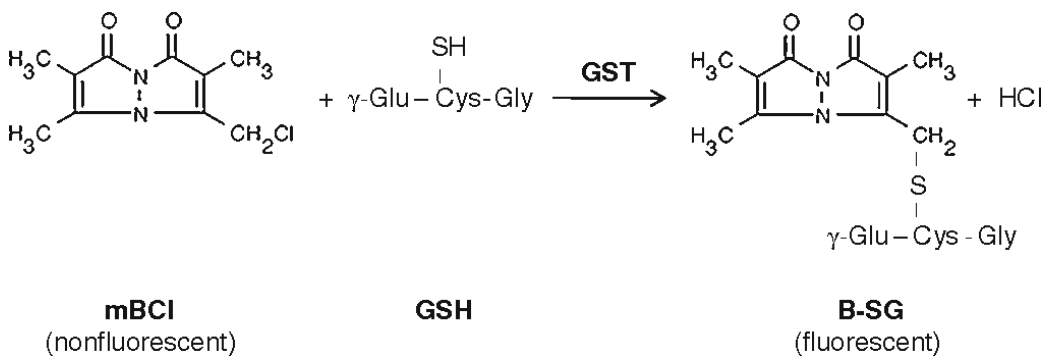
U istraživanje su bile uključene 83 žene, u dobi od 18 do 55 godina, a provedeno je u okviru dvostruko-slijepo, placebo kontrolirane studije. Kako bi pacijentice mogle sudjelovati u ispitivanju, najprije se morao provjeriti kriterij uključivanja i isključivanja i nakon toga potpisati informirani pristanak. Pacijentice koje su zadovoljile kriterije upoznate su sa svrhom i tijekom istraživanja te su uključene u studiju. Sve ispitanice bile su podvrgnute ginekološkom pregledu gdje im je kolposkopskom metodom utvrđena citološka dijagnoza (CIN 1 ili CIN 2). Nakon provedenog dijagnostičkog pregleda, pacijenticama su za potrebe laboratorijskih analiza uzeti uzorci krvi iz kubitalne vene (dvije epruvete). Metodom blok randomizacije pacijentice su nasumično raspoređene u tretiranu i kontrolnu skupinu gdje je svaka ispitanica dobila pakiranje označeno šifrom, od 180 kapsula, proizvođača Zada Pharmaceuticals, Tuzla, Bosna i Hercegovina. Pacijentice su bile dužne tijekom sljedećih 90 dana uzimati po dvije kapsule dnevno, ujutro i navečer, uz obrok, kao što je i navedeno u uputi o korištenju lijeka (600 mg  $\alpha$ -lipoične kiseline na dan). Pakiranja sadrže ili kapsule od 300 mg  $\alpha$ -lipoične kiseline (tretirana skupina) ili samo rižin škrob kao pomoćnu tvar (kontrolna skupina).

Nakon isteka 90 dana, pacijentice su ponovno obavile ginekološko-kolposkopski pregled kako bi se utvrdio dijagnostički kriterij te su im na isti način uzimani uzorci krvi radi opetovane laboratorijske analize. Kako bi se utvrdila adherencija terapiji, pacijentice su bile dužne nakon 90 dana vratiti ginekologu preostale kapsule u originalnoj ambalaži. Uzorci krvi su prikupljeni tijekom 18 mjeseci, a preostali serum, potreban za određivanje parametara oksidacijskog stresa, je alikvotiran i pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. ODREĐIVANJE REDUCIRANOG GLUTATIONA

#### 3.3.1. Princip metode

Monoklorobiman (MBCL) je nefluorescentan spoj koji nakon konjugacije s tiolnim skupinama molekula male molekulske mase stvara fluorescirajuće adukte (Slika 6). U takve molekule ubraja se i glutation (GSH), stoga se MBCL uobičajeno koristi kao biomarker za određivanje koncentracije GSH u stanici (Machado, Soares, 2012). Konjugirani MBCL fluorescira na valnim duljinama ekscitacije od 355 nm i emisije 460 nm.



**Slika 6.** Molekularna struktura nefluorescentnog monoklorobimana (MBCL) i njegova reakcija s GSH u kojoj nastaje fluorescentni adukt biman-glutation (B-SG) u reakciji koju katalizira glutation S-transferaza (GST) (preuzeto i prilagođeno od Machado i Soares, 2012).

### **3.3.2. Optimizacija metode kvantifikacije glutationa pomoću MBCL fluorescentne probe**

Kako bismo odredili prikladne uvjete za kvantifikaciju reduciranog GSH pomoću MBCL fluorescentne probe, potrebno je optimizirati metodu. Optimizacija metode obuhvaća odabir prikladnih slijepih proba, koncentracija seruma i vremena inkubacije.

#### **3.3.2.1. Optimizacija koncentracije seruma**

Potrebno je utvrditi koncentraciju seruma prikladnu za metodu te ispitati fluorescira li serum na valnim duljinama korištenim za mjerenje fluorescencije MBCL-a kako bi pravilno odabrali slijepe probe.

##### **Postupak :**

- U crnu mikrotitarsku pločicu pipetirati najprije serum, prethodno homogeniziran pomoću Vortex miješalice. Uzorak se pripremi u nekoliko koncentracija (5, 10, 20 i 40 puta razrijeđen) te se doda u kvadrilikatu u volumenu od 15  $\mu\text{L}$ . Zatim se dodaje 135  $\mu\text{L}$  MBCL-a (konačne koncentracije 40  $\mu\text{M}$  u jažici).
- Slijepe probe (blank) se pripreme tako da se serumu u istom razrjeđenju kao i u mjernoj otopini doda 135  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode.
- Na čitaču mikrotitarskih pločica napravi se protokol prema kojem se uzorci izmiješaju i inkubiraju tijekom 20 minuta na temperaturi od 37 °C, a fluorescencija se mjeri na valnim duljinama od 355 nm i 460 nm svaku minutu.

#### **3.3.2.2. Izrada baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije GSH**

##### **Postupak:**

- Za izradu baždarnog dijagrama pripravi se koncentracijski niz GSH u crnoj mikrotitarskoj pločici pripremljen iz stock otopine GSH otopljenog u DMSO-u.
- Najprije se u jažice mikrotitarske pločice pipetira 15  $\mu\text{L}$  GSH u kvadrilikatu u nekoliko koncentracija. Zatim se dodaje 135  $\mu\text{L}$  MBCL konačne koncentracije 40  $\mu\text{M}$  u jažici.
- Na čitaču mikrotitarskih pločica uzorci se najprije izmiješaju te inkubiraju tijekom 10 minuta pri temperaturi od 37 °C, zatim se mjeri fluorescencija na valnim duljinama od 355 i 460 nm.
- Iz izmjerenih vrijednosti fluorescencija izradi se baždarni dijagram koji pokazuje ovisnost relativne fluorescencije (RFU) o koncentraciji GSH.

### 3.3.3. Metoda kvantifikacije GSH

#### Postupak:

- U crnu mikrotitarsku pločicu pipetirati najprije 15  $\mu\text{L}$  seruma u kvadrilikatu, prethodno homogenizirano pomoću Vortex miješalice. Zatim dodati 135  $\mu\text{L}$  MBCL-a (konačne koncentracije 40  $\mu\text{M}$  u jažici).
- Slijepa probe (blank) se pripreme tako da se serumu u istom razrjeđenju kao i u mjernoj otopini doda 135  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode.
- Na čitaču mikrotitarskih pločica napravi se protokol prema kojem se uzorci izmiješaju, inkubiraju 10 minuta na temperaturi od 37 °C, nakon čega se mjeri fluorescencija na valnim duljinama od 355 nm i 460 nm.

### 3.4. ANALIZA UPITNIKA O UČESTALOSTI KONZUMACIJE NAMIRNICA

Za procjenu kvalitete prehrane pacijentica korišten je validirani semikvantitativni prehrambeni upitnik o učestalosti konzumacije namirnica (koje su ga ispunjavale samostalno, odnosno po potrebi uz pomoć educiranog osoblja) (Babić i sur., 2014; Prilog 1). Iz prikupljenih podataka dobivene su informacije o uobičajenom unosu specifičnih vrsta namirnica, kao i dodataka prehrani u proteklih mjesec dana. Upitnik sadrži i opći dio, iz kojeg su prikupljeni podaci o životnom stilu pacijentica, uključujući i pušenje i fizičku aktivnost. Pacijenticama je savjetovano da tokom trajanja studije ne mijenjaju način prehrane niti stupanj fizičke aktivnosti.

### 3.5. STATISTIČKA ANALIZA 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). Normalnost raspodjele dobivenih podataka testirana je primjenom D'Agostino - Pearsonovog testa te su na temelju dobivenih rezultata odabrani testovi za daljnju analizu podataka. Vrijednosti GSH prikazani su kao medijan  $\pm$  95% raspon pouzdanosti. Usporedba dobivenih rezultata (prije-poslije suplementacije/kontrola-ispitivana) provedena je primjenom Mann-Whitney U testa za razinu značajnosti  $p < 0,05$ .

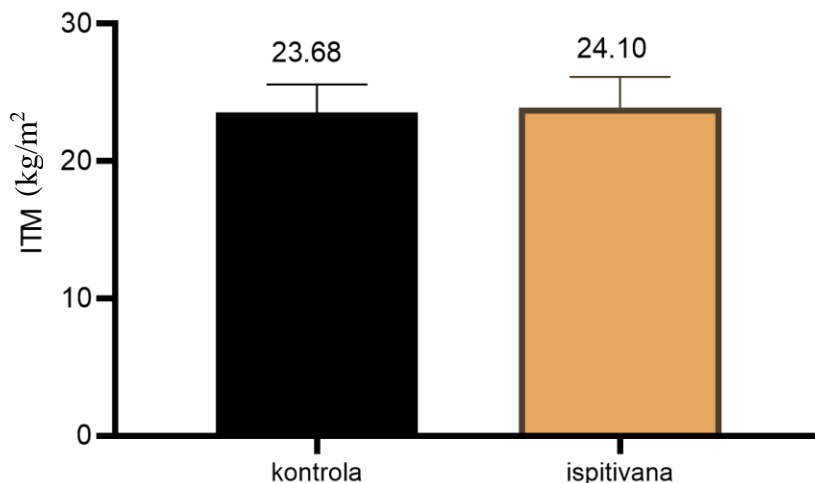
## 4. REZULTATI

### 4.1. KARAKTERISTIKE KONTROLNE I ISPITIVANE SKUPINE

Uspoređivane su pojedine karakteristike 83 ispitanica podijeljenih u ispitivanu i kontrolnu skupinu s ciljem utvrđivanja statistički značajnih razlika između dviju skupina koje bi mogle imati utjecaj na koncentraciju GSH u krvi. Parametri uključeni u ispitivanje su indeks tjelesne mase (ITM), pušenje te uzimanje suplemenata s antioksidansima. Navedeni podaci prikupljeni su iz prehrambenog upitnika (Prilog 1).

#### 4.1.1. Indeks tjelesne mase (ITM)

Srednja vrijednost ITM za kontrolnu skupinu iznosi 23,68 kg/m<sup>2</sup>, dok je u ispitivanoj skupini 24,10 kg/m<sup>2</sup> (Slika 7). Primjenom Mann-Whitneyevog testa utvrđeno je da između kontrolne i ispitivane skupine nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ). Također, srednje vrijednosti ITM-a ukazuju kako su pacijentice normalne tjelesne težine budući da ITM ne prelazi 25 kg/m<sup>2</sup>.



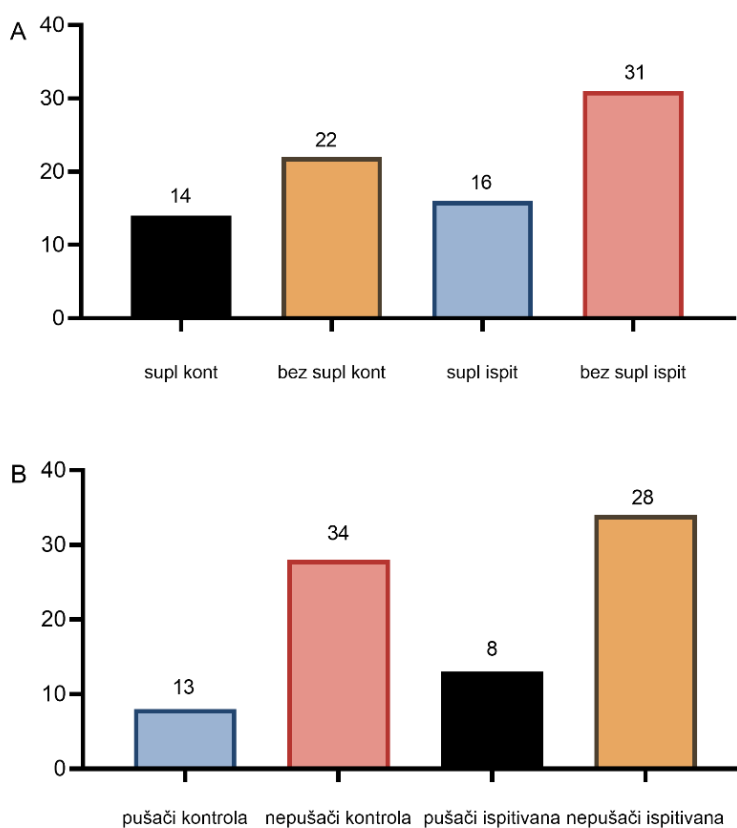
**Slika 7.** Usporedba kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na indeks tjelesne mase (ITM).



#### 4.1.2. Korištenje suplemenata s antioksidansima i pušenje

Grafički prikaz A na Slici 8. prikazuje broj ispitanica koje koriste suplemente s antioksidansima i broj ispitanica koje ne koriste suplemente s antioksidativnim učinkom u kontrolnoj i ispitivanoj skupini. Suplemente s antioksidansima redovito koristi 14 ispitanica iz kontrolne skupine te 16 ispitanica iz ispitivane skupine. U kontrolnoj skupini 22 ispitanice ne uzimaju suplemente s antioksidansima, a u ispitivanoj njih 31. Primjenom  $\chi^2$  testa utvrđena je vrijednost 0,2074 (Tablica 4) što znači da za vrijednost  $df=1$  i  $p<0,05$  nema statistički značajne razlike za dvije uspoređivane skupine.

Iz grafičkog prikaza B na Slici 8. proizlazi da je u kontrolnoj skupini 13 pušačica i 34 nepušačica, dok je u ispitivanoj skupini 8 pušačica i 28 nepušačica. Usporedba tih dvaju skupina provedena je primjenom  $\chi^2$  testa gdje dobivena  $\chi^2$  vrijednost iznosi 0,3189 iz čega proizlazi da za  $df=1$  i  $p<0,05$  dvije skupine u tom kontekstu nisu statistički značajno različite (Tablica 4).



**Slika 8.** Grafički prikaz kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na pacijentice koje uzimaju suplemente antioksidansa (A) i broj pušača (B).

**Tablica 4.** Rezultati Chi<sup>2</sup> testa usporedbe kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na broj pušača i broj pacijenata koje uzimaju suplemente antioksidansa.

	tretirana prije	tretirana poslije	kontrolna prije	kontrolna poslije
<b>Broj pacijenata</b>	47	47	36	36
<b>Minimum</b>	327.6	370	377.7	245.2
<b>25 % percentil</b>	444.5	452.2	447.1	420.2
<b>Medijan</b>	479.1	483.8	474.7	456.9
<b>75% percentil</b>	547.5	544	524.9	502
<b>Maksimum</b>	673.5	815.4	757.4	898.9
<b>Raspon</b>	345.9	445.3	379.8	653.7
<b>Srednja vrijednost</b>	494.8	507.3	496.6	461.1
<b>Standardna devijacija</b>	70.53	87.17	83.28	106.1
<b>Standardna pogreška</b>	10.29	12.72	13.88	17.68

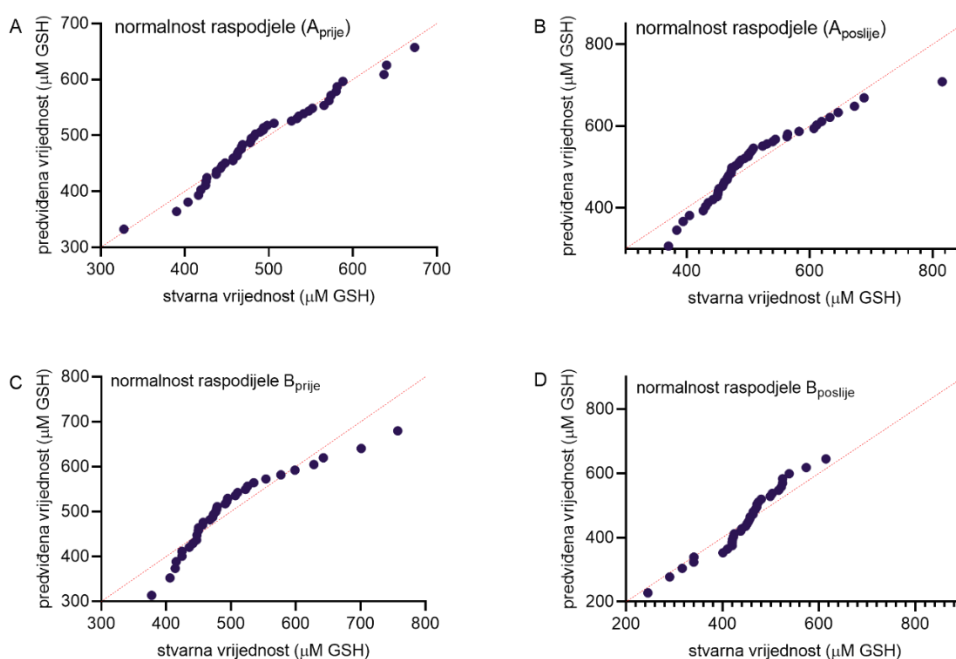
**Tablica 5.** Podaci deskriptivne analize koncentracija GSH u serumima pacijenata ispitivane i kontrolne skupine prije i poslije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom.

	Suplementi antioksidansa	Pušenje
Chi-square, df	0.2074, 1	0.3189, 1
z	0.4555	0.5647
P vrijednost	0.6488	0.5723
Statistički značajno (P<0,05)?	Ne	Ne

## 4.2. ISPITIVANJE NORMALNOSTI RASPODJELE KONCENTRACIJA GSH U KONTROLNOJ I ISPITIVANOJ SKUPINI

Deskriptivni statistički parametri korišteni u postupku deskriptivne analize koncentracije GSH u serumima kontrolne (36 pacijentica) i ispitivane (47 pacijentica) skupine prije i poslije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom prikazani su u Tablici 2.

Kako bi se ispitala normalnost raspodjele koncentracija GSH u kontrolnoj i ispitivanoj skupini korišten je QQ-plot pomoću kojeg se može naslutiti distribucija formiranog uzorka koja se kasnije provjerila primjenom D'Agostino-Pearsonovog testa.



**Slika 9.** Q-Q plotovi normalnosti za vrijednosti aktivnosti GSH seruma ispitivane skupine pacijentica prije suplementacije (A), ispitivane skupine pacijentica nakon suplementacije (B), kontrolne skupine pacijentica prije suplementacije (C) i kontrolne skupine pacijentica nakon suplementacije (D).

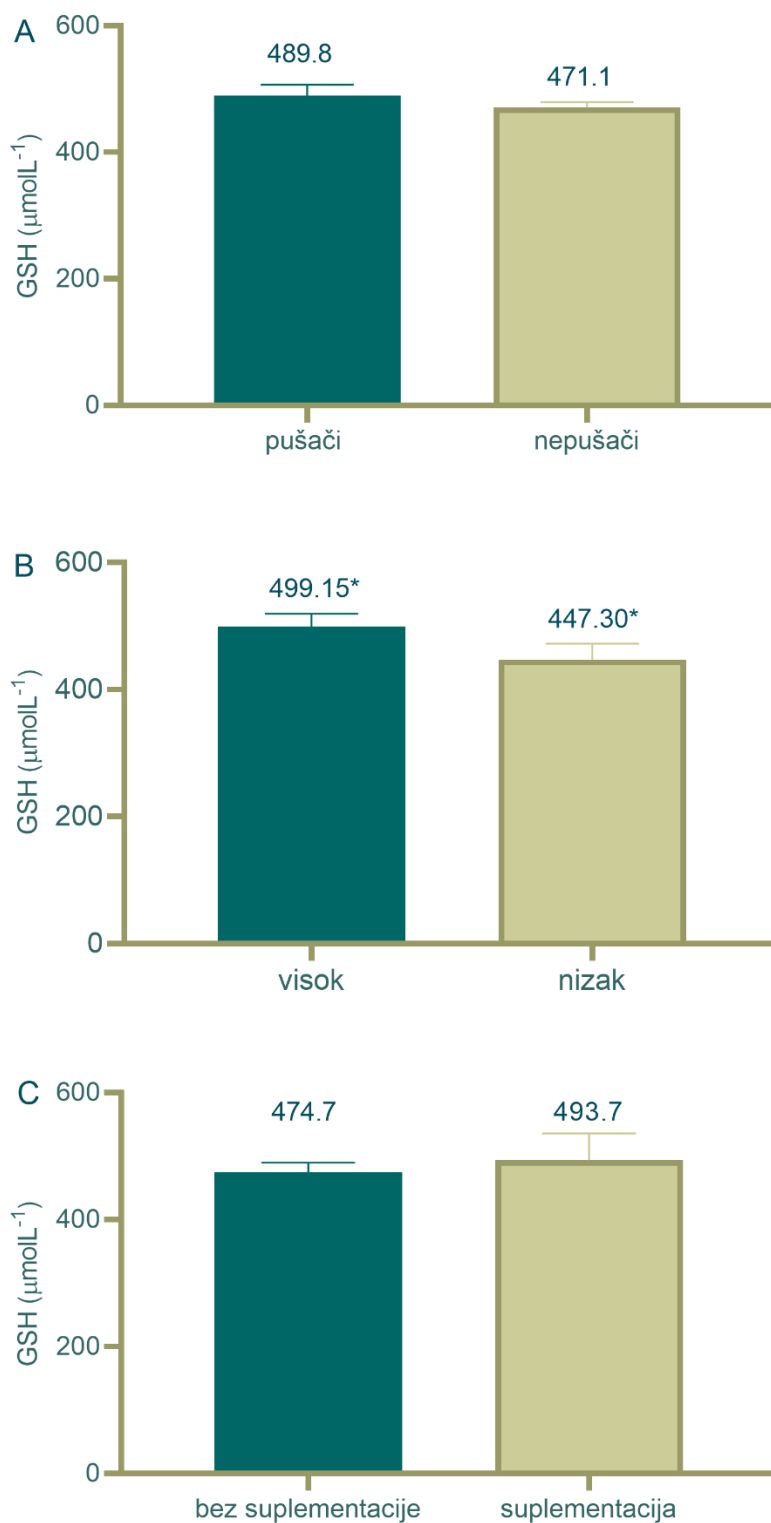
QQ-plotovi koncentracija GSH u serumima ispitanika kontrolne i ispitivane skupine prije i nakon suplementacije prikazani su na Slici 9. Normalnost distribucije provjerena je primjenom D'Agostino-Pearsonovog testa. Normalna razdioba utvrđena je za koncentracije GSH u ispitivanoj skupini prije suplementacije, a svi ostali podaci nemaju normalnu razdiobu podataka. S obzirom na to da na relativno mali broj pacijenata u skupinama, za analizu podataka korišteni su neparametrijski testovi.

### 4.3. UTJECAJ PARAMETARA ŽIVOTNOG STILA NA KONCENTRACIJE GSH U KRVI

Kako bi se istražio utjecaj karakteristika životnog stila i načina prehrane na koncentraciju GSH u krvi prije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom/placebom, sve pacijentice uključene u studiju podijeljene su u različite skupine s obzirom na

- pušački status (pušači i nepušači),
- konzumaciju povrća (pacijentice s visokim unosom povrća i one s niskim unosom)
- korištenje suplemenata sa antioksidansima (pacijentice koje uzimaju suplemente i one koje ne uzimaju suplemente).

Vrijednosti GSH u različitim skupinama uspoređene su primjenom Mann-Whitneyevog testa te su prikazane na Slici 10. Među ispitanicama bilo je ukupno 21 pušačica i 62 nepušačice. Izmjerena srednja početna vrijednosti koncentracija GSH u krvi u skupini pušačica iznosi 489,8  $\mu\text{mol/L}$ , dok u nepušačica iznosi 471,1  $\mu\text{mol/L}$ . U skupini pacijentica koje su koristile suplemente s antioksidansima srednja početna vrijednost koncentracija GSH u krvi iznosi 493,7  $\mu\text{mol/L}$ , a u skupini pacijentica koje nisu uzimale suplemente iznosi 474,7  $\mu\text{mol/L}$ . Iz dobivenih rezultata proizlazi da pušenje i suplementacija antioksidansima značajno ne utječu na početnu razinu GSH u serumu pacijentica ( $p > 0,05$ ). Nasuprot tome, zapaženo je kako obrasci prehrane mogu imati utjecaj na početnu vrijednost GSH. Usporedbom skupine pacijentica s najnižim unosom povrća, čija srednja početna vrijednost koncentracije GSH u serumu pacijentica iznosi 447,30  $\mu\text{mol/L}$ , sa skupinom s najvećim unosom povrća, gdje srednja početna vrijednost koncentracije GSH u krvi iznosi 499,15  $\mu\text{mol/L}$ , primijećene su statistički značajne razlike ( $p=0,0029$ ).

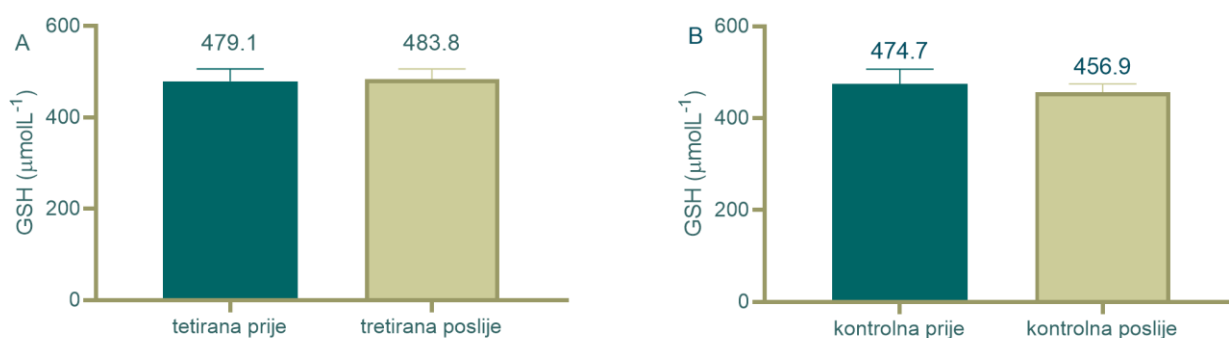


**Slika 10.** Grafički prikaz koncentracije GSH (izražene u µmol/L) u serumu pacijentica prije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom - utjecaj pušenja (A), unosa povrća (B) i unosa suplemenata s antioksidansima (C).

#### 4.4. UTJECAJ SUPLEMENTACIJE $\alpha$ -LIPOIČNOM KISELINOM NA VRIJEDNOSTI GSH U SERUMU

Koncentracija GSH u krvnom serumu izmjerena je u ispitivanoj i kontrolnoj skupini pacijentica prije i nakon suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom. Za svaku skupinu rezultata provedeno je testiranje normalnosti distribucije. Raspodjela podataka u svim skupinama zadovoljava test normalnost te je za daljnju usporedbu podataka korišten Mann-Whitneyev test.

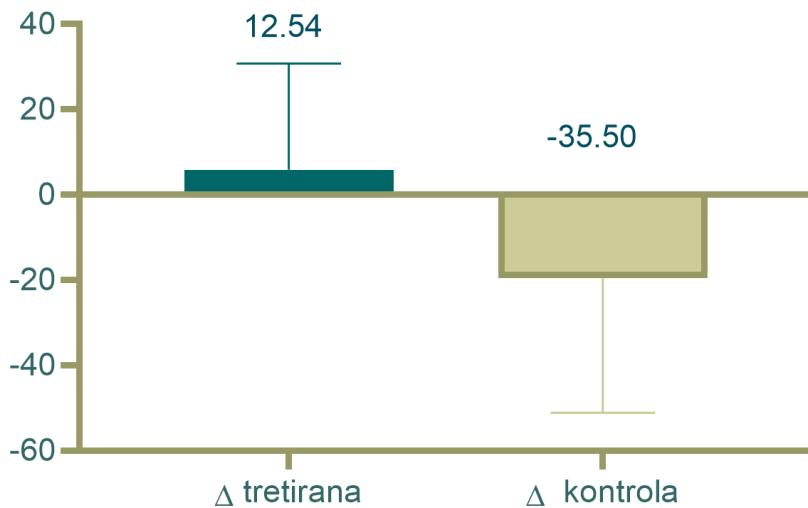
Na Slici 11. prikazane su srednje vrijednosti koncentracije GSH u krvnom serumu prije i nakon suplementacije u ispitivanoj (A) i kontrolnoj skupini (B).



**Slika 11.** Srednje vrijednosti početne koncentracije GSH u krvnom serumu ispitivane (A) i kontrolne (B) skupine pacijentica prije i nakon suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, odnosno placebo.

Srednja vrijednost koncentracije GSH u ispitivanoj skupini prije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom iznosi 479,1  $\mu\text{mol/L}$ , a nakon suplementacije 483,8  $\mu\text{mol/L}$ . Za kontrolnu skupinu, srednja vrijednost koncentracije GSH u krvnom serumu prije suplementacije iznosi 474,7  $\mu\text{mol/L}$ , a poslije suplementacije 456,9  $\mu\text{mol/L}$ . Dobiveni rezultati pokazuju kako nema statistički značajne razlike između početnih vrijednosti GSH u ispitivanoj i kontrolnoj skupini prije i nakon suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom ( $p > 0,05$ ).

Kako bi se utvrdila učinkovitost suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, izmjerene su promjene koncentracije GSH u serumima kontrolne i ispitivane skupine koja se odvijala tijekom suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom čije su dobivene vrijednosti prikazane na Slici 12.



**Slika 12.** Promjene koncentracije GSH u serumima tretirane i kontrolne skupine nakon suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, odnosno placebo.

Promjena koncentracije GSH u krvnom serumu nakon suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom u ispitivanoj skupini je pozitivna i iznosi 12,54 što znači da je tijekom suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom došlo do povećanja serumske koncentracije GSH. Nasuprot tome, u kontrolnoj skupini je negativna i iznosi -35,50. Promjene koncentracije serumskog GSH u kontrolnoj skupini su se smanjile tijekom suplementacije, dok je u ispitivanoj skupini primijećen blagi porast. Ipak, opažene razlike nisu bile statistički značajne ( $p=0,1434$ ).

## 5. RASPRAVA

Oksidativni stres, stanje izgubljene ravnoteže između oksidativnog i antioksidativnog sustava stanica i tkiva, rezultira prekomjernom proizvodnjom reaktivnih kisikovih i dušikovih specija. Prekomjerni generirani ROS mogao bi napasti stanične proteine, lipide i nukleinske kiseline uzrokujući time disfunkciju stanice što uključuje poremećaj energetskog metabolizma, promijenjenu staničnu signalizaciju, promijenjene mehanizme staničnog transporta, ukupnu smanjenu biološku aktivnost, imunološku aktivaciju i upalu. Neuravnotežena prehrana i različiti oblici malnutricije (npr. prehrana s previsokim udjelom masti i ugljikohidrata, pretilost, smanjen unos nutritivnih antioksidansa) također potiču oksidativni stres što se očituje povećanom peroksidacijom lipida, smanjenim antioksidativnim sustavom i smanjenom razinom GSH (Rani i sur., 2016). U ovoj kliničkoj studiji određivale su se srednje vrijednosti ITM-a ispitivane i kontrolne skupine pacijentica te se došlo do saznanja kako se uspoređivane skupine nisu statistički značajno razlikovale s obzirom na ispitivani parametar. Srednja vrijednost ITM-a za kontrolnu skupinu iznosila je 23,68 kg/m<sup>2</sup>, dok je za ispitivanu skupinu iznosila 24,10 kg/m<sup>2</sup>. To je važno iz razloga što visok ITM (>30 kg/m<sup>2</sup>) i nehomogene vrijednosti ITM-a u skupinama mogu značajno utjecati na učinkovitost suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom. Rani i suradnici (2016) u svom znanstvenom radu opisuju kliničku studiju koja ukazuje kako se kardiovaskularni rizik povezan s pretilošću može poboljšati smanjenjem tjelesne težine jer se na taj način smanjuju markeri oksidativnog stresa, a pojačava antioksidativni sustav. Došli su do zaključka kako režim prehrane koji sadrži prirodno voće, zeleno povrće, cjelovite žitarice, mahunarke, ribu, probiotike i maslinovo ulje može smanjiti rizik za razvoj metaboličkih bolesti brojnim potencijalnim mehanizmima, uključujući staničnu signalizaciju, promjenu u ekspresiji gena, smanjen oksidativni stres te smanjeno nakupljanje lipida i upalnih molekula. Prehrana s visokim unosom povrća dio je ispitivanja i u ovome radu, gdje su uspoređivane koncentracije GSH u krvnom serumu kod pacijentica s visokim i onih s niskom unosom povrća. Dobivena srednja vrijednosti početnih koncentracija GSH u krvnom serumu pacijentica s visokim unosom povrća iznosila je 499,15  $\mu$ mol/L, dok je kod pacijentica s niskom unosom ona bila 447,30  $\mu$ mol/L. Iz dobivenih rezultata uočava se statistički značajna razlika što je i u skladu s brojnim provedenim kliničkim studijama.

Devaraj i suradnici (2008) proveli su studiju čiji je primarni cilj bio usporediti postprandijalne učinke obroka bogatog energijom, bogatog masnoćom i brze hrane (FFS) s obrokom koji je preporučan od strane American Heart Association (AHA) na biomarkere oksidativnog stresa i



upalu u ispitanika s metaboličkim sindromom. Liječenje ispitanika s metaboličkim sindromom uključivalo je terapijske promjene načina života, smanjenje unosa zasićenih masti, kolesterola, trans masti i povećanje tjelesne aktivnosti te dodavanje sterola i vlakana u prehranu. Došli su do spoznaje kako pacijenti s metaboličkim sindromom koji su konzumirali obrok s visokim udjelom masti, visokim udjelom energije i soli (obrok FFS) usporedbom s pacijentima koji su primjenjivali obrok preporučen od AHA, rezultira značajnim povećanjem biomarkera oksidativnog stresa u postprandijalnom stanju. Povećan postprandijalni oksidativni stres rezultat je povećanog unosa masti, energijom bogatog obroka ili kombinacijom istih.

Nedavni eksperimentalni i klinički podaci podupiru hipotezu kako izloženost dimu cigareta povećava oksidativni stres kao potencijalni mehanizam za pokretanje kardiovaskularne disfunkcije. Oksidativni stres posredovan je slobodnim radikalima koji nastaju izravno iz dima cigarete, ali i iz endogenih izvora. Uobičajeno, dim cigarete se dijeli u dvije faze: fazu katrana i fazu plina. Faza katrana ili čestica dima cigarete sadrži > 1017 slobodnih radikala/g, a plinska faza sadrži >1015 slobodnih radikala/puhu. Radikali povezani s fazom katrana su dugovječni (sati do mjeseci), dok radikali povezani s plinskom fazom imaju kraći životni vijek (sekunde) (Ambrose i sur., 2004). Dikalov i suradnici (2019) proveli su studiju u kojoj su ispitali utjecaj pušenja duhana na kardiovaskularne bolesti i hipertenziju. Pretpostavili su kako dim cigarete izaziva kardiovaskularni mitohondrijski oksidativni stres, što doprinosi disfunkciji endotela i hipertenziji što su dobivenim rezultatima i potvrdili. Dokazali su kako dim cigarete izaziva hiperacetilaciju superoksid dismutaze 2 (SOD2) i pojačava endotelnu disfunkciju te, u suradnji s angiotenzinom II, inducira mitohondrijski oksidativni stres. Kako bi se utvrdila moguća korelacija između pušenja i utjecaja na antioksidacijski status pacijentica izmjerene su početne vrijednosti koncentracija GSH u krvi. U skupini pušačica dobivena srednja početna vrijednost koncentracije GSH iznosi 489,8  $\mu\text{mol/L}$ , dok u nepušačica iznosi 471,1  $\mu\text{mol/L}$ . Budući da dobivene vrijednosti nisu statistički značajno različite može se zaključiti kako pušenje ne utječe na koncentraciju GSH u krvi što nije u skladu s pretpostavkom i rezultatima provedenih studija. Razlog tomu vjerojatno se krije u činjenici što je u ispitivanje uključen vrlo mali broj ispitanica i korišteni biomarker, kao pokazatelj antioksidacijskog statusa, nije bio dovoljno osjetljiv.

Naš antioksidacijski obrambeni sustav uključuje endogene (enzimske i neenzimske) antioksidanse kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza i glutation (GSH), između ostalog i egzogene antioksidanse kao što su vitamin C, vitamin E, karotenoidi i polifenoli, pri čemu je prehrana glavni izvor istih. Endogeni i egzogeni antioksidansi djeluju interaktivno (npr. sinergistički) kako bi održali ili ponovno uspostavili redoks homeostazu, kao

što je regeneracija vitamina E putem GSH ili vitamina C za sprječavanje procesa lipidne peroksidacije. Mnoge zdravstvene organizacije preporučuju unos hrane bogate prirodnim antioksidansima, kao što su vitamini i polifenoli. Osim njihove prirodne pojave u hrani, obogaćivanje, suplementacija izoliranim komponentama i unos sintetskih antioksidativnih aditiva predstavljaju daljnje izvore antioksidansa (Bouayed i sur., 2010). Bouayed i suradnici (2010) proveli su studiju *in vitro* na temelju koje ističu citoprotektivnu aktivnost sastojaka biljne hrane kao što su polifenoli i mješavine te njihove preventivne učinke protiv stanične smrti uzrokovane oksidativnim stresom. Prooksidativna ili antioksidativna aktivnost usko ovisi o njihovoj koncentraciji. Nedavne studije koje su koristile stanične modele istaknule su prooksidativno djelovanje nekoliko polifenola već poznatih kao antioksidansi kao što su kvercetin, katehini uključujući epikatehin i epigalokatehin-3-galat (EGCG) i galičnu kiselinu. U visokim dozama, pokazalo se kako kvercetin (50  $\mu\text{M}$ ) može potencirati stvaranje superoksidnih radikala unutar izoliranih mitohondrija i kultiviranih stanica. U drugoj studiji, antioksidativna aktivnost kvercetina opažena je samo pri niskim dozama (0,1-20  $\mu\text{M}$ ) dok su veće koncentracije (>50  $\mu\text{M}$ ) smanjile preživljavanje i vitalnost stanica, sadržaj tiola, ukupni antioksidativni kapacitet i aktivnosti SOD, CAT i glutation S-transferaze. Također je pokazano da flavonoidi u visokim koncentracijama mogu generirati ROS autooksidacijom. U ovom radu ispitan je utjecaj dodataka prehrani s antioksidansima na razinu GSH u krvnom serumu. Rezultati analize pokazuju kako unošenje dodataka prehrani s antioksidansima nemaju značajan utjecaj na koncentraciju GSH u serumu pacijentica. Ispostavilo se kako je prehrana koja je prirodno bogata antioksidansima imala utjecaj na koncentraciju GSH u serumu, dok suplementi s antioksidansima nisu. Razlog tomu je vjerojatno činjenica da su pacijentice kontinuirano unosile antioksidanse prehranom, dok je uzimanje dodataka prehrani bilo vremenski ograničeno. Također, prehranom unosimo raznolik spektar sastavnica s antioksidativnim učinkom koje mogu različitim mehanizmima djelovati na antioksidativni status, mogu pokazivati sinergističko djelovanje i time međusobno pojačavati učinak pojedinih antioksidansa. Nadalje, antioksidanse putem hrane unosimo kontinuirano u fiziološkim dozama te je manja mogućnost zasićenja transportera što rezultira većom bioraspoloživošću antioksidansa. Suprotno tome, dodaci prehrani često sadrže jedan ili manji broj antioksidansa. Postoji mogućnost da se u dodacima prehrani nalazi manja količina antioksidansa od deklarirane vrijednosti ili se uopće ne nalazi deklarirani sastojak, budući da dodaci prehrani nisu podložni strogim kontrolama kao i lijekovi. Kako bi se dobili što pouzdaniji rezultati, ispitivanje bi trebalo provoditi na većem broju pacijentica i mjerenjem pratiti više biomarkera oksidativnog stresa.

Sangsefidi i suradnici (2020) u svojem su istraživanju ispitivali učinak suplementacije koenzimom Q10 (CoQ10) na oksidativni stres. Njihov cilj bio je procijeniti učinak suplementacije CoQ10 na razinu ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC), malondialdehida (MDA), glutation peroksidaze (GPx), superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) u serumu ispitanika, koristeći podatke prikupljene iz randomiziranih kontroliranih studija (RCT). Prema rezultatima meta-analize provedene na 19 prihvatljivih studija došli su do zaključka kako suplementacija koenzimom Q10 značajno povećava razine TAC-a i antioksidativnih enzima (SOD, GPx i CAT) te smanjuje razinu malondialdehida. Međutim, potrebno je provesti više kliničkih ispitivanja koristeći veće količine uzoraka, kroz dulji vremenski period kako bi se potvrdili pozitivni učinci suplementacije CoQ10 na oksidativni stres u različitim dozama. Zamani i suradnici (2019) proveli su studiju sustavnog pregleda i meta-analize kako bi utvrdili učinak suplementacije probioticima na pojedine biomarkere oksidativnog stresa među odraslim ispitanicima. Rezultati meta-analize otkrili su kako suplementacija probioticima može rezultirati povećanjem razine TAC-a i sniženjem razine MDA u serumu ispitanika, što poboljšava antioksidativni status. Također, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se razjasnio učinak suplementacije probioticima na biomarkere oksidativnog stresa. Mohammadi i suradnici (2021) svojim sustavnim pregledom i meta-analizom potvrdili su kako suplementacija cinkom može imati povoljan protuupalni i antioksidativni učinak kod odraslih. Heshmati i suradnici (2019) imali su za cilj sustavnim pregledom i meta-analizom sažeti rezultate randomiziranih kliničkih ispitivanja koji ispituju učinke suplementacije omega-3-masnim kiselinama na markere oksidativnog stresa. Zbirnom analizom podataka došli su do spoznaje da suplementacija omega-3-masnim kiselinama značajno povećava razinu TAC-a u serumu kao i aktivnost GPx, a smanjuje aktivnost MDA. Zaključili su kako se omega-3-masne kiseline mogu koristiti kao pojačivači u antioksidativnoj obrani od ROS-a.

Utjecaj suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na koncentraciju GSH u krvnom serumu pacijentica s CIN1 i CIN2 glavni je dio ispitivanja ovog diplomskog rada. Rezultati ispitivanja ne pokazuju statistički značajan utjecaj suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na koncentraciju GSH u krvnom serumu ispitanica. Također, srednje početne koncentracije GSH u krvnom serumu ispitivane i kontrolne skupine pacijentica prije i nakon suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, odnosno placeboom nisu pokazivale statistički značajnu razliku. U ovoj studiji istraživanje je provedeno na specifičnoj skupini pacijentica te je trajanje suplementacije duže nego u većini drugih provedenih studija. Budući da postoje dokazi *in vitro* antioksidativne sposobnosti  $\alpha$ -lipoične kiseline, suplementacija njome ne bi trebala biti u potpunosti odbačena

kao opcija za povećanje serumske koncentracije GSH. Neka istraživanja dobila su rezultate koji podržavaju antioksidativnu sposobnost  $\alpha$ -lipoične kiseline kao dodatka prehrani. Studija Rahimlou-a i suradnika (2019) procijenila je učinak suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na određene glikemijske i upalne parametre. Rezultati su pokazali značajan učinak  $\alpha$ -lipoične kiseline na razinu šećera u krvi natašte, hemoglobin A1c (HbA1c), faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ), razinu interleukina 6 (IL-6) i C-reaktivni protein (CRP). Iz ovih nalaza zaključili su kako je suplementacija ALA korisna u poboljšanju određenih glikemijskih i upalnih biomarkera. Vidović i suradnici (2014) proveli su studiju čija je svrha bila ispitati učinke suplementacije  $\alpha$ -lipoične kiseline na biomarkere oksidativnog stresa u bolesnika sa shizofrenijom. U krvnoj plazmi bolesnika sa shizofrenijom, u usporedbi s kontrolnom skupinom, utvrđene su povećane razine produkata lipidne peroksidacije (TBARS), ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC), ukupne sulfhidrilne skupine (-SH) i aktivnosti superoksid dismutaze (SOD). Suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom značajno je snizila razinu TBARS-a te povisila razinu TAC-a u zdravih ispitanika, dok u skupini bolesnika sa shizofrenijom nije bilo značajnih razlika. Zaključili su kako je suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom smanjila lipidnu peroksidaciju i oksidativno oštećenje proteina te povisila neenzimski antioksidacijski kapacitet u zdravih ispitanika. Međutim, nisu uočene značajne promjene biomarkera oksidacijskog stresa u bolesnika sa shizofrenijom. Suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom u svrhu povećanja serumske koncentracije GSH svakako bi se trebala dodatno istražiti, naročito kod bolesti u čijoj je patofiziologiji oksidacijski stres, kao što je i CIN. Ispitivanja bi trebalo proširiti na veći broj ispitanica, mjeriti više biomarkera oksidacijskog stresa. Kako bi se dobili što relevantniji rezultati, bilo bi pogodno da ispitivanje traje dulji vremenski period. Također, mogla bi se ispitati suplementacija primjenom viših doza  $\alpha$ -lipoične kiseline.

## 6. ZAKLJUČCI

- Indeks tjelesne mase nema značajan utjecaj na koncentraciju GSH u krvnom serumu te samim time ni na antioksidacijski status pacijentica s potvrđenom dijagnozom CIN1 i CIN2. Međutim, postoje brojni utvrđeni mehanizmi kojima pretilost doprinosi povećanju oksidacijskog stresa u organizmu. Kako bi se dobili što relevantniji rezultati, trebalo bi u studiju uključiti veći broj ispitanica te koristiti osjetljivije biomarkere oksidativnog stresa ili više njih.
- Pušenje cigareta nije pokazalo učinak na koncentraciju GSH u krvnom serumu CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica. Postoje studije koje dokazuju kako izloženost dimu cigareta povećava oksidativni stres brojnim mehanizmima. Radi dobivanja vjerodostojnih rezultata, istraživanje bi trebalo provesti na većem broju ispitanica te koristiti osjetljiviji biomarker oksidativnog stresa ili kombinirati više njih.
- Visoki unos povrća pokazuje značajan utjecaj na koncentraciju GSH u krvnom serumu pacijentica s utvrđenom dijagnozom CIN1 i CIN2 što je u skladu s brojnim dostupnim i provedenim studijama. Kako bi se dobiveni rezultati potvrdili i mogli koristiti u preventivne i terapijske svrhe, potrebna su dodatna istraživanja na većem broju pacijentica.
- Korištenje suplemenata s antioksidansima nije pokazalo učinak na koncentraciju GSH u krvnom serumu CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica. Razlog tomu krije se u činjenici da dodaci prehrani ne podliježu strogim zakonskim regulativama kao i lijekovi, nemaju dokazanu djelotvornost, a postoji i problem vjerodostojnosti sastava. Potrebno je provesti dodatna istraživanja gdje je uključeno više ispitanica te u mjerenju koristi druge biomarkere oksidativnog stresa ili više njih.
- Suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, u dozi od 600 mg dnevno kroz 90 dana, pozitivno je utjecala na koncentraciju GSH u krvnom serumu pacijentica s dijagnozom CIN1 i CIN2, ali opaženi učinak nije bio statistički značajan. Brojna istraživanja ipak su pokazala antioksidacijsko djelovanje  $\alpha$ -lipoične kiseline, tako da bi ispitivanja trebala provesti na većem broju pacijentica i mjerenjem osjetljivijih markera oksidacijskog stresa ili više njih radi dobivanja relevantnijih rezultata. Također, valjalo bi ispitati utjecaj suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, kroz dulje vremensko razdoblje i primjenom viših doza, na koncentraciju GSH u krvnom serumu CIN1 i CIN2 pozitivnih pacijentica.

## 7. LITERATURA

Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 19, 43, 1731-1737.

Ávila-Escalante ML, Coop-Gamas F, Cervantes-Rodríguez M, Méndez-Iturbide D, Aranda-González II. The effect of diet on oxidative stress and metabolic diseases-Clinically controlled trials. *J Food Biochem*, 2020, 44(5), e13191.

Babić D, Sindik J, Missoni S. Development and validation of a self- administered food frequency questionnaire to assess habitual dietary intake and quality of diet in healthy adults in the Republic of Croatia. *Coll. Antropol*, 2014, 38(3), 1017-1026.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 2012, 5(1), 9-19.

Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev*, 2010, 3, 228-237.

Cink-svestrani mineral, 2020., <https://vitamini.hr>, pristupljeno 3.2. 2022.

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

Dao DQ, Ngo TC, Thong NM, Nam PC. Is Vitamin A an Antioxidant or a Pro-oxidant? *J Phys Chem B*, 2017, 12, 121(40), 9348-9357.

Das BC, Thapa P, Karki R, Das S, Mahapatra S, Liu TC, Torregroza I, Wallace DP, Kambhampati S, Van Veldhuizen P, Verma A, Ray SK, Evans T. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(2), 673-683.

Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL, Jialal I. High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism*, 2008, 57, 867-870.

Dikalov S, Itani H, Richmond B, Vergeade A, Rahman SMJ, Boutaud O, Blackwell T, Massion PP, Harrison DG, Dikalova A. Tobacco smoking induces cardiovascular mitochondrial oxidative stress, promotes endothelial dysfunction, and enhances hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316, 639-646.

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

Fiedor J, Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 2014, 6(2), 466-488.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(1-2), 1-12.

Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, Ghezzi P. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 10, 23(14), 1144-1170.

Ghosh A. Effects of Oxidative Stress on Protein Translation: Implications for Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8), 2661

Heber D, Blackburn GL, Go VLW, Milner J. Nutritional oncology. Los Angeles, Academic Press, 2006, str. 97, 513-516, 545-553.

Heshmati J, Morvaridzadeh M, Maroufizadeh S, Akbari A, Yavari M, Amirinejad A, Maleki-Hajiagha A, Sepidarkish M. Omega-3 fatty acids supplementation and oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacological Research*, 2019, 149.

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

Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M, Wozniak M. Lipoic Acid Decreases the Viability of Breast Cancer Cells and Activity of PTP<sub>1</sub>B and SHP<sub>2</sub>. *Anticancer Research*, 2017, 37(6), 2893-2898.

Le T, Pham TV, Mai XL, Song C, Woo S, Jeong C, Choi S, Phan T, Kim K. Enantiomeric purity test of R-(+)-alpha lipoic acid by HPLC using immobilized amylose-based chiral stationary phase. *Analytical Science and Technology*, 2020, 33(1).

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4(8), 118-126.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010, 4(8), 118-26.

Machado M, Soares EV. Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *Journal of Applied Phycology*, 2012, 24, 1509-1516.

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.

Mohammadi H, Talebi S, Ghavami A, Rafiei M, Sharifi S, Faghihimani Z, Ranjbar G, Miraghajani M, Askari G. Effects of zinc supplementation on inflammatory biomarkers and oxidative stress in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2021, 68.

Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(5-6), 746-761.

Patel RN, Singh YP, Singh Y, Butcher RJ, Jasinski JP. Syntheses, single crystal structures, DFT and antioxidant superoxide dismutase studies of some new mono-/binuclear copper(II) complexes. *Polyhedron*, 2017, 129, 164-181.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017, 8416763.

Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas)*, 2014, 13(1), 8-12.

Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010, 198(1), 15-35.

Prasad AS. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health. *Front Nutr*, 2014, 1, 14.

Rahimlou M, Asadi M, Banaei Jahromi N, Mansoori A. Alpha-lipoic acid (ALA) supplementation effect on glycemic and inflammatory biomarkers: A Systematic Review and meta- analysis. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2019, 32, 16-28.

Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*, 2016, 148, 183-193.



Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tumer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, Akram M, Riaz M, Capanoglu E, Sharopov F, Martins N, Cho WC, Sharifi-Rad J. Insights on the Use of  $\alpha$ -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules*, 2019, 9(8), 356.

Sangsefidi ZS, Yaghoubi F, Hajiahmadi S, Hosseinzadeh M. The effect of coenzyme Q10 supplementation on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Food Sci Nutr*, 2020, 1766– 1776.

Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(10), 1149-1160.

Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(10), 1149-1160.

Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*, 2008, 13(2), 102-108.

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.

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

WHO. Biomarkers in Risk assessment. Validity and Validation. Geneva, WHO, 2001

Zamani B, Sheikhi A, Namazi N, Larijani B, Azadbakht L. The Effects of Supplementation with Probiotic on Biomarkers of Oxidative Stress in Adult Subjects: a Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. *Probiotics & Antimicro. Prot*, 2020, 8, 102–111.

Zinc, 2019, <https://www.hsph.harvard.edu>, pristupljeno, 16.11.2021.

## 8. SAŽETAK

Antioksidativni status organizma ovisi o brojnim čimbenicima životnog stila kao što su indeks tjelesne mase (ITM), pušenje, karakteristike prehrane, uzimanje dodataka prehrani itd. U okviru ovog istraživanja ispitan je utjecaj navedenih karakteristika životnog stila i suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom (ALA) (600 mg/dne; 3 mjeseca), na antioksidacijski status 100 pacijentica sa utvrđenom dijagnozom cervikalne intraepitelne neoplazije stupanj 1 i 2 (CIN1 i CIN2). Antioksidacijski status utvrđen je praćenjem promjene koncentracije reduciranog glutationa (GSH) u krvnom serumu pacijentica. Utjecaj suplementacije ALA na koncentracije GSH u serumu istražen je u okviru dvostruko-slijepe randomizirane placebo-kontrolirane studije korištenjem standardne fluorimetrijske metode, a utjecaj prehrane i karakteristika životnog stila korištenjem validiranog upitnika o učestalosti konzumacije namirnica. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako ITM, pušenje te uzimanje dodataka prehrani s antioksidansima nemaju bitan utjecaj na antioksidacijski status pacijentica. Također, suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom u dozi od 600 mg dnevno kroz 90 dana nije pokazala značajan utjecaj na antioksidacijski status pacijentica s dijagnozom CIN1 i CIN2. Nasuprot tome, pacijentice s visokim unosom povrća imale su značajno više koncentracije GSH u serumu. Kako bi se dobili što relevantniji rezultati i bolji uvid u antioksidacijsku sposobnost  $\alpha$ -lipoične kiseline potrebno je provesti daljnja istraživanja koja uključuju veći broj ispitanica, kao i osjetljivije biomarkere antioksidacijskog statusa ili kombinaciju istih.

## SUMMARY

The antioxidant status of the organism depends on a number of lifestyle factors such as body mass index (BMI), smoking, dietary characteristics, taking dietary supplements, etc. The study examined the impact of these lifestyle characteristics and  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) supplementation characteristics (600 mg / day; 3 months) on the antioxidant status of 100 patients diagnosed with grade 1 and 2 cervical intraepithelial neoplasia (CIN1 and CIN2). Antioxidant status was determined by monitoring changes in reduced glutathione (GSH) levels in the blood serum of patients. The effect of ALA supplementation on serum GSH concentrations was investigated in a double-blind randomized placebo-controlled study using a standard fluorimetric method, and the effect of diet and lifestyle characteristics using a validated food consumption frequency questionnaire. The results of this study showed that BMI, smoking and taking dietary supplements with antioxidants do not have a significant impact on the antioxidant status of patients. Also,  $\alpha$ -lipoic acid supplementation at a dose of 600 mg daily for 90 days did not show a significant effect on the antioxidant status of patients diagnosed with CIN1 and CIN2. On the contrary, patients with high vegetable intake had significantly higher serum GSH concentrations. In order to obtain the most relevant results and better insight into the antioxidant capacity of  $\alpha$ -lipoic acid, it is necessary to conduct further research involving a larger number of subjects, as well as more sensitive biomarkers of antioxidant status or a combination thereof.

## 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

3-godišnja srednja škola

4-godišnja srednja škola

viša škola (veleučilište)

fakultet, prvostupnik

fakultet, magistar struke

magistar, doktor znanosti

ostalo: \_\_\_\_\_

### 6. Broj osoba u domaćinstvu:

0 1 2 3 4 5 6 \_\_\_\_\_

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 neke 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 dugo 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   d) 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) 5-7 x tjedno   d) 3-5 x tjedno   e) 1-3 x tjedno  
f) < 1x tjedno   g) nikada

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

\_\_\_\_\_ čajnih žlica

**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 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 |

**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) u fotelji, gledajući TV ili radeći nešto | 1 | 2 | 3 |
| f) 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 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 |
| e) 5 obroka (glavni i međuobroci) | 1 | 2 | 3 |
| f) 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
<b>ŽITARICE</b>							
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							
<b>POVRĆE</b>							
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							
<b>VOĆE</b>							
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							
<b>MAHUNARKE I LEGUMINOZE</b>							
80.Bob							
81.Grah							
82.Grašak, svježi							
83.Grašak, smrznuti							
84.Mahune							
<b>MESO, RIBA, JAJA</b>							
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							
<b>MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI</b>							
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, parmezan, mozzarella)							
113. Feta sir							
114. Sir, punomasni (cheddar, trapist, edamer, roquefort)							
115. Sirni namaz							
<b>MASNOĆE</b>							
116. Margarin							
117. Ulje (suncokret, soja, sezam)							
118. Majoneza							
119. Ulje, maslinovo							
120. Maslac							
<b>SLATKO</b>							
121. Čokolada, mliječna							
122. Čokolada, tamna							
123. Biskvit							
124. Keksi							
<b>NAPITCI</b>							
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?

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) < 400 mg      B) 400-700 mg      C) 750 – 1250 mg      D) > 1300 mg  
E) drugo \_\_\_\_\_

**iii) Vitamin B<sub>6</sub>    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) < 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?

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) < 400 mg B) 400-900 mg C) 901-1300 mg D) > 1300 mg

E) drugo\_\_\_\_\_

vii) Željezo 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) < 51 mg                      B) 51 – 200 mg                      C) 201 – 400 mg                      D) > 401 mg

E) drugo\_\_\_\_\_

**viii)** Magnezij    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) < 200 mg                      B) 200-400 mg                      C) 401-900 mg                      D) > 900

E) drugo\_\_\_\_\_

**ix)** Cink    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) < 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 često (tjedno)? \_\_\_\_\_

Koliko dugo? \_\_\_\_\_                      U kojoj dozi? \_\_\_\_\_

Odaberite uobičajenu veličinu serviranja za 1 obrok:

**142. ŽITARICE**



A) 35 g



B) 85 g

C) \_\_\_\_\_

**143. KUKURUZNA KRUPICA**



A) 100 g



B) 200 g

C) \_\_\_\_\_

**144. TJESTENINA/RIŽA**



A) 100 g



B) 200 g



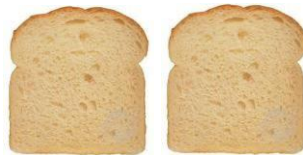
C) 350 g

D) \_\_\_\_\_

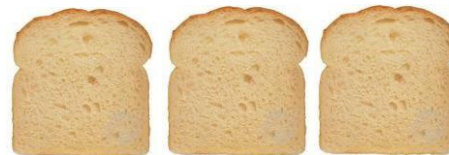
**145. KRUH**



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 g

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. KRASTAVAC, 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)  
ml)

B) ½ paketa (250 ml)

C) 1 pakiranje (500

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**

B) 1 komad

B) 2 komada

C) \_\_\_\_\_ komada

**164. BANANE**

C) 1 komad

B) 2 komada

C) \_\_\_\_\_ komada

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

A) ½ šalice

B) 1 šalice

C) 1 ½ šalice

D) 2 šalice

E) \_\_\_\_\_ šalice

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

A) ½ šalice

B) 1 šalice

C) 1 ½ šalice

D) 2 šalice

E) \_\_\_\_\_ šalice

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

- A) ½ šalice      B) 1 šalica      C) 1 ½ šalice      D) 2 šalice  
E) \_\_\_\_\_ šalica

168. ANANAS, SVJEŽI

- A) 1 kriška      B) 2 kriške      C) ½ ananasa      D) 1 ananas  
E) ostalo \_\_\_\_\_

169. KONZERVIRANO VOĆE (ananas, marelice)

- A) ¼ konzerve      B) ½ konzerve      C) 1 konzerva  
D) ostalo \_\_\_\_\_

170. SUHE ŠLJIVE, SUHE SMOKVE

- A) 2-3 komada      B) 10 komad      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) ½ komada  
E) ostalo \_\_\_\_\_

173. BOB, GRAH, GRAŠAK



- A) 50 g  
D) \_\_\_\_\_



B) 125 g



C) 200 g

**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 B) 2 čajne žličice C) \_\_\_\_\_čajne žličice

**184. ULJE**

A) \_\_\_\_\_jušnih žlica B) 1 šalica (2,5 dl)

C) \_\_\_\_\_

**185. MASLAC, MARGARIN, MAJONEZA**

A) 1 čajna žličica B) 2 čajne žličice C) \_\_\_\_\_čajne žličice

**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 žlica      B) 2 čajne žlice      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  
Zavod za kemiju prehrane  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ANTIOKSIDACIJSKI STATUS PACIJENTICA SUPLEMETIRANIH $\alpha$ -LIPOIČNOM KISELINOM S DIJAGNOZOM CERVİKALNE INTRAEPITELNE NEOPLAZIJE STUPNJA 1 I 2

**Marta Ivanko**

#### SAŽETAK

Antioksidativni status organizma ovisi o brojnim čimbenicima životnog stila kao što su indeks tjelesne mase (ITM), pušenje, karakteristike prehrane, uzimanje dodataka prehrani itd. U okviru ovog istraživanja ispitan je utjecaj navedenih karakteristika životnog stila i suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom (ALA) (600 mg/dne; 3 mjeseca), na antioksidacijski status 100 pacijentica sa utvrđenom dijagnozom cervikalne intraepitelne neoplazije stupanj 1 i 2 (CIN1 i CIN2). Antioksidacijski status utvrđen je praćenjem promjene koncentracije reduciranog glutationa (GSH) u krvnom serumu pacijentica. Utjecaj suplementacije ALA na koncentracije GSH u serumu istražen je u okviru dvostruko-slijepo randomizirane placebo-kontrolirane studije korištenjem standardne fluorimetrijske metode, a utjecaj prehrane i karakteristika životnog stila korištenjem validiranog upitnika o učestalosti konzumacije namirnica. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako ITM, pušenje te uzimanje dodataka prehrani s antioksidansima nemaju bitan utjecaj na antioksidacijski status pacijentica. Također, suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom u dozi od 600 mg dnevno kroz 90 dana nije pokazala značajan utjecaj na antioksidacijski status pacijentica s dijagnozom CIN1 i CIN2. Nasuprot tome, pacijentice s visokim unosom povrća imale su značajno više koncentracije GSH u serumu. Kako bi se dobili što relevantniji rezultati i bolji uvid u antioksidacijsku sposobnost  $\alpha$ -lipoične kiseline potrebno je provesti daljnja istraživanja koja uključuju veći broj ispitanica, kao i osjetljivije biomarkere antioksidacijskog statusa ili kombinaciju istih.

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

Rad sadrži: 61 stranica, 12 grafičkih prikaza, 5 tablica i 44 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: oksidacijski stres, antioksidans, glutation,  $\alpha$ -lipoična kiselina, cervikalna intraepitelna neoplazija

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

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

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Kristina Radić**, *asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj, 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### **ANTIOXIDANT STATUS OF $\alpha$ -LIPOIC ACID SUPPLEMENTED PATIENTS DIAGNOSED WITH GRADE 1 AND 2 CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA**

**Marta Ivanko**

#### **SUMMARY**

The antioxidant status of the organism depends on a number of lifestyle factors such as body mass index (BMI), smoking, dietary characteristics, taking dietary supplements, etc. The study examined the impact of these lifestyle characteristics and  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) supplementation characteristics (600 mg / day; 3 months) on the antioxidant status of 100 patients diagnosed with grade 1 and 2 cervical intraepithelial neoplasia (CIN1 and CIN2). Antioxidant status was determined by monitoring changes in reduced glutathione (GSH) levels in the blood serum of patients. The effect of ALA supplementation on serum GSH concentrations was investigated in a double-blind randomized placebo-controlled study using a standard fluorimetric method, and the effect of diet and lifestyle characteristics using a validated food consumption frequency questionnaire. The results of this study showed that BMI, smoking and taking dietary supplements with antioxidants do not have a significant impact on the antioxidant status of patients. Also,  $\alpha$ -lipoic acid supplementation at a dose of 600 mg daily for 90 days did not show a significant effect on the antioxidant status of patients diagnosed with CIN1 and CIN2. On the contrary, patients with high vegetable intake had significantly higher serum GSH concentrations. In order to obtain the most relevant results and better insight into the antioxidant capacity of  $\alpha$ -lipoic acid, it is necessary to conduct further research involving a larger number of subjects, as well as more sensitive biomarkers of antioxidant status or a combination thereof.

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

Thesis includes: 61 pages, 12 figures, 5 tables and 44 references. Original is in Croatian language.

Keywords: oxidative stress, antioxidant, glutathione,  $\alpha$ -lipoic acid, cervical intraepithelial neoplasia

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

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Radić, Ph.D.** *Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May, 2022.