

# Utjecaj obrazaca prehrane i suplementacije alfa-lipoičnom kiselinom na ORAC antioksidativni kapacitet seruma

---

**Drašković, Ivana**

**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:163:725577>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Ivana Drašković**

**Utjecaj obrazaca prehrane i suplementacije  $\alpha$ -  
lipoičnom kiselinom na ORAC antioksidativni  
kapacitet seruma**

**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 izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

*Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici, prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu, izuzetnom trudu i pruženoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada te na predanom profesorskom radu, susretljivosti i neizmjerne pozitivnoj energiji koja popravi dan.*

*Također, veliko hvala svim djelatnicama Zavoda za kemiju prehrane na pomoći koju su mi pružile tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada te na predivnom blagdanskome duhu i okruženju.*

*Najveće hvala mojim roditeljima na bezgraničnoj ljubavi, razumijevanju i vjeri u mene. Znam da nije uvijek bilo lako, stoga je ovaj uspjeh jednako Vaš i dijelimo ga zajedno! Posebno hvala mojoj teti Mariji na bezuvjetnoj podršci, toplini i pripadnosti koja mi je značila u svakom trenutku života pa tako i u godinama studiranja!*

*Veliko hvala mom dečku Mislavu na neizmjerne ljubavi, izuzetnom strpljenju i svim korisnim savjetima koji su me svakodnevno vodili kroz život.*

*Neizmjerne hvala dugujem svojem najboljem prijatelju i kolegi Dragi Ilišinoviću, koji me je strpljivo slušao, nesebično pomagao, savjetovao i naučio osnovama, ali i ljepotama fizike. Na kraju, ali ne i manje bitno, želim zahvaliti svim prijateljima i kolegama na predivnim uspomnama, podršci, lijepim riječima, pomoći te motivaciji. Vaša vjera u mene pomogla mi je da ustrajem i onda kad sam mislila da spasa nema!*

# Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1	$\alpha$ -lipoična kiselina .....	1
1.2	Farmakokinetika .....	2
1.3	Utjecaj na zdravlje .....	3
1.4	Antioksidativna uloga $\alpha$ -lipoične kiseline .....	5
1.4.1	Patofiziologija oksidativnog stresa.....	5
1.4.2	Biomarkeri oksidativnog stresa.....	7
1.4.3	Antioksidansi.....	10
1.4.4	$\alpha$ -lipoična kiselina .....	13
2.	OBRAZLOŽENJE TEME .....	15
3.	MATERIJALI I METODE .....	16
3.1	Plan istraživanja.....	16
3.2	Ispitanice.....	16
3.2.1	Kriteriji uključivanja/isključivanja.....	16
3.2.2	Uzimanje uzoraka krvi .....	17
3.2.3	Prehrambene i životne navike pacijentica .....	17
3.3	Materijali .....	17
3.3.1	Kemikalije .....	17
3.3.2	Instrumenti i pribor.....	18
3.4	Metode .....	18
3.4.1	ORAC antioksidativni kapacitet.....	18
3.4.2	Izrada reagensa .....	19
3.4.3	Postupak .....	19
3.5	Statistička analiza .....	21
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	22

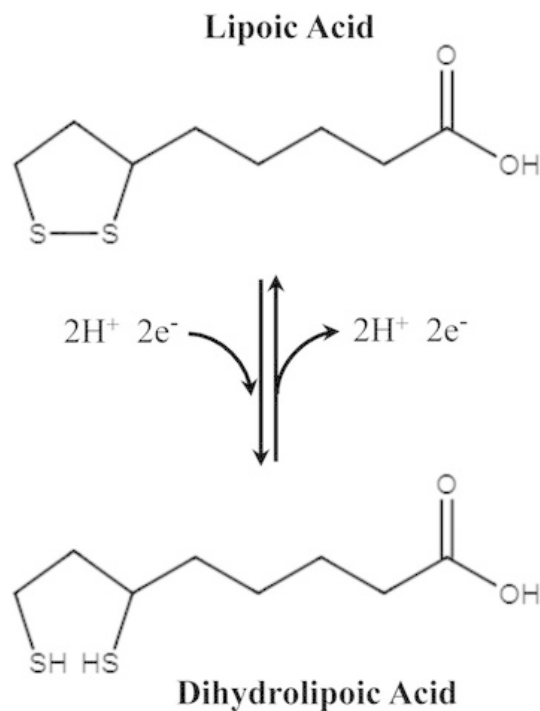
4.1	Utjecaj životnog stila na antioksidativni potencijal seruma .....	22
4.1.1	Utjecaj pušenja na ukupni antioksidativni potencijal seruma .....	22
4.1.2	Utjecaj indeksa tjelesne mase na antioksidativni potencijal seruma.....	23
4.1.3	Utjecaj obrasca prehrane na antioksidativni potencijal seruma .....	24
4.2	Utjecaj suplementacije $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na ORAC antioksidativni potencijal seruma .....	25
4.2.1	Karakteristike ispitivane i kontrolne skupine.....	25
4.2.2	Usporedba ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na dob .....	25
4.2.3	Usporedba ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na indeks tjelesne mase... 26	
4.2.4	Usporedba ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na pušački status te uzimanje dodataka prehrani .....	27
4.2.5	Utjecaj suplementacije $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na ORAC antioksidativni potencijal seruma.....	29
4.3	Rasprava .....	31
5.	ZAKLJUČAK .....	36
6.	LITERATURA.....	37
7.	SAŽETAK.....	44
8.	PRILOZI.....	46

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

# 1. UVOD

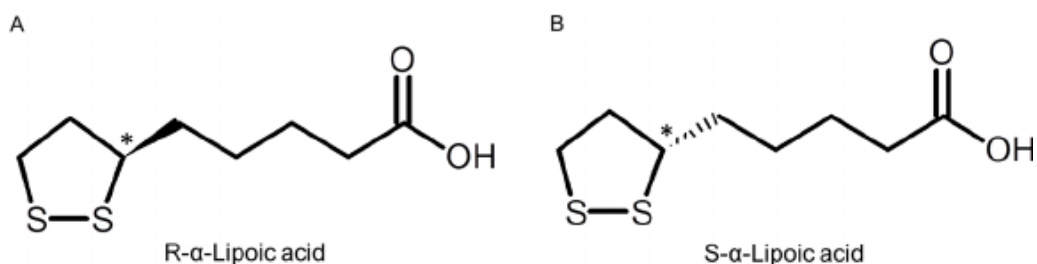
## 1.1 $\alpha$ -lipoična kiselina

$\alpha$ -lipoična kiselina (ALA) odnosno 1,2-ditiolan-3-pentanoična kiselina, disulfidni je derivat oktanske kiseline. Tvori intramolekularnu disulfidnu vezu u oksidiranom obliku, no torzijsko naprezanje prstena pomiče ravnotežu prema redukciji u dihidrolipoičnu kiselinu (DHHLA) (Çakatay, 2006). Redukcija  $\alpha$ -lipoične kiseline prikazana je na Slici 1.



**Slika 1.** Struktura oksidiranog (ALA) i reduciranog (DHHLA) oblika lipoične kiseline (preuzeto iz Kurutas, 2015)

$\alpha$ -lipoična kiselina sadrži jedan kiralni centar što rezultira s dva moguća optička izomera, R- i S-enantiomerom koji su prikazani na Slici 2. (Salehi i sur., 2019).



**Slika 2.** Prikaz strukture R- i S-enantiomera  $\alpha$ -lipoične kiseline (preuzeto iz Uchida i sur., 2015)

Živi organizmi (biljke, životinje, ljudi) proizvode aktivni R-enantiomer *de novo* sintezom u jetri iz oktanske kiseline i cisteina kao izvora sumpora (Golbidi i sur., 2011). Kemijskom sintezom iz tioktične kiseline nastaje racemična smjesa R- i S-izomera u podjednakim količinama, koja je ujedno i jedini način nastajanja S-enantiomera koji se ne nalazi u prirodi. S-enantiomer inhibira interakcije R- $\alpha$ -lipoične kiseline s genima, enzimima i proteinima (Salehi i sur., 2019).

Endogena sinteza  $\alpha$ -lipoične kiseline u ljudskom organizmu nedovoljna je za ispunjavanje energetske potrebe stanica stoga je egzogeni unos nužan (Salehi i sur., 2019). Životinjska tkiva s ekstenzivnim metaboličkim aktivnostima poput srca, bubrega i jetre sadrže velike količine  $\alpha$ -lipoične kiseline, kao i biljni izvori: špinat, brokula, rajčica, grašak, prokulice te rižine mekinje. Prirodna R- $\alpha$ -lipoična kiselina kovalentno je vezana na lizinske ostatke u obliku lipolizina, dok je  $\alpha$ -lipoična kiselina u suplementima slobodna (Golbidi i sur., 2011).

## 1.2 Farmakokinetika

Poznato je da stanice sadrže aktivne sustave za transport, iskorištenje i izlučivanje slobodne  $\alpha$ -lipoične kiseline. U različitim studijama korišteni su suplementi koji pretežito variraju od 50 do 600 mg  $\alpha$ -lipoične kiseline i primaran su izvor informacija o bioraspoloživosti i cjelokupnoj farmakokinetici.  $\alpha$ -lipoična kiselina se kroz membranu prenosi višestrukim proteinima nosačima zbog čega je gastrointestinalna apsorpcija vrlo varijabilna, a utjecaj hrane na apsorpciju značajan (Shay i sur., 2009). U studiji Gleiter i suradnici (1996.) dokazano je da hrana utječe na apsorpciju i bioraspoloživost oralne primjene  $\alpha$ -lipoične kiseline, smanjujući joj AUC i  $C_{max}$  vrijednosti, stoga se za najbolju učinkovitost preporučuje unos suplementa pola sata prije ili dva sata nakon jela. Apsolutna bioraspoloživost nakon oralne primjene iznosi 20

do 38% ovisno o izomeru i formulaciji. Unos hranom te biosinteza, dovode do veoma malih količina slobodne  $\alpha$ -lipoične kiseline u cirkulaciji, zbog čega je unos visokih doza slobodnog oblika nužan za korištenje u terapijske svrhe (Biewenga i sur., 1997).

Enantioselektivna farmakokinetika rezultira 40-50% većom koncentracijom R-enantiomera, naspram S-enantiomera, u plazmi. Unatoč tome, racemična smjesa je prikladnija za suplementaciju jer S-enantiomer može spriječiti polimerizaciju R-enantiomera, a time i poboljšati ukupnu bioraspoloživost (Shay i sur., 2009).

Metabolizam  $\alpha$ -lipoične kiseline je ekstenzivan. Primarni metabolički putevi su  $\beta$ -oksidacija bočnog lanca pentanske kiseline pri čemu nastaju bisnorlipoat, tetranorlipoat,  $\beta$ -hidroksi-bisnorlipoat te S-metilacija ditiolnog prstena pri kojoj nastaju njihovi bis-metilirani merkaptoderivati. Svi navedeni metaboliti, uključujući DHLA dobiven redukcijom, doprinose antioksidativnom učinku  $\alpha$ -lipoične kiseline (Biewenga i sur., 1997; Shay i sur., 2009).

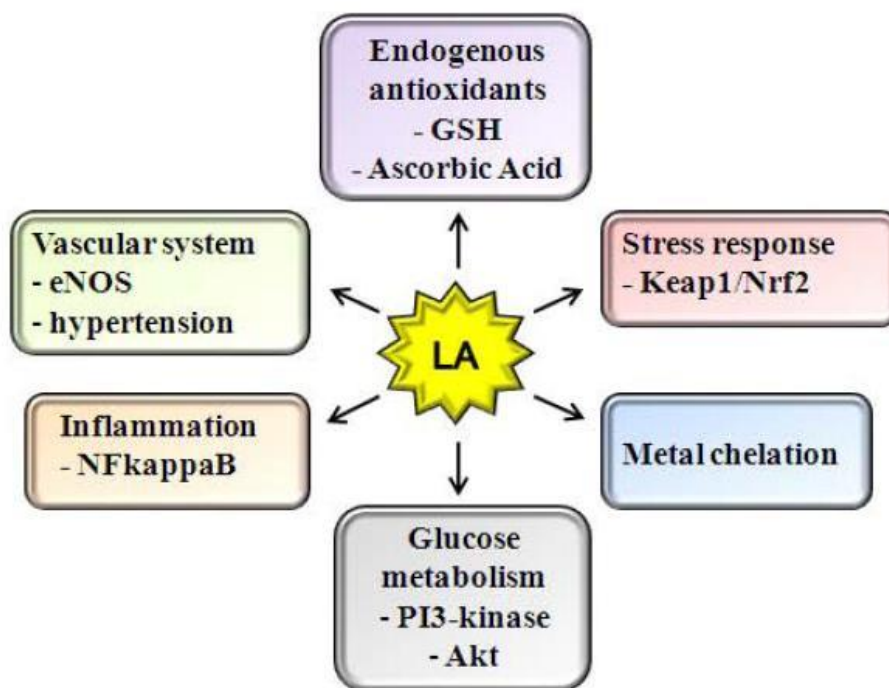
$\alpha$ -lipoična kiselina prelazi krvno-moždanu barijeru te se primarno, ali prolazno nakuplja u jetri, srcu, skeletnim mišićima, a potom i u ostalim tkivima. Brzi gastrointestinalni unos i prisustvo  $\alpha$ -lipoične kiseline u plazmi prati jednako brzi klirens koji utječe na transport u tkiva, glomerularnu filtraciju te bubrežno izlučivanje (Shay i sur., 2009).

### **1.3 Utjecaj na zdravlje**

Metabolička funkcija endogene  $\alpha$ -lipoične kiseline je proizvodnja energije u mitohondrijima gdje služi kao kofaktor za komplekse piruvat dehidrogenazu (PDH) i  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenazu pri čemu dolazi do NADH-ovisne redukcije u dihidrolipoičnu kiselinu (DHLA), dok u stanicama bez mitohondrija dolazi do NADP-ovisne redukcije u DHLA pomoću glutaciona (GSH) i tioredoksin reduktaze (Jones i sur., 2002).

Brojnim studijama dokazan je širok spektar bioloških uloga  $\alpha$ -lipoične kiseline prikazanih na Slici 3.





**Slika 3.** Biološke uloge  $\alpha$ -lipoične kiseline (preuzeto iz Shay i sur., 2009)

$\alpha$ -lipoična kiselina potentan je biološki antioksidans, ponajviše zbog svojih amfifilnih (hidrofilnih i lipofilnih) svojstava koja ju čine široko rasprostranjenom po organizmu te joj omogućavaju ispoljavanje antioksidativnog učinka u citosolu i staničnim membranama (Golbidi i sur., 2011).

Kelator je teških metala, a kao posrednik raznih staničnih signalnih puteva utječe na inzulinsku osjetljivost, unos glukoze, metabolizam lipida te djeluje hipotenzivno, protuupalno i na vaskularni sustav (Shay i sur., 2009). Zbog svojih antioksidativnih i protuupalnih svojstava koristi se u liječenju kroničnih bolesti s oksidativnim stresom kao podlogom poput diabetes mellitusa tip 2, dijabetičke polineuropatije, multiple skleroze, ateroskleroze, Alzheimerove i kardiovaskularnih bolesti (Harding i sur., 2012).

Novijim istraživanjima dokazao se utjecaj ALA na redukciju tjelesne mase, liječenje raka štitnjače, pluća, dojke i crijeva, a u životinjskim modelima i u terapiji glaukoma te osteoporoze (Gomes i Negrato, 2014).

## 1.4 Antioksidativna uloga $\alpha$ -lipoične kiseline

### 1.4.1 Patofiziologija oksidativnog stresa

Slobodni radikali su vrlo reaktivni atomi, odnosno molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Nastaju kada kisik stupi u interakciju s određenim molekulama u stanici, a zbog mogućnosti doniranja ili prihvatanja jednog elektrona, ponašaju kao oksidansi ili reducensi (Liguori i sur., 2018).

Djelomično reducirani oblici kisika zajednički su opisani kao reaktivne kisikove vrste (ROS), a dušika kao reaktivne dušikove vrste (RNS). Na Slici 4. prikazani su fiziološki važni predstavnici ROS i RNS (Boots i sur., 2008).

**Table 1**  
Typical physiological reactive oxygen and nitrogen species

Radicals	Non-radicals
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, $O_2^{\cdot-}$	Hydrogen peroxide, $H_2O_2$
Hydroxyl, $HO^{\cdot}$	Hypochlorous acid, HOCl
Peroxyl, $RO_2^{\cdot}$	Ozone, $O_3$
Alloxyl, $RO^{\cdot}$	Singlet oxygen, $^1O_2$
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide, $NO^{\cdot}$	Nitrous acid, $HNO_2$
Nitrogen dioxide, $NO_2^{\cdot}$	Nitrosyl cation, $NO^+$
	Nitroxyl anion, $NO^-$
	Peroxynitrite, $ONOO^-$
	Alkyl peroxyntrites, $ROONO$

**Slika 4.** Prikaz fiziološki važnih reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (preuzeto iz Boots i sur., 2008)

Reaktivnost spojeva se razlikuje, stoga spojevi poput  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ , i  $NO^{\cdot}$  reagiraju selektivno s nekoliko bioloških molekula, dok  $^{\cdot}OH$  i ostali veoma reaktivni spojevi, reagiraju sa svakom molekulom na koju naiđu. Također se razlikuju u mjestu njihove reaktivnosti; slobodni radikali reagiraju gotovo trenutno na mjestu nastanka, dok ne-radikali poput  $H_2O_2$  mogu proći biološke membrane te širiti reaktivnost i toksičnost (Boots i sur., 2008).

Formiranje ROS i RNS u stanicama posredovano je endogenim i egzogenim izvorima. U egzogene izvore ubrajamo: zagađenje zraka i vode, duhan, alkohol, teške ili prijelazne metale, lijekove (npr. ciklosporin, takrolimus, gentamicin i bleomicin), industrijska otapala, kuhanje (npr. dimljeno meso, otpadno ulje i mast) te zračenje (Liguori i sur., 2018).

Endogeni izvori uključuju enzime metaboličnih procesa: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazu, mijeloperoksidazu (MPO), lipooksigenazu i angiotenzin II.

NADPH oksidaza prevladavajući je izvor superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet}$ ) koji nastaje redukcijom molekularnog kisika. Superoksidni anion se zatim superoksidnom dismutazom (SOD) konvertira u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  tvori visoko reaktivni hidroksilni ion ( $OH^{\bullet}$ ) koji reagira s fosfolipidima u staničnim membranama i proteinima. U neutrofilima,  $H_2O_2$  se u prisutnosti klorida i MPO može pretvoriti u hipoklornu kiselinu; ROS koji posebno oštećuje stanične proteine (Liguori i sur., 2018).

Dušikov oksid (NO) proizvodi se iz L-arginina pomoću tri glavne izoforme NO-sintaze (NOS): endotelna NOS, povezana s vazodilatacijom i vaskularnom regulacijom, neuronska NOS, povezana s intracelularnom signalizacijom te inducibilna NOS, aktivirana kao odgovor citokina ili endotoksina.  $O_2$  također može reagirati s NO formirajući relativno reaktivnu molekulu, peroksinitrit ( $ONOO^{\bullet}$ ) (Liguori i sur., 2018).

Nepovoljna ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala (oksidansa) i antioksidativne obrane organizma u korist oksidansa, dovodi do oksidativnih oštećenja. Posljedica takve neravnoteže je oksidativni stres koji uzrokuje oštećenje lipida, proteina i nukleinskih kiselina (Lobo i sur., 2010). Pritom dolazi do nepovratnih kemijskih modifikacija, poremećaja fizioloških funkcija i redoks signalizacije. Promjene u redoks signalizaciji inducirane su visokim razinama ROS i RNS te ciljaju aktivnosti proteina u složenim mrežama kinaza, fosfataza, ionskih kanala, apoptotskih kaskada te transkripcijskih aktivnosti (Frijhoff i sur., 2015).

Oksidativni stres uvelike utječe na patogenezu: kardiovaskularnih, upalnih i ishemijskih bolesti, karcinoma, kronične opstruktivne bolesti pluća, neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova, Parkinsonova bolest), dijabetesa, kronične bubrežne bolesti i još mnogih drugih (Lobo i sur., 2010; Liguori i sur., 2018).

## 1.4.2 Biomarkeri oksidativnog stresa

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) definirala je biomarker kao bilo koju tvar, strukturu ili proces koji se može izmjeriti u organizmu ili njegovim produktima te pritom predviđa ili utječe na ishod ili bolest. Kriteriji koje mora ispunjavati su pokazivanje specifičnosti za određenu bolest (dijagnostički), posjedovanje prognostičke vrijednosti te korelacija sa stupnjem bolesti. Da bi bio klinički relevantan, biomarker mora biti mjerljiv, stabilan, prisutan u lako dostupnom tkivu te isplativ za reproducibilno mjerenje u velikim razmjerima (Frijhoff i sur., 2015).

Lipidi, nukleinske kiseline i proteini mogu biti modificirani reaktivnim kisikovim i dušikovim radikalima čime postaju biomarkeri oksidativnog stresa. Modifikacija može imati izravan utjecaj na funkciju ciljnih molekula, poput inhibicije enzima, ili može odražavati lokalni stupanj oksidativnog stresa. Klinički su najčešće korišteni uzorci krvi i mokraće, potom slina te izdahnuti zrak (Marrocco i sur., 2017).

Produkti lipidne oksidacije široko su korišteni biomarkeri oksidativnog stresa (Marrocco i sur., 2017). Polinezasićene masne kiseline (PUFA), posebice linolna i arahidonska kiselina (AA), veoma su osjetljive na oksidativno oštećenje (Frijhoff i sur., 2015). Peroksidacija lipida enzimatskim putem katalizana je lipooksigenazom te ciklooksigenazom (COX), a pritom dolazi do oksidacije AA u prostaglandine, leukotriene, prostaciklin i tromboksan. Oksidacija posredovana slobodnim radikalima uključuje autokatalitičku lančanu reakciju koju pokreću ROS, pretežno hidroksilni ( $\bullet$ HO) i peroksilni ( $\text{ROO}\bullet$ ) radikali, pri čemu dolazi do oduzimanja vodika u nezasićenim vezama te nastajanja ugljik radikala koji dalje reagira s kisikom stvarajući lipidni peroksilni radikal ( $\text{LOO}\bullet$ ). Zatim on, djelujući kao radikal, nastavlja lančanu reakciju kojom nastaju lipidni hidroperoksidi ( $\text{LOOH}$ ) (Marrocco i sur., 2017). U prisutnosti prijelaznih metala lipidni hidroperoksidi mogu stvarati lipidni alkoksil ( $\text{LO}\bullet$ ) ili  $\text{LOO}\bullet$ , koji dodatno održavaju lanac oksidacijskih reakcija te dovode do nastanka reaktivnih aldehida, od kojih su najviše istraženi malonaldehid (MDA) te trans-4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) (Frijhoff i sur., 2015).

F2-izoprostani (F2-IsoP) kemijski su stabilni izomeri slični prostaglandinu. Nastaju oksidacijom PUFA u membranskim fosfolipidima djelovanjem ROS, nakon čega se oslobađaju u cirkulaciju fosfolipazom (Marrocco i sur., 2017). Razina u cirkulaciji neovisna je o bubrežnoj

i jetrenoj funkciji stoga F2-IsoP predstavljaju pouzdani biomarker cjelokupnog oksidativnog stresa (Ho i sur., 2013).

3-nitro-tirozin (3-NO-Tyr) je glavni produkt oksidacije tirozina koja se događa unutar polipeptidnog slijeda ili na slobodnim tirozinskim ostacima. Modifikacija je posredovana reaktivnim dušikovim vrstama, pretežito peroksinitritom (ONOO<sup>-</sup>) i dušikovim dioksidom (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>), a može se odviti na više različitih načina (Marrocco i sur., 2017). Proces nitracije započinje oksidacijom tirozina što rezultira nastankom tirozinskog radikala. Radikal potom reagira s dušikovim dioksidom pri čemu dolazi do adicije nitro skupine na C-3 tirozina. Nastali nitrotirozin stabilan je biomarker oksidativnog stresa kod upalnih bolesti (Frijhoff i sur., 2015).

Lipoproteini niske gustoće (LDL) oksidativnim modifikacijama stječu niz važnih patofizioloških aktivnosti; od reguliranja putova povezanih s apoptozom i staničnom signalizacijom do utjecaja na ekspresiju gena modulacijom velikog broja transkripcijskih čimbenika (Brüne i sur., 2003). Oksidirani LDL (oxLDL) može nastati neenzimatski ili reakcijom posredovanom enzimima poput lipooksigenaze (Ho i sur., 2013). Povišene koncentracije oxLDL-a u plazmi opažene su kod kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze, pretilosti, diabetes mellitusa te inzulinske rezistencije (Frijhoff i sur., 2015). Iako mjerljiv, oxLDL nije kvantitativan biomarker oksidativnog stresa zbog heterogenosti oksidativnih produkata, niske specifičnosti za antitijela te raznolikosti u rezultatima dobivenih primjenom različitih testova (Marrocco i sur., 2017).

Oksidacija DNA i RNA događa se ponajviše u gvaninskom dijelu. Oksidirani nukleozidi izlučuju se mokraćom te postaju urinarni biomarkeri. Broj nukleinskih kiselina u određenom vremenskom periodu definira brzinu oksidacije DNA i RNA, a time i ukupni oksidativni stres u organizmu. Dakle, oksidirani nukleozidi najrelevantniji su za mjerenje stanja oksidativnog stresa u svim tkivima, odnosno cijelom organizmu (Frijhoff i sur., 2015).

Proteini predstavljaju široku te veoma podložnu metu za ROS i RNS. Nekoliko aminokiselinskih ostataka može se podvrgnuti oksidativnim modifikacijama u kojima dolazi do: oksidacije ostataka koji sadrže sumpor, hidroksilacije aromatskih i alifatskih skupina, nitracije tirozinskih ostataka, nitrozilacije i glutationilacije cisteinskih ostataka, kloriranja aromatskih i primarnih amino skupina te pretvorbe određenih aminokiselinskih ostataka u karbonilne derivate. Ukoliko se novonastala promjena ne popravi, utječe na trodimenzionalnu strukturu, fizikalno-kemijska svojstva proteina te njegovu toksičnost. Nepovratne modifikacije

proteina uključuju karbonilaciju, nitrozilaciju, kidanje histidinskih i triptofanskih prstenova te hidrolizu peptidne veze u prisutnosti prolina. Oksidacija proteina može se odrediti iz uzoraka krvi i urina, a još preciznije iz određenih tkiva i stanica. Proteinski karbonili nastaju različitim mehanizmima oksidativnog oštećenja zbog čega je mjerenje njihove koncentracije najviše korišten biomarker oksidativnog stresa. Međutim, biološki i klinički značaj oksidacije proteina kao biomarkera još uvijek je ograničen dostupnošću metoda za identifikaciju i kvantifikaciju oksidativnih modifikacija specifičnih proteinskih ostataka (Marrocco i sur., 2017).

Glutation (GSH), proteinski tioli te površinski izloženi ostaci cisteina osobito su osjetljivi na oksidaciju uzrokovanu ROS-om i RNS-om (Frijhoff i sur., 2015). Oksidacija cisteinskih ostataka je reverzibilna, a povratak u tiolni oblik omogućuju GSH i/ili specifični enzimi. Reverzibilna modifikacija proteina važna je značajka za antioksidativne obrambene sustave, pogrešno smatanje i agregaciju proteina, redoks regulirane stanične procese te redoks ovisne enzimske funkcije. Stoga, oksidacija odabranih cisteinskih ostataka može rezultirati regulacijom staničnog odgovora na oksidativni stres. GSH je tripeptid koji ima sposobnost čišćenja ROS-a reverzibilnom oksidacijom u GSSG. Redukcija u GSH odvija se pomoću NADPH i glutation reduktaze, a količina GSH te omjera GSH/GSSG smanjuje se u stanju oksidativnog stresa. Sinteza glutationa ovisi o dostupnosti cisteina, zbog čega dovodi u pitanje njegovo korištenje kao biomarkera oksidativnog stresa. Međutim, mjerenje GSH, GSSG i njihovog omjera u krvi smatra se indeksom redoks statusa u cijelom organizmu te korisnim markerom određenih bolesti (Marrocco i sur., 2017).

Povećane razine ROS-a utječu na gene uključene u regulaciju staničnog i sustavnog oksidativnog stresa. Nuklearni faktor Nrf-2 transkripcijski je faktor koji pokreće povećanu ekspresiju staničnih antioksidansa kao odgovor na oksidativni stres (Ho i sur., 2013). Keap1, protein povezan s Nrf-2, sadrži cisteinske ostatke osjetljive na oksidaciju. Oksidacija uzrokuje konformacijske promjene koje oslobađaju Nrf-2 te omogućuju njegovu translokaciju u jezgru. Potom Nrf-2 potiče transkripciju i ekspresiju više od 250 gena uključenih u antioksidativni odgovor organizma koji dovode do aktivacije mnogih antioksidansa i enzima za detoksifikaciju (glutation transferaze, glutation sintetaze, hem oksigenaze 1, NAPH-oksidoreduktaze...) (Marrocco i sur., 2017).

Proteinski cisteinski ostaci bitni su i kod drugih oksidacijskih stanja (Frijhoff i sur., 2015). Reverzibilni proces S-glutationacije događa se u fiziološkim uvjetima, unutar redoks signalnih puteva te kao rezultat antioksidativnog djelovanja GSH. U procesu dolazi do stvaranja

disulfidnih mostova između reaktivnih cisteinskih ostataka i glutaciona pri čemu nastaje disulfid proteina i glutaciona (PSSG). Mjerenje S-glutationilacije funkcionalno važnih proteina poput hemoglobina, obećavajući su biomarkeri oksidativnog stresa (Marrocco i sur., 2017).

Osim navedenih, postoje brojni drugi korišteni te potencijalni biomarkeri oksidativnog stresa.

### 1.4.3 Antioksidansi

Prooksidans, odnosno reaktivna vrsta, može uzrokovati oksidativno oštećenje lipida, proteina i nukleinskih kiselina, što rezultira raznim patološkim stanjima i bolestima. Antioksidans je tvar koja, prisutna u niskim koncentracijama naspram oksidiranog supstrata, značajno sprječava ili odgađa oksidaciju supstrata iniciranu prooksidansom. Antioksidativni kapacitet se može definirati kao sposobnost spoja da reducira prooksidanse (Prior i Cao, 1999).

Postoje dvije metode procjene razine oksidativnog stresa u organizmu: kvantifikacija aktivnosti antioksidativnih enzima poput katalaze, glutation peroksidaze ili superoksid dismutaze iz plazme te neenzimatsko mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta seruma (NEAC, eng. *nonenzymatic antioxidant capacity*) (Ho i sur., 2013; Marrocco i sur., 2017). NEAC je definiran kao mol oksidansa neutraliziran jednom litrom tjelesnih tekućina (Marrocco i sur., 2017).

Mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta klasificirano je u dvije skupine s obzirom na mehanizam: metode temeljene na prijenosu atoma vodika te metode temeljene na prijenosu elektrona. Većina testova temeljenih na prijenosu atoma vodika primjenjuje kompetitivnu shemu u kojoj se antioksidans i supstrat natječu za termički generirane peroksilne radikale dobivene razgradnjom azo-spojeva. Testovi temeljeni na prijenosu elektrona mjere kapacitet antioksidansa da reducira oksidans koji pritom mijenja boju, a stupanj promjene boje korelira s koncentracijom antioksidansa. Najkorišteniji predstavnici ovih metoda su ORAC (eng. *oxygen radical antioxidant capacity*) i TEAC (eng. *trolox equivalent antioxidant capacity*) (Zulueta i sur., 2009). Osim navedenih, koriste se i TRAP, CUPRAC, FRAP, metoda izbjeljivanja krocina te mnoge druge (Marrocco i sur., 2017).

Antioksidativna aktivnost ovisi o vrsti oksidativne reakcije te biološkoj molekuli koju je potrebno zaštititi od oksidacije (Biewenga i sur., 1997). Antioksidansi ispoljavaju djelovanje doniranjem vodika ili elektrona, čišćenjem radikala, raspadom vodikovog peroksida, enzimskom inhibicijom, gašenjem singletnog kisika, keliranjem metala te sinergistički s drugim

antioksidansima. Obrambeni antioksidativni sustavi dijele se na enzimatske i neenzimatske, a nalaze se unutar stanice ili u izvanstaničnom matriksu. Enzimatski sustavi primjenjuju više koraka detoksifikacije koji uključuju superoksid dismutazu, katalazu, glutathion reduktazu, glutathion peroksidazu te glutathion-S-transferazu (Lobo i sur., 2010). Neenzimatski antioksidansi su vitamini E i C, tiolni antioksidansi (glutathion, tioredoksin i  $\alpha$ -lipoična kiselina), melatonin, karotenoidi, prirodni flavonoidi te mnogi drugi spojevi. Antioksidansi mogu biti endogeni ili egzogeni, odnosno uneseni prehranom. Prehrambeni spojevi koji ne neutraliziraju slobodne radikale, ali pojačavaju endogenu aktivnost također se mogu klasificirati kao antioksidansi. Endogeni antioksidansi imaju ključnu ulogu u održavanju staničnih funkcija, no nedostatni su u stanju oksidativnog stresa koje zahtjeva unos egzogenih antioksidansa (Kurutas, 2015).

Prehrana ovisno o kvaliteti, vrsti, uravnoteženosti i karakteristikama, predstavlja jednog od najznačajnijih egzogenih etioloških čimbenika oksidativnog stresa (Rahal i sur., 2014). Pozitivni učinci prehrane bazirane na voću i povrću povezuju se s protuupalnim i antioksidativnim djelovanjem nutrijenata poput karotenoida, biljnih polifenola, vitamina C ili E te drugih (Holt i sur., 2009). Mediteranska prehrana također sadrži velik broj antioksidansa zbog čega snižava oksidativni stres, upalu te rizik od kardiovaskularnih bolesti (Dai i sur., 2008). Osim pozitivnog utjecaja, prehrana može djelovati upalno i prooksidativno čak i u normalnim fiziološkim uvjetima, može pojačati niz molekularnih reakcija te promijeniti metaboličko stanje. Prekomjerna unos kalorija abnormalno povećava količinu slobodnih masnih kiselina, triglicerida i glukoze u krvi što posljedično dovodi do stvaranja slobodnih radikala te iniciranja upale. Stoga, nutritivni oksidativni stres može se opisati kao postprandijalna neravnoteža između antioksidativne obrane i prooksidativnog opterećenja kao posljedica neadekvatne ili prekomjerne opskrbe hranjivim tvarima (Saha i sur., 2017).

Karotenoidi su tetraterpeni s više od 600 različitih vrsta. Široko su rasprostranjeni u biološkom sustavu te odgovorni za žutu, narančastu i crvenu pigmentaciju biljaka, životinja i mikroorganizama (Young i Lowe, 2018; Sharifi-Rad i sur., 2020). Biološke aktivnosti karotenoida su brojne, a među značajnijima je gašenje singletnog kisika te hvatanje slobodnih radikala čime smanjuju oksidativni stres (Sharifi-Rad i sur., 2020). Glavni karotenoidi u ljudskoj plazmi su  $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten, likopen, kriptoksantin i lutein (Palace i sur., 1998).  $\beta$ -karoten je primaran prekursor vitamina A, a nalazi se najviše u mrkvi, bundevi, špinatu, mangu i marelicama (Sharifi-Rad i sur., 2020). Vitamin A ne može se sintetizirati u ljudskom organizmu stoga je unos prehranom nužan (Palace i sur., 1998).



Vitamin E skupni je naziv za osam vitamina ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, i  $\delta$ -tokoferol,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokotrienol) topljivih u mastima (Lobo i sur., 2010). Pretežno se nalaze u jestivim uljima, orašastim plodovima, brokuli i ribi (Sharifi-Rad i sur., 2020). U staničnim membranama i drugim lipidno bogatim strukturama reagiraju s peroksilnim radikalom brže od nezasićenih masnih kiselina čime prekidaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Izrazito potentna antioksidativna svojstva posjeduju svi, a najučinkovitiji među njima je  $\alpha$ -tokoferol. Glavni je biološki lipofilni antioksidans, a u reakciji s radikalima dolazi do nastanka oksidiranog  $\alpha$ -tokoferol radikala koji se može reducirati u izvorni oblik askorbinskom kiselinom ili drugim antioksidansima (Kurutas, 2015).

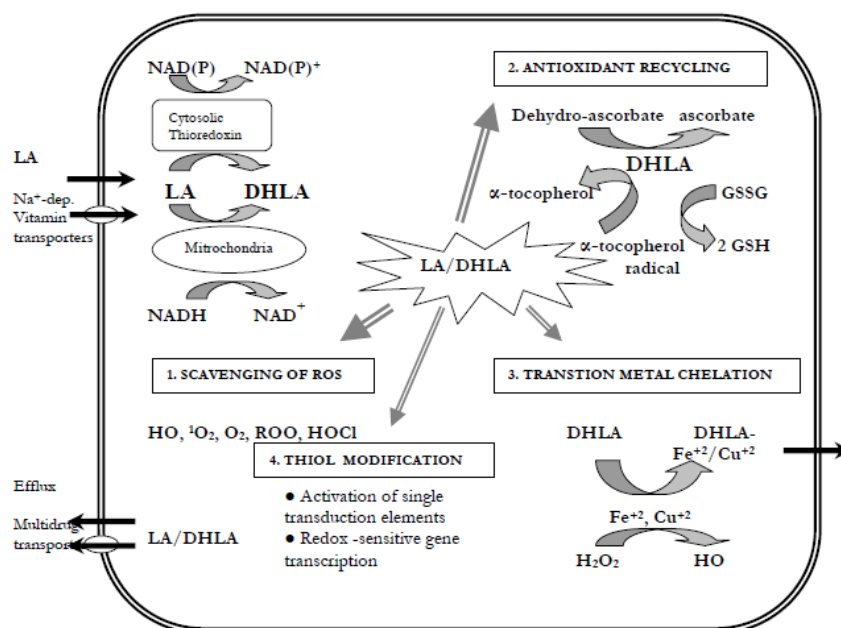
Vitamin C (askorbinska kiselina) monosaharidni je antioksidans biljaka i životinja (Lobo i sur., 2010). Zbog nemogućnosti sinteze, egzogeni unos je nužan, a najveće koncentracije sadržane su u citrusnom i bobičastom voću, ananasu, paprikama i tamnozelenom lisnatom povrću (Egbuna i Ifemeje, 2017). Izražena reduktivna svojstva askorbinske kiseline posljedica su lakog doniranja elektrona te oksidacije u dehidroaskorbinsku kiselinu (Sharifi-Rad i sur., 2020). Anionski oblik (askorbat) reagira s ROS i RNS, gasi ih i pritom se pretvara u slabo reaktivni askorбил radikal (Pizzino i sur., 2017). Time učinkovito smanjuje oksidativni stres i čisti organizam od slobodnih radikala poput superoksidnog aniona, singletnog kisika, vodikovog peroksida, lipidnih hidroperoksida, hidroksilnih radikala ili hipoklorne kiseline (Sharifi-Rad i sur., 2020). Osim izravnog antioksidativnog djelovanja, sudjeluje u reakcijama antioksidativnih enzima te reducira vitamin E i karotenoide (Kurutas, 2015).

Polifenoli su sekundarni metaboliti raznih biljaka koji se na temelju strukture i svojstava dijele na flavonoide, lignane, fenolne kiseline i stilbene. Identificirano je više od 8000 polifenolnih vrsta, od kojih čak polovicu čini skupina flavonoida (Pandey i Rizvi, 2009). Flavonoidi su derivati benzo- $\gamma$ -pirona koji se u hrani pretežito nalaze u obliku glikozida i polimera (Kurutas, 2015). Mnogi polifenoli poput kvercetina nalaze se u raznim biljnim proizvodima: voću, povrću, žitaricama, voćnim sokovima, čaju, vinu itd., dok su flavanoni i izoflavoni specifični za određene namirnice. U većini slučajeva hrana sadrži složene mješavine polifenola (Pandey i Rizvi, 2009). Najpoznatija svojstva polifenola su hvatanje superoksidnih, hidroksilnih i peroksilnih radikala, kao i inhibicija peroksidacije lipida, keliranje redoks aktivnih metala te sprječavanje radikalima posredovanog iscrpljivanja vitamina E i  $\beta$ -karotena (Yavari i sur., 2015).

Minerali su, u malim količinama, neophodni kofaktori za antioksidativne aktivnosti određenih enzima (Sharifi-Rad i sur., 2020). Bakar i cink kofaktori su bakar-cink superoksid dismutaze čija je uloga uklanjanje superoksidnih radikala (Yavari i sur., 2015). Nutritivni izvori cinka su nemasno crveno meso, mahunarke, žitarice, orašasti plodovi, sjemenke, mlijeko te razno voće i povrće (Egbuna i Ifemeje, 2017), dok bogate količine bakra nalazimo u iznutricama, orašastim plodovima, voću te žitaricama (Bost i sur., 2016). Selen je neophodan kofaktor glutation peroksidaze koja uklanja hidrogen peroksid (Yavari i sur., 2015), a najbogatije izvore čine brazilski orasi i bubrezi, potom slijede rakovi, školjke, jetra te riba. Njegova dostupnost u tlu varira, stoga je pšenica dobar izvor selena u Sjevernoj Americi, a zbog deficitarnog tla loš u Europi (Rayman, 2000). Mangan superoksid dismutaza koristi mangan kao kofaktor i uklanja superoksidne radikale nastale oksidativnom fosforilacijom (Yavari i sur., 2015). Bogat izvor mangana sadrže žitarice, orašasti plodovi, riža te čaj (Aschner i Aschner, 2005). Željezo je esencijalni kofaktor katalaze, odgovorne za uklanjanje hidrogen peroksida (Yavari i sur., 2015), a nalazi se najviše u mesu, ribi, mahunarkama, žitaricama, orašastim plodovima, povrću te mesu peradi (Gibson i sur., 2015).

#### **1.4.4 $\alpha$ -lipoična kiselina**

$\alpha$ -lipoična kiselina brzo se reducira u aktivniji DHLA oblik pomoću NADH ili NADPH u gotovo svim tkivima (Kurutas, 2015). DHLA pokazuje superiornost u antioksidativnom djelovanju, a zajedno čine moćan redoks par (Shay i sur., 2009). Postoje brojni literaturni podaci o antioksidativnim učincima  $\alpha$ -lipoične kiseline i DHLA, odnosno o metal kelirajućim svojstvima, neutralizaciji slobodnih radikala, regeneraciji endogenih antioksidansa te popravku oksidiranih oštećenja (Salehi i sur., 2019). Neki od antioksidativnih učinaka prikazani su na Slici 5.



**Slika 5.** Prikaz antioksidativnih učinaka  $\alpha$ -lipoične kiseline i DHLA (preuzeto iz Islam, 2009)

$\alpha$ -lipoična kiselina biološki je antioksidans topljiv u vodi i mastima, stoga može neutralizirati reaktivne kisikove i dušikove vrste unutar i izvan stanice, a da pritom ne postane radikal. DHLA može neutralizirati superoksid i dušikov oksid,  $\alpha$ -lipoična kiselina singletni kisik, a oba oblika sposobna su neutralizirati hidroksilne i peroksilne radikale, hipoklornu kiselinu te peroksinitrit (Shay i sur., 2009). Kelacijom metala sprječava se njihovo posredovanje u proizvodnji reaktivnih vrsta kisika, ne dovodeći pritom do iscrpljivanja metala.  $\alpha$ -lipoična kiselina kelira uglavnom  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ , dok DHLA, pored prethodno navedenih metala, može kelirati i  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  (Gomes i Negrato, 2014).

U antioksidativnoj obrani  $\alpha$ -lipoična kiselina sudjeluje i neizravno, induciranjem antioksidativnih enzima poput glutation sintaze čime dolazi do povećane sinteze GSH (Kurutas, 2015). Također, na koncentraciju GSH utječe i povećanjem unosa cistina iz plazme, redukcijom cistina u cistein koji potom postaje supstrat za sintezu GSH te naposljetku indukcijom transkripcijskih gena za *de novo* sintezu GSH. DHLA regenerira endogene antioksidanse vitamin C i E, reducirajući ih u aktivni antioksidativni oblik (Shay i sur., 2009). Mnogi eksperimentalni radovi dokazuju da  $\alpha$ -lipoična kiselina i DHLA mogu poboljšati antioksidativni kapacitet tkiva u različitim oblicima oksidativnog stresa (Biewenga i sur., 1997).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

$\alpha$ -lipoična kiselina (ALA) derivat je oktanoične kiseline te (uglavnom kao koenzim) sudjeluje u velikom broju biokemijskih procesa važnih za održavanje oksidoreduktivne homeostaze (održavanju egzogenih antioksidansa u aktivnom obliku, povećavanju intracelularnih koncentracija reduciranog glutaciona itd.). Oksidativni stres nalazi se u podlozi brojnih kroničnih bolesti te su istraživanja mogućnosti prevencije nastanka i liječenja oksidativnog stresa u fokusu znanosti već duže vrijeme. Glavni cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na parametre oksidativnog stresa (ukupni antioksidativni potencijal) u serumu ispitanica s dijagnozom cervikalne intraepitelne neuroplazije I. Istraživanje je organizirano kao dvostruko-slijepa placebo kontrolirana studija gdje su pacijentice kroz period od 3 mjeseca dnevno suplementirane sa 600 mg ALA. Paralelno su, primjenom validiranog semikvantitativnog upitnika o učestalosti konzumacije namirnica, utvrđene prehrambene navike pacijentica uključenih u studiju. S obzirom na mali broj istraživanja ovog tipa, rezultati ove studije predstavljaju vrijedan doprinos trenutnim, ograničenim saznanjima o mogućnostima primjene ALA kao dodatka prehrani u svrhu prevencije ili ublažavanja oksidativnog stresa.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1 Plan istraživanja**

Učinkovitost  $\alpha$ -lipoične kiseline istražena je u okviru slijepo, placebo kontrolirane studije na oko 100 pacijentica (raspon dobi 18-55 godina). Nakon provjere kriterija za isključivanje i dobivanja informiranog pristanka, pacijentice su uključene u studiju. Sve ispitanice koje su sudjelovale u istraživanju imale su promjene u citološkom nalazu, dokazane rutinskim dijagnostičkim pregledom u ginekološko-kolposkopskoj ambulanti. Po završetku istog, pacijenticama su iz kubitalne vene standardnim načinom uzete dvije epruvete krvi zbog laboratorijskih analiza neophodnih za istraživanje. Ispitanice su zatim ispunile upitnik o prehranbenim i životnim navikama (Prilog 1.). Nasumičnu raspodjelu pacijentica u tretiranu, odnosno kontroliranu skupinu provela je educirana osoba (suradnik projekta) metodom blok randomizacije. Pacijentice su potom dobile šifrom označeno pakiranje sa 180 kapsula te uputu o korištenju. Različitim šiframa označena pakiranja sadržavala su kapsule s 300 mg  $\alpha$ -lipoične kiseline (tretirana skupina) ili pomoćnu tvar - rižin škrob (kontrolna skupina) (proizvodnja: Zada Pharmaceuticals, Tuzla, Bosna i Hercegovina). Sljedećih 90 dana ispitanice su uzimale po dvije tablete dnevno; ujutro i navečer, uz obrok (kako je navedeno u uputi o korištenju) – ukupno 600 mg ALA/dne. Nakon isteka zadanog vremenskog perioda, ponovile su dijagnostički pregled u ginekološko-kolposkopskoj ambulanti te su im ponovo standardnim načinom iz kubitalne vene uzete dvije epruvete krvi radi dobivanja laboratorijskih nalaza nužnih za istraživanje. Pacijentice su, prilikom ponovljenog posjeta ginekologu, bile dužne vratiti preostale tablete suplementa u originalnoj ambalaži kako bi se utvrdila adherencija terapiji.

### **3.2 Ispitanice**

#### **3.2.1 Kriteriji uključivanja/isključivanja**

Kriteriji za uključivanje pacijentica u studiju bili su: histološka potvrda niskog stupnja skvamoznih intraepitelih lezija, seksualno aktivne žene, raspon dobi 18-55 godina. Za isključivanje pacijentica iz studije kriteriji su bili: trudnoća, abortus, menopauza, histerektomija, maligne bolesti, kronične upalne bolesti, HPV cijepljenje, dijabetes i

destruktivna terapija cerviksa. Pacijentice koje su zadovoljile sve navedene kriterije uključene su u studiju te upoznate sa svrhom i načinom njenog izvođenja.

### **3.2.2 Uzimanje uzoraka krvi**

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

### **3.2.3 Prehrambene i životne navike pacijentica**

Ispitivanje prehrambenih i životnih navika pacijentica provedeno standardiziranim i validiranim prehrambenim upitnikom (semikvantitativni upitnik o učestalosti konzumacije namirnica) uz pomoć educiranog osoblja. Prikupljeni podaci pružili su osnovne informacije o obrascima prehrane, korištenju dodataka prehrani, unosu antioksidansa, pušenju te fizičkoj aktivnosti pacijentica. Ispitanicama je savjetovano da ne mijenjaju način prehrane i stupanj fizičke aktivnosti tijekom trajanja studije.

## **3.3 Materijali**

### **3.3.1 Kemikalije**

- 2,2'-azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorid-AAPH (Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2-(6-hidroksi-3-okso-(3H)-ksanten-9-il) benzojeva kiselina-Fluorescein (Sigma, Missouri, SAD)
- Kalijev monohidrogenfosfat (Siegfried Handel, Zofingen, Švicarska)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ultračista voda (MiliQ-H<sub>2</sub>O) (Merck, New Jersey, USA)
- (±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina–Trolox (Sigma, Missouri, SAD)

### 3.3.2 Instrumenti i pribor

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

## 3.4 Metode

### 3.4.1 ORAC antioksidativni kapacitet

Antioksidativni potencijal seruma pacijentica određen je modificiranom ORAC metodom (eng. Oxygen radical absorbance capacity). ORAC test mjeri antioksidativnu inhibiciju oksidacije izazvane peroksil radikalima i mjera je ukupnog antioksidativnog kapaciteta (Shahidi i Zhong, 2015). U ovom testu, peroksilni radikal dobije se iz hidrofilnog azo spoja AAPH (2,2-azobis-2-metilimidamid, dihidroklorid) nakon termičke razgradnje u prisutnosti kisika. Stvoreni radikali reagiraju s fluorescentnom sondom i antioksidansom, a oksidacija slobodnih radikala fluorescentne sonde mjeri se promjenom njezinog intenziteta fluorescencije. Standardni antioksidans Trolox (vodotopljivi analog vitamina E), koristi se kao referenca, a ORAC vrijednosti testiranih antioksidansa kao Trolox ekvivalenti. Dinamičko opadanje fluorescencije sonde u vremenskom periodu izračunava se površinom ispod krivulje (AUC), a test se provodi do gašenja fluorescencije. Uspoređujući integral opadanja fluorescencije uzrokovane uzorkom i standardom s onim slijepe probe, ORAC test uzima u obzir stupanj i vrijeme inhibicije čime je poboljšano izračunavanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta.

### 3.4.2 Izrada reagensa

75 mM fosfatni pufer (pH 7,0) priprema se otapanjem 3,1573 g kalijeva dihidrogenfosfata i 2,4908 g kalijeva monohidrogenfosfata u ultračistoj vodi. Potrebna količina kalijevih soli izvaže se na analitičkoj vagi, otopi u čaši u manjoj količini vode (oko 400 mL) te prilagodi pH dodavanjem otopine natrijevog hidroksida. Mjerenje pH provodi se pomoću pH-metra, a otopina natrijevog hidroksida dodaje se dok se ne postigne pH 7,0. Otopina odgovarajućeg pH prelije se u odmjernu tikvicu od 500 mL i dopuni vodom do oznake.

Stock otopina fluoresceina (1 mM) priprema se otapanjem 37,6 mg fluoresceina u 75 mM fosfatnom puferu. Fluorescein se izvaže i prebaci u odmjernu tikvicu od 100 mL, gdje se otopi u manjoj količini pufera pa dopuni do oznake. Čuva se na hladnom (4°C) i mračnom mjestu. Prije same analize pripremi se 1 µM otopina fluoresceina razrjeđivanjem fosfatnim puferom te također čuva na mračnom mjestu u ledenoj kupelji.

Otopina AAPH priprema se na dan analize, otapanjem 610,2 mg AAPH u 15 mL 75 mM fosfatnog pufera u Falcon kiveti od 15 mL. Kiveta se čuva u hladnjaku omotana folijom i vadi neposredno prije korištenja u analizi.

Uzorci se odmrznu, razrijede 250 puta ultračistom vodom te vorteksiraju.

### 3.4.3 Postupak

Čitač mikrotitarskih ploča postavi se za očitavanje intenziteta fluorescencije s valnom duljinom ekscitacije 485 nm te valnom duljinom emisije 530 nm. Uređaj se namjesti tako da miješa ploču 5 sekundi, pauzira 25 sekundi, potom mjeri fluorescenciju svake jažice te na kraju pauzira 150 sekundi. Protokol se zatim ponavlja 20 puta, stoga mjerenje jedne ploče traje oko sat vremena. Analiza se provodi na temperaturi 37°C zbog visoko osjetljive termičke razgradnje AAPH, što zahtjeva desetominutnu inkubaciju reakcijske smjese prije njegovog dodavanja.

Reakcijska smjesa izrađuje se na način da se u svaku jažicu tamne mikrotitarske ploče pipetira 25 µL razrijeđenog uzorka u kvadrilikatu, osim u zadnje 4 jažice posljednjeg reda svake ploče, gdje se pipetira slijepa proba (25 mM fosfatni pufer). Pomoću multikanalne pipete, u svaku se jažicu pipetira 150 µL 1 µM otopine fluoresceina, a nakon desetominutne inkubacije, pipetira

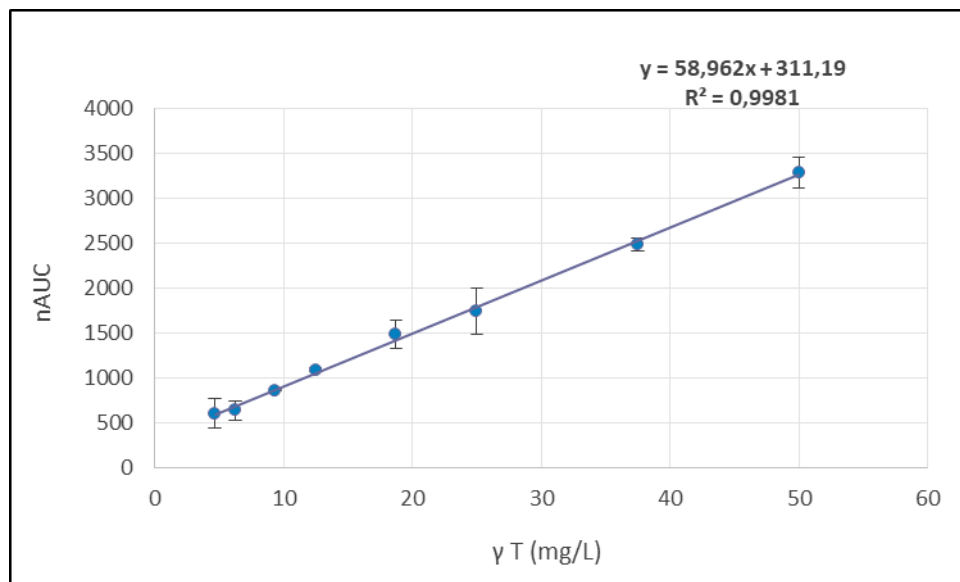


se 25  $\mu\text{L}$  otopine AAPH. Zatim započinje mjerenje fluorescencije u uređaju prema već opisanom protokolu.

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

Pomoću uređaja čitača izračunaju se površine ispod krivulje (AUC) za svaki uzorak, odnosno za svaku jažicu mikrotitarske ploče, a dobivena krivulja prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o vremenu. Svaki uzorak odgađa oksidaciju fluorescentne probe, ovisno o količini antioksidansa u uzorku. Dakle intenzitet fluorescencije opada s vremenom, znatno brže kod slijepe probe nego kod uzorka. ORAC aktivnost izračunava se oduzimanjem površine ispod krivulje slijepe probe od površine ispod krivulje uzorka. Time se dobije razlika površina ispod krivulje (netAUC). Važno je da fluorescencija pri svakom mjerenju padne na nulu kako bi površina ispod krivulje bila točno izračunata.

Koristeći otopine Troloxa poznatih koncentracija, izradi se baždarni dijagram ovisnosti netAUC o koncentraciji Troloxa prikazan na Slici 6. Iz dobivenog dijagrama može se izračunati ORAC aktivnost izražena kao Trolox ekvivalent.



**Slika 6.** Baždarni dijagram ovisnosti netAUC o koncentraciji Troloxa

### **3.5 Statistička analiza**

Analiza je provedena u četveroplikatu te su izračunate srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja. Statistička obrada podataka potom je napravljena korištenjem programa GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, USA). Testirana je normalnost raspodjele dobivenih podataka te su na temelju dobivenih rezultata odabrani statistički testovi za daljnju obradu. Rezultati su prikazani kao medijani, a usporedba rezultata provedena je korištenjem Mann-Whitneyevog testa, Fisherovog testa i Student t-testa pri čemu je  $p \leq 0,05$  smatran statistički značajnom razlikom.

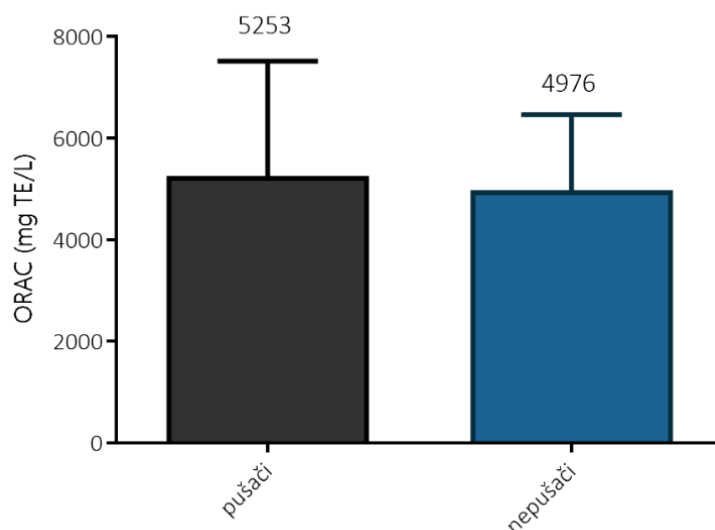
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Utjecaj životnog stila na antioksidativni potencijal seruma

U opservacijskom dijelu studije uspoređene su pojedine karakteristike životnog stila ispitanica kako bi se istražio njihov utjecaj na antioksidativni potencijal seruma prije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, odnosno placebo. Pacijentice su kategorizirane s obzirom na pušački status (pušači i nepušači), indeks tjelesne mase (normalan i prekomjeran) te obrazac prehrane, odnosno unos voća i povrća (I-IV kvartil). Prikazane su pomoću srednjih vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala seruma ispitanica.

#### 4.1.1 Utjecaj pušenja na ukupni antioksidativni potencijal seruma

Za ispitivanje utjecaja pušenja na ukupni antioksidativni potencijal seruma, ispitanice su podijeljene u dvije skupine; 26 pušača i 73 nepušača. Na Slici 7. prikazane su srednje vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala seruma prije suplementacije za obje skupine.

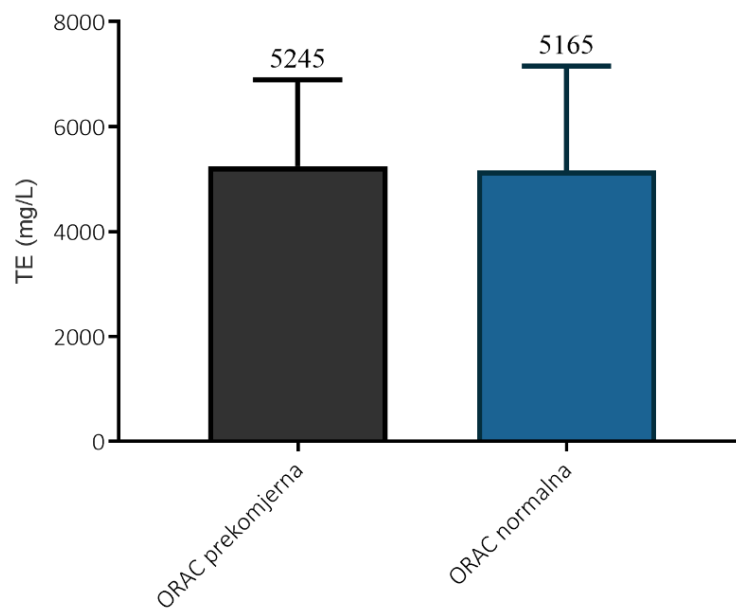


**Slika 7.** ORAC antioksidativni potencijal seruma za skupinu pušača te skupinu nepušača

Srednja vrijednost ORAC antioksidativnog potencijala u serumu pušača iznosi 5253 mg TE/L, a kod nepušača 4976 mg TE/L. Testirana je normalnost razdiobe dobivenih podataka i ustanovljeno je da se ne radi o normalnoj razdiobi. Stoga, dva su skupa podataka uspoređena Mann-Whitnejevim testom, a dobivena vrijednost  $p=0,6976$  pokazuje da nema statistički značajne razlike između njih.

#### 4.1.2 Utjecaj indeksa tjelesne mase na antioksidativni potencijal seruma

S obzirom na indeks tjelesne mase (ITM), ispitanice su podijeljene u skupinu s normalnim ITM ( $< 25 \text{ kg/m}^2$ ) koju čini 56 ispitanica te skupinu s prekomjernim ITM ( $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) s ukupno 44 ispitanice. Slika 8. prikazuje srednje vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala seruma prije suplementacije prikazane kao Trolox ekvivalenti.

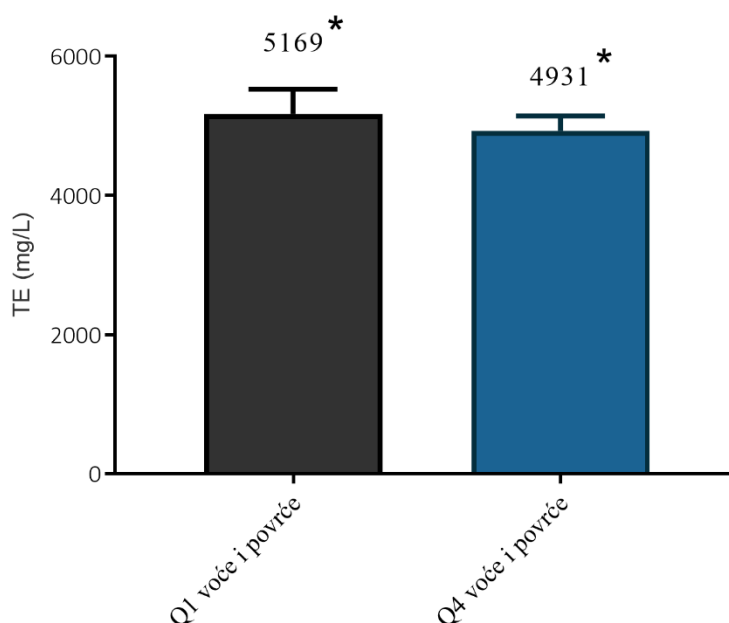


**Slika 8.** ORAC antioksidativni potencijal seruma za pacijentice s prekomjernim te normalnim indeksom tjelesne mase

Za ispitanice s  $\text{ITM} < 25 \text{ kg/m}^2$  iznosi 5165 mg TE/L, a kod ispitanica s  $\text{ITM} \geq 25 \text{ kg/m}^2$  iznosi 5245 mg TE/L. Testirajući normalnost razdiobe dobivenih podataka ustanovljeno je da se radi o normalnoj razdiobi te su dvije skupine podataka uspoređene Studentovim t-testom. Vrijednost  $p$  dobivena t-testom iznosi 0,8314 što znači da se dva skupa podataka međusobno ne razlikuju.

### 4.1.3 Utjecaj obrasca prehrane na antioksidativni potencijal seruma

Od ukupnog broja ispitanica, 35 ih je unosilo  $\geq 3$  porcije voća i povrća dnevno (I kvartil), dok je njih 57 unosilo  $< 3$  porcije voća i povrća na dan (IV kvartil). Srednja vrijednost ORAC antioksidativnog potencijala seruma prije suplementacije za skupinu prvog kvartila iznosi 5169 mg TE/L, a za skupinu četvrtog kvartila 4931 mg TE/L. Vrijednosti su prikazane kao Trolox ekvivalenti na Slici 9.



**Slika 9.** ORAC antioksidativni potencijal seruma za pacijentice iz I IV kvartila s obzirom na unos voća i povrća

\*statistički značajna razlika ( $p \leq 0,05$ )

Srednja vrijednost ORAC antioksidativnog potencijala u serumu ispitanica s unosom voća i povrća unutar prvog kvartila značajno je veća u usporedbi sa srednjom vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala seruma ispitanica s najnižim unosom voća i povrća, koje se nalaze u skupini četvrtog kvartila. S obzirom da se testirajući normalnost razdiobe dobivenih podataka ustanovila normalna razdioba, dvije skupine podataka uspoređene su korištenjem Studentovog t-testa. Vrijednost  $p=0,0059$  dokazuje da se dva skupa podataka međusobno značajno razlikuju ( $p \leq 0,05$ ) te da unos voća i povrća zamjetno utječe na antioksidativni potencijal seruma ispitanica.

## 4.2 Utjecaj suplementacije $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na ORAC antioksidativni potencijal seruma

### 4.2.1 Karakteristike ispitivane i kontrolne skupine

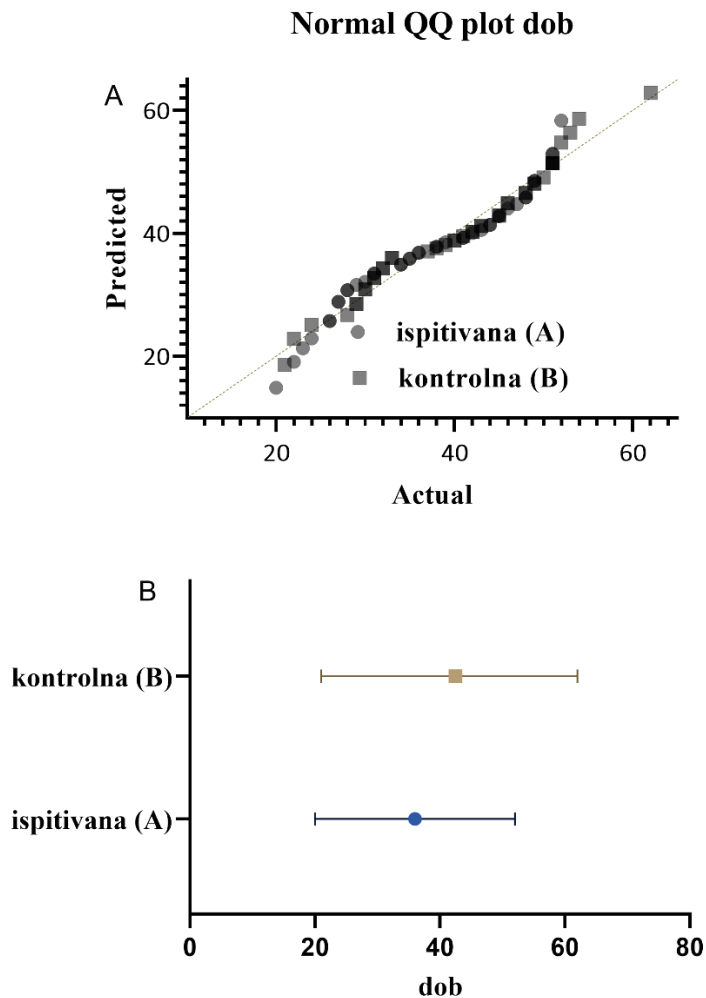
U interventnom dijelu studije uspoređene su karakteristike ispitivane i kontrolne skupine kako bi se utvrdilo postoji li između njih statistički značajna razlika koja može utjecati na antioksidativni potencijal seruma ispitanica. Usporedba je provedena na temelju podataka o dobi, indeksu tjelesne mase, pušačkom statusu te uzimanju dodataka prehrani. U Tablici 1. prikazane su vrijednosti pojedinih karakteristika ispitivane i kontrolne skupine, a svi navedeni podaci prikupljeni su iz prehrambenog upitnika (Prilog 1.).

**Tablica 1.** Karakteristike ispitivane i kontrolne skupine

	Ispitivana skupina	Kontrolna skupina
<b>Ukupan broj ispitanica</b>	50	50
<b>Pušači</b>	15	11
<b>Nepušači</b>	35	39
<b>Uzimanje dodataka prehrani</b>	16	19
<b>Bez dodataka prehrani</b>	34	31
<b>Medijan dobi</b>	36 godina	42,5 godine
<b>Medijan indeksa tjelesne mase</b>	23,88 kg/m <sup>2</sup>	24,48 kg/m <sup>2</sup>

### 4.2.2 Usporedba ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na dob

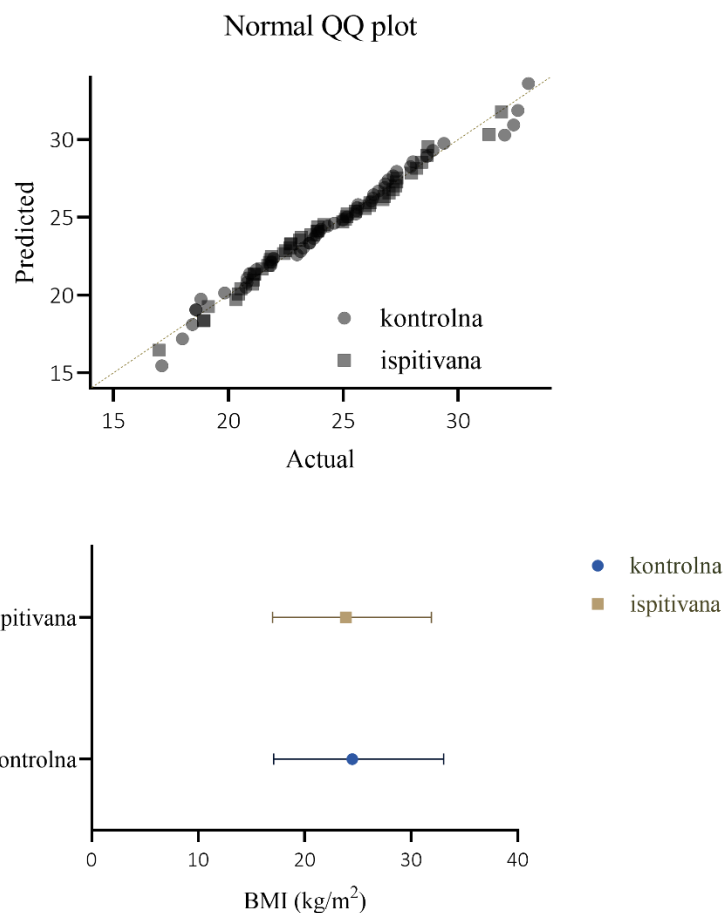
Dob skupine se određuje, a potom i uspoređuje pomoću medijana. Kod ispitivane skupine medijan iznosi 36 godina, a kod kontrolne 42,5 godine. Slika 10. prikazuje normalnost razdiobe podataka kojom je utvrđeno da se ne radi o normalnoj razdiobi. Za usporedbu je stoga korišten Mann-Whitnejev test, a dobivena p vrijednost iznosi 0,034. Temeljem dobivenih podataka, uočena je statistički značajna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između kontrolne i ispitivane skupine s obzirom na dob ispitanica.



**Slika 10.** Normalnost razdiobe podataka (A) te usporedbe ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na dob (B)

#### 4.2.3 Usporedba ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na indeks tjelesne mase

Medijan ITM-a ispitivane skupine iznosi  $23,88 \text{ kg/m}^2$ , a kontrolne  $24,48 \text{ kg/m}^2$ . Testirana je normalnost razdiobe podataka prikazana na Slici 11., kojom je utvrđeno da se radi o normalnoj razdiobi. Za usporedbu podataka, također prikazanu na Slici 11., korišten je Student t-test. P vrijednost t-testa iznosi 0,5732 što znači da nema statistički značajne razlike s obzirom na ITM skupina.

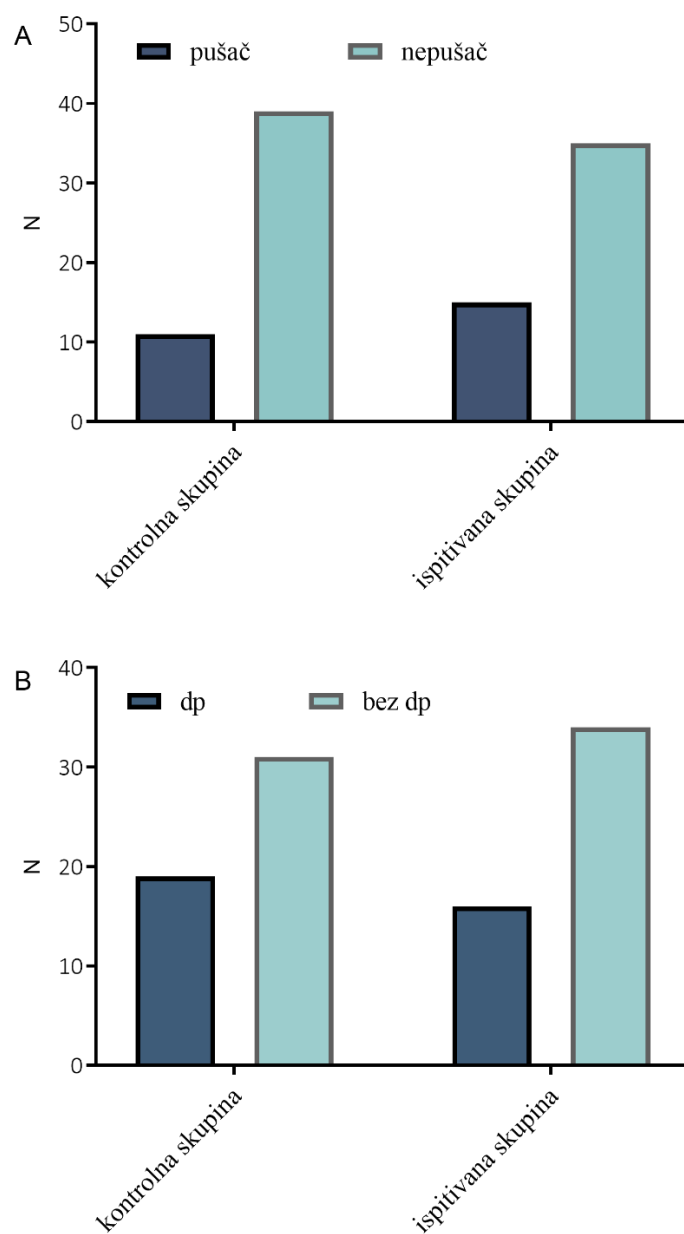


**Slika 11.** Normalnost razdiobe podataka (A) te usporedbe ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na indeks tjelesne mase (B)

#### 4.2.4 Usporedba ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na pušački status te uzimanje dodataka prehrani

Kontrolna skupina sadrži 11 pušača te 19 ispitanica koje redovito uzimaju dodatke prehrani. Sukladno tome, 39 ispitanica nisu pušači i 31 ispitanica ne uzima dodatke prehrani. U ispitivanoj skupini nalazi se 15 pušača i 16 ispitanica koje koriste dodatke prehrani, dok 35 ispitanica nisu pušači te njih 34 ne uzima dodatke prehrani. Na Slici 12. grafički su prikazani navedeni podaci. Usporedba ispitivane i kontrolne skupine s obzirom na pušački status (A) te uzimanje dodataka prehrani (B) provedena je korištenjem Fisherovog testa koji je pokazao da se skupine ne razlikuju s obzirom na promatrane parametre ( $p=0,4945$  (A) i  $p=0,6753$  (B)).

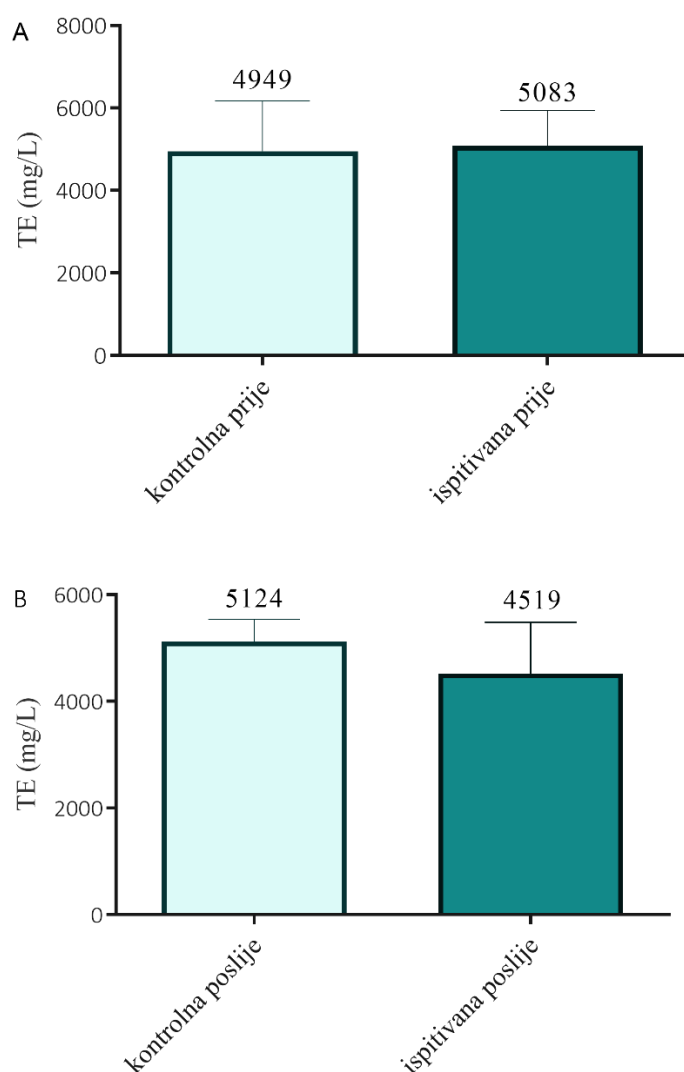




**Slika 12.** Broj pušača i nepušača (A) te ispitanica koje uzimaju i ne uzimaju dodatke prehrani (B) u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

#### 4.2.5 Utjecaj suplementacije $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na ORAC antioksidativni potencijal seruma

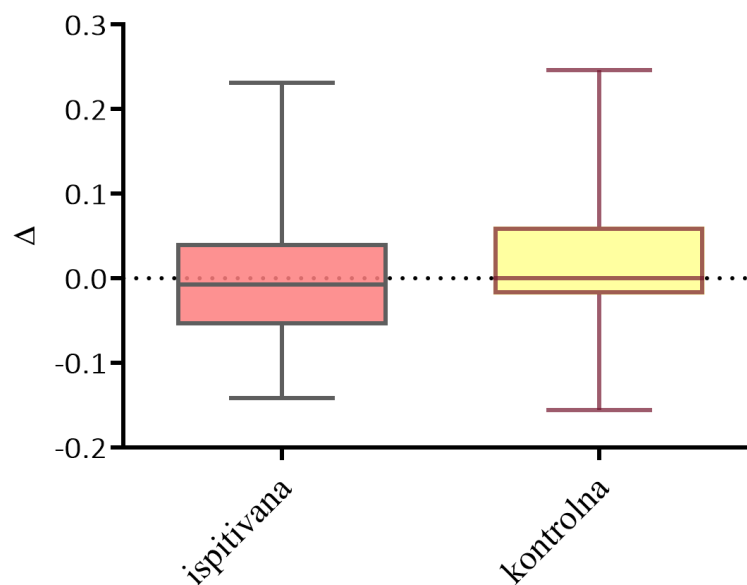
Ukupni ORAC antioksidativni potencijal seruma izmjeren je kontrolnoj skupini prije i poslije suplementacije placeboom te ispitivanoj skupini prije i poslije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom. Dobiveni medijani ORAC vrijednosti antioksidativnog potencijala seruma prikazani su na Slici 13. te za ispitivanu skupinu iznose 5083 mg TE/L prije suplementacije, a 4519 mg TE/L poslije suplementacije. Medijan ORAC vrijednosti antioksidativnog potencijala seruma kontrolne skupine prije suplementacije iznosi 4949 mg TE/L, a poslije 5124 mg TE/L.



**Slika 13.** Medijani ukupnog ORAC antioksidativnog potencijala seruma kontrolne skupine prije (A) i poslije (B) suplementacije placeboom te ispitivane skupine prije (A) i poslije (B) suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom

Za usporedbu podataka provedeno je testiranje normalnosti razdiobe te utvrđeno da razdioba nije normalna. Stoga je usporedba medijana ORAC vrijednosti ispitivane i kontrolne skupine prije (A) te nakon suplementacije (B) provedena Mann-Whitnejevim testom. Vrijednosti  $p=0,6253$  prije suplementacije i  $p=0,4463$  nakon suplementacije dokazuju da ne postoje statistički značajne razlike između medijana ORAC vrijednosti ispitivane i kontrolne skupine.

Na Slici 14. prikazana je promjena ukupne ORAC vrijednosti antioksidativnog potencijala seruma (izračunata kao postotak početne vrijednosti) nakon suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom u ispitivanoj te placebo u kontrolnoj skupini.



**Slika 14.** Promjene ORAC vrijednosti antioksidativnog potencijala seruma ispitanica poslije suplementacije u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Testirajući normalnost razdiobe podataka utvrđena je normalna razdioba i korišten je Student t-test. Dobivena vrijednost  $p=0,2048$  pokazuje da nema statistički značajne razlike te da su promjene nakon suplementacije bile jednake u ispitivanoj i kontrolnoj skupini. Dakle, suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom nema utjecaja na ukupni antioksidativni potencijal seruma ispitanica.

### 4.3 Rasprava

Čimbenici okoliša i način života uvelike utječu na unos egzogenih slobodnih radikala prisutnih u zraku, hrani i vodi (Caliri i sur., 2021). Zbog toga su u ovom radu provedene usporedbe pacijentica s obzirom na pušački status, prehranu te indeks tjelesne mase.

Prva usporedba odnosila se na pušački status pacijentica u kojoj nije zamijećena statistički značajna razlika između vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala u skupinama pušača i nepušača. Duhanski dim sadrži brojne štetne spojeve, uključujući ROS i RNS, stoga pušenje uzrokuje kronični oksidativni stres dišnog sustava, narušavajući pritom i stanje u ostatku organizma. Oksidativno oštećenje može biti izravna reakcija s reaktivnim tvarima u dimu ili posljedica sekundarne reakcije potaknute dimom (Ozguner i sur., 2005). Identificirane su dvije glavne faze dima: faza katrana (čestica) i faza plina. Obje faze bogate su slobodnim radikalima; ROS, RNS te ne-radikalima. Analizom faza procijenjeno je da svaki dim cigarete sadrži približno 1014 slobodnih radikala u fazi katrana te 1015 radikala u plinskoj fazi. Radikali plinske faze su reaktivniji i kratkotrajni, ali ipak dolazi do reakcije s prirodnim endogenim oksidansima nastalim tijekom oksidativnog praska induciranog fagocitima koji su posljedica upalnog odgovora na iritaciju uzrokovanu dimom cigarete (Elsayed i Bendich, 2001). Radikali faze katrana uglavnom su manje reaktivni kompleksi kinon-hidrokinon redoks sustava, no stvaraju superoksidni anion koji posljedično dovodi do nastanka peroksinitrita,  $H_2O_2$  i visoko reaktivnog hidroksilnog iona. U dimu se nalaze i metali apsorbirani iz tla tijekom rasta biljke, od kojih mnogi sudjeluju u redoks reakcijama te stvarajući ROS pridonose oksidativnom stresu (Caliri i sur., 2021). Karademirci i suradnici (2018.) ispitali su utjecaj pušenja na zdrave muškarce te otkrili da je TAS (total antioxidant status) statistički bio niži, a TOS (total oxidant status) i OSI (TOS/TAC vrijednost) značajno viši u skupini pušača. Sukladno tome, vrijednosti vitamina C i E opadale su s povećanjem dnevnog broja cigareta, a najniži rezultat imala je skupina pušača s konzumacijom više od 31 cigarete dnevno. Jedan od biomarkera lipidne peroksidacije je njen krajnji produkt malonaldehid (MDA) (Ozguner i sur., 2005). U studiji Ozguner i suradnici (2005.) izmjerene su povišene razine MDA u plazmi pušača što dokazuje da je kod njih povećan proces lipidne peroksidacije. Pušači su imali smanjene razine antioksidansa melatonina u usporedbi sa skupinom nepušača. Vrijednosti antioksidativnih enzima superoksid dismutaze i glutation peroksidaze u hemolizatima bile su povećane kod pušača ukazujući na to da je enzimski antioksidativni odgovor pojačan zbog prisutnih radikala. Ipak, u studiji Beschasnyi i suradnici (2021.) uočeno je da dugoročno pušenje dovodi do

smanjenja antioksidativnog odgovora organizma tijekom oksidativnog stresa. Aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u eritrocitima znatno su smanjene kod ispitanika koji aktivno puše tri ili više godina. Koncentracije MDA kod pušača bile su povišene u usporedbi s koncentracijama nepušača i u ovoj studiji. Slijedom navedenog, vidljivo je da pušenje ima utjecaj na oksidativni status i antioksidativni potencijal, što u ovom diplomskom radu nije dokazano. Glavne pretpostavke za nedosljednost rezultata su mala skupina ispitanica, mjerenje samo jednog parametra te osjetljivost metode određivanja antioksidativnog statusa.

Statistički značajna razlika ipak je uočena kod usporedbe ispitanica s različitim unosom voća i povrća. Skupina ispitanica koje su konzumirale 3 ili više porcija voća i povrća dnevno imale su veće vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala seruma naspram skupine koja je unosila manje od 3 porcije dnevno. Razlog tomu je bogat antioksidativni sastav voća i povrća, koji ovisi o uvjetima rasta, preradi te skladištenju namirnica (Sies i sur., 2005). Štoviše, sastav prehrane osim na antioksidativne mehanizme može utjecati i na intenzitet oksidativnog oštećenja što, barem djelomično, objašnjava odnos prehrane i nekih kroničnih bolesti kao što su ateroskleroza, diabetes mellitus te rak. Najčešće preporučeni obrazac prehrane za prevenciju kronično degenerativnih bolesti je mediteranska dijeta (Vetrani i sur., 2013). Studija Luisi i suradnici (2019.) proučila je odnos mediteranske dijetae obogaćene visoko kvalitetnim ekstra djevičanskim maslinovim uljem na oksidativni stres. Nakon tromjesečnog perioda, polifenolima bogata prehrana smanjila je količine MDA i produkta oksidativnog oštećenja 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina u kontrolnoj ( $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ ) te ispitivanoj ( $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) skupini. Dijeta bogata vlaknima s niskim udjelom masti primijenjena je na pretilim muškarcima ( $ITM \geq 35 \text{ kg/m}^2$ ) u studiji Roberts i suradnici (2002.). Nakon 21 dana kontrolirane dijetae i svakodnevne tjelovježbe izmjerene su niže serumske vrijednosti biomarkera oksidativnog stresa (8-izoprostaglandin  $F2\alpha$ ). Korelacija između antioksidativnog statusa i dnevnog unosa voća i povrća ispitana je u studiji Bacchetti i suradnici (2019.) na zdravim ispitanicima s normalnim ITM-om. Utvrđeno je da povećana konzumacija voća i povrća smanjuje plazmatske razine markera peroksidacije lipida (ox-LDL i lipidni hidroperoksidi), a povećava koncentraciju karotenoida u plazmi te antioksidativni kapacitet plazme kod oba spola (izmjeren ORAC metodom). Slična studija koju su proveli Holt i suradnici (2009.) na zdravim adolescentima, pokazala je inverzan utjecaj prehrane bogate voćem i povrćem na biomarkere oksidativnog stresa (F2-izoprostan). U nešto drugačijoj studiji Chai i suradnika (2019.), ispitan je utjecaj uzimanja 480 mL soka od višanja, kroz 12 tjedana, na starije pacijente koji već unose 5 porcija voća i povrća na dan. Plazmatske vrijednosti oxLDL-a i MDA ispitivane skupine smanjile su

se za 11% i 3%, a uočene su i niže razine urinarnih biomarkera oksidativnog stresa (8-hidroksi-2'-deoksigvanozin i 8-hidroksigvanozin). Zdravim ispitanicima su Bacchetti i suradnici (2015.) prehranu nadopunili s 250 g ječmeno povrtna juhe (40% ječma, 60% pigmentiranog povrća) u periodu od 12 tjedana. Dobiveni podaci prikazali su sniženje markera lipidne peroksidacije u plazmi i značajno povećanje ukupnog ORAC antioksidativnog potencijala plazme. Razne studije provedene su i na pacijentima s određenim zdravstvenim tegobama, pa tako imamo studiju Barati Boldaji i suradnika (2019.) s ispitanicima na hemodijalizi. Pacijenti su dobivali 100 mL soka od nara tri puta tjedno nakon svake hemodijalize. Poslije prvih 8 tjedana konzumacije soka uslijedila je pauza od 4 tjedna, a nakon drugih 8 tjedana izmjerena je niža koncentracija serumskog MDA te veća vrijednost ukupnog antioksidativnog kapaciteta naspram početka studije. Rezultati ovog diplomskog rada u skladu su s prethodno navedenim studijama koje su pokazale da je unos voća i povrća povezan s nižim razinama oksidativnog stresa i jačim antioksidativnim odgovorom organizma.

Pretilost, koju karakterizira povećanje tjelesne težine s prekomjernim nakupljanjem masti, može inducirati sistemski oksidativni stres i, ukoliko potraje, može smanjiti aktivnost antioksidativnih enzima. WHO definira prekomjernu tjelesnu težinu kao indeks tjelesne mase od 25,0 do 29,9 kg/m<sup>2</sup>, a pretilost kao ITM  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup> (Fernández-Sánchez i suradnici, 2011). Eksperimentalni dokazi sugeriraju da su izvori oksidativnog stresa brojni, a uključuju hiperglikemiju, hiperleptinemiju, povećanu stopu stvaranja slobodnih radikala, neadekvatnu antioksidativnu obranu, povećanu razinu mišićnih lipida, povećanu mišićnu aktivnost, promjenu mitohondrijske funkcije, endotelnu disfunkciju i kroničnu upalu (Di Domenico i sur, 2019). U studiji Tabur i suradnici (2010.) uspoređene su serumske TAC i OSI vrijednosti pretilih pacijenata (ITM  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) s kontrolnom skupinom (ITM  $\leq$  25 kg/m<sup>2</sup>) te su dobivene TAC vrijednosti bile niže kod pretilih ispitanika, a OSI vrijednosti više naspram kontrolne skupine. Dokazana je i negativna korelacija TAC s ITM te pozitivna korelacija OSI s ITM ispitanika. Chrysohoou i suradnici (2007.) sličnu su studiju proveli na puno većem broju zdravih ispitanika (preko 3000) i također uočili korelaciju indeksa tjelesne mase s koncentracijom TAC. Dobiveni rezultati serumske TAC vrijednosti bili su 6% niži u skupini pretilih muškaraca te čak 10% niži u skupini pretilih žena u usporedbi s rezultatima kontrolne skupine. Nakupljanje masti igra ključnu ulogu u patogenezi sistemskog oksidativnog stresa već od pedijatrijske dobi, što je vidljivo u studiji Faienza i suradnici (2012.). Nakon usporedbe s kontrolnom skupinom, djeca i adolescenti u pretiloj skupini imali su veći dROM (diacron reactive oxygen metabolites) koji je bio u izravnoj korelaciji s ITM te niži BAP (biological

antioxidant potential) u inverznoj korelaciji s ITM. Izmjerene vrijednosti biomarkera oksidativnog stresa pokazuju da je pretilost neovisni čimbenik rizika za peroksidaciju lipida u djece i adolescenata. Olusi je u studiji (2002.), osim izravne povezanosti indeksa tjelesne mase i koncentracije MDA u plazmi, dokazao i da trajanje pretilosti ima značajan utjecaj na aktivnost antioksidativnih enzima koja posljedično dovodi do njihovog iscrpljivanja. Skupini pretilih ispitanika izmjerene su niže aktivnosti eritrocitne bakar-cink superoksid dismutaze te glutation peroksidaze u usporedbi s kontrolnom skupinom, a vrijednosti enzimskih aktivnosti bile inverzno povezane s indeksom tjelesne mase. U ovom radu uspoređene su serumske vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala ispitanica prekomjerne tjelesne mase ( $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) s vrijednostima ispitanica normalne tjelesne mase ( $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ ) te proturječno navedenim studijama, nije postojala statistički značajna razlika između skupina. Mogući razlozi su premalen broj pacijentica uključenih u studiju ( $n=3$ ) te usporedba pacijentica normalne tjelesne težine s onima prekomjerne tjelesne težine ( $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), a ne pretilim pacijenticama ( $ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ).

Suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, u ovom radu, nije dovela do povećanja antioksidativnog potencijala seruma. Statistički je utvrđeno da su promjene ORAC vrijednosti nakon suplementacije bile jednake u ispitivanoj i kontrolnoj skupini. Mogući uzroci ovih rezultata su promatranje samo jednog parametra oksidativnog stresa, režim doziranja te mala ispitivana skupina. Iako brojne *in vitro* studije dokazuju antioksidativni učinak  $\alpha$ -lipoične kiseline, *in vivo* ispitivanja zasad daju razne rezultate ovisno o provedbi same studije. Marangon i suradnici (1999.) uvidjeli su da 600 mg ALA dnevno kroz 2 mjeseca snižava vrijednosti urinarnog F2-izoprostana i biomarkere lipidne peroksidacije u zdravih ispitanika. Studija Bobe i suradnika (2020.), provedena na pacijentima s prekomjernim ITM-om i povišenim trigliceridima, izmjerila je veću ekspresiju antioksidativnih gena te niže urinarne razine F2-izoprostana nakon uzimanja 600 mg R-ALA dnevno u periodu od 6 mjeseci. Također, 600 mg ALA dnevno kroz 3 mjeseca dovelo je do statistički značajnog porasta serumske SOD aktivnosti u pacijenata sa starosnom makularnom degeneracijom, prema studiji Sun i suradnici (2012.). Intravenska primjena 600 mg ALA kroz 5 dana ispitana je u studiji Li i suradnici (2013.), a uočene su značajno niže razine biomarkera oksidativnog stresa i njihova međusobna korelacija (8-izoprostaglandin F2 $\alpha$ , aldehid dehidrogenaza 2). U novijoj studiji Sun i suradnika (2017.), dvotjedna intravenska primjena 600 mg ALA kod dijabetičkih bolesnika dovela je do značajnog smanjenja MDA te povećanja SOD u ispitivanoj skupini. Rezultati nekih istraživanja, poput ovog diplomskog rada, ne dokazuju *in vivo* antioksidativni utjecaj  $\alpha$ -lipoične

kiseline. Studija Baumgartner i suradnici (2017.) ispitala je utjecaj 600 mg ALA dnevno kroz 3 četverotjedna perioda (s četverotjednim pauzama između svakog perioda) kod pacijenata s diabetes mellitusom tip 2 ili s poremećenom tolerancijom glukoze te uočila da nije došlo do značajnih promjena MDA, TEAC antioksidativnog kapaciteta i drugih parametara oksidativnog stresa. Ahmadi i suradnici (2013.) također su uočili da 600 mg ALA dnevno kroz 2 mjeseca nema utjecaja na biomarkere lipidne peroksidacije kod pacijenata na hemodijalizi. Sukladno navedenom, rezultati dobiveni u istraživanju ovog diplomskog rada, u skladu su s nekim dosadašnjim istraživanjima. Kako bi se točnije utvrdio antioksidativni utjecaj  $\alpha$ -lipoične kiseline, potrebno je provesti još studija koje bi uključivale promjene u dozi, načinu primjene i trajanju suplementacije. Klinička istraživanja dokazala su da čak 2400 mg ALA dnevno nema prijavljenih nuspojava u odnosu na placebo te da je sigurna suplementacija 1800 mg ALA dnevno u periodu od 6 mjeseci (Shay i sur., 2009).



## 5. ZAKLJUČAK

- Utjecaj parametara životnog stila na antioksidativni potencijal seruma ispitanica:
  - Pušenje ne utječe značajno na antioksidativni potencijal seruma ispitanica ispitan ORAC metodom (5253 mg TE/L (pušači) i 4976 mg TE/L (nepušači);  $p=0,6976$ ).
  - Antioksidativni potencijal seruma bio je usporediv kod pacijentica s normalnim ( $ITM < 25 \text{ kg/m}^2$ ) i prekomjernim ( $ITM \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) indeksom tjelesne mase (5165 mg TE/L i 5245 mg TE/L;  $p=0,8314$ ).
  - Iako je brojnim studijama dokazano da pušenje i indeks tjelesne mase mogu značajno utjecati na parametre oksidacijskog stresa, to ovom studijom nije pokazano. Uzrok navedenome su premali broj ispitanica te činjenica da je studiji korištena samo jedna *in vitro* metoda za praćenje oksidativnog stresa.
  - Unos voća i povrća prehranom značajno utječe na antioksidativni potencijal seruma ispitanica praćen ORAC metodom (ispitanice u prvom kvartilu unosa 5169 mg TE/L, a ispitanice u četvrtom kvartilu unosa 4931 mg TE/L;  $p=0,0059$ ). Navedeni podaci su u skladu sa zaključcima istraživanja drugih autora.
- Utjecaj suplementacije ALA na antioksidativni potencijal seruma ispitanica praćen ORAC metodom:
  - Kontrolna i ispitivana skupina pacijentica međusobno se nisu razlikovale s obzirom na parametre životnog stila, dob, ITM ili obrasce prehrane što ukazuje na kvalitetnu randomizaciju.
  - Suplementacija ALA nije značajno utjecala na antioksidativni potencijal seruma pacijentica – ni u kontrolnoj ni u tretiranoj skupini nisu primijećene statistički značajne razlike ORAC vrijednosti prije i nakon suplementacije.
  - Broj studija koje se bave istraživanjem učinkovitosti ALA u prevenciji oksidativnog stresa vrlo je ograničen. Neke studije su pokazale značajan učinak, a druge ne, ovisno o režimu doziranja i promatranom parametru oksidativnog stresa.

## 6. LITERATURA

Ahmadi A, Mazooji N, Roozbeh J, Mazloom Z, Hasanzade J. Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 2013, 7(6), 461.

Aschner JL, Aschner M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular aspects of medicine*, 2005, 26(4-5), 353-362.

Bacchetti T, Turco I, Urbano A, Morresi C, Ferretti G. Relationship of fruit and vegetable intake to dietary antioxidant capacity and markers of oxidative stress: A sex-related study. *Nutrition*, 2019, 61, 164-172.

Bacchetti T, Tullii D, Masciangelo S, Gesuita R, Skrami E, Brugè F, Silvestri S, Orlando P, Tiano L, Ferretti G. Effect of a barley-vegetable soup on plasma carotenoids and biomarkers of cardiovascular disease. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2015, 57(1), 66-73.

Barati Boldaji R, Akhlaghi M, Sagheb MM, Esmaeilinezhad Z. Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: A randomized crossover trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(2), 846-854.

Baumgartner S, Mensink RP, Haenen GR, Bast A, Binder CJ, Bekers O, Plat J. The effects of vitamin E or lipoic acid supplementation on oxyphytosterols in subjects with elevated oxidative stress: a randomized trial. *Scientific reports*, 2017, 7(1), 1-9.

Beschasnyi S, Hasiuk O, Shakhman N, Sheldahayeva H. Oxidative stress in athletes after occasional smoking. *Journal of Physical Education and Sport*, 2021, 21(2), 942-947.

Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1997, 29(3), 315-331.

Bobé G, Michels AJ, Zhang WJ, Purnell JQ, Woffendin C, Pereira C, Hagen TM. A randomized controlled trial of long-term (r)- $\alpha$ -lipoic acid supplementation promotes weight loss in overweight or obese adults without altering baseline elevated plasma triglyceride concentrations. *The Journal of nutrition*, 2020, 150(9), 2336-2345.

Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 2008, 585(2-3), 325-337.

Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2016, 35, 107-115.

Brüne B, Zhou J, Von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney international*, 2003, 63, S22-S24.

Çakatay U. Pro-oxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Medical hypotheses*, 2006, 66(1), 110-117.

Caliri AW, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2021, 787, 108365.

Chai SC, Davis K, Zhang Z, Zha L, Kirschner KF. Effects of tart cherry juice on biomarkers of inflammation and oxidative stress in older adults. *Nutrients*, 2019, 11(2), 228.

Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas I, Papademetriou L, Economou M, Stefanadis C. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2007, 17(8), 590-597.

Dai J, Jones DP, Goldberg J, Ziegler TR, Bostick RM, Wilson PW, Vaccarino V. Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress. *The American journal of clinical nutrition*, 2008, 88(5), 1364-1370.

Di Domenico M., Pinto F, Quagliuolo L, Contaldo M, Settembre G, Romano A, Coppola M, Ferati K, Bexheri-Ferati A, Sciarra A, Nicoletti GF, Ferraro GA, Boccellino M. The role of oxidative stress and hormones in controlling obesity. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10, 540.

Egbuna C, Ifemeje JC. Oxidative stress and nutrition. *Tropical Journal of Applied Natural Sciences*, 2017, 2(1), 110-116.

Elsayed NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutrition Research*, 2001, 21(3), 551-567.

Faienza MF, Francavilla R, Goffredo R, Ventura A, Marzano F, Panzarino G, Marinelli G, Cavallo L, Di Bitonto G. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Hormone research in paediatrics*, 2012, 78(3), 158-164.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International journal of molecular sciences*, 2011, 12(5), 3117-3132.

Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Ghezzi P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 2015, 23(14), 1144-1170.

Gibson RS, Wawer AA, Fairweather-Tait SJ, Hurst R, Young SD, Broadley MR, Siyame EW. Dietary iron intakes based on food composition data may underestimate the contribution of potentially exchangeable contaminant iron from soil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 40, 19-23.

Gleiter CH, Schug BS, Hermann R, Elze M, Blume HH, Gundert-Remy U. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. *European journal of clinical pharmacology*, 1996, 50(6), 513-514.

Golbidi S, Badran M, Laher I. Diabetes and alpha lipoic acid. *Frontiers in pharmacology*, 2011, 2, 69.

Gomes MB, Negrato CA. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetology & metabolic syndrome*, 2014, 6(1), 1-18.

Harding SV, Rideout TC, Jones PJ. Evidence for using alpha-lipoic acid in reducing lipoprotein and inflammatory related atherosclerotic risk. *Journal of Dietary Supplements*, 2012, 9(2), 116-127.

Ho E, Galougahi KK, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox biology*, 2013, 1(1), 483-491.

Holt EM, Steffen LM, Moran A, Basu S, Steinberger J, Ross JA, Sinaiko AR. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *Journal of the American Dietetic Association*, 2009, 109(3), 414-421.

Islam MT. Antioxidant activities of dithiol alpha-lipoic acid. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 2009, 8(3), 46-51.

Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. Uptake, recycling, and antioxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(1), 83-93.

Karademirci M, Kutlu R, Kilinc I. Relationship between smoking and total antioxidant status, total oxidant status, oxidative stress index, vit C, vit E. *The clinical respiratory journal*, 2018, 12(6), 2006-2012.

Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 2015, 15(1), 1-22.

Li RJ, Ji WQ, Pang JJ, Wang JL, Chen YG, Zhang Y. Alpha-lipoic acid ameliorates oxidative stress by increasing aldehyde dehydrogenase-2 activity in patients with acute coronary syndrome. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 2013, 229(1), 45-51.

Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 2018, 13, 757.

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

Luisi MLE, Lucarini L, Biffi B, Rafanelli E, Pietramellara G, Durante M, Vidali S, Provensi G, Madaia S, Gheri CF, Masini E, Ceccherini MT. Effect of Mediterranean diet enriched in high quality extra virgin olive oil on oxidative stress, inflammation and gut microbiota in obese and normal weight adult subjects. *Frontiers in pharmacology*, 2019, 10, 1366.

Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effect of  $\alpha$ -lipoic acid and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27(9-10), 1114-1121.

Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *International journal of obesity*, 2002, 26(9), 1159-1164.

Ozguner F, Koyu A, Cesur G. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicology and Industrial Health*, 2005, 21(10), 21-26.

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

Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2009, 2(5), 270-278.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Bitto A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.

Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods1. *Free radical biology and medicine*, 1999, 27(11-12), 1173-1181.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.

Rayman MP. The importance of selenium to human health. *The lancet*, 2000, 356(9225), 233-241.

Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation*, 2002, 106(20), 2530-2532.

Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K, Yang GM, Cho SG. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(7), 1544.

Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tümer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, Sharifi-Rad J. Insights on the use of  $\alpha$ -lipoic acid for therapeutic purposes. *Biomolecules*, 2019, 9(8), 356.

Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 2015, 18, 757-781.

Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, Sharifi-Rad J. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in physiology*, 2020, 11, 694.

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

Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of nutrition*, 2005, 135(5), 969-972.

Sun YD, Dong YD, Fan R, Zhai LL, Bai YL, Jia LH. Effect of (R)- $\alpha$ -lipoic acid supplementation on serum lipids and antioxidative ability in patients with age-related macular degeneration. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2012, 60(4), 293-297.

Sun H, Yao W, Tang Y, Zhuang W, Wu D, Huang S, Sheng H. Urinary exosomes as a novel biomarker for evaluation of  $\alpha$ -lipoic acid's protective effect in early diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2017, 31(6), e22129.

Tabur S, Torun AN, Sabuncu T, Turan MN, Celik H, Ocak AR, Aksoy N. Non-diabetic metabolic syndrome and obesity do not affect serum paraoxonase and arylesterase activities but do affect oxidative stress and inflammation. *European journal of endocrinology*, 2010, 162(3), 535.

Uchida R, Okamoto H, Ikuta N, Terao K, Hirota T. Enantioselective pharmacokinetics of  $\alpha$ -lipoic acid in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9), 22781-22794.

Vetrani C, Costabile G, Di Marino L, Rivellesse AA. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *International journal of food sciences and nutrition*, 2013, 64(3), 312-326.

Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian journal of sports medicine*, 2015, 6(1).

Young AJ, Lowe GL. Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants*, 2018, 7(2), 28.

Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food chemistry*, 2009, 114(1), 310-316.



## 7. SAŽETAK

Podlogu brojnih kroničnih bolesti čini oksidativni stres, odnosno stanje neravnoteže između stvaranja slobodnih radikala (oksidansa) i antioksidativne obrane organizma u korist oksidansa. Stoga je adekvatan unos egzogenih antioksidansa važan doprinos prevenciji i/ili liječenju bolesti povezanih s oksidativnim stresom.  $\alpha$ -lipoična kiselina (ALA) je zbog svojih višestrukih bioloških uloga (neutralizacija slobodnih radikala, regeneracija endogenih antioksidansa, popravak oksidiranih oštećenja, kelacija metala, itd.) i dobre raspodjele u organizmu moćan antioksidans. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na ukupni antioksidativni potencijal seruma pacijentica s dijagnozom cervikalne intraepitelne neuroplazije. Istraživanje je provedeno kao dvostruko-slijepa placebo kontrolirana studija u kojoj su pacijentice kroz period od 3 mjeseca dnevno suplementirane sa 600 mg ALA. Modificiranom ORAC metodom izmjeren je antioksidativni potencijal seruma te uspoređen utjecaj određenih parametara životnog stila i prehrambenih navika pacijentica. Uočeno je da unos voća i povrća (3 ili više porcija dnevno) prehranom značajno povećava antioksidativni potencijal seruma pacijentica. Suprotno tome, nije uočena razlika antioksidativnog potencijala seruma pacijentica s obzirom na pušenje i indeks tjelesne mase. Suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom nije značajno utjecala na vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala. Trenutno je dostupan vrlo ograničen broj znanstvenih studija koje pokazuju oprečne rezultate vezano uz učinkovitost ALA u prevenciji oksidativnog stresa te je u tom kontekstu potrebno provesti dodatna istraživanja.

## SUMMARY

The basis of many chronic diseases is oxidative stress; that is, a state of imbalance between the creation of free radicals (oxidants) and the body's antioxidant defense, in favor of oxidants. Therefore, optimizing the intake of antioxidants is crucial in the context of prevention and/or treatment of oxidative stress-related diseases.  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) is a powerful antioxidant due to its multiple biological roles (neutralization of free radicals, regeneration of endogenous antioxidants, repair of oxidized damage, metal chelation, etc.) and adequate distribution in the body. The aim of this thesis was to examine the influence of supplementation with  $\alpha$ -lipoic acid on the total antioxidant potential in the serum of patients diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. The research was conducted as a double-blind placebo-controlled study in which patients were supplemented with 600 mg of ALA daily for a period of 3 months. Using the modified ORAC method, the antioxidant potential of serum was measured and the influence of certain parameters of the lifestyle and eating habits of the patients was compared. It was observed that the intake of fruits and vegetables (3 or more portions per day) significantly increased the antioxidant potential of female patients. On the contrary, no difference was observed in the antioxidant potential of female patients related to smoking and body mass index. Supplementation with  $\alpha$ -lipoic acid did not significantly affect the ORAC serum values. The effectiveness of ALA in the prevention of oxidative stress has not been properly investigated and the number of available studies is limited. Therefore, further research is needed in order to get better insight into antioxidant efficiency of ALA.

## 8. 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 ispredodgovora, 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:

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> osnovna škola             | <input type="checkbox"/> fakultet, prvostupnik      |
| <input type="checkbox"/> 3-godišnja srednja škola  | <input type="checkbox"/> fakultet, magistar struke  |
| <input type="checkbox"/> 4-godišnja srednja škola  | <input type="checkbox"/> magistar / doktor znanosti |
| <input type="checkbox"/> viša škola (veleučilište) | <input type="checkbox"/> ostalo _____               |

6. Broj osoba u domaćinstvu:

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

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

8. Da li bolujete od neke bolesti?            DA            NE

9. Da li redovito uzimate

lijekove?    DA            NE

Ako da, koje? \_\_\_\_\_

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

Ako da, na koju? \_\_\_\_\_

11. Da li pušite?            DA            NE

Ako da, koliko dnevno? \_\_\_\_\_

**12. Da li konzumirate alkohol? DA NE**

Ako da, koliko tjedno? \_\_\_\_\_

**13. Da li se bavite tjelesnom**

**aktivnosti? DA NE**

Ako da, kojom? \_\_\_\_\_

Koliko puta tjedno? \_\_\_\_\_

Koliko prosječno traje? \_\_\_\_\_

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

Ako da, koji? \_\_\_\_\_

Koliko dugo slijedite taj način prehrane? \_\_\_\_\_

Zašto ste se odlučili za alternativan način prehrane?  
\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

**18. Koliko često sami pripremate svoje obroke?**

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

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

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

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

\_\_\_\_\_ čajnih žličica

**21. Na koji način najčešće konzumirate doručak radnim danom? (1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)**

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

**22. Na koji način najčešće konzumirate ručak radnim danom? (1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)**

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

**23.** Na koji način najčešće konzumirate večeru radnim danom?  
(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

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

**24.** Na koji način najčešće konzumirate doručak vikendom?  
(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

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

**25.** Na koji način najčešće konzumirate ručak vikendom?  
(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

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

**26.** Na koji način najčešće konzumirate večeru vikendom?  
(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

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

**27.** Kojom brzinom najčešće konzumirate obroke (u prosjeku)?  
(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

a) vrlo brzo (unutar 10 minuta)	1	2	3
b) brzo (10 – 20 minuta)	1	2	3



c) umjereno brzo (20 – 30 minuta)	1	2	3
d) sporo (preko 30 minuta)	1	2	3

**28.** Koliko obroka najčešće konzumirate dnevno?  
(1 = rijetko ili nikad, 2 = srednje često, umjereno 3 = najčešće)

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

**29.** Koliko redovito konzumirate doručak?

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

**30.** Koliko redovito konzumirate ručak?

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

**31.** Koliko redovito konzumirate večeru?

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

## ANTROPOMETRIJSKA MJERENJA

**32.** Tjelesna masa (kg): \_\_\_\_\_

**33.** Tjelesna visina (cm): \_\_\_\_\_

## PREHRAMBENI UPITNIK

U posljednji mjesec dana koliko često ste konzumirali sljedeće namirnice?

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
<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							
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							
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, mozzarella, parmezan)						
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						
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 dugo? \_\_\_\_\_

Koliko često (tjedno)? \_\_\_\_\_

U kojoj dozi? \_\_\_\_\_



Odaberite uobičajenu veličinu serviranja za 1 obrok:

142. ŽITARICE:



A) 35 g

B) 85g

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

143. KUKURUZNA KRUPICA



A) 100 g

B) 200 g

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

144. TJESTENINA/RIŽA



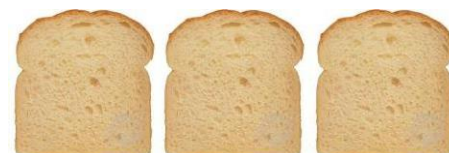
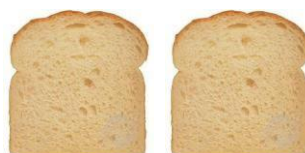
A) 100 g

B) 200 g

C) 350 g

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

145. KRUH



A) 40 g

B) 80 g

C) 120 g

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

146.

**LISNATA TIJESTA / PEKARSKI PROIZVODI**



A) 50 g



B) 120 g



C) 300 g

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

147.

**JEČAM / PROSO / HELJDA**



A) 100 g



B) 200 g

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

148.

**KOKICE**



A) 100 g



B) 200 g



C) 350 g

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

1) ¼ paketa (125 ml)

B) ½ paketa (250 ml)

C) 1 pakiranje (500 ml)

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

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

A) ¼ konzerve (125 g)

B) ½ konzerve (250 g)

C) 1 konzerva (500 g)

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

160. KUPUS



A (100 g)

B (200 g)

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

161. KRUMPIR



A) 150 g

B) 300 g

C) 500 g

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

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

A) 1 komad B) 2 komada C) \_\_\_\_\_ komada

163. JABUKE, KRUŠKE

A) 1 komad B) 2 komada C) \_\_\_\_\_ komada

164. BANANE

A) 1 komad B) 2 komada C) \_\_\_\_\_ komada

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

A) 1/2 šalice B) 1 šalice C) 1 1/2 šalice D) 2 šalice E) \_\_\_\_\_ šalice

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

A) 1/2 šalice B) 1 šalice C) 1 1/2 šalice D) 2 šalice E) \_\_\_\_\_ šalice

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

A) 1/2 šalice B) 1 šalice C) 1 1/2 šalice D) 2 šalice E) \_\_\_\_\_ šalice

168. ANANAS, SVJEŽI

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

169. KONZERVIRANO VOĆE (ananas, marelice)

A) 1/4 konzerve B) 1/2 konzerve C) 1 konzerva D) ostalo \_\_\_\_\_

**170. SUHE ŠLJIVE, SUHE SMOKVE**

A) 2-3 komada B) 10 komada C) ostalo \_\_\_\_\_

**171. ORAŠASTI PLODOVI (bademi, orasi, lješnjaci)**

A) 2-3 komada B) 10 komada C) ostalo \_\_\_\_\_

**172. LUBENICA, DINJA**

A) 1 kriška B) 2 kriške C) 3 kriške D) ½ komada E) ostalo \_\_\_\_\_

**173. BOB, GRAH, GRAŠAK**



A) 50 g

B) 125 g

C) 200 g)

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

**174. MAHUNE**



A) 50 g

B) 125 g

C) 200 g

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



175. MESO, PERAD, RIBA, IZNUTRICE



A) 100 g

B) 200 g

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

176. RAKOVI, ŠKOLJKE



A) 100 g

B) 200 g

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

177. MESNI NARESCI



A) 20 g

B) 75 g

C) 125 g

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



178. HRENOVKE, KOBASICE

- A) 1 hrenovka/kobasica                      B) 2 hrenovke/kobasice  
C) \_\_\_\_\_ hrenovke/kobasice

179. JAJA

- A) 1 komad                      B) 2 komada                      C) 3 komada  
D) \_\_\_\_\_ komada

180. MLJEKO, 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 žličica                                  B) 2 čajne žličice                                  C) \_\_\_\_\_ čajnih žličica

**190. ČAJ (u vrećicama)**

A) 1 vrećica                                  B) 2 vrećice                                  C) \_\_\_\_\_ vrećica

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

A) 1 čaša (2,5 dl)                                  B) 2 čaše (500 ml)                                  C) \_\_\_\_\_

**192. IZOTONIČNI NAPITAK**

A) ½ boce (2,5 dl)                                  B) 1 boca (500 ml)                                  C) \_\_\_\_\_

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za kemiju prehrane  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### UTJECAJ OBRAZACA PREHRANE I SUPLEMENTACIJE $\alpha$ -LIPOIČNOM KISELINOM NA ORAC ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET SERUMA

Ivana Drašković

#### SAŽETAK

Podlogu brojnih kroničnih bolesti čini oksidativni stres, odnosno stanje neravnoteže između stvaranja slobodnih radikala (oksidansa) i antioksidativne obrane organizma u korist oksidansa. Stoga je adekvatan unos egzogenih antioksidansa važan doprinos prevenciji i/ili liječenju bolesti povezanih s oksidativnim stresom.  $\alpha$ -lipoična kiselina (ALA) je zbog svojih višestrukih bioloških uloga (neutralizacija slobodnih radikala, regeneracija endogenih antioksidansa, popravak oksidiranih oštećenja, kelacija metala, itd.) i dobre raspodjele u organizmu moćan antioksidans. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na ukupni antioksidativni potencijal seruma pacijentica s dijagnozom cervikalne intraepitelne neuroplazije. Istraživanje je provedeno kao dvostruko-slijepa placebom kontrolirana studija u kojoj su pacijentice kroz period od 3 mjeseca dnevno suplementirane sa 600 mg ALA. Modificiranom ORAC metodom izmjeren je antioksidativni potencijal seruma te uspoređen utjecaj određenih parametara životnog stila i prehranbenih navika pacijentica. Uočeno je da unos voća i povrća (3 ili više porcija dnevno) prehranom značajno povećava antioksidativni potencijal seruma pacijentica. Suprotno tome, nije uočena razlika antioksidativnog potencijala seruma pacijentica s obzirom na pušenje i indeks tjelesne mase. Suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom nije značajno utjecala na vrijednosti ORAC antioksidativnog potencijala. Trenutno je dostupan vrlo ograničen broj znanstvenih studija koje pokazuju oprečne rezultate vezano uz učinkovitost ALA u prevenciji oksidativnog stresa te je u tom kontekstu potrebno provesti dodatna istraživanja.

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

Rad sadrži: 70 stranica, 14 grafičkih prikaza, 1 tablica i 63 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: oksidativni stres, antioksidans, antioksidativni kapacitet,  $\alpha$ -lipoična kiselina

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

Rad prihvaćen: srpanj 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

### THE INFLUENCE OF DIETARY PATTERNS AND ALPHA LIPOIC SUPPLEMENTATION ON ORAC ANTIOXIDATIVE CAPACITY OF SERUM

Ivana Drašković

#### SUMMARY

The basis of many chronic diseases is oxidative stress; that is, a state of imbalance between the creation of free radicals (oxidants) and the body's antioxidant defense, in favor of oxidants. Therefore, optimizing the intake of antioxidants is crucial in the context of prevention and/or treatment of oxidative stress-related diseases.  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) is a powerful antioxidant due to its multiple biological roles (neutralization of free radicals, regeneration of endogenous antioxidants, repair of oxidized damage, metal chelation, etc.) and adequate distribution in the body. The aim of this thesis was to examine the influence of supplementation with  $\alpha$ -lipoic acid on the total antioxidant potential in the serum of patients diagnosed with cervical intraepithelial neoplasia. The research was conducted as a double-blind placebo-controlled study in which patients were supplemented with 600 mg of ALA daily for a period of 3 months. Using the modified ORAC method, the antioxidant potential of serum was measured and the influence of certain parameters of the lifestyle and eating habits of the patients was compared. It was observed that the intake of fruits and vegetables (3 or more portions per day) significantly increased the antioxidant potential of female patients. On the contrary, no difference was observed in the antioxidant potential of female patients related to smoking and body mass index. Supplementation with  $\alpha$ -lipoic acid did not significantly affect the ORAC serum values. The effectiveness of ALA in the prevention of oxidative stress has not been properly investigated and the number of available studies is limited. Therefore, further research is needed in order to get better insight into antioxidant efficiency of ALA.

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

Thesis includes: 70 pages, 14 figures, 1 tables and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: oxidative stress, antioxidant, antioxidant capacity, alpha lipoic acid

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Full 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

**Kristina Radić, Ph.D.** *Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.