

# Utjecaj suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na reduktivni potencijal plazme i aktivnost superoksid dismutaze

---

Zonjić, Iva

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:163:960969>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

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



**Iva Zonjić**

**Utjecaj suplementacije alfa lipoičnom kiselinom  
na reduktivni potencijal plazme i aktivnost  
superoksid dismutaze**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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

Želim se zahvaliti svojoj mentorici, prof.dr.sc. Dubravki Vitali Čepo na posvećenom vremenu i stručnim savjetima kojima je pomogla pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistenticama Zavoda za kemiju prehrane na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Posebno se želim zahvaliti roditeljima, sestri i baki na beskrajnoj potpori, razumijevanju i strpljenju. Kolegama, prijateljima i dečku veliko hvala na pomoći i podršci koju su mi pružali tijekom studija.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Oksidativni stres.....	1
1.2. Biomarkeri oksidativnog stresa.....	1
1.3. Oksidativni stres i prehrana.....	6
1.4. Alfa lipoična kiselina kao antioksidans.....	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. Ispitanici.....	12
3.2. FRAP reduktivni potencijal plazme.....	12
3.2.1. Kemikalije.....	13
3.2.2. Instrumenti i pribor.....	13
3.2.3. Priprema reagensa.....	13
3.2.4. Postupak.....	14
3.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	15
3.3.1. Kemikalije.....	15
3.3.2. Instrumenti i pribor.....	16
3.3.3. Priprema reagensa.....	16
3.3.4. Postupak.....	16
3.4. Statistička analiza.....	18
4. REZULTATI.....	19
4.1 Karakteristike kontrolne i ispitivane skupine.....	19
4.2. FRAP seruma i aktivnost SOD-a prije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom.....	21
4.3. Utjecaj pušenja, unosa dodataka prehrani, pretilosti i unosa povrća na FRAP seruma i aktivnost SOD-a.....	23
4.4. Utjecaj suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na FRAP seruma i aktivnost SOD-a...24	
5. RASPRAVA.....	26
6. ZAKLJUČCI .....	29
7. LITERATURA .....	30
8. SAŽETAK/SUMMARY .....	33

# 1. UVOD

## 1.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje neravnoteže između stvaranja i uklanjanja slobodnih radikala u organizmu (Vetrani i sur., 2013). U normalnom procesu metabolizma dolazi do kontinuiranog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) koji mogu nastati enzimatskim ili neenzimatskim reakcijama u stanici, a najvećim dijelom nastaju u mitohondriju. Do neravnoteže može doći zbog povećane količine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), kao što su superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilni radikal ( $HO^{\cdot}$ ), peroksil radikal ( $ROO^{\cdot}$ ) i alkoksil radikal ( $RO^{\cdot}$ ) i reaktivnih dušikovih spojeva (RNS), npr. dušikovog oksida ( $NO^{\cdot}$ ), dušikovog dioksida ( $NO_2^{\cdot}$ ), peroksinitrata ( $ONOO^-$ ) (Aldini i sur., 2010) ili zbog smanjenog kapaciteta antioksidativnih sustava. Antioksidativni sustavi uključuju neenzimatske molekule poput vitamina A, C, E, glutationa i antioksidansa prisutnih u hrani i enzimatske sustave kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GPX) (Marrocco i sur., 2017). ROS sudjeluju u različitim biološkim procesima poput vazoregulacije i u prijenosu staničnih signala, no njihova povećana količina može oštetiti makromolekule u stanici: lance nezasićenih masnih kiselina u membranama, tiolne grupe u proteinima i dušične baze u DNA (Aldini i sur., 2010). Tvorenje adukata s DNA doprinosi kancerogenoj aktivnosti, a oksidativni stres utječe i na transkripcijske faktore koji vode do ekspresije gena, među kojima su geni za faktor rasta, upalne citokine, kemokine i molekule koje reguliraju stanični ciklus (Vetrani i sur., 2013). Stanje oksidativnog stresa je uključeno u proces starenja i povezano s patogeneom više kroničnih bolesti kod ljudi, poput ateroskleroze, dijabetesa, katarakta, makularne degeneracije i Alzheimerove bolesti (Aldini i sur., 2010).

## 1.2. Biomarkeri oksidativnog stresa

Biomarker je bilo koja tvar, struktura ili proces čija koncentracija ili aktivnost u tijelu ili tjelesnim produktima može utjecati na; ili predviđati pojavnost bolesti (Frijhoff i sur., 2015), a potrebno je da bude osjetljiv i specifičan. U slučajevima u kojima oksidativno oštećenje uzrokuje bolest, biomarkeri pomažu razumjeti patogene mehanizme, procjenu učinkovitosti različitih obrambenih strategija i pronalazak novih potencijalnih meta djelovanja lijekova. Kad je oksidativni stres posljedica bolesti, njegovim mjerenjem možemo predvidjeti početak i

progresiju bolesti. Direktne metode određivanja biomarkera oksidativnog oštećenja mjere produkte oksidacije lipida, proteina ili nukleinskih kiselina, a indirektne metode mjere antioksidativni status analiziranjem endogenih razina enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa i otpornost biološkog matriksa na inducirani oksidativni stres (Aldini i sur., 2010).

ROS i RNS koji nastaju u leukocitima, a inače imaju ulogu u imunološkom odgovoru, možemo mjeriti protočnom citometrijom. U stanju kronične upale ili metaboličkog sindroma oksidirani LDL (oxLDL) aktivira stvaranje ROS i RNS u stanicama imunološkog sustava. Kvantifikacija ROS i RNS je važan biomarker koji odražava proces bolesti. Fluorescentne probe se u stanici hidroliziraju esterazama i oksidiraju u fluorescirajuće produkte u kontaktu s ROS i RNS, kao što su hidroksilni radikal i dušikov dioksid, ali i dvovalentnim željezom u prisutstvu O<sub>2</sub> ili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zbog čega su mogući lažno pozitivni rezultati (Marrocco i sur., 2017).

Polinezasićene masne kiseline (PUFAs) kao što je arahidonska kiselina, zbog nezasićenih dvostrukih veza vrlo su podložne oksidativnom oštećenju, lipidnoj oksidaciji lančanim reakcijama u kojima kao produkti nastaju aldehidi, alkani i alkeni u prisutstvu ROS ili slobodnih radikala. 4-hidroksi-2nonenal (HNE) često se detektira uz pomoć HPLC direktno ili kao derivat, GC-MS kombinacijom ili uz pomoć specifičnih antitijela. Malondialdehid (MDA), alkenali i dialkenali su supstance koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) stvarajući rozi kompleks koji se detektira kolorimetrijski ili fluorimetrijski. Lipidna peroksidacija može biti i posljedica enzimskih reakcija lipooksigenaze i ciklooksigenaze (COX) koje oksidiraju arahidonsku kiselinu u prostaglandine, prostacikline, tromboksane i leukotriene (Marrocco i sur., 2017). Izoprostani su eikozanoidi neenzimatskog porijekla, nastaju oksidacijom fosfolipida kisikovim radikalima. F2 izoprostani izomeri su prostaglandina F2 $\alpha$ , koji nastaje djelovanjem ciklooksigenaze (Sánchez-Moreno i sur., 2003). Dobar su marker oksidativnog stresa jer im koncentracije ne ovise o unosu masnoća prehranom. Mogu se mjeriti u kondenzatu daha, iz tjelesnih tekućina ili u tkivima (u esterificiranom obliku) (Marrocco i sur., 2017). LDL (low density lipoprotein) je nosač kolesterola, esterificiranog kolesterola, triglicerida, fosfolipida, karotenoida i vitamina E i K. Oksidacija LDL-a in vivo i in vitro može biti biomarker oksidativnog stresa, međutim in vitro LDL oksidacija nije pouzdan biomarker jer ne odražava aktivnost hidrofilnih antioksidansa (Aldini i sur., 2010). OxLDL povezan je s aterosklerozom i kardiovaskularnim bolestima, a detektira se specifičnim protutijelima (Marrocco i sur., 2017).

Kao marker DNA oksidacije, odnosno oštećenja DNA najčešće se koristi 7,8 dihidroksi-8-okso-2'deoksigvanozin (8oxodG) koji se može detektirati optimiziranim HPLC/GC-MS metodama ili ELISA metodom koja se temelji na specifičnim antitijelima; zatim eteno-DNA adukti koji se mjere HPLC/MS tehnikama; a za RNA oksidaciju 7,8 dihidroksi-8-oksogvanozin (8oxoGuo) koji je povezan s neurodegenerativnim bolestima i dijabetesom (Marrocco i sur., 2017). Komet metodom mjeri se oštećenje DNA u pojedinoj stanici. Stanice se fiksiraju u tankom agaroznom gelu, liziraju se s visokom koncentracijom soli i deterdžentom čime se uklone membrane i topljivi dijelovi citoplazme i nukleoplazme, a DNA ostane vezana za matriks jezgre. DNA koja je oštećena gubi strukturu superuzvojnice i nakon inkubacije u lužini elektroforezom putuje prema anodi stvarajući „rep kometa“ koji se vizualizira reakcijom s etidij bromidom (Choi i sur., 2004). Put repa se analizira softverom za komet metodu i uspoređi sa stanicama izloženim oksidativnom agensu ( $H_2O_2$ ) (Choi i sur., 2004; Müller i sur., 2010).

Prilikom oksidacije proteina može doći do oksidacije aminokiselina sa sumpornim ostatkom, hidroksilacije aromatskih i alifatskih grupa, nitracije tirozinskih ostataka, nitrozilacije i glutationilacije cisteinskih ostataka, klorinacije aromatskih skupina i primarnih amina i pretvaranja aminokiselinskih ostataka u karbonilne derivate. Također može doći do kidanja polipeptidnog lanca i formiranja poprečno povezanih proteinskih agregata (Marrocco i sur., 2017).

Karbonilni derivati povišeni su kod neurodegenerativnih bolesti, pretilosti ili dijabetesa. ELISA i HPLC su najčešće korištene metode za njihovo utvrđivanje. Karbonilna grupa se derivatizira s 2,4 dinitrofenilhidrazinom (DNPH) i stvara stabilni dinitrofenilni produkt (DNP) koji se može detektirati spektrofotometrijski ili specifičnim antitijelima - ELISA, Western-blotom nakon elektroforeze i uz HPLC. Proteini mogu reagirati i s produktima oksidacije lipida i ugljikohidrata čime nastaju završni produkti peroksidacije (ALE); npr. karboksimetil lizin i završni produkti glikacije (AGE); najčešće karboksimetil lizin, karboksimetil valin i pentozidin. Određuju se imunodetekcijskim metodama i masenom spektrometrijom (MS) (Marrocco i sur., 2017). 3-nitrotirozin nastaje kao glavni produkt oksidacije tirozina, procesa koji se odvija u dva koraka, stvaranjem tirozinskog radikala i zatim reakcijom s dušikovim dioksidom ( $NO_2\cdot$ ). Povišen je u kardiovaskularnim bolestima, astmi, dijabetesu i neurodegenerativnim bolestima starenja. Određuje se kromatografski i ELISA metodom. Napredni produkti oksidacije proteina (AOPP - Advanced Oxidation Protein Products) markeri su kroničnog zatajenja bubrega i upale, a nastaju reakcijom s

kloriranim oksidansima pri čemu nastaju 3-klorotirozin i 2,5 diklorotirozin. Najčešće sadrže disulfidne mostove ili poprečne veze tirozina. Određuju se kolorimetrijskim testom s kloraminskim standardom ili MS (Marrocco i sur., 2017).

Albumin je proteinski nosač u serumu podložan oksidaciji i karbonilaciji koji djeluje kao antioksidativni sustav preko cisteinskih ostataka. Ishemija miokarda (ROS) uzrokuje strukturne promjene na N kraju serumskog albumina, moguće zbog negativne modulacije nakon vezanja masnih kiselina na dva vezna mjesta. To uzrokuje promjenu kapaciteta vezanja metala, poglavito kobalta, što se detektira testom vezanja kobalta (ACB test) (Marrocco i sur., 2017).

ROS-generirajući enzimi i enzimatski antioksidativni sustavi (SOD, CAT, GPX) mijenjaju se u uvjetima povećanog oksidacijskog stresa, što može poslužiti kao indikator redoks stanja u organizmu. Cisteinski ostaci aminokiselina osobito su podložni oksidaciji ROS i RNS. U cirkulaciji se nalaze ROS-generirajući enzimi, ksantin oksidaza (XO) i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza (NOX). XO katalizira oksidaciju hipoksantina i ksantina u mokraćnu kiselinu što stvara superoksid ione, dok u obliku ksantindehidrogenaze (XDH) katalizira istu reakciju, ali troši  $\text{NAD}^+$  te generira NADH. Upala i hipoksični uvjeti potiču ekspresiju XDH u tkivima i vaskularnim endotelnim stanicama i otpuštanje u cirkulaciju. U cirkulaciji se brzo konvertira u XO, veže na površinu endotela i uzrokuje oksidativni stres induciran ksantin oksidazom, koji je povezan s kardiovaskularnim bolestima i dijabetesom. Detektira se određivanjem metabolita. Mokraćna kiselina je važan antioksidans i biomarker u dijabetesu; hvata superoksid radikale i hidroksil radikale, a oksidativni produkt je alantoin, dobar biomarker jer mu je stvaranje neovisno o promjenama u koncentraciji mokraćne kiseline (Marrocco i sur., 2017).

Enzimski antioksidansi eliminiraju oksidirane molekule i imaju ključnu ulogu u održavanju redoks ravnoteže u stanici. U uvjetima oksidativnog stresa može se pojačati njihova ekspresija. Superoksidni anion nastaje u mitohondrijima redukcijom kisika u respiratornom lancu. Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira dismutaciju radikala superoksidnog aniona ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) u molekulu kisika i vodikovog peroksida. Ljudska jetra sadrži relativno visoke količine SOD1, koja sadrži Cu/Zn ione i nalazi se u citoplazmi, lizosomima i jezgri. SOD2 u aktivnom centru ima ion mangana, nalazi se u matriksu mitohondrija, a najveća aktivnost joj je u kori bubrega. SOD3 je ekstracelularan enzim, nalazi se u plazmi i limfi i sadrži ione bakra i cinka. Ima visok afinitet za heparin te funkcionira kao hvatač superoksida i štiti tkiva od vanstaničnih oksidativnih oštećenja (Aldini i sur., 2010). SOD aktivnost može se mjeriti analizirajući inhibiciju brzine redukcije tetrazolne soli sa



superoksidnim ionom generiranim u ksantin i ksantin oksidaza sustavu (Marrocco i sur., 2017). Vodikov peroksid može stvarati reaktivne hidroksilne radikale ( $\text{HO}\cdot$ ) u redoks reakcijama s metalnim ionima. Glutation peroksidaza (GPX) je glikoprotein, katalizira redukciju vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksida u vodu i odgovarajuće alkohole. U aktivnom mjestu sadrži selenocisteinski ostatak. Reducirani monomerni glutacion (GSH) djeluje kao donor vodika i oksidira u glutacion disulfid (GSSG). Enzim glutacion reduktaza uz NADPH ponovno regenerira GSH iz GSSG. NADPH se regenerira iz  $\text{NADP}^+$  tijekom oksidacije glukoze (Aldini i sur., 2010). Pacijenti s hipertenzijom imaju značajno snižene GSH koncentracije u eritrocitima (Pawluk i sur., 2017). GSH se može mjeriti spektrofotometrijskim metodama, HPLC, kapilarnom elektroforezom, NMR i MS. GPX aktivnost se mjeri uz kumen hidroksid i GSH kao supstrate, u reakciji uparenoj s glutacion reduktazom (GR) u prisutnosti NADPH. Oksidacijom NADPH dolazi do pada apsorbancije koja je proporcionalna aktivnosti GPX (Marrocco i sur., 2017).

Reverzibilna S-glutacionilacija proteina može se dogoditi u fiziološkim uvjetima ili u reakciji s GSH pri čemu nastaje miješani disulfid protein-glutacion (PSSG). Mogući razlog te reakcije je sprječavanje ireverzibilne oksidacije u sulfinsku ili sulfonsku kiselinu. PSSG se može reducirati spontano kad je omjer GSH/GSSG visok; ili kataliziran protein-tiol-disulfid oksidoreduktazama kao što su glutaredoksini, protein disulfid izomeraze, tioredoksin, peroksiredoksini i sulfiredoksini. Glutacionilacija hemoglobina mjeri se MS i ELISA tehnikama (Marrocco i sur., 2017).

Katalaza (CAT) je enzim s hemskom prostetnom skupinom koji katalizira pretvorbu  $\text{H}_2\text{O}_2$  u kisik i vodu. Nalazi se najvećim dijelom u peroksisomima i mjeri kolorimetrijski ili spektrofotometrijski (Marrocco i sur., 2017). Povećana ekspresija CAT ima ulogu u spječavanju hipertenzije i normaliziranju ekspresije ACE-2 enzima u Akita miševima (Pawluk i sur., 2017).

Nrf-2, transkripcijski faktor koji regulira ekspresiju preko 250 gena u sustavu antioksidativnog odgovora (ARE), u koji spadaju i glutacion S transferaza, glutacion sintetaza, hem oksigenaza 1 i NADPH oksigenaza, u citoplazmi je vezan s proteinom Keap1 koji uz pomoć cisteinskih ostataka djeluje kao senzor oksidativnog stresa. Nakon oksidacije mijenja konformaciju i otpušta Nrf-2 omogućujući njegovu translokaciju u jezgru. Nrf-2 aktivnost je povećana u tumorskom tkivu, gdje omogućuje otpornost na velike količine ROS koje nastaju tijekom proliferacije ili kemoterapije pa se imunološkim metodama ili RT-PCR određuje kao biomarker u uzorcima tumorskih tkiva. Također, Nrf-2 ima i ulogu u transkripciji nekih ROS-generirajućih i inflamatornih enzima (Marrocco i sur., 2017).

Endogeni neenzimatski antioksidansi su mokraćna kiselina, bilirubin i tioli, dok se egzogeni unose prehranom: tokoferol, askorbinska kiselina, karotenoidi, fenoli, itd. Broj molekula oksidansa koje neutralizira jedna litra tjelesne tekućine zove se enzimatski antioksidativni kapacitet (NEAC), odnosno totalni antioksidativni kapacitet (TAC) (Marrocco i sur., 2017). Njihovo mjerenje temelji se na reakcijama prijenosa vodikovog atoma (HAT); kompetitivnoj reakciji u kojoj se antioksidant i supstrat natječu za termalno generirane peroksil radikale nastale raspadom azo-spojeva (Huang i sur., 2005), a mjera antioksidativnog kapaciteta je inhibicija oksidacije indikatorske tvari (Marrocco i sur., 2017); ili elektron transferu (ET), gdje se antioksidativni kapacitet mjeri redukcijom oksidansa pri čemu dolazi do promjene boje. Promjena boje korelira s koncentracijom antioksidansa. HAT ispitivanja uključuju inhibiciju inducirane autooksidacije LDL-a, ORAC (oxygen radical antioxidant capacity) i TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) i metodu izbjeljivanja krocina (Huang i sur., 2005). TRAP metoda se temelji na zaštitnom djelovanju antioksidansa (lag fazi) tijekom kontrolirane reakcije peroksidacije (Pecorari i sur., 2010). ET ispitivanja uključuju određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom (FCR), ispitivanje antioksidativnog kapaciteta u odnosu na standardni antioksidans Trolox, TEAC (Trolox equivalence antioxidant capacity) i FRAP (ferric ion reducing antioxidant power) (Huang i sur., 2005). Antioksidativni potencijal u FRAP metodi temelji se na sposobnosti ispitivane tvari da reducira Fe<sup>III</sup>-TPTZ (Fe(III) kompleks s 2,4,6 tripiridil-S-triazinom) u Fe<sup>II</sup>-TPTZ, čime dolazi do stvaranja intenzivno plavog obojenja. Mjerenjem apsorbancije uzorka na 593nm i praćenjem promjene u FRAP vrijednosti određuje se antioksidativni potencijal (Duthie i sur., 2006).

### 1.3. Oksidativni stres i prehrana

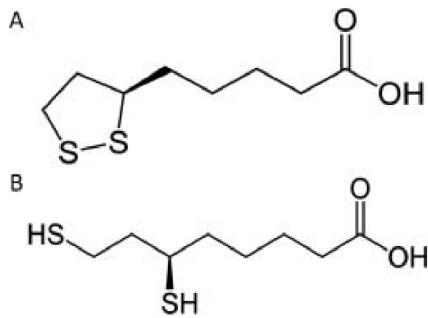
Prehranom unosimo antioksidanse kao što su tokoferoli i askorbat (vitamini E i C), β karoten, GSH, ubikvinole, nutrijente koji su potrebni za funkcioniranje antioksidativnih sustava poput selena, željeza, bakra, cinka, riboflavina i drugih B vitamina, tvari koje imaju djelovanje na oksidativni metabolizam poput karotenoida (lutein, likopen), flavonoida (antocijanini, floretin), flavonola (kvercetin, kempferol), flavanola (katehin, epikatehin), flavanona (hesperetin, eriodictiol), flavona (lutein), izoflavonoida (daidzein, genistein), organosumpornih spojeva (alicin), fenolnih kiselina (kavena kiselina, klorogenska kiselina), polifenola (kurkumin, resveratrol), stilbena (tetrahidroksistilben glukozid) i tanina (elagitanin) (Dennis i sur., 2019). Prehrana može utjecati na antioksidativne mehanizme i intenzitet

oksidativnog oštećenja, što objašnjava ulogu prehrane u razvoju nekih kroničnih bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetes i rak (Vetrani i sur., 2013). Nutritivni oksidativni stres je postprandijalna neravnoteža između antioksidansa i prooksidansa kao posljedica nedovoljnog ili suvišnog unosa nutrijenata. Nakon obroka glukoza i lipidi uzrokuju povećano stvaranje ROS u leukocitima i induciranu upalu zbog viška mikronutrijenata. Takav učinak može imati i unos proteina, ali u manjoj mjeri, a kod pretilih osoba taj učinak je još više izražen (Saha i sur., 2017). Pretilost je povezana s povećanim oksidativnim stresom, tjelesna masa i indeks tjelesne mase (BMI) koreliraju s izoprostanima u urinu i 8-hidroksi 2-deoksigvanozinom (8-OH-dG). Smanjenje mase od 10% dovodi do značajnog smanjenja biomarkera DNA oksidacije (Vetrani i sur., 2013), a kalorijski limit dovodi do smanjenja stvaranja ROS lipidnom peroksidacijom i karboksilacijom proteina (Saha i sur., 2017). Adipociti imaju ulogu u patogenezi raka, povezuju regulatornu mrežu između imuniteta, stresa i staničnog ciklusa putem lipida i ROS koji djeluju kao signalne molekule. Slobodne masne kiseline iz adipoznog tkiva su biomarker za rak jer uzrokuju ili moduliraju imuno-upalni odgovor (Chirumbolo, 2021). Hrana s visokim glikemijskim indeksom povezana je s lipidnom peroksidacijom (MDA i izoprostani) u opservacijskoj studiji, no ne i u eksperimentalnim uvjetima. U opservacijskoj studiji i interventnoj studiji pokazalo se da mononezasićene masne kiseline (MUFA) poboljšavaju oksidaciju lipida i proteina, dok zasićene masne kiseline (SFA) negativno djeluju na OS. Učinak polinezasićenih masnih kiselina nije do kraja razjašnjen. Prehrana bogata voćem i povrćem bogata je vitaminima i njihovim prekursorima, mineralima koji djeluju kao kofaktori, vlaknima koja mogu smanjiti apsorpciju glukoze i fitokemikalijama, te povoljno djeluje na smanjenje OS. Orašasti plodovi, pistacija i badem, maslinovo ulje (ovisno o sadržaju polifenola), zeleni čaj i kakao također smanjuju OS prema nekim istraživanjima. Alkohol povećava oksidativni stres zbog stvaranja slobodnih radikala tijekom svog metabolizma, no crveno vino ovisno o sadržaju polifenola može djelovati povoljno na lipidnu peroksidaciju. Opservacijske studije pokazale su da cjelovite žitarice i mediteranska prehrana djeluju povoljno na smanjenje OS, međutim potrebna su dodatna istraživanja kako bi to dokazali (Vetrani i sur., 2013).

#### 1.4. Alfa lipoična kiselina kao antioksidans

Alfa lipoična kiselina (LA), odnosno 1,2-ditiolan-3-pentanoična kiselina je ditiolni spoj koji se sintetizira u mitohondriju iz oktanoične kiseline. (R)-LA ima ključnu ulogu u metabolizmu energije u mitohondriju kao kofaktor mitohondrijske dehidrogenaze  $\alpha$ -keto kiselina (Shay i

sur., 2009). Kao kofaktor veže se za multienzimske komplekse dehidrogenaza 2-oksokiselina preko lizinskih ostataka, veže acilne grupe i transportira ih s jednog dijela enzimskog kompleksa na drugi. Pri tome se reducira u dihidrolipoičnu kiselinu (DHHLA), koja se reoksidira lipoamid dehidrogenazom uz stvaranje NADH (Biewenga i sur., 1997).



Slika 1. Kemijska struktura (A) alfa lipoične kiseline i (B) dihidrolipoične kiseline

$\alpha$ LA djeluje kao hvatač slobodnih radikala, kelira metale i obnavlja unutarstanične koncentracije glutationa koje se smanjuju starenjem. Koristi se u terapiji prevencije dijabetičkih polineuropatija, a istražuje se i potencijalna primjena u prevenciji vaskularnih bolesti, hipertenzije, Alzheimerove bolesti i upale. LA i DHHLA mogu hvatati hidroksil radikale i hipoklornu kiselinu, hvatanjem hipoklorita mogu spriječiti stvaranje proteinskih karbonila, a LA neutralizira i singletni kisik. LA i DHHLA ne djeluju na vodikov peroksid. DHHLA također regenerira druge endogene antioksidanse kao što su vitamin C i E i neutralizira slobodne radikale bez da sama postane slobodni radikal. LA kompleksira ione bakra, cinka i olova, no ne može kelirati feri ion. DHHLA kompleksira ione cinka, olova, žive i feri ion, tvori kompleks s bakrom i sprječava oksidaciju LDL-a ionom bakra Cu(II) in vitro (Shay i sur., 2009).

U Alzheimerovoj bolesti povišene koncentracije metalnih iona bakra, željeza i cinka u mozgu u reakciji ovisnoj o dobi uzrokuju taloženje peptida i formiranje amiloidnih plakova, a kombinacija beta amiloidnog peptida  $A\beta$  s Cu ili Fe potiče stvaranje vodikovog peroksida iz molekularnog kisika čime nastaje neurotoksični hidroksilni radikal. LA keliranjem smanjuje koncentraciju tih metala. Također, LA povećava proizvodnju acetilkolina (Ach) aktivacijom kolin acetiltransferaze te povećavanjem unosa glukoze u stanice, čime povećava količinu dostupnog acetyl Co-A potrebnog za sintezu Ach. To je bitno jer su poteškoće u učenju i pamćenju kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti uzrokovane disfunkcijom i propadanjem kolinergičnih neurona i smanjenom količinom kolin acetiltransferaze i Ach. LA povećava

prokrvljenost mozga NO posredovanom vazodilatacijom. Hvatanjem ROS povećava količinu reduciranog glutaciona, a hvata i produkte lipidne peroksidacije kao što su hidroksinonenal i akrolein koji su neurotoksični. Antioksidativnim djelovanjem smanjuje redoks osjetljive upalne procese koji su važan dio patogeneze Alzheimerove bolesti. Studije na životinjama pokazale su da bi LA mogla imati pozitivan učinak na Alzheimerovu bolest i oksidativni stres povezan sa starenjem, no potrebna su dodatna istraživanja na ljudima (Holmquist i sur., 2007).

LA preko promjena u redoks statusu tiola u stanici, oksidacijom sulfhidrilnih grupa i stvaranjem miješanih disulfida na proteinima utječe na staničnu signalizaciju. Povećava unutarstanične koncentracije askorbinske kiseline i glutaciona (GSH) koje inače opadaju starenjem na način da povećava apsorpciju iz plazme, a u slučaju GSH i transkripcijski inducirajući *de novo* sintezu. LA može djelovati kao blagi pro-oksidans, formira kompleks s Keap1 proteinom i tako sprječava njegovo vezanje na transkripcijski faktor Nrf2 koji regulira ekspresiju gena GSH čime povećava sintezu GSH. Utječe na redoks status cisteinskih ostataka različitih kinaza i fosfataza čime dolazi do konformacijskih promjena koje ih mogu aktivirati ili deaktivirati. LA aktivira periferanu AMP-aktiviranu protein kinazu (AMPK), koja inducira fosforilaciju supstrata 1 inzulinskog receptora (IRS1) i aktivaciju IRS1/PI3K signalizacije i stimulira GLUT4 translokaciju inaktivacijom Akt supstrata (AS160) neovisno o IRS1/PI3K/Akt signalnoj kaskadi. LA povećava unos glukoze u stanice i smanjuje razinu glukoze u krvi. Pacijenti s dijabetesom tipa 2 primjenom LA pokazali su poboljšanje u odlaganju glukoze i smanjenje simptoma polineuropatije u stopalima i donjim ekstremitetima nakon i.v. doze od 600mg dnevno tijekom tri tjedna (Shay i sur., 2009). U studiji učinka oralne primjene LA tijekom 5 tjedana pokazano je poboljšanje simptoma pacijenata s dijabetičkom polineuropatijom i smanjenje boli. Mehanizam tako brzog poboljšanja može biti povezan s poboljšanjem živčanog krvnog protoka koje nastaje kao posljedica antioksidativnog djelovanja LA (Ziegler i sur., 2006).

Elastičnost stijenke krvnih žila regulirana je dušikovim oksidom (NO) koji proizvodi NO sintaza (eNOS), čije smanjenje aktivnosti dovodi do smanjene vazodilatacije, proupalnog okruženja i protrombotskog stanja. PI3K/Akt signalni put na koji utječe LA ima važnu ulogu u aktivaciji eNOS. LA također smanjuje pretjeranu proizvodnju vazokonstriktora endotelina-1 u bubrezima i krvnim žilama. Zbog tih učinaka istražuje se i upotreba LA kao antihipertenziva, no učinak nije potvrđen. U ispitivanju LA kao lijeka za vaskularnu endotelnu disfunkciju pokazala se učinkovitost, međutim potrebne su veće i dugoročnije studije za upotrebu u toj indikaciji.

U ispitivanju protuupalnih učinaka in vitro, LA snižava ekspresiju molekule adhezije vaskularnih stanica VCAM-1 i endotelnu adheziju monocita. Također inhibira NF-kappaB ovisnu ekspresiju metaloproteinaze 9. U ispitivanju protuupalnog djelovanja na ljudima primjenom doze od 300mg/dne tijekom 4 tjedna LA je pokazala 15% smanjenje interleukina 6, markera upale u srčanim aterosklerotičnim plakovima koji također regulira ekspresiju drugih upalnih citokina kao što je interleukin-1 i TNF $\alpha$  (Shay i sur., 2009).

U studiji na pacijenticama normalne tjelesne mase sa sindromom policističnih jajnika LA je smanjila koncentracije triglicerida i preusmjerila stvaranje LDL-a u veće, manje aterogene čestice, dok je u drugim studijama primijećen porast HDL-C (Harding i sur., 2012).

U istraživanju na miševima pokazalo se djelovanje na artritis smanjenjem upalnih citokina kao TNF $\alpha$ , djelomičnom inhibicijom NF-kappa B vezanja na DNA i inhibicijom stvaranja osteoklasta. U animalnom modelu mutiple skleroze pokazan je imunomodulatorni učinak, a u modelu bronhijalne astme na miševima također je pokazano značajno povoljno djelovanje. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio učinak na ljudima (Shay i sur., 2009).

$\alpha$ LA koja nastaje biosintezom vezana je za proteine, isto kao i  $\alpha$ LA iz hrane.  $\alpha$ LA se nalazi u hrani koja potječe od metabolički aktivnih organa, npr. srca, a apsorbira se u obliku lipoilizina, odnosno vezana na lizin. Vrlo male količine slobodne  $\alpha$ LA iz hrane dospiju u cirkulaciju, za razliku od oralne primjene kad je prisutna u relativno velikim količinama.  $t_{1/2}$  je 30 min (Biewenga i sur., 1997). U studijama doze do 2400mg  $\alpha$ LA dnevno nisu imale nuspojave u odnosu na placebo. 20-40% doze se apsorbira, a prilikom apsorpcije natječe se s hranom za transportne proteine. LA i reducirani oblik DHLA čine redoks par sa standardnim redukcijskim potencijalom -0.32V, što čini DHLA jednim od najjačih prirodnih antioksidansa (Shay i sur., 2009).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Oksidativni stres posljedica je neravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih reakcija u organizmu i povezan je s razvojem brojnih kroničnih bolesti. Alfa lipoična kiselina je spoj koji ima ključnu ulogu u metabolizmu energije i koristi se u terapiji dijabetičke polineuropatije. Zbog njenih antioksidativnih svojstava istražuje se primjena alfa lipoične kiseline u terapiji brojnih drugih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Cilj ovog rada je istražiti utjecaj alfa lipoične kiseline na antioksidativni status plazme, uzimajući u obzir učinke životnih navika poput pušenja, pretjerane tjelesne mase, konzumacije povrća i drugih dodataka prehrani. Rezultati ovog istraživanja će pridonijeti trenutnim saznanjima o potencijalnoj primjeni alfa lipoične kiseline kao antioksidansa u prevenciji ili terapiji određenih bolesti povezanih s oksidativnim stresom.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Ispitanici

Ispitanici su 100 žena od 18 do 55 godina koje su u okviru dvostruko-slijepe, placebom kontrolirane studije 90 dana uzimale ili dvije tablete od 300mg (ukupno 600mg) alfa lipoične kiseline dnevno (tretirana skupina) ili tablete s pomoćnom tvari, rižinim škrobom (kontrolna skupina). Nasumična raspodjela pacijentica u tretiranu odnosno kontrolnu skupinu provela se metodom blok randomizacije. Tablete su uzimane ujutro i navečer uz obrok, prema uputi proizvođača. Proizvođač tableta (ALA i placebo) je Zada pharmaceuticals, Tuzla, BiH. Na početku studije i nakon isteka 90 dana uzeti su uzorci krvi iz kubitalne vene, standardnim načinom za potrebe laboratorijskih analiza. Po isteku 90 dana pacijentice su bile dužne vratiti preostale tablete suplementa u originalnoj ambalaži kako bi se mogla utvrditi adherencija terapiji. Uzorci su prikupljeni tijekom 18 mjeseci, a za određivanje parametara oksidacijskog stresa korišteni su alikvotirani uzorci seruma prethodno pohranjeni na -20 °C.

### 3.2. FRAP reduktivni potencijal plazme

U ovom radu korištena je FRAP metoda mjerenja antioksidativnog kapaciteta plazme uz manje modifikacije. FRAP (engl. Ferric Reducing Ability of Plasma) metodu otkrili su Benzie i Strain (1996.). To je postupak ispitivanja antioksidativne moći mjerenjem sposobnosti plazme da reducira feri u fero ion. Pri niskom pH, kad se žuti kompleks feri iona s 2,4,6 tripiridil-S-triazinom ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPTZ) reducira u fero kompleks ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPTZ), dolazi do stvaranja intenzivno plavog obojenja. Mjeri se apsorbancija uzorka na 593nm, a FRAP vrijednosti dobiju se uspoređivanjem vrijednosti apsorbancije ispitivanog uzorka s vrijednostima apsorbancije standardnog antioksidansa Troloxa (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), vodotopljivog analoga vitamina E poznate koncentracije i izražavaju se kao ekvivalenti Troloxa. Prilikom ispitivanja uzorci su analizirani u kvadriplikatu, a pojedini uzorci su analizirani razrijeđeni 2 puta s ultračistom vodom.



### 3.2.1. Kemikalije

- Natrij acetat trihidrat (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2,4,6-Tris(2-piridil)-S-triazin – TPTZ (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
- Klorovodična kiselina, 37 % (Panreac, Barcelona, Španjolska)
- FeCl<sub>3</sub> (Riedel-de Haen, Njemačka)
- Ultračista voda (MiliQ H<sub>2</sub>O)
- (±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina – Trolox (Sigma, Missouri, SAD)
- Dimetil sulfoksid (Gram - Mol, Zagreb, Hrvatska)

### 3.2.2. Instrumenti i pribor

- Analitička vaga (AB265S, Mettler Toledo, OH, USA)
- pH metar (702 SM Titrino, Metrohm, Herisau, Švicarska)
- Vortex miješalica (VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan)
- Čitač mikrotitarskih pločica (Multimode Plate Reader – Victor X3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
- Mikrotitarska pločica s 96 jažica (Thermo Fisher Scientific 130188, Waltham, MA, USA)
- Vodena kupelj 1086 (GFL, Burgwedel, Njemačka)

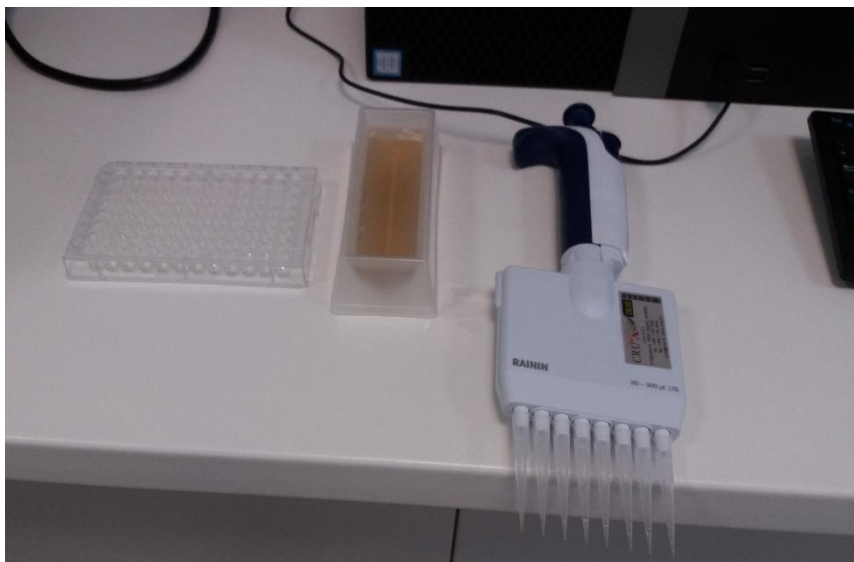
### 3.2.3. Priprema reagensa

- Napravi se 10mM otopina TPTZ u 40mM HCl.
- Priredi se 300mM acetatni pufer pH 3.6 tako da se odvaži 3.1g natrijevog acetata trihidrata, kvantitativno prebaci u volumetrijsku tikvicu i doda ultra čista voda. pH metrom se izmjeri pH i ukoliko je potrebno podešava se do pH 3.6 i zatim se napuni do oznake (1L) ultra čistom vodom.
- Napravi se 20mM otopina FeCl<sub>3</sub> u ultra čistoj vodi.
- Svježi FRAP reagens se priprema iz jednog dijela 20mM otopine FeCl<sub>3</sub>, jednog dijela 10mM otopine TPTZ u 40mM HCl, 10 dijelova acetatnog pufera i inkubira se na 37°C u vodenoj kupelji.

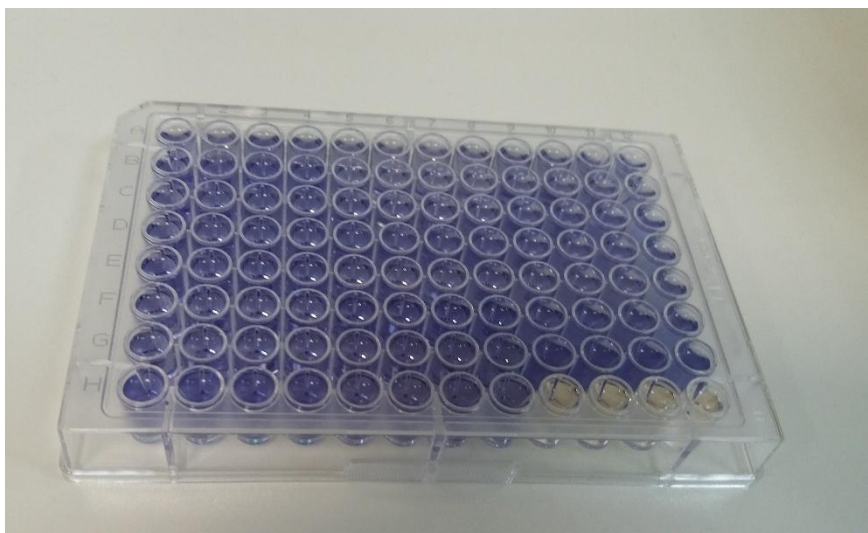
- Za izradu baždarnog pravca pripremi se Trolox stock otopina 1g/L u dimetil sulfoksidu.

#### 3.2.4. Postupak

- Na čitaču mikrotitarskih pločica napravi se protokol kojim se uzorci prvo mućkaju 60s, zatim se inkubiraju 120s na 37°C i nakon toga mjeri se apsorbancija na 530nm (0,1s) (nakon ukupno 4 minute inkubacije).
- Za Trolox baždarni pravac naprave se razrjeđenja Trolox stock otopine od 1000 $\mu$ L do 50 $\mu$ L s ultra čistom vodom.
- Pipetira se 10 $\mu$ L prethodno Vortex miješalicom promiješanog uzorka/ Trolox standarda/ slijepa probe (otapalo) u jažicu mikrotitarske pločice. Ponovi se u kvadrilikatu. Zatim se doda 300 $\mu$ L FRAP reagensa prethodno zagrijanog na 37°C u jažice multikanalnom pipetom.
- Mjeri se apsorbancija svakog uzorka na 530nm prema protokolu.
- Antioksidativni kapacitet uzorka se izračuna tako da se oduzme prosječna vrijednost apsorbancije slijepih proba od svake vrijednosti apsorbancije uzorka.



Slika 2. Mikrotitarska pločica s uzorcima, Trolox standardom i slijepom probom prije dodatka FRAP reagensa



Slika 3. Mikrotitarska pločica nakon dodatka FRAP reagensa

### 3.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Superoksid dismutaza je jedan od najvažnijih antioksidativnih enzima. Katalizira reakciju dismutacije superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ) u vodikov peroksid i molekularni kisik. U ovom radu koristila se metoda određivanja aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) koja koristi tetrazolnu vodotopljivu sol WST-1 (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazol mononatrijevu sol) koja nakon što se reducira superoksidnim anionom prelazi u plavo obojeni WST-1-formazan. SOD će inhibirati tu reakciju reagirajući sa superoksidnim anionom pa se tako aktivnost superoksid dismutaze može izmjeriti mjerenjem apsorbancije na 440nm. SOD aktivnost je proporcionalna smanjenju razvoja boje. Superoksidni anion potreban za ispitivanje nastaje aktivnošću enzima ksantin oksidaze.

#### 3.3.1. Kemikalije

Komplet za određivanje aktivnosti SOD-a (19160 SOD determination kit, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA)

Sadržaj:

- WST otopina
- Otopina enzima
- Otopina pufera

- Pufer za razrjeđivanje

### 3.3.2. Instrumenti i pribor

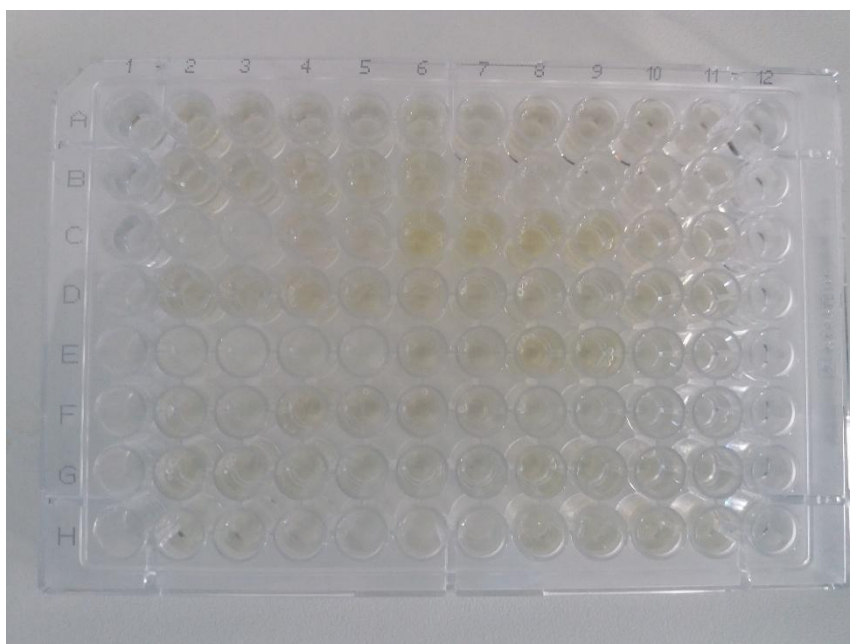
- Vortex miješalica (VTY-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan)
- Čitač mikrotitarskih pločica (Multimode Plate Reader – Victor X3, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)
- Mikrotitarska pločica s 96 jažica (Thermo Fisher Scientific 130188, Waltham, MA, USA)

### 3.3.3. Priprema reagensa

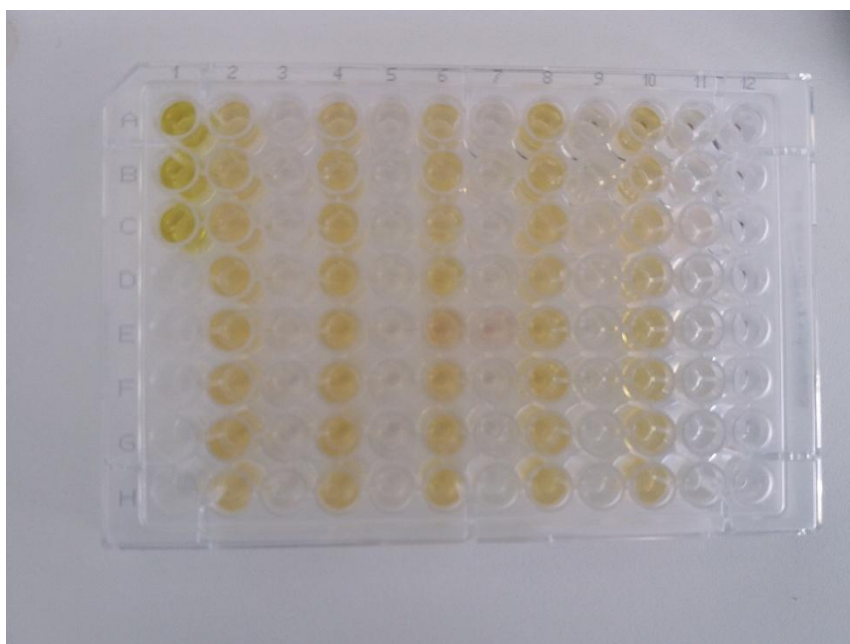
- WST radna otopina se pripremi tako da se 1mL WST otopine razrijedi s 19mL otopine pufera.
- Radna otopina enzima se napravi tako da se otopina enzima promiješa pipetiranjem i 15 $\mu$ L te otopine se razrijedi s 2.5mL pufera za razrjeđivanje.

### 3.3.4. Postupak

- Na čitaču mikrotitarskih pločica napravi se protokol kojim se uzorci inkubiraju na temperaturi od 37°C 20 minuta i zatim se izmjeri apsorbancija na 450nm.
- Na mikrotitarsku pločicu pipetira se 20 $\mu$ L prethodno Vortex miješalicom promiješanog uzorka u jažicu uzorka i u jažicu slijepe probe (blank) 2.
- U jažicu slijepe probe 1 i 3 pipetira se 20 $\mu$ L ultra čiste vode.
- U svaku jažicu pipetira se 200 $\mu$ L WST radne otopine.
- U svaku jažicu slijepe probe 2 i 3 pipetira se 20 $\mu$ L pufera za razrjeđivanje.
- U svaku jažicu uzorka i svaku jažicu slijepe probe 1 pipetira se 20 $\mu$ L radne otopine enzima.



Slika 4. Mikrotitarska pločica prije dodavanja radne otopine enzima SOD



Slika 5. Mikrotitarska pločica nakon dodavanja radne otopine enzima SOD

- Mjeri se apsorbancija na 450nm nakon inkubacije prema protokolu.
- SOD aktivnost (% inhibicije) izračuna se jednadžbom:

$$\text{SOD aktivnost (\% inhibicije)} = \left\{ \left[ (A_{\text{slijepa proba 1}} - A_{\text{slijepa proba 3}}) - (A_{\text{uzorak}} - A_{\text{slijepa proba 2}}) \right] / (A_{\text{slijepa proba 1}} - A_{\text{slijepa proba 3}}) \right\} \times 100$$

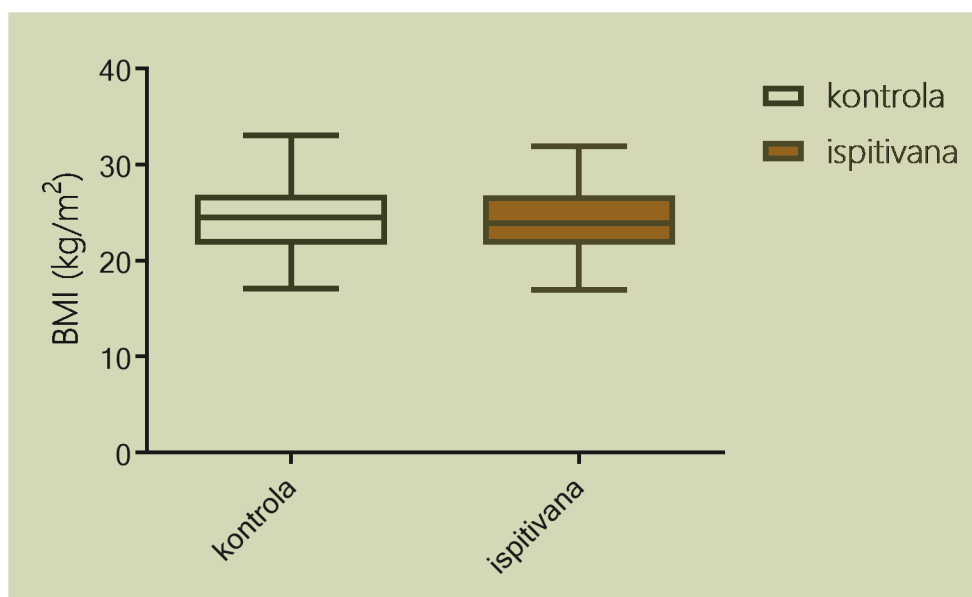
### 3.4. Statistička analiza

Srednje vrijednosti, standardne devijacije i relativne standardne devijacije paralelnih mjerenja izračunate su u programu Excel (Microsoft Corporation, USA). Statistička obrada potom je nastavljena u programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Normalnost raspodjele dobivenih podataka testirana je primjenom D'Agostino - Pearsonovog testa te su na temelju dobivenih rezultata odabrani testovi za daljnju analizu podataka. Vrijednosti SOD-a i FRAP-a prikazani su kao median ± 95% raspon pouzdanosti. Usporedba dobivenih rezultata (prije-poslije suplementacije/kontrola-ispitivana) provedena je primjenom Mann-Whitney U testa za razinu značajnosti  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI

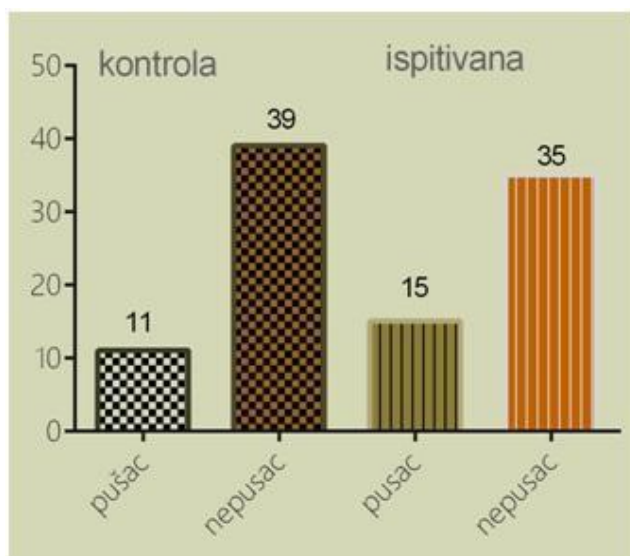
### 4.1 Karakteristike kontrolne i ispitivane skupine

Iz podataka dobivenih iz standardiziranog upitnika o učestalosti konzumacije namirnica (Bilić, 2021) koji su ispunile ispitanice iz kontrolne (50) i ispitivane (50) skupine uspoređene su pojedine karakteristike skupina kako bi se utvrdilo postoje li statistički značajne razlike između skupina koje bi mogle imati utjecaj na antioksidativni kapacitet seruma. Usporedbom indeksa tjelesne mase (BMI) utvrđeno je da je u kontrolnoj skupini minimalni BMI iznosio 17,11; maksimalni BMI 33,66; dok je srednja vrijednost BMI u skupini iznosila 24,53. U ispitivanoj skupini minimalni BMI iznosio je 16,98; maksimalni 31,89; a srednja vrijednost BMI iznosila je 24,12 (Slika 6). Raspodjela podataka prošla je test normalnosti te je t-testom utvrđena  $p=0,5732$ , iz čega možemo zaključiti da ne postoje statistički značajne razlike u prosječnom indeksu tjelesne mase između skupina.



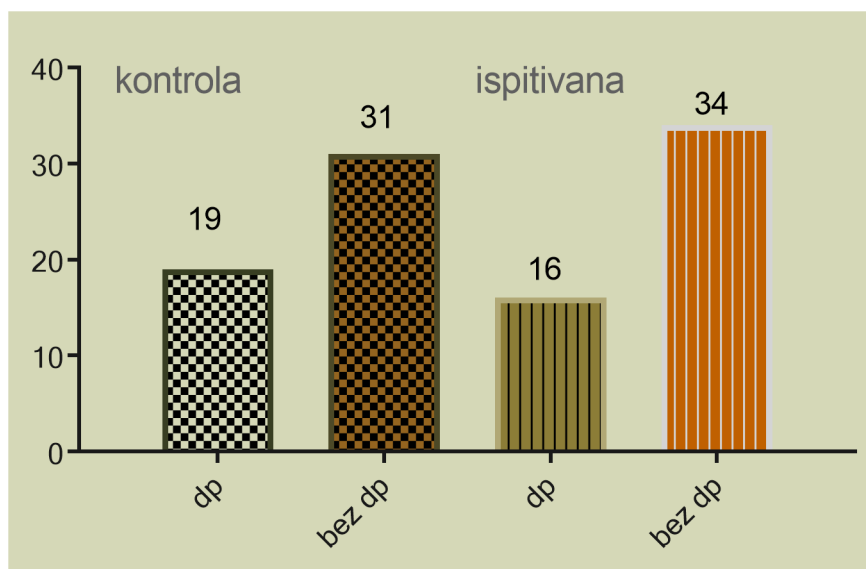
Slika 6. Grafički prikaz raspona BMI kontrolne i ispitivane skupine (Bilić, 2021)

Usporedbom broja pušača i nepušača ustanovljeno je da je u kontrolnoj skupini bilo 11 pušačica i 39 nepušačica, dok je u ispitivanoj skupini bilo 15 pušačica i 35 nepušačica (Slika 7).  $\chi^2$  testom utvrđena je vrijednost 0,8316 što ukazuje na to da za vrijednosti  $df=1$  i  $p<0,05$  ne postoje statistički značajne razlike između dvije skupine u tom pogledu.



Slika 7. Grafički prikaz broja pušača i nepušača u kontrolnoj i ispitivanoj skupini (Bilić, 2021)

U kontrolnoj skupini dodatke prehrani s antioksidansima redovito koristi 19 ispitanica, dok 31 ne koristi. U ispitivanoj skupini dodatke prehrani redovito koristi 16 ispitanica, dok ih 34 ne koristi (Slika 8).  $\chi^2$  testom utvrđena je vrijednost 0,3955, što govori da za vrijednost  $df=1$  i  $p<0,05$  ne postoje statistički značajne razlike između ispitivane i kontrolne skupine.



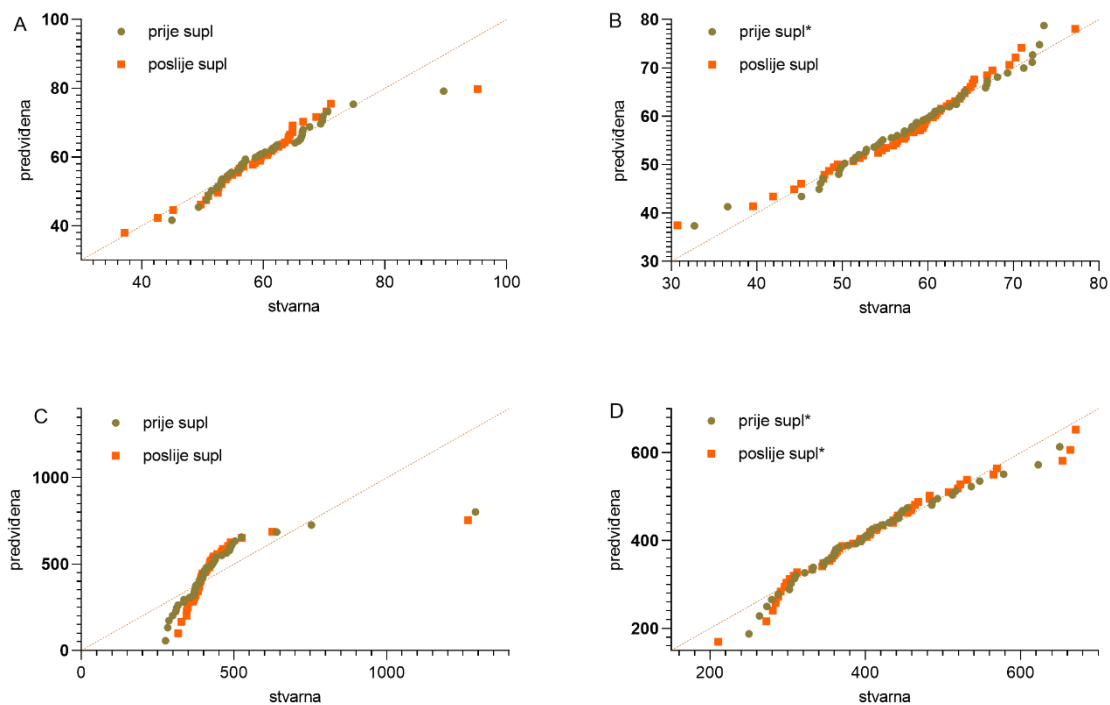
Slika 8. Grafički prikaz broja ispitanica koje koriste antioksidativne dodatke prehrani (dp) i onih koje ne koriste dodatke prehrani (bez dp) u kontrolnoj i ispitivanoj skupini (Bilić, 2021)



#### 4.2. FRAP seruma i aktivnost SOD-a prije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom

Iz uzoraka krvi ispitanica uzetih na početku studije, prije suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom, izračunat je antioksidativni kapacitet plazme FRAP metodom i metodom određivanja aktivnosti SOD-a. Prilikom određivanja distribucije uzorka koristio se QQ plot.

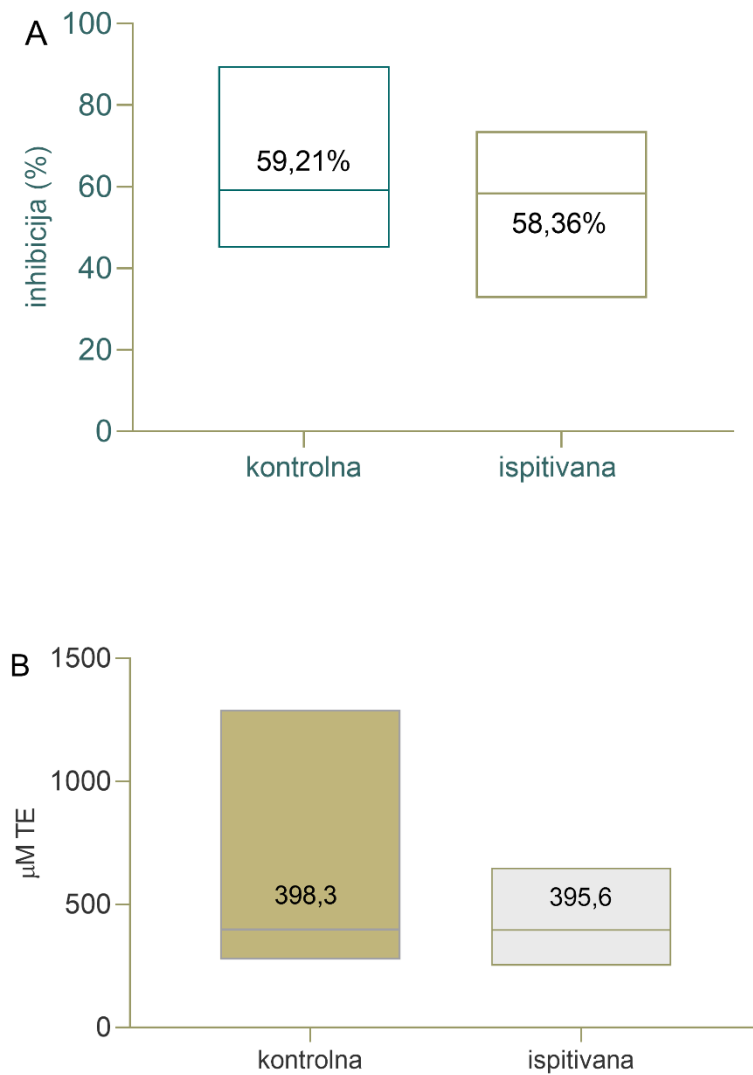
QQ-plot (quantile-quantile plot) je jedan od najboljih načina kako usporediti distribuciju uzorka  $x$  s nekom teorijskom distribucijom. Na taj način možemo vizualizirati distribuciju podataka, a kasnije je potvrditi statističkim testom. QQ-plotovi SOD aktivnosti i FRAP seruma u kontrolnoj i ispitivanoj skupini prije i nakon suplementacije prikazani su na Slici 9. Normalnost distribucije provjerena je primjenom D'Agostino-Pearsonovog testa. Normalna razdioba utvrđena je za SOD aktivnost u ispitivanoj skupini prije suplementacije, a za FRAP seruma ispitivane skupine prije i nakon suplementacije. Svi ostali podaci nemaju normalnu razdiobu podataka. S obzirom na to i na relativno mali broj ispitanika u skupinama, za daljnju analizu podataka korišteni su neparametrijski testovi.



Slika 9. Q-Q plotovi normalnosti za vrijednosti aktivnosti SOD-a i FRAP-a seruma kontrolne i ispitivane skupine ispitanica prije i nakon suplementacije

Legenda: A-SOD aktivnost u kontrolnoj skupini prije i nakon suplementacije; B-SOD aktivnost u ispitivanoj skupini prije i nakon suplementacije; C-FRAP seruma kontrolne skupine prije i nakon suplementacije; D-FRAP seruma ispitivane skupine prije i nakon suplementacije. \*normalni QQ plotovi (normalna razdioba podataka)

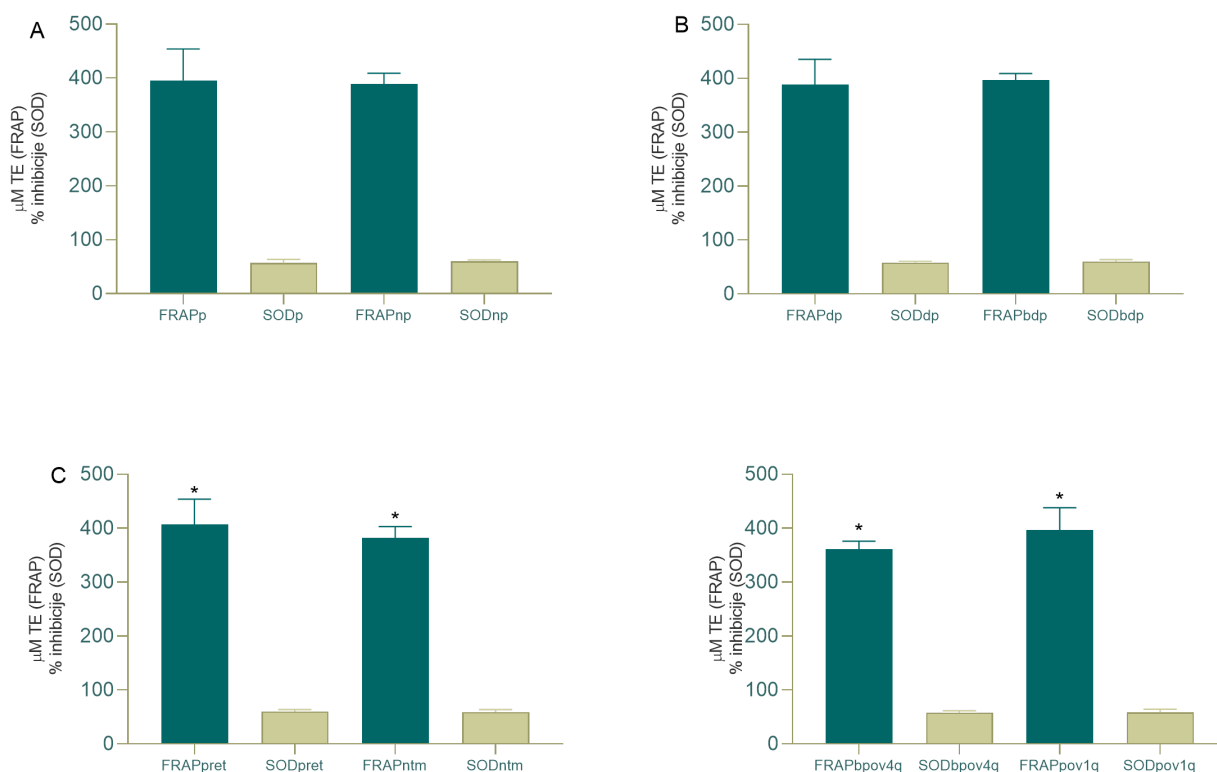
Medijani SOD aktivnosti i FRAP seruma prije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom iznose 59,21% inhibicije SOD-a u kontrolnoj skupini i 58,36% u ispitivanoj skupini te 398,3  $\mu$ M TE u kontrolnoj i 395,6  $\mu$ M TE u ispitivanoj skupini (Slika 10).



Slika 10. Medijani SOD aktivnosti (A) i FRAP seruma (B) kontrolne i ispitivane skupine prije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom

#### 4.3. Utjecaj pušenja, unosa dodataka prehrani, pretilosti i unosa povrća na FRAP seruma i aktivnost SOD-a

Izračunati su medijani SOD aktivnosti i FRAP seruma za različite skupine ispitanica prije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom (Slika 11) da bi procijenili utjecaj pušenja, unosa dodataka prehrani, pretilosti i unosa povrća na antioksidativni kapacitet plazme. Korištenjem MannWhitney statističkog testa s  $p < 0,05$  pokazalo se da kod SOD aktivnosti prije uzimanja alfa lipoične kiseline ne postoji statistički značajna razlika između ispitanica koje puše i onih koje ne puše, između ispitanica koje uzimaju antioksidativne dodatke prehrani i onih koje ih ne uzimaju, između ispitanica normalne tjelesne mase i onih prekomjerne tjelesne mase niti kod ispitanica sa najvišim unosom povrća i onih sa najnižim. Kod FRAP metode pokazala se statistički značajna razlika u antioksidativnom kapacitetu plazme prije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom između ispitanica s normalnom tjelesnom masom i ispitanica s prekomjernom tjelesnom masom i također između ispitanica s najvećim unosom povrća i onih s najnižim. Ispitanice s najvišim unosom povrća (prvi kvartil) imale su veći antioksidativni kapacitet plazme od ispitanica s najnižim unosom (četvrti kvartil). Ispitanice s prekomjernom tjelesnom masom imale su veći antioksidativni kapacitet plazme od ispitanica normalne tjelesne mase. Između ispitanica koje puše i onih koje ne puše kao i onih koje koriste antioksidativne dodatke prehrani i onih koje ih ne koriste nije postojala značajna statistička razlika.



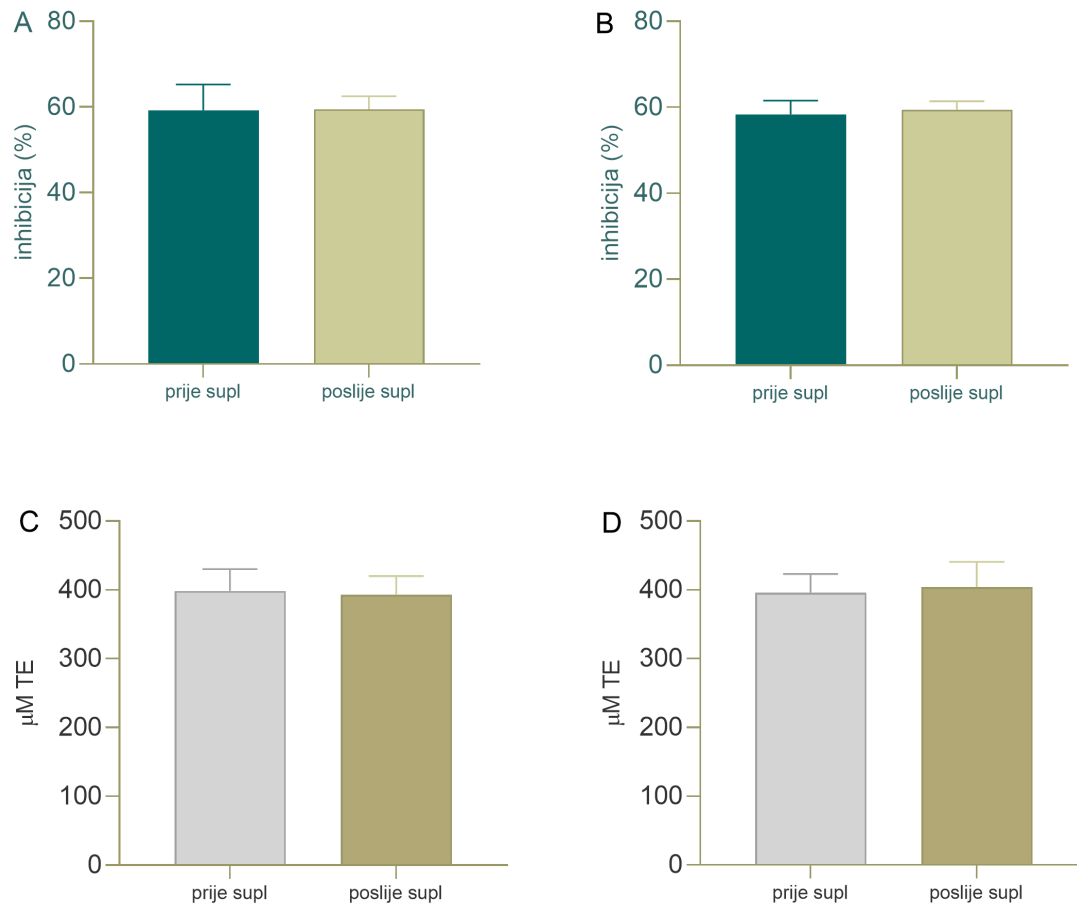
Slika 11. Medijani SOD aktivnosti i FRAP seruma prije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom: utjecaj pušenja (A), unosa antioksidansa kao dodatka prehrani (B), pretilosti (C) i unosa povrća (D) (usporedba ispitanica sa najnižim unosom i ispitanica s najvišim unosom)

Legenda: Rezultati su prikazani kao medijani  $\pm$  95% raspon pouzdanosti; p-pušači; np-nepušači; dp-unose dodatke prehrani; bdp-ne unose dodatke prehrani; pret- pacijenti prekomjerne tjelesne mase; ntm-ispitanice normalne tjelesne mase; pov1q-ispitanice s najvišim unosom povrća (prvi kvartil); pov4q-ispitanice s najnižim unosom povrća (četvrti kvartil); \*uočene razlike su statistički značajne ( $p < 0.05$ )/Mann Whitney test.

#### 4.4. Utjecaj suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na FRAP seruma i aktivnost SOD-a

Izračunati su medijani SOD aktivnosti i FRAP seruma prije i poslije suplementacije alfa lipoičnom kiselinom u ispitivanoj, kao i prije i poslije suplementacije placeboom u kontrolnoj skupini (Slika 12), da bi procijenili utjecaj suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na antioksidativni kapacitet plazme. Nije se pokazala statistički značajna razlika nakon suplementacije ni u jednoj skupini, odnosno, iako je postotak inhibicije SOD aktivnosti i FRAP vrijednost bila neznatno viša nakon suplementacije alfa lipoičnom kiselinom, nije se

pokazao statistički značajan učinak suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na FRAP seruma i aktivnost SOD-a.



Slika 12. Aktivnost SOD-a i FRAP seruma kontrolne i ispitivane skupine prije i nakon suplementacije

Legenda: Rezultati su prikazani kao medijani  $\pm$  95% raspon pouzdanosti; A-SOD aktivnost u kontrolnoj skupini prije i nakon suplementacije; B-SOD aktivnost u ispitivanoj skupini prije i nakon suplementacije; C-FRAP seruma kontrolne skupine prije i nakon suplementacije; D-FRAP seruma ispitivane skupine prije i nakon suplementacije. FRAP vrijednosti iskazane su kao  $\mu$ mol ekvivalenata Trolox-a

## 5. RASPRAVA

Između ispitivane i kontrolne skupine nisu pronađene statistički značajne razlike u određenim karakteristikama koje bi mogle utjecati na antioksidativni kapacitet seruma, čime se osiguralo dobivanje točnijih podataka u istraživanju. Normalna razdioba utvrđena je za SOD aktivnost u ispitivanoj skupini prije suplementacije i za FRAP seruma ispitivane skupine prije i nakon suplementacije. Svi ostali podaci, odnosno SOD aktivnost u kontrolnoj skupini prije i poslije suplementacije, FRAP seruma kontrolne skupine prije i poslije suplementacije i SOD aktivnost u ispitivanoj skupini poslije suplementacije nemaju normalnu razdiobu podataka. Rezultat dobiven prilikom ispitivanja utjecaja tjelesne mase na FRAP seruma prema kojemu su ispitanice sa većom tjelesnom masom imale veći antioksidativni kapacitet plazme od ispitanica normalne tjelesne mase suprotan je očekivanjima, odnosno rezultatima istraživanja koja pokazuju da pretilost korelira sa povećanim oksidativnim stresom organizma. Chirumbolo (2021) opisuje ulogu adipocita u patogenezi raka, Vetrani i suradnici (2013) ističu kako je pretilost povezana s povećanim oksidativnim stresom, što je mjerljivo pomoću različitih biomarkera oksidativnog stresa kao što su izoprostani i 8-hidroksideoksigvanozin (8-OH-dG), a Saha i suradnici (2017) govore kako je postprandijalni oksidativni stres kod pretilih osoba puno jači nego kod osoba normalne tjelesne mase.

Bitno je naglasiti da su uočene razlike u antioksidativnom potencijalu plazme ispitanica s normalnom tjelesnom masom i onih s povišenom, vrlo male (iako statistički značajne). Nadalje, sve ispitanice koje nisu imale normalnu tjelesnu masu bile su u kategoriji indeksa tjelesne mase koji označava prekomjernu tjelesnu masu, a ne pretilost. Većina dostupnih radova koja povezuje porast tjelesne mase sa porastom oksidacijskog stresa u organizmu odnosi se uglavnom na pretilu pacijente.

Slični rezultati drugačiji od očekivanih dobiveni su ispitivanjem antioksidativnog statusa na istom uzorku drugim metodama. U istraživanju antioksidativnog kapaciteta TEAC metodom (Bilić, 2021) pokazalo se da BMI nema statistički značajan utjecaj na antioksidativni status plazme. Ponuđeno objašnjenje je mogućnost da nije uočena razlika u utjecaju BMI na antioksidacijski potencijal jer su se uspoređivale ispitanice normalne tjelesne mase ( $BMI \leq 25$  kg/m<sup>2</sup>) s onima prekomjerne tjelesne mase ( $BMI > 25$  kg/m<sup>2</sup>), a ne s pretilima ( $BMI > 30$  kg/m<sup>2</sup>), zbog premalog broja pretilih ispitanica uključenih u studiju (n=3).

Aldini i suradnici (2010) navode da su kod pušača pronađene povećane razine izoprostana F2-IsoP, markera oksidativnog stresa koji ima jako vazokonstriktorno djelovanje u bubregu,

plućima, mrežnici oka, portalnoj veni, mozgu i limfatičkom sustavu i također 8OhdG, markera oksidativnog oštećenja DNA. Pušenje povećava oksidativni stres, što doprinosi patologiji raznih bolesti i može ubrzati razvoj ateroskleroze i respiratornih bolesti. Također, antioksidativni status plazme trebao bi se poboljšati korištenjem antioksidansa, međutim očekivani rezultati utjecaja pušenja i korištenja antioksidativnih dodataka prehrani na antioksidativni status plazme su izostali i kod FRAP metode i kod ispitivanja aktivnosti SOD. U preglednom radu Vetrani i suradnici (2013) opisuju kako prehrana bogata voćem i povrćem smanjuje oksidativni stres organizma. Voće i povrće bogato je vitaminima A, C i E i karotenoidima koji imaju poznati antioksidativni kapacitet ili djeluju indirektno, poboljšavanjem djelovanja enzima za popravak DNA kao što su enzimi koji sudjeluju u DNA metilaciji ili popravku izrezivanjem baza. Također, minerali prisutni u voću i povrću djeluju kao kofaktori enzima i tako poboljšavaju obranu od slobodnih radikala, dok vlakna mogu smanjiti apsorpciju glukoze, odnosno postprandijalnu hiperglikemiju koja potiče stvaranje ROS. Fitokemikalije koje su prisutne također povoljno djeluju na smanjenje OS. U ovom istraživanju, kod ispitivanja SOD aktivnosti nije bilo statistički značajnog utjecaja tjelesne mase ni unosa povrća na antioksidativni kapacitet plazme. Moguće je da je u tim slučajevima istraživanje rađeno na premalom broju ispitanika, da je korištena metoda ispitivanja antioksidativnog potencijala seruma koja nije dovoljno osjetljiva ili da je došlo do pogrešaka u izvedbi istraživanja.

Primjenom FRAP metode pokazana je statistički značajna razlika u antioksidativnom statusu plazme između ispitanica s najvećim unosom povrća i onih s najnižim. Ispitanice s najvišim unosom povrća (prvi kvartil) imale su veći antioksidativni kapacitet plazme od ispitanica s najnižim unosom (četvrti kvartil), što je u skladu s drugim rezultatima istraživanja.

Ispitivanje utjecaja suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na FRAP seruma i aktivnost SOD-a nije pokazalo statistički značajan učinak na antioksidativni status plazme. Takav rezultat nije u skladu s očekivanjima jer je alfa lipoična kiselina u brojnim istraživanjima pokazala antioksidativno djelovanje. Shay i suradnici (2009) navode različite mehanizme antioksidativnog djelovanja: hvatanje slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva, hidroksilnih radikala i hipoklorita, singletnog kisika, zatim povećanje koncentracije endogenog glutationa (GSH) stvarajući supstrat za njegovu sintezu i aktivacijom Nrf2, transkripcijskog faktora u sintezi GSH; regeneriranje endogenih antioksidansa kao što su vitamini C i E, kompleksiranje metalnih iona, aktiviranje periferalne AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) i sniženje koncentracije glukoze u krvi. Također, ALA smanjuje ekspresiju VCAM-1 i metaloproteinaze 9 inhibiranjem NF-kappaB, ima imunomodulatorno djelovanje,

a djeluje i na vazodilataciju posredovanu dušikovim oksidom djelujući na endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS). Klinički je dokazana učinkovitost djelovanja alfa lipoične kiseline na komplikacije dijabetesa kao što je dijabetička polineuropatija. Istražuje se primjena za brojne druge indikacije, kao što su vaskularne bolesti, hipertenzija, Alzheimerova bolest i druge upalne bolesti poput multiple skleroze, reumatoidnog artritisa i bronhijalne astme, za koje su in vitro istraživanja ili istraživanja na životinjama dala obećavajuće rezultate, no potrebna su kvalitetna istraživanja učinkovitosti kod ljudi. U novom istraživanju Sun i suradnika (2021) istraživala se primjena u liječenju vitiliga čija je patologija također povezana s oksidativnim stresom, no nije se dokazala učinkovitost. Mohammadshahi i suradnici (2021) pripremili su protokol za studiju koja bi trebala utvrditi utjecaj alfa lipoične kiseline na antropometričke parametre, sastav tijela i faktore angiogeneze, sirtuin-1 i peroksisom proliferator aktivirani receptor gama 1 $\alpha$  koaktivator (PGC1 $\alpha$ ) kod pretilih ljudi koji su na restriktivnoj dijeti, čime bi se ispitaio utjecaj alfa lipoične kiseline na mršavljenje. S obzirom na poznate mehanizme antioksidativnog djelovanja alfa lipoične kiseline i brojne rezultate istraživanja koja pokazuju njenu učinkovitost in vitro i na životinjskim modelima trebalo bi ispitati njen utjecaj na antioksidativni status plazme na većem broju ispitanika, s duljim trajanjem studije i različitim dozama alfa lipoične kiseline.



## 6. ZAKLJUČCI

- Utjecaj pušenja na antioksidativni status plazme nije pokazan u ispitivanju FRAP i SOD metodom. Iz brojnih prijašnjih istraživanja poznato je negativno djelovanje pušenja na oksidacijski stres organizma pa bi trebalo provesti dodatna istraživanja na većem broju ispitanika ili promatrati veći broj biomarkera oksidativnog stresa.
- Unos dodataka prehrani nije imao učinak na antioksidativni status plazme. S obzirom na to da postoji vrlo velik broj dodataka prehrani s potencijalno različitim djelovanjem, trebalo bi provesti odvojena ispitivanja djelovanja pojedinih dodataka prehrani na antioksidativni status.
- Povećani indeks tjelesne mase nije utjecao na aktivnost superoksid dismutaze ispitanica dok su ispitivanja antioksidativnog statusa FRAP metodom pokazala malu, ali statistički značajnu razliku; veći antioksidativni kapacitet plazme izmjeren je kod ispitanica prekomjerne tjelesne mase nego kod ispitanica s normalnom tjelesnom masom. To je u suprotnosti s dosadašnjim istraživanjima u kojima se pokazala povezanost pretilosti i oksidativnog stresa. Iz tog razloga trebala bi se provesti dodatna ispitivanja na većem uzorku i s većim brojem biomarkera oksidativnog stresa.
- Konzumacija povrća nije utjecala na aktivnost superoksid dismutaze, međutim primjenom FRAP metode pokazano je statistički značajno povećanje antioksidativnog kapaciteta plazme, što je u skladu s drugim istraživanjima.
- Suplementacija alfa lipoičnom kiselinom u dozi od 600mg dnevno tijekom 90 dana nije pokazala učinak na antioksidativni kapacitet plazme ispitanica u ispitivanju SOD i FRAP metodom. S obzirom na brojna istraživanja koja potvrđuju njeno antioksidativno djelovanje potrebna su dodatna ispitivanja na većem broju ispitanika, s duljim trajanjem studije, različitim dozama i korištenjem drugih biomarkera oksidativnog stresa ili više njih.

## 7. LITERATURA

Aldini G, Yeum KJ, Niki E, Russell RM. Biomarkers for antioxidant defense and oxidative damage: principles and practical applications. John Wiley & Sons, 2011, str. 6, 15-17, 19-21, 32-35, 81-82, 285.

Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol.*, 1997, 315–331.

Bilić P. (2021) Utjecaj suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom na antioksidacijski status pacijentica s cervikalnom intraepitelnom neoplazijom stupnja 1 i 2. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Chirumbolo S. Oxidative Stress, Nutrition and Cancer: Friends or Foes? *World J Mens Health*, 2021, 19-30.

Choi SW, Benzie IF, Collins AR, Hannigan BM, Strain JJ. Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. *Mutat Res.*, 2004, 109-117.

Dennis KK, Go YM, Jones DP. Redox Systems Biology of Nutrition and Oxidative Stress. *J Nutr.*, 2019, 553-565.

Duthie SJ, McE. Jenkinson A, Crozier A, Mullen W, Pirie L, Kyle J, Yap LS, Christen P, Duthie GG. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur J Nutr.*, 2006, 113–122.

Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight A, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Cipak Gasparovic A, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HHHW, Ghezzi P. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling*, 2015, 1144–1170.

Harding SV, Rideout TC, Jones PJ. Evidence for using alpha-lipoic acid in reducing lipoprotein and inflammatory related atherosclerotic risk. *J Diet Suppl.*, 2012, 116-127.

Holmquist L, Stuchbury G, Berbaum K, Muscat S, Young S, Hager K, Engel J, Münch G. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. *Pharmacol Ther.*, 2007, 154-164.

Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 1841-1856.

Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-32.

Mohammadshahi M, Zakizadeh E, Ahmadi-Angali K, Ravanbakhsh M, Helli B. The effect of alpha-lipoic acid supplementation and electrical isotonic contraction on anthropometric parameters, body composition and angiogenesis factor, sirtuin-1 and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  in obese people under a weight loss regime: A study protocol for a randomized controlled clinical trial. *Nutr Health.*, 2021, 123-128.

Müller N, Ellinger S, Alteheld B, Ulrich-Merzenich G, Berthold HK, Vetter H, Stehle P. Bolus ingestion of white and green tea increases the concentration of several flavan-3-ols in plasma, but does not affect markers of oxidative stress in healthy non-smokers. *Mol Nutr Food Res.*, 2010, 1636-1645.

Pawluk H, Pawluk R, Robaczewska J, Kędziora-Kornatowska K, Kędziora J. Biomarkers of antioxidant status and lipid peroxidation in elderly patients with hypertension. *Redox Rep.*, 2017, 542-546.

Pecorari M, Villaño D, Testa MF, Schmid M, Serafini M. Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. *Mol Nutr Food Res.*, 2010, 278-283.

Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K, Yang GM, Dayem AA, Cho SG. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *Int J Mol Sci.*, 2017, 18-1544.

Sánchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granada F, Martín A. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *Am J Clin Nutr.*, 2003, 454-460.

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

Sun Y, Guan X, Wang H, Zhang J, Gu H, Lu H, Yao Z, Chen X, Zeng F, Wu Y, Gao XH. Randomized clinical trial of combined therapy with oral  $\alpha$ -lipoic acid and NB-UVB for nonsegmental stable vitiligo. *Dermatol Ther.*, 2021, 1-6.

Vetrani C, Costabile G, Di Marino L, Rivellese AA. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *Int J Food Sci Nutr.*, 2013, 312-326.

Ziegler D, Ametov A, Barinov A, Dyck PJ, Gurieva I, Low PA, Munzel U, Yakhno N, Raz I, Novosadova M, Maus J, Samigullin R. Oral treatment with alpha-lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care*, 2006, 2365-2370.

## 8. SAŽETAK

Oksidativni stres se javlja zbog povećane količine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) ili smanjenog kapaciteta enzimatskih i neenzimatskih antioksidativnih sustava. Alfa lipoična kiselina je moćan antioksidans s trenutnom primjenom u terapiji dijabetičke polineuropatije. Brojna istraživanja proučavaju utjecaj alfa lipoične kiseline na oksidativni stres i njenu potencijalnu primjenu u terapiji raznih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na ukupan antioksidativni kapacitet seruma, a s obzirom na neke parametre životnog stila pacijentica (pretilost, pušenje, korištenje dodataka prehrani i način prehrane). Antioksidativni status pacijentica određen je mjerenjem reduktivnog potencijala plazme i mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD). Nije uočen značajni utjecaj pušenja, korištenja dodataka prehrani, indeksa tjelesne mase niti načina prehrane na aktivnost SOD. Podskupina pacijentica s najvišim unosom povrća (1.kvartil) imale su značajno veći reduktivni potencijal plazme od ostalih pacijentica. Suplementacija sa 600mg alfa-lipoične kiseline/dne kroz 3 mjeseca nije značajno utjecala na reduktivni potencijal plazme niti aktivnost SOD u krvi ispitanica. Potrebno je provesti dodatna istraživanja s većim brojem ispitanika, različitim biomarkerima oksidativnog stresa i različitim dozama alfa lipoične kiseline da bi se utvrdio utjecaj suplementacije alfa lipoične kiseline na antioksidativni kapacitet.

## 8. SUMMARY

Oxidative stress may occur as a result of an increased amount of reactive oxygen species (ROS) or reduced enzymatic or nonenzymatic antioxidant system capacity.

Alpha lipoic acid is a potent antioxidant, currently used in the treatment of diabetic polyneuropathy. Numerous trials are examining the effect of alpha lipoic acid on oxidative stress and its potential application in the treatment of various oxidative stress related diseases. The goal of this paper was to examine the effect of alpha lipoic acid supplementation on total serum antioxidant capacity, in regard to lifestyle parameters (obesity, smoking, diet and dietary supplements). Antioxidative status of the patients was determined using ferric reducing ability of plasma assay and by measuring superoxide dismutase activity (SOD). There was no significant observed effect of smoking, use of dietary supplements, body mass index, or diet on SOD activity. The group of patients with the highest vegetable consumption (1st quartile) showed significantly higher reducing ability of plasma compared to other patients. 90 day 600mg/day alpha lipoic acid supplementation showed no significant effect on reducing ability of plasma or SOD activity in the blood of the patients. Additional research should be conducted using a larger number of participants, different oxidative stress biomarkers and different doses of alpha lipoic acid to determine the effects of alpha lipoic acid supplementation on antioxidant capacity.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### UTJECAJ SUPLEMENTACIJE ALFA LIPOIČNOM KISELINOM NA REDUKTIVNI POTENCIJAL PLAZME I AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE

Iva Zonjić

#### SAŽETAK

Oksidativni stres se javlja zbog povećane količine reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) ili smanjenog kapaciteta enzimatskih i neenzimatskih antioksidativnih sustava. Alfa lipoična kiselina je moćan antioksidans s trenutnom primjenom u terapiji dijabetičke polineuropatije. Brojna istraživanja proučavaju utjecaj alfa lipoične kiseline na oksidativni stres i njenu potencijalnu primjenu u terapiji raznih bolesti povezanih s oksidativnim stresom. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na ukupan antioksidativni kapacitet seruma, a s obzirom na neke parametre životnog stila pacijentica (pretilost, pušenje, korištenje dodataka prehrani i način prehrane). Antioksidativni status pacijentica određen je mjerenjem reduktivnog potencijala plazme i mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze (SOD). Nije uočen značajni utjecaj pušenja, korištenja dodataka prehrani, indeksa tjelesne mase niti načina prehrane na aktivnost SOD. Podskupina pacijentica s najvišim unosom povrća (1.kvartil) imale su značajno veći reduktivni potencijal plazme od ostalih pacijentica. Suplementacija sa 600mg alfa-lipoične kiseline/dne kroz 3 mjeseca nije značajno utjecala na reduktivni potencijal plazme niti aktivnost SOD u krvi ispitanica. Potrebno je provesti dodatna istraživanja s većim brojem ispitanika, različitim biomarkerima oksidativnog stresa i različitim dozama alfa lipoične kiseline da bi se utvrdio utjecaj suplementacije alfa lipoične kiseline na antioksidativni kapacitet.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 12 grafičkih prikaza, 0 tablica i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Alfa lipoična kiselina, oksidativni stres, superoksid dismutaza, reduktivni potencijal plazme

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

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

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Lovorka Vujić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### EFFECT OF ALPHA LIPOIC ACID SUPPLEMENTATION ON PLASMA REDUCING CAPACITY AND ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE

Iva Zonjić

#### SUMMARY

Oxidative stress may occur as a result of an increased amount of reactive oxygen species (ROS) or reduced enzymatic or nonenzymatic antioxidant system capacity. Alpha lipoic acid is a potent antioxidant, currently used in the treatment of diabetic polyneuropathy. Numerous trials are examining the effect of alpha lipoic acid on oxidative stress and its potential application in the treatment of various oxidative stress related diseases. The goal of this paper was to examine the effect of alpha lipoic acid supplementation on total serum antioxidant capacity, in regard to lifestyle parameters (obesity, smoking, diet and dietary supplements). Antioxidative status of the patients was determined using ferric reducing ability of plasma assay and by measuring superoxide dismutase activity (SOD). There was no significant observed effect of smoking, use of dietary supplements, body mass index, or diet on SOD activity. The group of patients with the highest vegetable consumption (1st quartile) showed significantly higher reducing ability of plasma compared to other patients. 90 day 600mg/day alpha lipoic acid supplementation showed no significant effect on reducing ability of plasma or SOD activity in the blood of the patients. Additional research should be conducted using a larger number of participants, different oxidative stress biomarkers and different doses of alpha lipoic acid to determine the effects of alpha lipoic acid supplementation on antioxidant capacity.

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

Thesis includes: 34 pages, 12 figures, 0 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Alpha lipoic acid, oxidative stress, superoxide dismutase, reducing ability of plasma

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

The thesis was accepted: September 2022.



