

# Učinkovitost suplementacije alfa-lipoičnom kiselinom kod premalignih promjena vrata maternice

---

Divković, Anja

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:277535>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-16**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANJA DIVKOVIĆ

**UČINKOVITOST SUPLEMENTACIJE A-  
LIPOIČNOM KISELINOM KOD  
PREMALIGNIH PROMJENA VRATA  
MATERNICE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANJA DIVKOVIĆ

**UČINKOVITOST SUPLEMENTACIJE A-  
LIPOIČNOM KISELINOM KOD  
PREMALIGNIH PROMJENA VRATA  
MATERNICE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo  
Doc. dr. med. sci. Zinaida Karasalihović

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB  
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

ANJA DIVKOVIĆ

**THE EFFICIENCY OF  
SUPPLEMENTATION WITH A-LIPOIC  
ACID IN PATIENTS WITH  
PRECANCEROUS CERVICAL LESIONS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:  
Prof. Dubravka Vitali Čepo, PhD  
Ass. prof. Zinaida Karaslihović, MD, PhD

Zagreb, 2024



*Ovaj doktorski rad je izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju, Klinici za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra u Tuzli, i u Zavodu za prehranu i dijetoterapiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo i suvoditeljstvom doc. dr. med. sci. Zinaide Karasalihović, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Medicinske-biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvale:*

*Najtoplije se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo na ukazanom povjerenju i razumijevanju, korisnim savjetima, izdvojenom vremenu i nesebično pruženoj stručnoj pomoći pri izradi ovoga doktorskog rada. Zahvaljujem se i svojoj komentorici doc. dr. med. sci. Zinaidi Karasalihović na ukazanoj pomoći, podršci i korisnim savjetima.*

*Također se zahvaljujem i Farmaceutskoj kompaniji Zada Pharmaceuticals na donaciji suplementa alfa lipoične kiseline i placeba za potrebe ove kliničke studije, Klinici za ginekologiju i akušerstvo JZU UKC Tuzla i Ordinaciji za ginekologiju i akušerstvo dr. med. sci. Feđa Omeragić na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka, Poliklinici za laboratorijsku dijagnostiku JZU UKC Tuzla i Zavodu za kemiju prehrane Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

*Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, braći i mojoj Lani koji su mi uvijek bili najveća podrška i oslonac u životu, koji su se sa mnom veselili mojoj sreći i tješili me u trenucima žalosti. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene i što ste mi omogućili da postanem čovjek kakav jesam.*

*Ne možemo činiti ništa veliko –  
samo male stvari s velikom ljubavlju.*

*MAJKA TEREZA*

## SAŽETAK:

Premaligne lezije vrata maternice etiološki su vezane uz infekciju humanim papiloma virusom (HPV) i posljedičan razvoj upale i oksidativnog stresa zbog čega bi se antioksidansi mogli smatrati učinkovitim protiv progresije skvamozne intraepitelne lezije niskog stupnja (engl. *low grade SIL*, LSIL). Recentna istraživanja pokazuju da je  $\alpha$ -lipoična kiselina (ALA) jedan od najpotentnijih prirodnih antioksidanasa s još uvijek ograničenom terapijskom primjenom u liječenju bolesti povezanih s upalom i oksidativnim stresom. Cilj ove randomizirane, dvostruko slijepe placebo kontrolirane studije je istražiti učinkovitost suplementacije ALA-om (600 mg/dne) na regresiju LSIL-a na uzorku od 100 pacijentica te dobiti širi uvid u terapijski potencijal i mehanizme djelovanja ALA-e na oksidativni stres, upalne biljege i parametre lipidnog statusa. Prisutnost LSIL-a utvrđena je nakon citološkog probira, kolposkopskog pregleda i ciljane biopsije te histološke potvrde citološko-kolposkopske dijagnoze. Parametri oksidativnog stresa, upale, lipidnog statusa i prisustvo HPV-a su utvrđeni standardnim laboratorijskim metodama. Prehrambene i životne navike istražene su korištenjem standardiziranog i validiranog semikvantitativnog upitnika o konzumiranju hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*, FFQ). Dobiveni rezultati pokazali su da je suplementacija ALA-om znatno reducirala broj pacijentica s citološkim abnormalnostima niskog stupnja u odnosu na pacijentice koje su uzimale placebo. Uzimajući u obzir dobivenu razinu značajnosti ( $p < 0,001$ ), prezentirani rezultati upućuju da kratkoročna suplementacija ALA-om pokazuje klinički značajan učinak na cervikalnu citologiju. Intervencija nije imala značajan utjecaj na parametre antioksidativnog statusa iako je antioksidativni kapacitet seruma (Trolox ekvivalentni antioksidativni učinak (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*, TEAC), kapacitet vezanja kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) i Folin-Ciocalteu redukcijски potencijal (engl. *Folin-Ciocalteu*, FC)) bio povećan nakon suplementacije kod određenih podskupina pacijentica u ovisnosti o njihovom unosu antioksidanasa hranom. Utjecaj suplementacije ALA-om na lipemiju ovisio je o inicijalnom lipidnom statusu pacijentica. Buduće studije bi trebale biti usmjerene na istraživanje učinkovitosti dugoročnije terapije ALA-om (duže od 3 mjeseca) te uključiti i pacijentice s visokim stupnjem SIL-a. Također bi se trebale usmjeriti na istraživanje inovativnih formulacija ALA-e s povećanom bioraspoloživošću, te na istraživanje sinergističkih učinaka modificiranog životnog stila i suplementacije ALA-om.

**Ključne riječi:** skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja (LSIL), humani papiloma virus (HPV),  $\alpha$ -lipoična kiselina (ALA), parametri antioksidativnog statusa, parametri upale, parametri lipidnog statusa, indeks kvalitete prehrane

## SUMMARY:

**Introduction.** A-lipoic acid (ALA) is potent antioxidant that performs pleiotropic actions on biological pathways linked to numerous diseases. Among other effects, it shows direct antioxidant activity, regulates the status of glutathione and modulates different signalling transduction pathways (such as insulin and nuclear factor kappa B (NFκB) and regulates glucose homeostasis and inflammatory response. Therefore, its potential as therapeutic agent in diabetic neuropathy, brain disease and cognitive dysfunction, cardiovascular diseases, endothelial dysfunction, hemorrhoidal illness, obesity and cancer is being intensively investigated. The majority of known therapeutic effects of ALA can be contributed to its direct antioxidant activity. ALA has specific structural properties characterized by a dithiolane ring, enabling the existence of both the oxidized and reduced form that together create a potent redox couple that has a standard reduction potential of  $-0.32$  V. This makes ALA a potent direct antioxidant capable of scavenging a variety of reactive oxygen species. Furthermore, it regenerates other antioxidants, chelates redox-active transition metals, and induces the uptake (or enhances the synthesis) of endogenous low molecular weight antioxidants or antioxidant enzymes, particularly glutathione (GSH) (by activating Nrf2 pathway). ALA functions as the cofactor of oxidative decarboxylation reactions in glucose metabolism; the function that requires the disulfide group of the lipoic acid to be reduced to its dithiol form, dihydrolipoic acid, DHLA. It exerts the wide range of anti-inflammatory activities, including the reduction in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated release of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ); interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ); IL-6; LPS-induced expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Recent investigation shows that through the combination of antioxidative and anti-inflammatory mechanisms, and through regulation of glucose homeostasis, ALA could also ameliorate lipid abnormalities in the hyper-lipemic and atherosclerotic environment *in vivo*. Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) is a diagnostic term used when cytology reveals either permissive HPV infection or cervical intraepithelial neoplasia I (CIN I). This classification is also applied in histopathology, where LSIL and low-grade CIN are used interchangeably. LSILs constitute most abnormal findings in cervical cancer screenings, and typically resolve spontaneously within a year of diagnosis. The exact rate of spontaneous regression is difficult to ascertain due to variations in study methodologies, with reported regression percentages ranging between 7 % and 95 %. Progression to a high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) is more likely

if LSIL is caused by high-risk, oncogenic human papillomavirus (HPV) genotypes. HPV infection triggers the release of inflammation mediators, leading to the generation of reactive oxygen species (ROS) and a decrease in antioxidant levels. HPV integration, coupled with oxidative stress, induces genomic damage and epigenetic changes that hinder apoptosis and alter cellular proliferation. Dietary components with antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant properties may offer protection against SIL progression and cervical cancer development. Observational studies suggest that Western dietary patterns increase the risk of persistent HPV infection, whereas adherence to the Mediterranean diet reduces this risk. Consumption of a diverse range of whole foods rich in vitamins, minerals, and bioactive compounds, particularly those with antioxidant and antiviral properties, appears effective in preventing LSIL progression to HSIL or cervical cancer. Therefore, a balanced diet rich in mentioned health-promoting components should be recommended to patients upon LSIL diagnosis as a preventive strategy. The primary goal of this study is to investigate the impact of supplementing patients with diagnosed LSIL with alpha lipoic acid (ALA) and observe the effects on the progression/regression of LSIL after a 3-month supplementation. Additionally, we aim to investigate if a 3-month supplementation with 600 mg of ALA shows significant effect on the parameters of antioxidant - or lipid status. The secondary goal of this investigation is to find out if the observed responses to supplementation depend on the diet characteristics of the study participants, having in mind that the human antioxidant defense system resists modulation by dietary antioxidants and might depend on their nutritional intake.

**Methods.** This study was designed as a double-blind, randomized, placebo-controlled trial that recruited 100 female patients with the diagnosis of LSIL, which was determined after cytological screening, colposcopy, and a targeted biopsy. Exclusion criteria were diabetes, malignant diseases, chronic inflammatory diseases, hysterectomy, abortion, destructive therapy of the cervix, HPV vaccination and menopause. Patients who reported regular use of antioxidant dietary supplements and lipid-lowering pharmacotherapy were also not eligible for inclusion into the study. The sample size was calculated by using a randomized clinical trial sample size formula. Block randomization was used to distribute participants to either the placebo or the intervention group in a 1:1 ratio. Patients were supplemented with either 600 mg per day of ALA (oral capsules containing all-rac ALA) or a placebo (provided as oral capsules containing rice starch, visually identical to ALA capsules) for 3 months. The capsules of both ALA and placebo were provided by Zada Pharmaceuticals (Lukavac, Bosnia and Herzegovina). At the initial appointment patients filled a standardized and validated semi-quantitative food

frequency questionnaire to provide information on diet characteristics, use of dietary supplements, smoking, and physical activity. FFQ was designed as a 192-item questionnaire with one month as the reference period of intake. There were 100 dietary items listed, and the remaining items were questions about supplementation use and eating habits. The primary outcome of the study was LSIL, which was determined after the performed cytological screening, colposcopic examination of the cervix, targeted biopsy and histological confirmation of cytological-colposcopic diagnosis at the study baseline and after the 3 months intervention. Uterine tissue samples obtained by targeted colposcopic biopsy were processed by a standard histological method. Cervical smears were also tested for the presence of high-risk HPV strains. Assessment of the pathological diagnosis was done as blindness by a single experienced pathologist at baseline and after the intervention. At the initial and the follow-up appointment, blood samples were taken from the patient's cubital vein, using the standard procedure. The serum was separated by centrifugation and multiple aliquots of each sample were either analyzed immediately (biochemical parameters) or stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for future analysis (oxidative stress- and inflammation parameters). Biochemical parameters (total cholesterol (CHO), LDL, high density lipoproteins (HDL), triglycerides (TGC) and antioxidant status indicators (oxygen radical absorbance capacity (ORAC); Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC); Folin-Ciocalteu reducing capacity (FC); ferric reducing activity (FRAP); superoxide dismutase (SOD) activity; reduced glutathione (GSH); and malondialdehyde (MDA) levels) and inflammation indicators (high-sensitive C-reactive protein (hsCRP), fibrinogen (FI) and sedimentation (SE)) were determined from the collected blood samples.

**Results.** All patients recruited for the study had a diagnosis of LSIL at the initial visit; by the end of the study, this number of patients was reduced in both groups - in the placebo group 44 patients still had an LSIL diagnosis; in the treated group of patients only 2 of them still had an LSIL diagnosis ( $p < 0.0001$ ). The percentage of patients with positive HPV findings remained the same during the 3 months of study; 37.5 % in the placebo and 46.3 % in the treated group of patients were HPV-positive and observed differences were not statistically significant. The number of LSIL-positive patients decreased from 48 to 44 in the placebo group (8.33 % of patients recovered), but the observed change was found to be statistically insignificant ( $p = 0.1171$ ). On the other hand, in the ALA-treated group as much as 95.12 % of patients recovered ( $p < 0.0001$ ). None of the patients in either of the investigated groups progressed to the higher grade of SIL. The percentage of HPV-infected patients remained the same in both groups.

At the initial visit, hsCRP and FI were significantly lower in the placebo group ( $p = 0.0344$  and  $p = 0.0130$ , respectively) but still within the normal range, while SE rates were comparable ( $p = 0.0785$ ). At the 3-month follow-up visit, the situation was reversed: inflammation parameters were higher in the placebo group and observed differences were statistically significant for FI and SE rates ( $p = 0.0437$  and  $0.0046$ , respectively). All inflammation parameters increased during 3 months of supplementation in the placebo group and observed changes were statistically significant ( $p < 0.001$ ). On the contrary, in the ALA-treated group all observed inflammation parameters decreased moderately but significantly ( $p < 0.0001$ ). Investigation on the biomarkers of antioxidant status showed that at the initial measurement there were no significant differences between medians of MDA levels ( $p = 0.151$ ), FRAP ( $p = 0.381$ ), SOD ( $p = 0.180$ ), ORAC ( $p = 0.488$ ), or GSH ( $p = 0.389$ ) in the placebo and the intervention groups; TEAC was significantly higher ( $p = 0.048$ ) and FC reducing capacity was significantly lower in the intervention group ( $p = 0.005$ ). After the 3 months of supplementation the situation remained unchanged except for the GSH levels that were now significantly lower in the intervention group compared to the placebo ( $p = 0.050$ ). However, the apparent decrease of GSH values that was observed in the ALA-supplemented group after 3 months of supplementation was found to be statistically insignificant ( $p = 0.411$ ). Moreover, none of the monitored antioxidant status parameters were significantly changed, neither in the placebo nor in the intervention groups. Since diet characteristics can play a significant role in modulating the overall effectiveness of antioxidant supplements, a subgroup analysis was conducted to compare the ALA effectiveness in subgroups of patients with high ( $> 11$ ) and low ( $< 7$ ) Med-DQI (indicating low and high degree of adherence to Mediterranean dietary patterns). The Med-DQI was chosen because it quantifies the levels of adherence to the Mediterranean diet and dietary diversity, which are known to contribute to lower antioxidant and inflammation biomarkers. Subgroup analysis showed that the effects of antioxidant supplementation on antioxidant status indicators might be significantly affected by the patient's dietary characteristics. In the subgroup of patients with higher levels of compatibility with Mediterranean dietary patterns (Med-DQI  $< 7$ ) supplementation with ALA showed positive effects on SOD activity (it prevented the decrease in SOD activity that was observed in the placebo group). This was not observed in the remaining patients (Med-DQI  $> 7$ ). Lipid parameters didn't differ significantly between the placebo and intervention groups, initially. However, after 3 months, the supplementation LDL levels in the intervention group were significantly higher compared to the placebo group ( $p = 0.033$ ). During the 3-month supplementation period, CHO and LDL levels of the placebo group remained unchanged, while

in the intervention group they increased from 5.19 to 5.69 ( $p = 0.001$ ) and from 2.89 to 3.46 ( $p = 0.006$ ). The obtained results are not consistent with the results of other authors who showed that ALA either decreased LDL or showed no significant effect; however, those data were mostly obtained in studies focusing on patients with metabolic diseases and hyperlipidemia. Based on the assumption that ALA could have different effects on LDL levels depending on the initial lipid status, subgroup analysis was conducted focusing specifically on participants with hypercholesterolemia ( $LDL > 3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and specifically on normolipemic patients ( $LDL \leq 3.00 \text{ mmol L}^{-1}$ ). In patients with hyperlipidemia supplementation with ALA resulted in a very small but statistically significant decrease in LDL values (the median decreased from 3.95 to 3.89  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $p = 0.049$ ); however, a more pronounced effect has been observed in the placebo group (with a decrease from 3.76 to 3.54  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $p = 0.022$ ). This might be explained by a possible positive modification of dietary and lifestyle habits of the patients upon recruitment into the dietary clinical study (despite clear instruction that dietary habits and lifestyle should not be changed during the study), which has been noted in the literature. In the subgroup of patients with normal LDL levels, a significant increase in LDL levels was observed in the intervention but not in the placebo group (median increased from 4.01 to 4.07  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $p = 0.003$ ), which confirmed our hypothesis that the effect of ALA supplementation on lipid status might be affected by the initial lipid status of the patient.

**Conclusions.** The results of the conducted trial demonstrate that 3 months of supplementation with 600 mg of ALA significantly promotes regression of LSIL but does not affect HPV infection rates. Positive effects are probably associated with observed antiinflammatory effects of ALA. ALA showed modest effect on the parameters of antioxidant status that were partially affected by diet characteristics – primarily by the degree of compliance to a Mediterranean dietary pattern. ALA supplementation resulted with a small but statistically significant increase in LDL and CHO levels, indicating that the lipid-lowering effect of ALA observed in some studies might depend on the initial lipid status of the participants (which has been confirmed by the post-hoc subgroup analysis).

**Keywords:** low-grade squamous intraepithelial lesion; human papilloma virus; alpha lipoic acid; parameters of antioxidant status; inflammation parameters; lipid status parameters; diet quality index



## Popis upotrijebljenih kratica:

AAPH	2,2-azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenziazolin-sulfonska kiselina)
Ach	acetilkolin
AGC-NOS	atipične nespecificirane glandularne (žljezdane) stanice endocervikalnog podrijetla
AI	zadovoljavajući unos (engl. <i>adequate intake</i> )
ALA	$\alpha$ -lipoična kiselina (alfa lipoična kiselina)
AMDR	prihvatljivi raspon unosa makronutrijenata (engl. <i>Acceptable Macronutrient Distribution Range</i> )
AMPK	protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom (engl. <i>AMP-activated protein kinase</i> )
AR	prosječne potrebe (engl. <i>average requirement</i> )
ARE	element antioksidativnog odgovora (engl. <i>antioxidant response element</i> )
ASC-H	atipične skvamozne (pločaste) stanice koje mogu biti povezane s abnormalnim promjenama višeg stupnja (CIN II, CIN III)
ASC-US	atipične skvamozne (pločaste) stanice neodređenog značenja
ATP	adenozin trifosfat
AUC	površina ispod krivulje odnosa koncentracije lijeka u krvnoj plazmi i vremena (engl. <i>area under the curve</i> )
BHT	butilirani hidroksitoluen
CAT	katalaza
CHOL	kolesterol
CIN	cervikalna intraepitelna neoplazija
CGIN	cervikalna glandularna intraepitelna neoplazija
CoA	koenzim A
DHLA	dihidrolipoična kiselina
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DQI-I	internacionalni indeks kvalitete prehrane (engl. <i>The Diet Quality Index-International</i> )
EGCG	epigalokatehin-3-galat
FC	Folin-Ciocalteu redukcijski potencijal

FDG	fluor-deoksi-glukoza
FFQ	upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica (engl. <i>Food Frequency Questionnaire</i> )
FI	fibrinogen
FRAP	smanjenje antioksidativne snage željezom (engl. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
GCL	glutamat cistein ligaza
GLUT1	transporter glukoze tip 1 (engl. <i>glucose transporter type 1</i> )
GLUT4	transporter glukoze tip 4 (engl. <i>glucose transporter type 4</i> )
GP <sub>x</sub>	glutation peroksidaza
Grb2	protein vezan za receptor faktora rasta 2 (engl. <i>growth factor receptor bound protein 2</i> )
GSH	reducirani glutation
GSSG	glutationdisulfid
HDL	lipoprotein velike gustine (engl. <i>high density lipoprotein</i> )
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
HPLC	visokorazdjelna tekućinska kromatografija (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HPV	humani papiloma virus
hrHPV	visoko rizični HPV (engl. <i>high risk HPV</i> )
hsCRP	visoko osjetljivi C reaktivni protein (engl. <i>high-sensitivity C-reactive protein</i> )
HSIL	SIL visokog stupnja (engl. <i>high grade</i> )
ICAM-1	(engl. <i>intercellular adhesion molecule-1</i> )
I-3-C	indol-3-karbinol
IL	interleukin
IS	ispitivana (tretirana) skupina
ITM	indeks tjelesne mase
KS	kontrolna skupina
LDL	lipoprotein niske gustine (engl. <i>low density lipoprotein</i> )
LPS	lipopolisaharid
LSIL	SIL niskog stupnja (engl. <i>low grade</i> )
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza (engl. <i>mitogen activated protein kinase</i> )

mBCI	monoklorobiman
MDA	malondialdehid
Med-DQI	indeks kvalitete mediteranske prehrane (engl. <i>Mediterranean Diet Quality Index</i> )
MUFA	mononezasićene masne kiseline (engl. <i>monounsaturated fatty acids</i> )
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
NBT	engl. <i>nitroblue tetrazolium</i>
NFκB	engl. <i>nuclear factor kappa B</i>
NNK	metilnitrozoamino-piridil butan
Nrf-2	nuklearni faktor eritroid 2 vezani faktor 2 (engl. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> )
OGDC	alfa ketoglutarat dehidrogenaza
ORAC	kapacitet apsorpcije radikala kisika (engl. <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> )
PDH	piruvat dehidrogenaza
PI3-kinaza	fosfatidil-inozitol 3-kinaza
PKB	proteinska kinaza B
PRI	referentni unos (engl. <i>population reference intake</i> )
PUFA	polinezasićene masne kiseline (engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> )
RNS	reaktivne dušikove vrste (engl. <i>reactive nitrogen species</i> )
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SE	sedimentacija
SF	zasićene masti
SFA	zasićene masne kiseline (engl. <i>saturated fatty acids</i> )
SIL	skvamozna intraepitelna lezija
SOD	superoksid dismutaza
TAG	trigliceridi
TBA	tiobarbiturna kiselina
TEAC	Trolox ekvivalentni antioksidativni učinak (engl. <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> )
TGL	trigliceridi
TNF-α	tumorski faktor nekroze-alfa (engl. <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
UL	gornja granica sigurnog unosa (engl. <i>upper limit</i> )

VCAM-1    engl. *vascular adhesion molecule-1*

VLDL      lipoprotein vrlo niske gustoće

# Sadržaj

<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 Premaligne lezije vrata maternice.....	2
1.1.1 Anatomija i histologija vrata maternice.....	2
1.1.2 Premaligne lezije epitela vrata maternice.....	3
1.1.3 Epidemiologija i etiologija raka vrata maternice.....	4
1.1.4 Liječenje premalignih lezija vrata maternice niskog stupnja-pristup temeljen na dokazima.....	5
1.2 Regulacija upale i antioksidativnog statusa u prevenciji i liječenju premalignih promjena vrata maternice.....	7
1.2.1 Upala kao etiološki čimbenik premalignih promjena vrata maternice.....	7
1.2.2 Regulacija antioksidativnog statusa organizma.....	9
1.2.3 Endogeni antioksidativni sustav obrane organizma i antioksidansi iz hrane.....	11
1.2.4 Primjena imunomodulatora i antioksidanasa u prevenciji i liječenju premalignih promjena vrata maternice.....	14
1.3 A-lipoična kiselina.....	17
1.3.1 Struktura i svojstva $\alpha$ -lipoične kiseline.....	17
1.3.2 Biološke uloge $\alpha$ -lipoične kiseline.....	19
1.3.3 Mogućnost primjene $\alpha$ -lipoične kiseline kao nutraceutika.....	21
<b>2 OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	24
2.1 Hipoteza i ciljevi istraživanja.....	26
<b>3 METODE</b> .....	27
3.1 Dizajn istraživanja.....	28
3.2 Ispitanice.....	28
3.3 Opis i tijek istraživanja.....	29
3.4 Utvrđivanje prehrambenih navika ispitanica.....	31
3.5 Materijali.....	33
3.5.1 Kemikalije.....	33
3.5.2 Instrumenti.....	33
3.6 Dijagnosticiranje SIL-a.....	34
3.7 Krvne pretrage.....	35
3.7.1 Određivanje upalnih parametara.....	35
3.7.1.1 Određivanje sedimentacije.....	35
3.7.1.2 Određivanje fibrinogena.....	35

3.7.1.3	Određivanje visoko osjetljivog CRP-a.....	35
3.7.1.4	Određivanje interleukina 6.....	36
3.7.2	Određivanje lipidnog statusa.....	36
3.7.3	Određivanje antioksidativnog statusa.....	38
3.7.3.1	Određivanje reduciranog glutationa.....	38
3.7.3.2	Određivanje malondialdehida.....	38
3.7.3.3	Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta seruma (ORAC metoda).....	39
3.7.3.4	Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta seruma (TEAC metoda).....	40
3.7.3.5	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	40
3.8	Statistička obrada podataka.....	41
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>42</b>
4.1	Karakteristike obrazaca prehrane ispitanica uključenih u studiju.....	43
4.2	Usporedba ulaznih karakteristika kontrolne i ispitivane skupine.....	53
4.3	Utjecaj suplementacije ALA-om na stupanj SIL-a, HPV infekciju i parametre upale.....	55
4.4	Utjecaj suplementacije ALA-om na parametre oksidativnog stresa i lipemiju.....	57
4.5	Utjecaj obrazaca prehrane na učinkovitost ALA-e u djelovanju na parametre antioksidativnog statusa.....	61
4.6	Utjecaj lipidnog statusa na učinkovitost ALA-e u djelovanju na lipidne parametre.....	64
<b>5</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>68</b>
5.1	Povezanost životnih navika ispitanica i stopa spontane regresije LSIL-a.....	69
5.2	Utjecaj $\alpha$ -lipoične kiseline na regresiju LSIL-a.....	75
5.3	Utjecaj suplementacije ALA-om na parametre antioksidativnog statusa.....	78
5.4	Utjecaj suplementacije ALA-om na parametre lipidnog statusa.....	80
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>85</b>
	PRILOZI.....	113
	ŽIVOTOPIS.....	171
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD...173	

# **1 UVOD**

## 1.1 Premaligne lezije vrata maternice

### 1.1.1 Anatomija i histologija vrata maternice

Maternica (*lat. uterus*) je mišićni organ smješten u maloj zdjelici između mokraćnog mjehura sprijeda i rektuma straga. Čine je trup maternice (*lat. corpus uteri*) i vrat maternice (*lat. cervix uteri*). Između trupa i vrata nalazi se suženi dio (*lat. isthmus*), koji anatomski pripada trupu maternice, a funkcionalno vratu (kod poroda donji uterini segment isthmusa ima važnu ulogu). Dno maternice (*lat. fundus uteri*) je dio trupa maternice koji se nalazi izbočen iznad hvatišta jajovoda za maternicu. Rogovi maternice (*lat. cornua*) su dijelovi maternice na koje se vežu jajovodi. Maternica je kod odrasle žene duga 7,5 cm (4 cm trup, 0,5 cm suženi dio, 3 cm vrat), a teška 40 do 60 grama. Vrat maternice dijelimo na dio koji se nalazi u rodnici – egzocerviks (*lat. portio vaginalis cervicis*) i dio iznad rodnice (*lat. pars supravaginalis cervicis*). Porcija se nalazi otprilike 1 cm u rodnici, dok je ostatak dug otprilike 2 cm. Zaobljeni vaginalni dio vrata maternice okružuje vanjski otvor kanala maternice te je sam egzocerviks okružen uskim prostorom, vaginalnim svodom (*lat. fornix*). Supravaginalni dio je odvojen sprijeda od mokraćnog mjehura rahlim vezivnim tkivom te straga odijeljen od ravnog crijeva preko rektouterinog zatona. Kroz cijeli vrat maternice prolazi kanal vrata maternice ili endocerviks [1, 2, 3].

Vrat maternice je građen od mješavine fibroznog, mišićnog i elastičnog tkiva obloženog cilindričnim i mnogoslojnim pločastim epitelom. Fibrozno vezivno tkivo je dominantna komponenta. Glatki mišići čine oko 15 % osnovne supstance uglavnom koncentrirane u endocerviksu. Suprotno tome, 50-60 % potpornog tkiva u isthmusu čine mišićni elementi aranžirani u koncentrične snopove i imaju ulogu sfinktera.

Vaginalni dio vrata maternice (egzocerviks) pokriven je mnogoslojnim pločastim epitelom. Endocervikalna sluznica građena je od cilindričnog epitela i nalazi se u kompleksnom sustavu kriпти, u obliku džepova.. Na oba ova epitela vrata maternice može doći do malignih promjena (potencijalna mogućnost progresije do invazivnog karcinoma). Mjesto gdje se izmjenjuju cilindrični i pločasti epitel označuje se kao zona transformacije i najčešće je mjesto pojave abnormalnosti: displazija, prekanceroza i karcinoma vrata maternice [4, 5]. Budući da na obje vrste epitela može doći do malignih promjena, one se dijele na dvije skupine:

1. Promjene podrijetla mnogoslojnog pločastog (cervikalna intraepitelna neoplazija – CIN) jesu preteče invazivnog planocelularnog, odnosno skvamoznog karcinoma.



2. Promjene podrijetla cilindričnog epitela (cervikalna glandularna intraepitelna neoplazija – CGIN) jesu preteče invazivnog adenokarcinoma vrata maternice.

### 1.1.2 Premaligne lezije epitela vrata maternice

Zbog lakog pristupa vratu maternice lezije epitela vrata maternice istraživane su više nego bilo koja druga premaligna lezija ženskog spolnog sustava što je dovelo do napretka u njezinom otkrivanju i liječenju [6]. U uporabi je veliki broj izraza kojima se opisuju premaligne lezije vrata maternice. Veoma je važno naglasiti da je pojavnost lezija dio kontinuuma blage do ozbiljne atipičnosti koja može progredirati sve do invazivnog karcinoma [7]. Displazije se mogu podijeliti na displazije lakog, srednjeg i težeg stupnja. Danas je ovaj termin zamijenjen terminom CIN (cervikalna intraepitelna neoplazija) ili još novijim terminom SIL (skvamozna intraepitelna lezija) [6]. Riječ lezija odnosi se na područje abnormalnog tkiva dok intraepitelna podrazumijeva da su abnormalne stanice prisutne samo unutar epitela [8]. Uvođenjem termina SIL u uporabu, za klasifikaciju premalighnih promjena vrata maternice koriste se dva stupnja: SIL niskog stupnja (engl. *low grade*, LSIL), koji obuhvaća displazije blagog stupnja (CIN I), dok skvamozna intraepitelna lezija visokog stupnja (engl. *high grade*, HSIL) obuhvaća lezije u smislu displazija srednjeg i visokog stupnja (CIN II, CIN III) (klasifikacija prema Bethesda sustavu) [6]. LSIL odnosi se na rane promjene u veličini, obliku i broju stanica koje čine površinu vrata maternice. Neke lezije niskog stupnja mogu vremenom progredirati u lezije višeg stupnja. Kod LSIL-a lezije su ograničene na donju trećinu debljine epitela. Takve rane lezije na vratu maternice najčešće nastaju kod žena između 25 i 35 godina, ali se mogu javiti i kod drugih dobnih skupina [9]. HSIL podrazumijeva da postoji veći broj prekanceroznih stanica i da su lezije epitela izraženije pa se izmijenjene stanice značajno razlikuju od normalnih stanica. Slično LSIL-u, te prekancerozne lezije zahvaćaju samo stanice na površini vrata maternice [10, 11]. Displazija označava poremećaj maturacije, diferencijacije i orijentacije stanica epitela vrata maternice s različitim stupnjem stanične atipičnosti. Atipičnost podrazumijeva nepravilan izgled jezgara, veličine jezgara, nepravilan odnos jezgara i citoplazme kao i promjene u kromatinu. Kod displazije srednjeg stupnja (CIN II) poremećeni rast stanica nalazi se na više od 1/3 debljine epitela, dok kod CIN III lezije zahvaćaju više od 2/3 debljine epitela. Razlika između CIN III i invazivnog karcinoma je histološke naravi; kod CIN III je još uvijek intaktna bazalna membrana - tanka membrana koja dijeli epitel od subepitelnog vezivnog tkiva u kojem se nalaze limfne i krvne žile (stroma). Kod invazivnog karcinoma dolazi do prodora atipičnih (malignih) stanica kroz bazalnu membranu [12, 13]. Patohistološki se u 90-95 % slučajeva radi o karcinomu mnogoslojno-pločastog epitela:

skvamozni karcinom ili planocelularni karcinom vrata maternice. U 5 % slučajeva nastaje adenokarcinom vrata maternice i u 0-5 % slučajeva ostali karcinomi (najčešće karcinom rezervnih stanica) [5].

### **1.1.3 Epidemiologija i etiologija raka vrata maternice**

U drugoj polovini 20. stoljeća brojna epidemiološka istraživanja ukazala su na čimbenike rizika za nastanak karcinoma vrata maternice i njegovih predstadija. Rak vrata maternice je četvrti po učestalosti rak u svijetu kod žena. 2022. godine dijagnosticirano je oko 660 000 novooboljelih u svijetu te je zabilježeno oko 350 000 smrtnih slučajeva [14]. Incidencija/prevalencija se smanjuje u razvijenim zemljama zbog svijesti o zdravlju i redovitog/sustavnog pregleda vrata maternice; neke zemlje koje koriste HPV-HR (DNA) test uz Papanicolaou test (PAPA test). Ovaj rutinski probir smanjio je stopu na 70 % u razvijenim zemljama, budući da je glavni etiološki čimbenik koji dovodi do nastanka cervikalne neoplazije upravo humani papiloma virus (HPV) [15]. Rigoni-Stern je davne 1842. godine primijetio povezanost između pojave karcinoma vrata maternice i spolne aktivnosti [10]. Incidencija raka vrata maternice u zemljama u razvoju je puno viša i iznosi oko 40 oboljelih na 100 000 stanovnika [16]. Premaligne promjene vrata maternice napreduju postupno pružajući dovoljno vremena za intervenciju i sprječavanje pojave raka vrata maternice. Približne stope spontane regresije za CIN I, CIN II i CIN III su 60, 40 i 33 %, a njihove stope progresije do invazivnog karcinoma su 1,5 % za CIN I i 12 % za CIN II i CIN III [17]. U pregledu koji je objavio Ostör (1993) pokazana je vjerojatnost progresije od CIN I do CIN III približno 10 % [18]. U studiji koju su proveli Pretorius i sur. (2006) pokazano je da su stope progresije za nastanak CIN III ili raka, nakon kolposkopske dijagnoze CIN I, oko 1,9 % što je značajno niže nego u Ostörovoj studiji [19]. Cox i sur. (2003) pokazali su da je 11-13 % dijagnoza CIN I rezultiralo pojavom HSIL-a unutar 2 godine [20].

Trenutačno je teško predvidjeti ishod CIN-a, a javljaju se i nepotrebni kirurški zahvati liječenja CIN-a koji bi mogao regradirati prirodnim putem. Posljednjih godina prekomjerno kirurško liječenje CIN-a izazvalo je niz neželjenih učinaka, uključujući neplodnost, pobačaj, prijevremeni porod, insuficijenciju vrata maternice kao i indicirani carski rez u naknadnim trudnoćama. Upravo stoga je glavni cilj brojnih istraživanja postalo razumijevanje predvidivih čimbenika progresije CIN-a [21, 22]. Infekcija visoko rizičnim HPV-om (engl. *high risk HPV*, hrHPV) je najvažniji čimbenik rizika za nastanak CIN-a i kritična je komponenta njegove progresije do invazivnog karcinoma [23]. Životni rizik od infekcije HPV-om procjenjuje se na

80 % [24], pri čemu će barem 80 % hrHPV infekcija biti prolazno [25], dok će se kod 5-10 % inficiranih žena razviti CIN, a kod manje od 1 % će se razviti invazivni rak vrata maternice [26-28]. To pokazuje da hrHPV infekcija nije jedini čimbenik u progresiji CIN-a [29]. Identificiranje mogućih kofaktora hrHPV-a je važno za sprječavanje progresije CIN-a [30-32]. HPV infekcija je nedovoljna da uzrokuje rak vrata maternice jer postoji dugo latentno razdoblje između infekcije i manifestacije raka vrata maternice i sve žene zaražene HPV-om neće razviti rak vrata maternice. Stoga, postoje neki kofaktori koji imaju sinergističko djelovanje s HPV-om u nastanku raka vrata maternice. Čimbenici rizika dokazani epidemiološkim istraživanjima su pušenje, dugotrajna uporaba oralnih kontraceptiva, uporaba intrauterinog kontracepcijskog sustava, način života kao što su rani početak seksualnog života/višestruki seksualni partneri, nizak socioekonomski status, prehrana siromašna antioksidansima, genetska predispozicija i smanjeni imunitet. Pored toga, seksualno prenosive bolesti kao što su bolesti uzrokovane s *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* i sl. imaju ulogu u nastanku raka vrata maternice [33]. Nedavna istraživanja o povezanosti statusa mikronutrijenata i progresije premalighnih promjena pokazala su da su niske razine folata, vitamina A, vitamina E i ostalih mikronutrijenata povezane s rizikom od nastanka raka vrata maternice [30-32]. Osim navedenog, važan etiološki čimbenik u razvoju SIL-a je i upala. Naime, maligne lezije na vratu maternice ne pojavljuju se na potpuno zdravom cerviksu već su uvijek povezane s kroničnim cervicitisom [34].

#### **1.1.4 Liječenje premalighnih promjena vrata maternice niskog stupnja - pristup temeljen na dokazima**

Prema Hrvatskom društvu za ginekologiju i opstetriciju kod histološke dijagnoze CIN I, gdje je prethodni citološki nalaz bio ASC-H (atipične skvamozne (pločaste) stanice koje mogu biti povezane s abnormalnim promjenama višeg stupnja (CIN II, CIN III)); ASC-US (atipične skvamozne (pločaste) stanice neodređenog značenja) ili LSIL, preporuka je raditi testiranje na HPV-HR (DNA) za 12 mjeseci. Alternativa HPV-HR testiranju je citološka kontrola (PAPA test) za 6 do 12 mjeseci. Ukoliko u ponovljenom PAPA testu postoje citološke abnormalnosti  $\geq$  ASC-US ili u slučaju da je HPV-HR (DNA) testiranje pozitivno, preporuka je da se učini kolposkopija. Rutinski citološki probir se preporučuje ukoliko dva uzastopna PAPA testa budu negativna na intraepitelnu leziju ili malignitet, ili ukoliko je HPV test negativan. Ukoliko je CIN I prisutan najmanje 2 godine pristupa se liječenju ili daljnjem konzervativnom nadzoru. Ukoliko je opcija liječenja odabrana i ukoliko se kolposkopijom dobije zadovoljavajući

rezultat, prihvatljive opcije su dijagnostički ekscizijski postupak i destruktivno liječenje. U slučaju da je pacijentica bila liječena, a u kiretmanu endocerviksa je prisutan CIN ili ukoliko kolposkopski rezultat nije zadovoljavajući, preporuka je dijagnostički ekscizijski postupak. Preporuka je odabrati liječenje prema kliničkoj procjeni koja se vodi iskustvom, kliničkim vrijednostima za pojedinu pacijenticu, kao i raspoloživim resursima. Ako rezultat kolposkopije nije zadovoljavajući, destruktivni postupci nisu prihvatljivi u liječenju pacijentica sa CIN I. U području vrata maternice kao i vaginalno nije prihvatljivo koristiti proizvode koji su na bazi podofilina kao ni sam podofilin. Kod liječenja CIN I histerektomija nije prihvatljiva kao primarna i načelna opcija. Kod žena kod kojih je prije CIN I dijagnosticirana citološka abnormalnost HSIL ili AGC (atipične glandularne (žljezdane) stanice endocervikalnog podrijetla), prihvatljiva opcija liječenja je dijagnostički ekscizijski postupak. Alternativa dijagnostičko ekscizijskom postupku jeste kliničko opserviranje s kontrolama za šest i dvanaest mjeseci, te učinjenim citološko kolposkopskim nalazima, pod uvjetom da je endocervikalni kiretman negativan i zadovoljavajući kolposkopski rezultat. U ovoj situaciji prihvatljiva opcija je i provjera citološkog, kolposkopskog i histološkog nalaza, te se tada liječenje prilagođava smjernicama za interpretaciju koja je revidirana. Ukoliko bi se odabrala opcija kliničke opservacije s citološko-kolposkopskom kontrolom u žena u kojih se na kontroli unutar šest i dvanaest mjeseci ponove citološke abnormalnosti tipa AGC ili HSIL, preporučuje se dijagnostička ekscizijska procedura. Nakon kliničkog promatranja, u trajanju od godinu dana, i dva uzastopna PAPA testa koja su negativna na intraepitelnu leziju ili malignitet, preporučuje se vratiti pacijenticu u rutinski citološki probir. U žena s histološkom dijagnozom CIN I, preporučuje se dijagnostičko ekscizijska terapija i to u slučaju ako je CIN I prethodio nalaz HSIL ili AGC (PAPA test) kod kojih kolposkopski rezultat nije bio zadovoljavajući, osim u posebnih populacija kao što su trudnice. U adolescentica s dijagnozom CIN I preporuka je da konzervativni nadzor i citološka kontrola budu za 12 mjeseci. Adolescentica se upućuje na kolposkopiju samo ukoliko se u PAPA testu za godinu dana nađu citološke abnormalnosti veće ili jednake HSIL-u. Ukoliko na kontrolnom PAPA testu za dvije godine postoje abnormalnosti u citološkom nalazu veće ili jednake ASC-US-u, preporuka je pacijentici napraviti kolposkopiju. Kod adolescentica u kojih su prisutne i histološke i citološke abnormalnosti, nije prihvatljivo upotrebljavati HPV-HR (DNA) tistiranje u svrhu nadzora. Trudnicama koje imaju histološku dijagnozu CIN I preporučuje se konzervativno nadziranje i praćenje bez ikakve terapije. Trudnice koje imaju histološku dijagnozu CIN I nije prihvatljivo liječiti [35].

Također postoje i algoritmi (sistematizirani prikazi terapijskog postupka) u liječenju CIN I. Ukoliko je rezultat PAPA testa pokazao CIN I, sljedeće što bi liječnik trebao tražiti je ponovljeni PAPA test za 6 i 12 mjeseci. U slučaju da je pacijentica adolescentica, PAPA test se ponavlja za 12 mjeseci. Ukoliko ponovljeni PAPA test pokaže da se radi o histološkoj dijagnozi većoj ili jednakoj ASC-US-u, prema algoritmu se radi kolposkopski pregled. Ukoliko se kolposkopijom dobije zadovoljavajući rezultat i rezultat prikazuje normalan nalaz, daljnji postupak je klinička opservacija pacijentice. Ukoliko se kolposkopijom dobije nezadovoljavajući rezultat ili se dobiju abnormalne lezije, radi se terapijska ekscizija lezije [35].

## **1.2 Regulacija upale i antioksidativnog statusa u prevenciji i liječenju premalighnih promjena vrata maternice**

### **1.2.1 Upala kao etiološki čimbenik premalighnih promjena vrata maternice**

Upala je složena reakcija živih tkiva na čitav niz oštećenja ili podražaja. Upalom se organizam štiti od štetnog djelovanja vanjskih čimbenika (mikroorganizmi, kemikalije, fizikalna oštećenja) kao i unutarnjih čimbenika (poremećaji metabolizma, krvotoka, oksidativni stres). Upala može nastati i kao odgovor na druge bolesti, kao što je karcinom. Obrambena upalna reakcija uključuje proizvodnju kisikovih radikala, fagocitozu, lučenje protumikrobnih tvari („prirodni antibiotici“), lučenje protuendotoksinskih molekula, fibroziranje i neovaskularizaciju te promjene tkivne arhitekture zahvaćenog organa ili tjelesnog prostora. U kliničkom smislu upala se očituje akutnim, subakutnim te kroničnim tijekom koji se, osim vremenske dinamike, razlikuju patogenetskim učincima, zastupljenošću pojedinačnih reakcija te ishodom. Neki uzročnici upale (infekcije, infestacije, autoimunost) pokreću uz upalnu reakciju i specifični imunosni odgovor (humoralni, stanični, citokinski). Pri tom se razvija sinergizam imunosne i upalne reakcije preko zajedničkih citokina i efektornih mehanizama [36].

Upala vrata maternice (cervicitis) je najčešća bolest zbog koje se žene obraćaju za pomoć ginekologu, a ispoljava se pojačanim sekretom različite gustoće, boje i mirisa, što u prvom redu ovisi od samog uzročnika. Upalni proces ženskog spolnog sustava može biti uzrokovan infekcijom raznim mikroorganizmima te fizikalnim i kemijskim čimbenicima [37, 38]. Nedovoljno zreo epitel, traume endocervikalnog kanala ili bilo kakve ozljede te alkalinizacija

pH rodnice, čimbenici su koji pogoduju razvoju upale. Najčešći mikroorganizmi koji uzrokuju upale su bakterije (*Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*), virusi (*HPV*, *Herpes simplex virus*, *Citomegalovirus*), gljivice (*Candida albicans*) te paraziti (*Trichomonas vaginalis*). Tri su glavna mehanizma upale: izravna invazija patogena (uglavnom spolno prenesena), širenje upale iz susjednih organa ili hematogeni transfer. Svi infektivni procesi mogu se očitovati akutnom ili kroničnom upalnom reakcijom [38]. Akutni cervicitis je rijedak, a najčešće se dovodi u vezu s porođajima ili pobačajima. Kronični cervicitis se mnogo češće susreće, a obično je povezan s ascendentnom infekcijom koja se u endocerviks proširi iz rodnice. Akutni i kronični cervicitis mogu biti neinfektivni i infektivni. Neinfektivni cervicitis je najčešće izazvan mehaničkim ili kemijskim oštećenjima, a upalni odgovor je nespecifičan. Žene s perzistentnom upalom na PAPA testovima zahtijevaju posebnu dijagnostičku pozornost te ih je potrebno češće pratiti jer se atipičnosti povezane s upalom mogu zamijeniti s atipičnim promjenama kod SIL-a ili invazivnog karcinoma [39]. Ukoliko se uzročnik upale ne eliminira, dolazi do stanja kronične upale koja može dovesti i do razvoja kroničnih bolesti. Molekule koje aktiviraju stvaranje citokina i drugih produkata upalnog odgovora su produkti mikroorganizama, te sami citokini. U citokine se ubraja skupina interleukina (označenih od IL-1 do IL-29), čimbenika nekroze tumora i interferona. Proupalni citokini su IL-1 β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, TNF-α i IL-12 [40]. Citokini reguliraju i ekspresiju adhezijskih molekula (npr. ICAM-1 molekula (engl. *intercellular adhesion molecule -1*); VCAM-1 molekula (engl. *vascular adhesion molecule-1*)) na endotelnim stanicama. Također, ove molekule se vežu na različite receptore i time aktiviraju četiri osnovna unutarstanična signalna puta kojima se kontrolira ekspresija gena uključenih u upalni odgovor na transkripcijskoj i posttranskripcijskoj razini [41, 42]. Jedan od signalnih puteva ekspresije gena uključenih u upalni odgovor je signalni put protein-kinaza kojim se aktivira transkripcijski čimbenik NF-κB (engl. *nuclear factor kappa B*) [43]. Aktivaciju NF-κB mogu izazvati različiti čimbenici kao što su citokini, bakterijski ili virusni produkti, UV zračenje ali i reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) [44]. Aktivacija NF-κB transkripcijskog čimbenika je od ključne važnosti za imunitet, upalu, rast i opstanak stanica, te njihov razvoj i širenje [45-47]. NF-κB transkripcijski čimbenik regulira ekspresiju stotine gena koji su uključeni u proces regulacije rasta i diferencijacije stanica [48]. Može aktivirati i veliki broj gena uključenih u stresni odgovor, upalu i apoptozu [43].

Glavni etiološki čimbenici za nastanak karcinoma vrata maternice su upala, oksidativni stres i infekcija HPV-om. Oštećenje cervikalnog epitela izaziva upalni odgovor koji je karakteriziran

degenerativnim promjenama citoplazme i koagulacijskom nekrozom jezgara te sistemskim promjenama u stromi koje uključuju: hiperemiju papilarnih krvnih žila, eksudaciju tekućine u okolno tkivo te posljedični edem i migraciju polimorfonukleara na mjesto infekcije ili ozljede [37, 38]. Ovisno o etiologiji, upalne promjene mogu zahvatiti pločaste stanice, cilindrične stanice ili oba tipa stanica [38]. Prema nekim istraživanjima, oko 32 % displastičnih lezija povezuje se s upalnim sadržajem. Studije su pokazale da su infekcije HPV-om i *Chlamydom trachomatis* najjače povezane s razvojem premalighnih promjena vrata maternice [49]. Prema studiji provedenoj u Republici Hrvatskoj, 43 % pacijentica s nalazom CIN I imalo je udruženu infekciju s *Ureaplasma urealytica* i HPV-om te s *Chlamydia trachomatis* i *Ureaplasma urealytica* u 35 % uzetih i analiziranih obrisaka. Pokazalo se da postojanje kolpitisu te agresivna i ponovljena ili pak neracionalna profilaktična antibiotska terapija mogu biti čimbenici rizika za razvoj CIN-a [50].

### **1.2.2 Regulacija antioksidativnog statusa organizma**

U nastanku upale važnu ulogu ima pojava oksidativnog stresa koji nastaje kao posljedica oksidativne neravnoteže u organizmu [34]. Oksidativnim stresom označava se neravnoteža između stvaranja oksidansa i odgovarajućih obrambenih sustava organizma. Oksidansima pripadaju ROS, reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), sumporni radikali i različiti drugi oblici. Oni nastaju uslijed djelovanja kako egzogenih tako i endogenih čimbenika. Čimbenici okoliša koji potiču nastanak slobodnih radikala su ultraljubičasto i ionizirajuće zračenje, profesionalna izloženost brojnim metalima sa promjenjivom valencijom (Mn, Cd, Fe, itd.), organskim otapalima, plinovitim otrovima, kao i uporaba lijekova i drugih ksenobiotika s redoks-ciklizirajućim metabolizmom [51]. Najznačajniji endogeni izvori ROS-a su nepotpuna redukcija kisika u respiratornom lancu mitohondrija i oksidativna eksplozija (engl. *oxidative burst*) prouzročena NADPH-oksidadom u stanicama fagocita, pri čemu nastaje superoksidni radikal [52]. U akutnoj upali aktivacija neutrofila dovodi do značajne proizvodnje kisikovih radikala aktivacijom NADPH-oksidade te u pobuđenim neutrofilima nastaje superoksidni anion. Pri tome potrošnja kisika u neutrofilima ekscesivno raste (do više nego pedeseterostruko), a istodobno ekscesivno raste i potrošnja reduciranog supstrata NADPH, koji se obnavlja potrošnjom glukoze u fosfoglukonatnom putu. Time se pri oksidativnoj eksploziji u neutrofilima snažno povećava potrošnja glukoze, što kadšto može postati ograničavajući čimbenik upalotvorne sposobnosti neutrofila. Oksidativna eksplozija i ubrzanje glikolize i fosfoglukantnog metabolizma istodobno pridonose termogenezi. Stvoreni radikali imaju snažne toksične učinke na stanice i njihove strukture. Osobito je u akutnoj upali važna lipidna

peroksidacija, koja može uzrokovati razaranje susjednih membrana i stanica te samorazaranje neutrofila, čime se stvara amorfn masa, gnoj.

Oštećenju tkiva pridonosi i lizosomna mijeloperoksidaza u neutrofilima stvaranjem hipokloritnih radikala iz vodikova peroksida i klora. Budući da se ekscesivnim lokalnim oksidativnim stresom razaraju i aktivirani neutrofili, proces je samoograničavajući. Tim se mehanizmom postiže temeljna obrambena uloga upale (minimalizacija nokse i uklanjanje razorenoga tkiva) [53].

U biološkim sustavima, oksidativni stres izazivaju prije svega slobodni radikali. Slobodni radikali su reaktivne vrste koje u obliku iona, atoma ili molekula, s jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, teže formiranju elektronskog para. Zbog toga posjeduju svojstvo ekstremne reaktivnosti. Jednom stvoren slobodni radikal može započeti niz lančanih reakcija reagirajući s drugim biomolekulama, kada nastaju sekundarni slobodni radikali. Na ovaj način se širi oksidativno oštećenje. Pored slobodnih radikala postoje i druge reaktivne molekule koje imaju svojstvo slobodnih radikala, ali su po kemijskoj strukturi molekuli ili ioni koji ne sadrže nespareni elektron. Primjer takvih reaktivnih vrsta su vodikov peroksid ili anion peroksinitrita, koji iniciraju i posreduju u lančanim reakcijama slobodnih radikala [52]. Većina slobodnih radikala može reagirati s različitim biomolekulama u stanici, kao što su enzimi, strukturni i receptorski proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Iako se slobodni radikali u organizmu obično nalaze u vrlo niskoj koncentraciji ( $10^{-5}$  do  $10^{-9}$  mol), oni prije svega pokazuju toksične efekte. Kumulativni učinak kaskade reakcija iniciranih slobodnim radikalima može dovesti do smrti stanice uslijed nekroze i apoptoze ili uvjetovati neoplastičnu transformaciju. Stanice se štite od toksičnog djelovanja slobodnih radikala brojnim proteinima, enzimima i neproteinskim molekulima koji zajedno čine tzv. antioksidativni sustav organizma. Antioksidansom se smatra svaka ona tvar koja pri niskoj koncentraciji u usporedbi s oksidabilnim biosupstratom, značajno smanjuje ili prevenira oksidaciju tog supstrata. Antioksidativna obrana stanica ostvaruje se na više načina: sprječavanjem nastanka slobodnih radikala, neutralizacijom nastalih radikala, popravkom oštećenja nastalih djelovanjem radikala, povećanim uklanjanjem oštećenih molekula i sprječavanjem popravka oštećenih molekula [54].

Sveukupnim djelovanjem antioksidansi učinkovito preveniraju toksične učinke izazvane slobodnim radikalima, čineći ravnotežu s prooksidativnim procesima [52]. S obzirom na mogućnost sinteze u organizmu antioksidansi se mogu podijeliti na endogene i egzogene.



Endogeni antioksidansi se sintetiziraju u organizmu i mogu biti enzimski (glutation peroksidaza (GPx), superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT)) i neenzimski ( $\alpha$ -lipoična kiselina, koenzim Q10, mokraćna kiselina, bilirubin itd.). Egzogeni antioksidansi se u organizam unose putem hrane. Najvažniji egzogeni antioksidansi su vitamin C, vitamin E, cink, selen, polifenoli, flavonoidi i karotenoidi.

Većina egzogenih i neki endogeni antioksidansi posjeduju izravni antioksidativni učinak koji se manifestira kao sposobnost vezivanja (gašenja, hvatanja) slobodnih radikala (najčešće kisikovih), a u tu se skupinu ubraja većina antioksidanasa iz hrane. S obzirom na zajedničku sposobnost gašenja kisikovih radikala oni smanjuju oksidativni stres, tj. akutno povećanje koncentracije radikala u tkivima te posredno i njihovo proupalno djelovanje. Učinkovitost izravnih antioksidansa primarno ovisi o njihovom kemijskom potencijalu, ali i topljivosti s obzirom da djelovanje u membranama, micelarnim i emulzijskim sustavima zahtijeva lipofilni ili ambifilni karakter [55].

### **1.2.3 Endogeni antioksidativni sustav obrane organizma i antioksidansi iz hrane**

Na razini stanice, razvijeni su posebni enzimski mehanizmi koji djeluju protiv slobodnih radikala. Enzimi koji djeluju antioksidativno su SOD, CAT i superoksid peroksidaza. Skupinu SOD čine tri vrste dismutaza koje djeluju u različitim dijelovima stanice: citosolu, mitohondrijima i ekstracelularno. SOD katalizira pretvaranje slobodnih radikala kisika u peroksid. Katalaza reducira peroksid do kisika i vode te je posebno značajna kada je koncentracija peroksida niska. Veće koncentracije peroksida zahtijevaju djelovanje glutation peroksidaze (GPx), pri čemu se reducirani glutation (GSH) oksidira u glutathiondisulfid (GSSG) a zatim ponovno reducira do GSH uz pomoć glutation reduktaze uz NADPH kao koenzim. GPx može uklanjati i druge lipidne perokside pretvarajući ih u odgovarajuće alkohole [56].

Glutation je tripeptid kojeg sintetiziraju stanice sisavaca u dvije enzimске reakcije ovisne o ATP-u. Glutation je osnovni stanični antioksidans koji uklanja reaktivne kisikove vrste i elektrofile. Antioksidativna funkcija glutathiona određena je redoks potencijalom tiolne (-SH) skupine cisteina [57]. Iako se sintetizira u citosolu, glutation se nalazi u intracelularnim organelama, uključujući endoplazmatski retikulum, nukleus i mitohondrije gdje sudjeluje u regulaciji specifičnih staničnih mehanizama [58].

Ubikinon ili koenzim Q10 je ključna molekula u transportnom sustavu elektrona u mitohondrijima gdje igra bitnu ulogu prilikom sinteze ATP-a koji je neophodan za opstanak

stanice i kao izvor energije za procese kao što su proliferacija, apoptoza, angiogeneza i imuni odgovor organizma [59]. Najveća koncentracija ubikinona je u citoplazmi i mitohondrijima. Pored toga što se sintetizira u organizmu, može se naći u malim količinama i u hrani kao što su meso, riba, orasi i neka ulja, a u još manjim količinama prisutan je u voću i povrću [60]. Zajedno s tokoferolom, učestvuje u prevenciji raka i procesima starenja, a zahvaljujući antioksidativnom djelovanju sprječava upalni odgovor organizma [59].

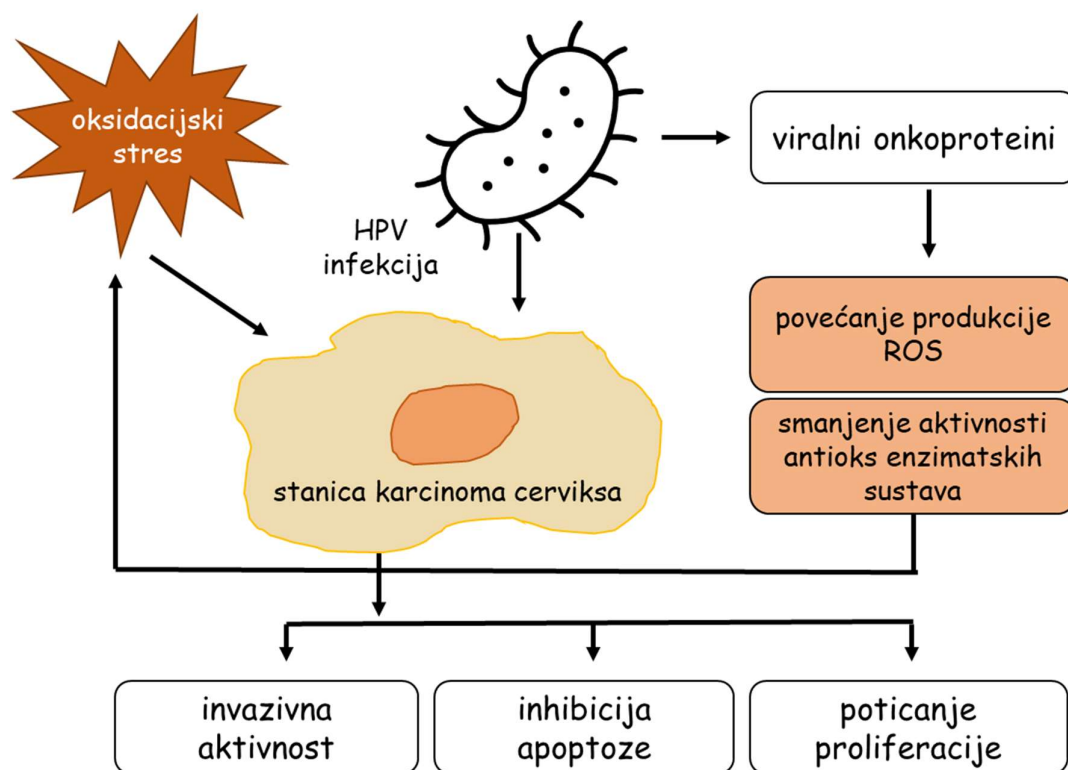
Pojedine vrste hrane, osobito voće i povrće sadrže mnogo različitih biološki aktivnih sastavnica koje također ispoljavaju antioksidativna svojstva. Zahvaljujući tome, vjerojatno utječu na ekspresiju upalnog odgovora NF- $\kappa$ B te sprječavaju upalni odgovor organizma, smanjuju oksidativno oštećenje i mijenjaju ekspresiju gena [61].

Polifenoli su velika skupina biološki aktivnih sastavnica hrane u čijoj strukturi se nalazi aromatski prsten sa jednom ili više hidroksilnih skupina. Nalaze se u voću, povrću, kavi, čaju, sokovima i vinu [62]. Zbog svog antioksidativnog djelovanja većina polifenola može utjecati na smanjenje aktivacije NF- $\kappa$ B pa se konzumiranje hrane koja ih sadrži preporučuje za smanjenje upalnog odgovora organizma. Izoflavoni su podskupina polifenola koji imaju strukturu sličnu estrogenu. Nalaze se u leguminozama. Najpoznatiji je genistein prisutan u sojinom zrnu. Genistein se ponaša kao fitoestrogen i može u kasnijoj životnoj dobi aktivirati receptore za estrogen kod žena [63]. Zbog svog djelovanja na supresiju upalnog odgovora putem zaustavljanja NF- $\kappa$ B i supresiju arahidonske kiseline, genistein djeluje i protiv raka dojke [64]. Flavonoli su grupa polifenola koji se sintetiziraju u biljkama pod djelovanjem sunca, tako da njihova koncentracija u biljci ovisi o izloženosti svjetlosti [62]. Najviše je istraženo djelovanje kvercetina koji između ostalog djeluje i kao inhibitor NF- $\kappa$ B [65]. Kempferol djeluje kao antioksidans (a zbog mehanizma djelovanja i protuupalno), u prevenciji karcinoma i usporava rast postojećih stanica raka [66]. Flavanoli uključuju katehine, galokatehine prisutne u voću, povrću, zelenom čaju, crnom vinu i čokoladi [62]. Oni djeluju supresivno na proliferaciju različitih stanica kao i na upalni odgovor putem NF- $\kappa$ B [67, 68]. Resveratrol je polifenol koji spada u grupu stilbena a nalazi se u crvenom vinu. *In vitro* studije i studije na životinjama pokazale su da usporava rast stanica raka, reducira upalu i smanjuje aktivaciju NF- $\kappa$ B [61]. Kurkumin je derivat hidroksicinamične kiseline, štiti od oksidativnog stresa i upalnog oštećenja. Jedan od mehanizama putem kojih djeluje kurkumin je supresija NF- $\kappa$ B upalnog odgovora [69]. Terpeni su izoprenoidi koji grade velike molekule kao što su retinoidi, likopeni i tokoferoli [61]. Retinoidi su tamno zeleni i tamno žuti pigmenti u voću i povrću, poznatiji kao

karotenoidi. Ispoljavaju antikarcinogeno djelovanje putem regulacije specifičnih puteva odgovornih za proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu te su neophodni za normalnu staničnu diferencijaciju [70]. Koncentracija karotenoida u plazmi obrnuto je proporcionalna riziku za razvoj raka dojke [71]. Likopeni su crveni pigmenti voća i nalaze se u većoj količini u rajčici, lubenici i crvenom grejpu [61]. Bolja bioraspoloživost se postiže kuhanjem [72]. Likopen djeluje antikarcinogeno posebno kada je u pitanju rak dojke i rak prostate [73-75]. Najpoznatiji tokoferol je vitamin E, koji je liposolubilna sa snažnom antioksidativnom aktivnošću pri čemu može izravno utjecati na ekspresiju gena [61]. Sumporni spojevi obuhvaćaju izotiocijanate i organosumporne spojeve koji se nalaze u povrću iz porodice lukovica. Izotiocijanati daju karakterističnu aromu povrću i prema studijama sprječavaju rak djelujući antioksidativno [61]. Organosumporni spojevi, koji se nalaze u lukovicama, osobito češnjaku, sprječavaju rak prostate [76, 77]. Ovi spojevi djeluju putem različitih mehanizama, ali prije svega inhibicijom NF- $\kappa$ B signalnog puta te antioksidativnim djelovanjem [78]. Vitamin C (askorbinska kiselina) je jedan od najbolje istraženih vitamina. Nalazi se u svježem voću i povrću. Ima mnogo uloga u organizmu kao što su formiranje kostiju, zacjeljivanje rana, pozitivno djeluje na zdravlje kože i sluznica. Kada je u pitanju metabolizam, aktivira vitamine B skupine, neophodan je za transformaciju kolesterola u žučne kiseline, transformaciju triptofana u serotonin. Među najvažnijim djelovanjima vitamina C su antioksidativno i protuupalno [79]. Vitamin C je topljiv u vodi i vrlo brzo reagira s različitim vrstama kisika, uključujući superoksid- i hidroksi-radikal, formirajući askorbat radikal koji dalje stupa u reakciju s drugim askorbat radikalom te nastaje dehidroaskorbat i askorbat. Askorbat je antioksidans koji djeluje u citosolu. Zbog toga je zanimljiva njegova interakcija s vitaminom E koji je liposolubilna i djeluje na staničnoj membrani. Vitamin E je vrlo reaktivan i sprječava lipidnu peroksidaciju. Askorbat koji se nalazi u citosolu, može reagirati s vitaminom E vezanim na membranu stanice i reparirati ga. Oba vitamina u reduciranoj formi održava intracelularni reduktant GSH [56]. Vitamin E (tokoferol) postoji u više oblika, a svi ispoljavaju snažno antioksidativno djelovanje [59]. Minerali koji pokazuju izuzetnu antioksidativnu sposobnost su cink i selen. Cink se istražuje dugi niz godina i njegovo antioksidativno djelovanje može biti akutno i kronično. Akutno djelovanje se temelji na zaštiti sulfhidrilnih grupa proteina i redukciji OH grupe do peroksida. Kronično antioksidativno djelovanje cinka povezano je s neizravnim učinkom na druge antioksidanse kao što su metaloproteini [80]. Selen ostvaruje svoje antioksidativne učinke kao dio selenocisteina koji sudjeluje u izgradnji brojnih proteina uključenih u antioksidativnu obranu organizma.

### 1.2.4 Primjena imunomodulatora i antioksidanasa u prevenciji i liječenju premalighnih promjena vrata maternice

Uz prepoznatu važnost upale u etiologiji premalighnih lezija vrata maternice, sve je više prepoznata i važnost oksidativnog stresa (Slika 1). Oksidativni stres i prekomjerno stvaranje ROS-a uzrokuju oksidativna oštećenja DNA te doprinose stvaranju mutacija i općenito genomskoj nestabilnosti i karcinogenezi [81].



**Slika 1.** Osnovni mehanizmi kojima oksidativni stres doprinosi karcinogenezi (slika nacrtana korištenjem programskog paketa Microsoft Power Point)

Smatra se da adekvatan unos antioksidanasa hranom ima preventivni učinak u nastanku premalighnih promjena vrata maternice te da povećan unos antioksidanasa hranom povećava vjerojatnost spontane regresije LSIL-a [82]. Do danas provedene kliničke studije pokazuju da je prevencija progresije LSIL-a u viši stupanj odnosno potpuna regresija LSIL-a povećanim unosom nutrijenata sa snažnim antioksidativnim, antiviralnim i protuupalnim učincima najučinkovitija upravo kod pacijentica sa LSIL-om [83]. U tom smislu do danas je dokazana učinkovitost suplementacije nekim potentnim antioksidansima: zelenim čajem, indol-3-

karbinolom, vitaminima C, E, A, B12, folnom kiselinom, i dugotrajnom suplementacijom selenom (Se) [84-88].

Selen je esencijalni mikronutrijent u tragovima koji ima ključnu ulogu u različitim glavnim metaboličkim putevima, čime štiti organizam od toksičnih učinaka teških metala [89]. Zabilježen je obrnuti odnos između razina selena u serumu i CIN-a ili raka vrata maternice [90], a koncentracija selena značajno je niža u tkivima žena s rakom vrata maternice u usporedbi s tkivima žena koje nemaju lezije [91]. Unos selena može smanjiti rizik od raka putem povećane ekspresije selenoproteina, zaštite od oksidativnog oštećenja DNA i/ili poboljšanih procesa popravke DNA [89]. Ovi mehanizmi mogu sugerirati važnost dodatka selena u procesu maligne transformacije i proliferacije u karcinogenezi vrata maternice. U studiji Karamli i suradnika (2015) dokazano je da je došlo do regresije CIN I kod žena koje su uzimale selen tijekom 6 mjeseci u usporedbi sa ženama koje su uzimale placebo, te je suplementacija selenom imala blagotvorne učinke na biljege metabolizma inzulina, koncentracije TAG, VLDL i HDL-kolesterola kao i biomarkere oksidativnog stresa [87].

U studiji Ahn i suradnika (2003) istražena je učinkovitost ekstrakata zelenog čaja (polifenon E (poli E) i (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG)) koji su primjenjivani u obliku masti ili kapsula kod pacijentica s cervikalnim lezijama zaraženim HPV-om [85]. Pedeset i jedna pacijentica s promjenama vrata maternice (kronični cervicitis, blaga displazija, umjerena displazija i teška displazija) podijeljene su u četiri skupine, u usporedbi s 39 neliječenih pacijentica koje su bile kontrolna skupina. Poli E je primijenjen lokalno u obliku masti u 27 pacijentica, dva puta tjedno. Za oralnu primjenu, korišteno je 200 mg poli E ili EGCG u obliku kapsula, koje su uzimane svaki dan tijekom osam do dvanaest tjedana. U studiji je 20 od 27 pacijentica (74 %), koje su bile tretirane s poli E u obliku masti, pokazalo odgovor, a od ukupno šest pacijentica koje su bile tretirane s poli E u obliku kapsula, tri (50 %) su pokazale odgovor. Šest od 10 pacijentica (60 %), koje su bile pod terapijom EGCG u obliku kapsula, su pokazale odgovor. Sveukupno, zabilježena je stopa odgovora od 69 % (35/51) kod liječenja ekstraktima zelenog čaja, u usporedbi sa stopom odgovora od 10 % (4/39) u netretiranim kontrolama ( $P < 0,05$ ). Prikupljeni podaci iz ove studije pokazali su da su ekstrakti zelenog čaja u obliku masti i kapsula učinkoviti u liječenju cervikalnih lezija, što sugerira da ekstrakti zelenog čaja mogu biti potencijalni terapijski režim za pacijentice s cervikalnim lezijama i HPV-om [85].

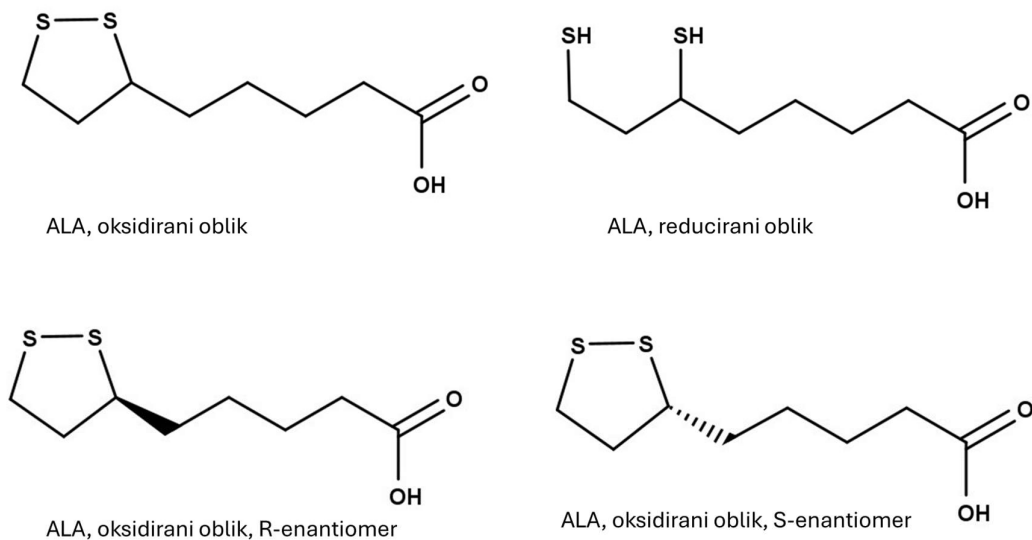
Bell i suradnici (2000) u svom istraživanju pretpostavili su da je primarni mehanizam djelovanja indol-3-karbinola (I-3-C) mijenjanje omjera 2-hidroksiestrona/16a-hidroksiestrona

[86]. Pokazali su rastuću promjenu tog omjera između placeba u odnosu na skupine koje su tretirane s 200 i 400 mg na dan indol-3-karbinolom, i to na način veća doza-bolji odgovor. U ovom istraživanju nije primijećena toksičnost niti u jednoj od skupina koje su uzimale 200 ili 400 mg na dan indol-3-karbinola. Kada se promatraju pojedinačni omjeri i utvrđuje može li pozitivna promjena omjera predvidjeti hoće li kod pacijentice doći do regresije lezije, podatci iz ovog istraživanja su pokazali da je kod šest od osam pacijentica koje su imale regresiju došlo do pozitivne promjene u omjeru 2-hidroksiestrona prema 16a-hidroksiestronu u mokraći. Nasuprot tome, kod pet od šest pacijentica koje su imale negativnu promjenu u omjeru 2-hidroksiestrona/16a-hidroksiestrona u mokraći, pokazan je perzistentni CIN. Činjenica da nisu sve ispitanice imale značajno povećanje (veće od 50 %) njihovog omjera 2/16 može se objasniti alternativnim putevima kojima indol-3-karbinol djeluje. Ovi alternativni putevi uključuju indukciju apoptoze [92], inhibiciju sklapanja mikrotubula [93], i smanjeni učinak NNK-a, poznatog karcinogena iz duhana [94, 95]. Indol-3-karbinol možda neće izazvati promjenu u metabolizmu estrogena u podskupini opće populacije. Neke pacijentice imaju polimorfizam citokrom P450 1A1 (*CYP 1A1*) gena, MSP-1 polimorfizam (2A, m1, T3801C, ili rs4646903) i polimorfizam Ile462Val (2C, m2, ili rs1048943) [96], stoga se u tom slučaju ne očekuje da će primjena I-3-C pomaknuti omjer 2/16-hidroksiestrona. Bell i suradnici u svom istraživanju nisu testirali *CYP 1A1* genotip kod pacijentica. Genotip *CYP 1A1* prisutan je u 1–16% stanovništva, ovisno o njihovom etničkom podrijetlu [97], stoga bi daljnje studije u kojima se koristi I-3-C kod cervikalne displazije trebale uključivati genotipizaciju *CYP 1A1* kako bi se procijenila učinkovitost I-3-C u različitim genotipovima *CYP 1A1*.

## 1.3 A-lipoična kiselina

### 1.3.1 Struktura i svojstva $\alpha$ -lipoične kiseline

A-lipoična kiselina (ALA) ili 1,2-ditiolan-3-pentanoična kiselina je spoj koji nastaje u mitohondrijima iz oktanoične kiseline (Slika 2).



**Slika 2.** Struktura  $\alpha$ -lipoične kiseline (ALA) (strukture nacrtane korištenjem MarvinSketch 23.16. software <https://chemaxon.com/>)

ALA u biološkim sustavima prelazi iz reduciranog oblika, dihidrolipoične kiseline (DHLA), u oksidirani oblik (ALA) i obrnuto. Ima kiralni centar te se javlja kao R- ili S- optički izomer (enantiomer). R-enantiomer ima značajno bolju oralnu bioraspoloživost i biološku aktivnost od S-enantiomera.

ALA se sintetizira i u biljkama i životinjama, a nastaje i u ljudskom organizmu. Kod ljudi se sintetizira u jetri kao i u drugim tkivima, gdje kao kofaktor sudjeluje u enzimskim reakcijama višeenzimskih kompleksa dehidrogenaza, prvenstveno piruvat dehidrogenaze (PDH) i  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaze (OGDC) [98]. Kovalentno vezana na dihidrolipoil transacetilaznu komponentu (E<sub>2</sub>) PDH kompleksa, ALA preuzima acetilnu skupinu te je prenosi na koenzim A (CoA), pri čemu nastaje acetil-koenzim A (acetil CoA) [99]. Budući da se kod ljudi može sintetizirati u vrlo malim količinama iz masnih kiselina i cisteina, ALA-u je neophodno unositi u organizam prehranom [100]. Prisutna je u hrani biljnog i životinjskog podrijetla. Najznačajniji izvor ALA-e iz hrane su crveno meso, srce, jetra i bubrezi, dok se u tamnozelenom, lisnatom

povrću i voću nalazi u vrlo malim količinama i to prije svega u špinatu, brokuli, krumpiru, mrkvi i rajčici [101, 102]. ALA je dostupna kao dodatak prehrani u dozama do 600 mg dnevno. Kako bi se postigla bolja bioraspoloživost, ALA-u kao dodatak prehrani treba uzimati 30 minuta prije ili sat vremena poslije jela [103]. Kod oralne primjene bioraspoloživost iznosi 30 %. ALA se ekstenzivno metabolizira pri prvom prolazu u jetri. Primarni metabolički putevi u čovjeka su  $\beta$ -oksidacija karboksilne kiseline postraničnog lanca te S-metilacija ditiolanskog prstena. Iako metaboliti imaju dulje poluvrijeme eliminacije ( $t_{1/2}$ ) od same ALA-e, ne dolazi do njihova nakupljanja u tijelu [104]. Metaboliti koji doprinose antioksidativnoj aktivnosti *in vivo* su DHLA i tetranorlipoična kiselina, produkt  $\beta$ -oksidacije [98]. U novije vrijeme pojavila se i zabrinutost oko mogućnosti djelovanja visokih doza ALA-e i DHLA-e kao prooksidansa, ovisno o vrsti oksidativnog stresa i fiziološkim uvjetima u kojima se nalazi. S obzirom na tu mogućnost od izrazite je važnosti odabir odgovarajuće doze ALA-e u terapiji bolesti vezanih uz oksidativni stres [105]. ALA ima visoki redukcijski potencijal; redukcijom nastaje DHLA [106]. Prema kemijskom sastavu ALA je disulfitni derivat oktanoične kiseline [107]. Sadrži osam atoma ugljika, pri čemu je šesti atom kiralni centar, što rezultira njezinim postojanjem u dva optička izomera: R-ALA i S-ALA (Slika 2). Prirodna ALA je u R obliku dok je sintetička mješavina R i S oblika [108]. Od njih jedino R-ALA nastaje endogenom sintezom te je prisutna u hrani kovalentno vezana za lizinske ostatke proteina [109]. S-ALA nastaje kemijskom sintezom te inhibira neke od interakcija R-ALA-e s genima, enzimima i proteinima [110]. Jedna od prednosti racemične smjese (omjer R:S = 50:50) je sposobnost S-ALA-e da spriječi polimerizaciju R-ALA-e što posljedično povećava njezinu bioraspoloživost [102].

ALA je mala molekula koja u svom heterocikličnom 1,2 ditiolanskom prstenu sadrži dva atoma sumpora, što je čini izuzetno reaktivnom [100]. Kemijska aktivnost ALA-e se veže za ditiolanski prsten i oksidativno stanje. Oksidirani (ALA) i reducirani (DHLA) oblik predstavljaju potentni redoks par. U mitohondrijima u NADP-ovisnoj reakciji lipoamid dehidrogenaza reducira ALA-u u DHLA-u, dok u stanicama bez mitohondrija tu ulogu mogu obaviti glutation (GSH) i tioredoksin reduktaza [111]. Obje forme, ALA i DHLA, imaju antioksidativnu ulogu u organizmu.

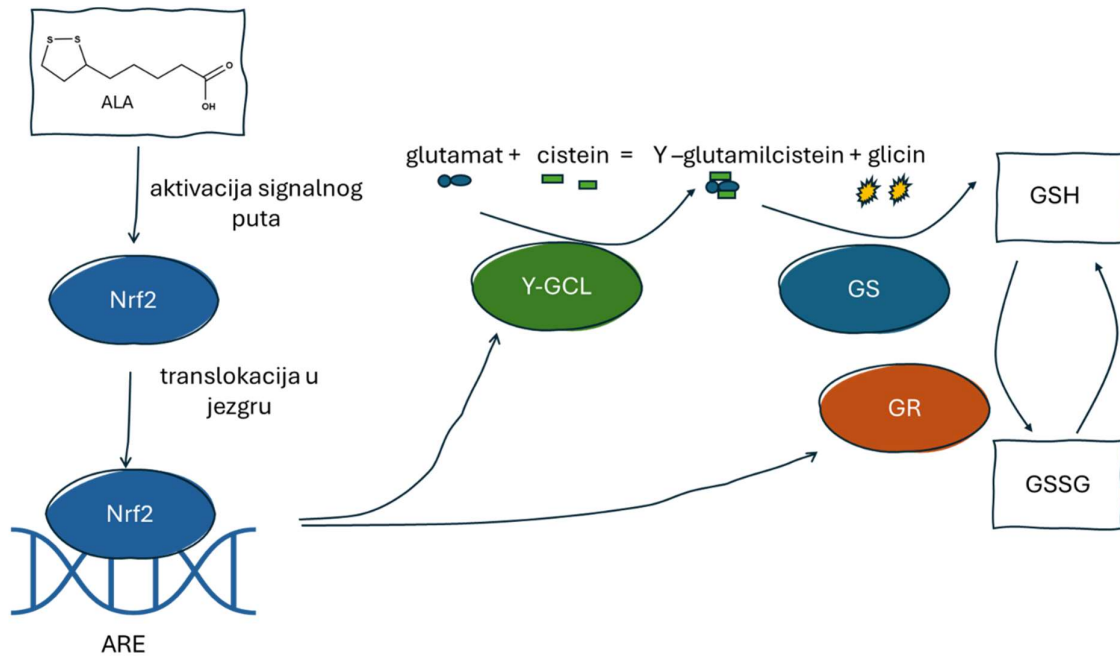


### 1.3.2 Biološke uloge $\alpha$ -lipoične kiseline

Standardni redoks potencijal ALA-e je -32 V, što je čini jednim od najpotentnijih prirodnih antioksidanasa. ALA poboljšava učinkovitost intrinzičnih antioksidativnih sustava te obnavlja njihovu funkciju (Slika 3). Sudjeluje u reakcijama kao kofaktor enzima, uključena je u metabolizam lipida i glukoze, te također kelira teške metale odgovorne za oksidativni stres iz krvi [102]. Inhibira  $\text{Cu}^{2+}$ -kataliziranu oksidaciju askorbinske kiseline te  $\text{Cu}^{2+}$ -kataliziranu liposomalnu peroksidaciju putem stvaranja kompleksa s  $\text{Cu}^{2+}$  i na taj način limitira sudjelovanje  $\text{Cu}^{2+}$  u reakcijama [112]. Čisti reaktivne kisikove i dušikove čestice te učinkovito neutralizira OH slobodni radikal i hipoklornu kiselinu međutim, nije učinkovita u neutraliziranju vodikovog peroksida [102].

A-lipoična kiselina regenerira druge endogene antioksidanse kao što su vitamin C, E i glutatation [113, 114]. DHLA reducira oksidirani oblik koenzima  $\text{Q}_{10}$ , te na taj način može sniziti koncentraciju  $\alpha$ -tokoferol radikala [113].

ALA utječe na status GSH djelovanjem na Nrf-2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) posredovanu gensku ekspresiju (Slika 3). Nrf-2 ključan je transkripcijski faktor koji upravlja ekspresijom gena za antioksidanse, a koje reguliraju ARE (engl. *antioxidant response element*). Razine Nrf-2 u jezgri određuju ekspresiju gena za sintezu GSH [115]. U citoplazmi je Nrf-2 u inaktivnom stanju, a to stanje održava protein Keap 1 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) vezujući se za transkripcijski faktor. ALA potiče oslobađanje Nrf-2 od inhibitora te translokaciju Nrf-2 u jezgru, kao i posljedičnu Nrf-2 posredovanu ekspresiju gena za sintezu glutatona. Na taj način u velikoj mjeri može utjecati na intenzitet sinteze GSH [116]. Također, ALA povećava aktivnost glutamat cistein ligaze (GCL), enzima koji je prvi u reakcijama sinteze GSH [115]. Razine sintetiziranog GSH su kontrolirane i dostupnošću supstrata za njegovu sintezu. A-lipoična kiselina smanjuje omjer cistina i cisteina u stanici, odnosno pojačava unos cisteina u stanicu i na taj način omogućava pojačanu sintezu GSH [117].



**Slika 3.** Važnost ALA-e za status GSH u organizmu

ALA aktivira transkripcijski faktor Nrf-2 koji se vezuje za ARA u jezgri i potiče ekspresiju Y-GCL (čime se potiče sinteza GSH) te ekspresiju GR (čime se osigurava učinkovito recikliranje GSH u stanici). Nrf-2-engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor*; Y-GCL- gama glutamil-cisteil ligaza; ARE-engl. *antioxidant responsive elements*; GS-glutation sintetaza; GR-glutation reuktaza; GSH-reducirani glutation; GSSG-oksidirani glutation.

ALA posjeduje i antidijabetični učinak jer potiče fosforilaciju inzulinskog receptora. To dovodi do aktivacije PI3-kinaza/Akt signalnih puteva i translokacije GLUT4 (engl. *glucose transporter type 4*) te također do aktivacije p38 MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase*) signalnih puteva i promjena u intrinzičnoj aktivnosti GLUT4. Rezultat toga je intenziviran transport glukoze u stanice [115].

Farmakokinetiku ALA-e karakterizira brz klirens iz plazme - maksimalne koncentracije u plazmi se postižu unutar sat vremena nakon administracije. Povoljni fiziološki učinci ALA-e vidljivi su s vremenskim odmakom u odnosu na vrijeme maksimalne koncentracije u plazmi ( $t_{max}$ ). R-ALA potiče brzu translokaciju GLUT1 i GLUT4 transportera na staničnu membranu što je usporedivo s učincima inzulina na redistribuciju GLUT1 i GLUT4. Smatra se kako je upravo to mehanizam kojim ALA omogućuje brzo unošenje glukoze u stanice [118]. ALA ima izravan utjecaj na skeletne mišiće tako što u skeletnim mišićima povećava unos glukoze i oksidaciju masnih kiselina putem aktivacije AMPK (engl. *AMP-activated protein kinase*). S obzirom da ALA potiče transport glukoze što za posljedicu ima smanjenje aktivnosti AMPK u

hipotalamusu, vidljivo je da ALA pokazuje suprotne efekte na aktivnost AMPK ovisno o tkivima u kojima se nalazi [119].

Kada je prisutna upala koja se povezuje s oksidativnim stresom, njezin nastanak vezan je za aktivaciju NF- $\kappa$ B, promotora transkripcije i ekspresije gena uključenih u upalu i migraciju u endotelne stanice. Stoga su protuupalne terapijske mjere obično usmjerene i prema ublažavanju proizvodnje ROS-a i oksidativnog oštećenja. Protuupalno djelovanje ALA-e povezuje se s njezinim antioksidativnim učincima, a manifestira se smanjenjem lučenja proupalnih citokina i inhibicijom NF- $\kappa$ B [120]. U studiji Zhang-a i suradnika (2007) pokazano je da ALA inhibira LPS-induciranu aktivaciju monocita putem aktivacije PI3-kinaza/Akt signalnih puteva [121].

### 1.3.3 Mogućnosti primjene $\alpha$ -lipoične kiseline kao nutraceutika

Tijekom godina, ALA je prepoznata kao dodatak prehrani s blagotvornim učincima u terapiji različitih oboljenja [100, 122, 123]. Farmakološki učinci ALA-e prvenstveno su povezani s njezinim antioksidativnim djelovanjem, ali ALA i DHLA također su pokazale zanimljiva protuupalna, antikarcinogena, neuroprotektivna, kognitivna, „anti-age“ svojstva kao i poželjne učinke na kardiovaskularni sustav [123].

Nekoliko je studija istaknulo potencijalnu uporabu ALA-e kod dijabetesa zbog njezine sposobnosti povećanja unosa glukoze u mišićno tkivo koje je osjetljivo i mišićno tkivo koje je otporno na inzulin [124, 125]. Studija Konrada i sur. (2001) pokazala je da ALA stimulira p38 MAPK fosforilaciju i aktivnost kinaza, čiju aktivnost također potiče i inzulin u 3T3-L1 adipocitima. Stupanj fosforilacije od strane ALA-e bio je usporediv sa stupnjem fosforilacije od strane inzulina. Putem utjecaja na p38 MAPK, inzulin i ALA povećavaju intrinzičnu aktivnost GLUT transportera, odnosno postižu maksimalnu stimulaciju transporta glukoze [126].

Postoje brojni dokazi o utjecaju oksidativnog stresa u patogenezi Alzheimerove bolesti. *In vitro* istraživanja su pokazala da ALA ima neuroprotektivni učinak na A $\beta$ -posredovanu citotoksičnost [127-129] kroz zaštitu kortikalnih neurona od citotoksičnosti inducirane od strane A $\beta$  ili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [130], što se djelomično pripisuje aktivaciji signalnog puta PKB/Akt. Druga studija je pokazala da ALA ima sposobnost učinkovite zaštite kultiviranih neurona hipokampusa od A $\beta$  peptida i Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posredovane toksičnosti [131]. Istraživanja su također

pokazala da ALA pokazuje učinkovitost kod demencije i Alzheimerove bolesti povećanjem proizvodnje acetilkolina (Ach) putem aktivacije kolin acetiltransferaze, što dovodi do povećanja apsorpcije glukoze i stoga opskrbljuje više acetyl-CoA za proizvodnju Ach [132]. Osim oksidativnog stresa, jedno od glavnih obilježja Alzheimerove bolesti je i kronična upala. Karakterizirana je povišenim razinama slobodnih radikala i proupalnih citokina [133] pri čemu se TNF- $\alpha$  smatra pokazateljem blagih kognitivnih oštećenja u Alzheimerovoj bolesti [129, 134]. ALA ima višestruke i složene učinke uklanjanjem ROS-a, iona prijelaznih metala, povećanjem razine reduciranog glutationa [132, 135], uklanjanjem produkata lipidne peroksidacije [134, 136, 137] pa čak i djelovanjem na puteve prijenosa signala [135, 138]. Slično tome, Dinicola i sur. (2017) otkrili su da ALA snižava razine upalnih citokina IL-1B i IL-6 u SK-N-BE stanicama humanog neuroblastoma putem modulacije ovisne o metilaciji DNA, utirući put utjecaju epigenetskih mehanizama u kontroli/prevenciji Alzheimerove bolesti [139].

Sve veći broj istraživanja i radova ističe potencijalnu primjenu ALA-e u liječenju raka [140, 141]. Stanice raka pretvaraju glukozu ponajprije u laktat za stvaranje ATP-a, što je fenomen poznat kao Warburgov efekt ili aerobna glikoliza. Stalna aktivacija aerobne glikolize u karcinogenim stanicama dovodi do aktivacije onkogeni ili gubitka tumorskih supresora, uzrokujući tako napredovanje raka. U tom pogledu, inhibicija aerobnog ciklusa može doprinijeti antikarcinogenom učinku [142, 143]. Piruvat dehidrogenaza katalizira pretvorbu piruvata u acetyl CoA, čime sprječava proizvodnju laktata. Feueracker i sur. (2012) istraživali su mogućnost ALA-e da aktivira piruvat dehidrogenazu u tumorskim stanicama. Rezultati su pokazali da ALA inhibira staničnu proliferaciju, [18-F]-FDG unos i stvaranje laktata i povećava apoptozu u staničnim linijama neuroblastoma Kelly, SK-N-SH, Neuro-2a i u staničnoj liniji kod raka dojke SkBr3 [144]. ALA potiskuje proliferaciju i rast stanica raka štitnjače putem aktivacije AMPK i naknadnom deregulacijom signalnog puta mTOR-S6 u BCPAP, HTH-83, CAL-62 i FTC-133 staničnim linijama [145]. Inibirana je proliferacija stanica karcinoma pluća putem smanjenja nivoa EGFR posredovanog aktivnošću Grb2 pod utjecajem ALA-e [146]. Znanstveni podaci pokazuju da se ALA može primijeniti za liječenje i prevenciju raka.

Također postoje literaturni podaci kako se ALA može primijeniti u terapiji pretilosti. Pretilost je kompleksan poremećaj u kojem dolazi do abnormalnog skladištenja masti, što može dovesti do ozbiljnih bolesti ne samo kod odraslih nego i kod djece. Broj pretilih osoba je u svakodnevnom porastu, a zadovoljavajuća terapija i dalje ne postoji. Povezuje se sa značajnim morbiditetom i smrtnošću zbog kardiovaskularnih komplikacija i dijabetesa. ALA djelovanjem

na AMPK i kontrolu apetita pokazuje svoj potencijal u terapiji pretilosti. Osim toga, važno je spomenuti i njezin utjecaj na inzulinsku rezistenciju te dijabetes kao i posljedične komplikacije [147].

ALA se ipak najviše povezuje s dijabetičkom polineuropatijom u čijoj indikaciji su potencijalni terapijski učinci prvo i bili istraživani [98]. Postoji više različitih čimbenika koji su glavni pokretači dijabetičke polineuropatije u dijabetesu tipa 2, uključujući oksidativni stres, vaskularne i metaboličke promjene, dok je kod dijabetesa tipa 1 hiperglikemija glavni čimbenik koji dovodi do niza patoloških promjena [148]. S obzirom da ALA pokazuje utjecaj na inzulinsku osjetljivost, transport glukoze, mikrocirkulaciju, te ima svojstva antioksidansa, mogla bi biti obećavajuća terapija za dijabetičku polineuropatiju.

## **2 OBRAZLOŽENJE TEME**

Infekcija HPV-om smatra se jednim od najvažnijih etioloških čimbenika u razvoju raka vrata maternice. Kronična upala uzrokovana prisustvom HPV-a dovodi do pojave SIL-a koje u 10-30 % slučajeva prerastaju u rak.

Stope progresije skvamoznih intraepitelnih lezija niskog stupnja (CIN I) u one visokog stupnja (HSIL, CIN III) ili rak su niske, ali ipak dovoljno relevantne za obvezno praćenje, a moguće i konzervativno liječenje.

Za sam proces progresije SIL-a u karcinom izuzetno je bitna i prisutnost kofaktora rizika među kojima su najvažniji oksidativni stres i upala. Stoga bi smanjenje oksidativnog stresa i upale moglo usporiti ili prevenirati progresiju SIL-a. Usprkos obećavajućim rezultatima observacijskih studija o važnosti antioksidativnog i protuupalnog djelovanja prehrane na progresiju SIL-a te učinkovitosti suplementacije nekim nutritivnim antioksidansima, službenih preporuka o primjeni prirodnih antioksidansa/tvari s protuupalnim učinkom u prevenciji progresije SIL-a nema.

ALA je potentan antioksidans i tvar s izraženim protuupalnim učinkom. Primjena ALA-e kao dodatka prehrani je sigurna, a najčešća terapijska indikacija je ublažavanje simptoma neuropatije različitih etiologija. U okviru ovog istraživanja po prvi put je istražena mogućnost terapijske primjene ALA-e kod pacijentica s dijagnozom LSIL-a. Interpretacijom dobivenih biokemijskih, citoloških i histoloških parametara dobiti će se uvid u učinkovitost te potencijalne mehanizme njezinih bioloških učinaka. Analizom prehrambenih navika pacijentica utvrditi će se povezanost karakteristika prehrane i nutritivnog statusa i učinkovitosti primjene ALA-e.

## 2.1 Hipoteza i ciljevi istraživanja

Hipoteza istraživanja je da suplementacija potentnim antioksidansom kao što je ALA može usporiti napredovanje i/ili potaknuti regresiju premalignih promjena vrata maternice kod pacijentica s dijagnozom LSIL-a.

Opći cilj istraživanja je utvrditi utjecaj suplementacije ALA-om na promjenu stupnja LSIL-a i predložiti mehanizam djelovanja.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi utjecaj suplementacije s ALA-om na citološke i histološke parametre pločastog epitela vrata maternice,
2. Utvrditi utjecaj suplementacije s ALA-om na parametre upale i oksidativnog stresa,
3. Utvrditi utjecaj životnog stila i prehrane na učinkovitost suplementacije ALA-om.



# **3 METODE**

### **3.1 Dizajn istraživanja**

Istraživanje je dizajnirano kao dvostruko-slijepa, placebo kontrolirana studija i provedeno je na 100 ispitanica. Uzorci su prikupljeni u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra u Tuzli, a analizirani u centralnom biokemijskom laboratoriju Univerzitetskog kliničkog centra u Tuzli te u Zavodu za kemiju prehrane Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Studija je provedena u skladu s Helsinškom deklaracijom i CONSORT smjernicama. Istraživački protokol i informirani pristanak odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (br: 251-62-03-18-23; 19.04.2018.) i Etičkog povjerenstva Univerzitetskog kliničkog centra Tuzla (broj: 02-09/2-61-16; 19.10.2016.). Studija je registrirana na platformi Clinical Trials.gov ([www.Clinicaltrials.gov](http://www.Clinicaltrials.gov); br. NCT05485259). Po pokretanju studije osnovano je i nezavisno tijelo koje je pratilo napredak studije i potencijalnu pojavu nuspojava.

Sve sudionice uključene u studiju pročitale su i potpisale informirani pristanak (Prilog 1) u kojem su detaljno opisani svrha i cilj istraživanja, uloga ispitanika u istraživanju, mogući rizici i prednosti te podatci o povjerljivosti podataka i pravu uvida u podatke.

### **3.2 Ispitanice**

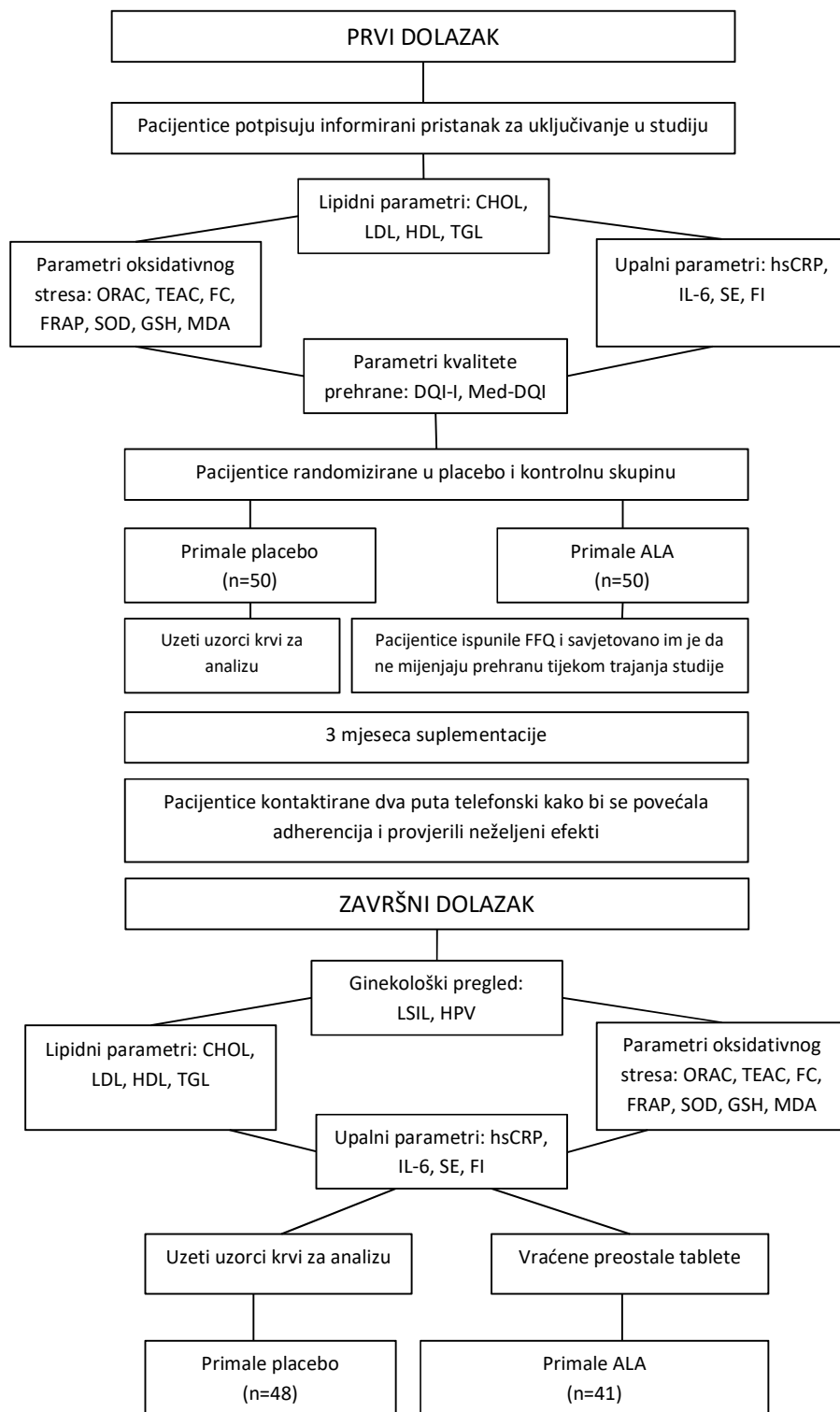
U studiju je uključeno ukupno 100 ispitanica u dobi od 18 do 55 godina u periodu od svibnja 2020. godine do lipnja 2022. godine. Kriteriji za uključivanje ispitanica u studiju bili su: PAPA testom potvrđene abnormalnosti LSIL-a u citološkom obrisku vrata maternice seksualno aktivnih pacijentica, životne dobi od navršениh 18 do 55 godina. Kriteriji za isključivanje ispitanica iz studije bili su: trudnoća, postojanje maligne bolesti, diabetes mellitus, kronične upalne bolesti izuzev kronične upale vrata maternice, totalna histerektomija, destruktivna terapija vrata maternice zbog ranijih premalignih ili malignih promjena, HPV vakcinacija i menopauza duža od pet godina. Ispitanice koje su zadovoljile gore navedene kriterije upoznate su sa svrhom i načinom izvođenja studije te su nakon davanja informiranog pristanka uključene u studiju.

Po uključanju u studiju, ispitanice su metodom blok randomizacije nasumično raspodijeljene u ispitivanu odnosno kontrolnu skupinu u omjeru 1:1.

### 3.3 Opis i tijek istraživanja

Na inicijalnom pregledu ispitanicama su uzeti uzorci krvi iz kubitalne vene, standardnim načinom za potrebe laboratorijskih analiza. Ispitanice su uz pomoć educirane osobe popunile standardizirani i validirani semikvantitativni upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica, FFQ (Prilog 2), kako bi se utvrdili njihovi obrasci prehrane. Svaka ispitanica je dobila pakiranje tableta u kojem se nalazilo 180 tableta te uputa o korištenju [149]. Pakiranja tableta su bila označena šiframa (A i B) i sadržavala su ili tablete sa 300 mg  $\alpha$ -lipoične kiseline (ispitivana skupina) ili pomoćnu tvar – rižin škrob (kontrolna skupina) (proizvodnja: Zada Pharmaceuticals, Tuzla, Bosna i Hercegovina). Ispitanice su dobile uputu da tijekom trajanja studije ne mijenjaju uobičajene prehrambene navike te da ne započnu suplementaciju nekim drugim vrstama dodataka prehrani.

Ispitanice su kroz sljedećih 90 dana uzimale po dvije tablete dnevno; ujutro i navečer, uz obrok (kako je bilo navedeno u uputi o korištenju) – ukupno 600 mg ALA/dne. Nakon isteka 90 dana ispitanice su ponovile dijagnostički pregled u ginekološko-kolposkopskoj ambulanti te su im ponovno iz kubitalne vene standardnim načinom uzete tri epruvete krvi radi dobivanja laboratorijskih nalaza nužnih za istraživanje. Prilikom ponovljenog dolaska ginekologu, ispitanice su vratile preostale tablete suplemenata u originalnoj ambalaži te je utvrđena adherencija terapiji. Tijek istraživanja prikazan je shematski na Slici 4.



Slika 4. Dizajn i tijek provedenog istraživanja

### 3.4 Utvrđivanje prehrambenih navika ispitanica

Ispitivanje prehrambenih i životnih navika ispitanica provedeno je pomoću standardiziranog i validiranog FFQ-a [149]. Prikupljeni podaci pružili su osnovne informacije o obrascima prehrane, unosu antioksidanasa, korištenju dodataka prehrani, pušenju i fizičkoj aktivnosti ispitanica.

FFQ čini 192 pitanja, od kojih se 100 odnosi na hranu/namirnice gdje je uz svaku namirnicu postavljen upit o tjednoj učestalosti konzumiranja, kao i veličini serviranja. Za procjenu veličine serviranja ponuđene su tri kvantitativne grupe (mala, srednja i velika porcija) koje su popraćene fotografijama ili opisima veličina porcija prema pakiranju proizvoda u kojem se nalaze na tržištu ili koje su uobičajene prilikom konzumiranja određenih proizvoda (npr. šnita, čaša, žličica) uz pripadajuće vrijednosti u gramima. Učestalost konzumiranja određena je s obzirom na odabir između ponuđenih odgovora: nikada, jednom mjesečno, dva-tri puta mjesečno, jednom tjedno, dva-tri puta tjedno, četiri-šest puta tjedno, ili svaki dan. Preostala pitanja odnosila su se na uzimanje dodataka prehrani te prehrambene navike, pri čemu je referentni period za koji se procjenjuje prehrambeni unos prethodni mjesec.

Upitnik je svaka ispitanica ispunjavala samostalno uz nadzor istraživača, koji je bio na raspolaganju za eventualne nedoumice i pitanja. Kako bi se prehrambeni unos za ciljane skupine namirnica (voće, povrće, žitarice, crveno meso) izrazio u količini serviranja za preračunavanje su korištene veličine serviranja prema Američkim prehrambenim smjernicama - *USDA Dietary Guidelines for Americans, 2020-2025* [150].

Kako bi se procijenila kvaliteta prehrane i unos antioksidanasa, odnosno usklađenost prehrane ispitanika s mediteranskim obrascem prehrane, koji se smatra jednim od preporučljivih obrazaca prehrane za prevenciju kroničnih oboljenja, za svaku ispitanicu izračunat je Med-DQ-indeks (engl. *Mediterranean Diet Quality Index*, Med-DQI) [151]. Med-DQI izračunava se uzimajući u obzir 7 karakteristika prehrane: zasićene masne kiseline (%kJ), kolesterol (mg), meso (g), maslinovo ulje (mL), riba (g), žitarice i proizvodi (g) i voće i povrće (g). Svaki nutrijent ili svaka skupina namirnica se boduje bodovima 0, 1 ili 2, a bodovanje se temelji na prehrambenim smjernicama. Ukupan zbroj ostvarenih bodova po svim bodovanim skupinama

čini Med-DQI. Zbroj se kreće u rasponu od 0 do 14, a prehrana se smatra kvalitetnijom ukoliko je Med-DQI niži.

Izvršnu kvalitetu prehrane podrazumijeva 0 bodova; dobra kakvoća prehrane kreće se u rasponu od 1-4 boda, umjereno (srednje) dobra 5-7, srednje loša prehrana 8-10, te loša prehrana 11-14 bodova. Dobru kakvoću prehrane s obzirom na Med-DQI označava unos zasićenih masnih kiselina manji od 10 %kJ od ukupnog energetskeg unosa, unos kolesterola manji od 300 mg, unos mesa manji od 25 g dnevno, maslinovog ulja veći od 15 mL, unos masne ribe veći od 60 g, cjelovitih žitarica i njihovih proizvoda više od 300 g, dok bi konzumiranje namirnica iz skupine voće i povrće dnevno trebalo biti veće od 700 g [151].

Međunarodni indeks kvalitete prehrane (engl. *The Diet Quality Index-International*, DQI-I) je indeks kvalitete prehrane koji ukazuje na aspekte prehrane povezane s pojavom kroničnih nezaraznih bolesti te malnutricijom [152] i stavlja fokus na 4 aspekta prehrane koja doprinose poboljšanju njezine kvalitete, a to su: raznolikost (sveukupna raznolikost skupina namirnica i unutar skupine raznolikost za proteine), adekvatnost (povrće, voće i skupina žitarica, prehrambena vlakna, proteini, željezo, kalcij i vitamin C), umjerenost (ukupne masti, zasićene masti, kolesterol, natrij i hrana bez kalorija) i uravnoteženost prehrane (omjer makronutrijenata i omjer masnih kiselina). Svaki od navedena 4 aspekata predstavlja jednu od kategorija DQI-I-a unutar koje se procjenjuju specifične komponente prehrane, a svaka od tih kategorija pomaže identificirati kritični aspekt prehrane koji se najviše treba poboljšati kako u razvijenim tako i u zemljama u razvoju [153]. Rezultati za svaku komponentu sumiraju se u svakoj od četiri glavne kategorije, a zbroj bodova u sve 4 kategorije rezultira ukupnim DQI-I rezultatom. DQI-I se kreće u rasponu od 0 do 100 pri čemu je 0 najlošiji, a 100 najbolji mogući rezultat koji označava najvišu kvalitetu prehrane.

## 3.5 Materijali

Za potrebe ovog istraživanja korištene su sljedeće kemikalije i instrumenti.

### 3.5.1 Kemikalije

- Fibrinogen (Siemens, Marburg, Njemačka)
- C-reaktivni protein (Abbott, Wiesbaden, Njemačka)
- Interleukin-6 (Siemens, Marburg, Njemačka)
- Kolesterol (Abbott, Wiesbaden, Njemačka)
- HDL kolesterol (Abbott, Wiesbaden, Njemačka)
- LDL kolesterol (Abbott, Wiesbaden, Njemačka)
- Trigliceridi (Abbott, Wiesbaden, Njemačka)
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol–ABTS (Sigma, Missouri, SAD)
- Kalijev persulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ultračista voda (MiliQ-H2O), (Merck, New Jersey, SAD)
- (±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina–Trolox (Sigma, Missouri, SAD)
- Natrijev hidroksid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Tiobarbiturna kiselina-TBA (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- Butilirani hidroksi toluen-BHT (Sigma Aldrich GmbH, Njemačka)
- Kalijev monohidrogenfosfat (Siegfried Handel, Zofingen, Švicarska)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- 2-(6-hidroksi-3-okso-(3H)-ksanten-9-il) benzojeva kiselina-Fluorescein (Sigma, Missouri, SAD)
- 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidroklorid-AAPH (Aldrich, St. Louis, SAD)

### 3.5.2 Instrumenti

- Integrirani biokemijsko-imunokemijski analizator Architect ci8200, (Abbott, Illinois, SAD)
- Integrirani biokemijsko-imunokemijski analizator Advia Centaur XPT, (Siemens, Erlangen, Njemačka)

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

### 3.6 Dijagnosticiranje SIL-a

U svrhu utvrđivanja dijagnoze LSIL-a u svih ispitanica provedeni su citološki probir, kolposkopski pregled vrata maternice te ciljana biopsija, odnosno histološka potvrda citološko-kolposkopske dijagnoze.

Za PAPA test specijalista ginekolog je uzeo obrisak vrata maternice spatulom i endocervikalnom četkicom. Obrisak se nanosi na predmetno stakalce i fiksira u 96%-tnom etanolu. Nalaz je kvalificiran prema međunarodno priznatom obrascu „Zagreb 2002“ [154] od strane specijaliste patološke anatomije. Za klasificiranje kolposkopskog nalaza korišten je kolposkopski obrazac „Rio de Janeiro/Zagreb 2011“ [155, 156]. Uzorci tkiva vrata maternice dobiveni ciljanom biopsijom kolposkopom obrađeni su standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 %-tnom puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniziranje i bojanje standardnom metodom hemalaun-eozin. Klasifikacija premalignih i invazivnih lezija pločastog epitela vrata maternice određena je prema Bethesda klasifikaciji [157].



## **3.7 Krvne pretrage**

Rutinske biokemijske laboratorijske pretrage, lipidni status te parametri upale (sedimentacija, visoko osjetljivi CRP (hsCRP), fibrinogen i interleukin 6 (IL-6)) određeni su neposredno po uzimanju uzoraka krvi. Preostali serum je alikvotiran i pohranjen na -20°C do analiza. Alikvotirani uzorci seruma koristili su se za određivanje parametara oksidativnog stresa (antioksidativni potencijal seruma, koncentracije malondialdehida u serumu i tiola u serumu).

### **3.7.1 Određivanje upalnih parametara**

#### **3.7.1.1 Određivanje sedimentacije**

Sedimentacija eritrocita određena je metodom po Westergreenu. Tom metodom određuje se brzina taloženja eritrocita - normalno, eritrociti se talože sporo i izdvaja se malo plazme. Kod upale sintetiziraju se proteini, tj. reaktanti akutne faze, CRP i fibrinogen. Krv se vadi u odgovarajuću epruvetu sa citratnom krvi te se lagano promiješa kako bi se antikoagulans pomiješao sa uzorkovanom krvi. Otvori se epruveta i Westergreenova pipeta se stavi direktno u epruvetu pod pritiskom, pri čemu se krv lagano navuče do oznake 0 i postavi na odgovarajuće mjesto na stalku za pipete. Pipeta u stalku mora stojati uspravno te se stalak ne smije pomjerati tijekom izvođenja analize. Temperatura prostorije, u kojoj se vrši određivanje, mora biti od 18 do 24 °C. Nakon sat vremena očitava se vrijednost sedimentacije tako što se gleda visina sloja plazme iznad nivoa eritrocita. Rezultati se izražavaju u mm bistre plazme.

#### **3.7.1.2 Određivanje fibrinogena**

Fibrinogen je određen modifikacijom Claussove metode. Ovim testom mjeri se funkcionalno aktivni fibrinogen u plazmi. Kod modifikacije Claussove metode dolazi do koagulacije citratne plazme velikim suviškom trombina. Vrijeme koagulacije ovisi uglavnom o sadržaju fibrinogena u uzorku. Koncentracija fibrinogena u plazmi određena je metodom koagulometrije na analizatoru BCS XP, uporabom originalnih reagenasa tvrtke Siemens.

#### **3.7.1.3 Određivanje visoko osjetljivog CRP-a (hsCRP)**

HsCRP određen je metodom turbidimetrije odnosno imunoturbidimetrije na analizatoru Architect ci8200 uporabom originalnih reagenasa tvrtke Abbott. Multigent CRP Vario je lateks

imunotest koji je razvijen za precizno i reproducibilno mjerenje razine CRP-a u krvi, odnosno u serumu i plazmi. Kada dođe do reakcije antigen-protutijelo između CRP-a u uzorku i anti-CRP protutijela, koje je adsorbirano na čestice lateksa, dolazi do aglutinacije. Ova se aglutinacija detektira kao promjena apsorbancije, pri čemu je brzina promjene proporcionalna koncentraciji CRP-a u uzorku. Porast apsorbancije na 572 nm proporcionalan je koncentraciji CRP-a u uzorku.

#### **3.7.1.4 Određivanje interleukina 6 (IL6)**

Koncentracija IL-6 određena je metodom kemiluminiscencije na analizatoru Advia Centaur XPT uporabom originalnih reagenasa tvrtke Siemens. Advia Centaur IL-6 analiza je potpuno automatizirana, izravna imunološka analiza koja se odvija u jednom koraku korištenjem kemiluminiscentne tehnologije. Test koristi monoklonsko mišije anti-IL-6 protutijelo obilježeno akrinidijevim esterom kao Lite reagens. Čvrsta faza sastoji se od paramagnetnih mikročestica obloženih anti-IL-6 mišijim monoklonskim protutijelima.

#### **3.7.2 Određivanje lipidnog statusa**

Princip postupka određivanja koncentracije ukupnog kolesterola zasniva se na fotometrijskom određivanju s kolesterol-oksidadom na analizatoru Architect ci8200 uporabom originalnih reagenasa tvrtke Abbott. Ovaj reagens se temelji na formulaciji Allaina i suradnika [158] i na modifikaciji Roeschlaua [159] s daljnjim poboljšanjima kako bi otopina reagensa bila stabilnija. Kolesterol esteri enzimatski se hidroliziraju djelovanjem kolesterol-esteraze u kolesterol i slobodne masne kiseline. Stvoreni slobodni kolesterol, uključujući i onaj prisutan u uzorku, oksidira se katalitičkim djelovanjem kolesterol-oksidade u kolest-4-en-3-on uz istovremeno nastajanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vodikov peroksid oksidira 4-aminoantipirin (4-aminofenazon) uz prisutnost hidroksibenzojeve kiseline, pod katalitičkim djelovanjem peroksidaze u 4-(p-benzokinon monoimino)-fenazon. Nastali obojeni kinonimin određuje se kvantitativno na 500 nm, što odgovara koncentraciji kolesterola u uzorku.

Ultra HDL test je homogena metoda za izravno mjerenje koncentracije HDL kolesterola u serumu ili plazmi. Metoda se temelji na primjeni dva reagensa i njena učinkovitost ovisna je o svojstvima specifičnog deterdženta. Postupak se bazira na ubrzavanju reakcije kolesterol oksidaze s neesterificiranim non-HDL kolesterolom te selektivnom otapanju HDL kolesterola

pomoću specifičnog deterdženta. Prvi reagens izaziva enzimatsku reakciju s neesterificiranim non-HDL kolesterolom, pri čemu se oslobađa vodikov peroksid koji u peroksidnoj reakciji reagira s DSBmT (N,N-bis (4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium) dajući bezbojni produkt. Drugi reagens sastoji se od deterdženta (sposobnog solubilizirati HDL kolesterol), kolesterol esteraze i kromogena (kopulacijske komponente) koji razvija boju za kvantitativno određivanje HDL kolesterola. Analiza je rađena na analizatoru Architect ci8200 uz korištenje originalnih reagenasa tvrtke Abbott.

Multigent izravni LDL test je homogena metoda za izravno mjerenje razine LDL kolesterola u serumu ili plazmi. Određivanje LDL kolesterola odvija se u dva koraka i zavisi od specifičnog deterdženta. Deterdžent u reagensu R1 solubilizira samo čestice non-LDL kolesterola. Oslobođeni kolesterol sa kolesterol esterazom i kolesterol oksidazom stvara nebojeni kromogen. Deterdžent R2 solubilizira preostale LDL čestice i s kromogenom nastalim u prvoj reakciji stvara obojeni produkt. Enzimatska reakcija sa LDL kolesterolom u prisutnosti kromogena producira boju koja je proporcionalna koncentraciji LDL kolesterola prisutnog u uzorku. Analiza je rađena na analizatoru Architect ci8200 uz korištenje originalnih reagenasa tvrtke Abbott.

Određivanje triglicerida je rađeno na analizatoru Architect ci8200 uz uporabu originalnih reagenasa tvrtke Abbott. Ova analitička metoda temelji se na reakciji koju su opisali Fossati i suradnici [160] i McGowan i suradnici [161]. Reagens koji se koristi u ovoj metodi je 4-klorofenol umjesto 2-hidroksi-3,5-diklorobenzensulfonata koji se koristi u studijama Fossatia i McGowana. Trigliceridi se enzimatski hidroliziraju lipazom u slobodne masne kiseline i glicerol. Glicerol se fosforilira uz pomoć adenzin trifosfata s glicerol kinazom kako bi nastao glicerol-3-fosfat i adenzin difosfat. Glicerol-3-fosfat se oksidira u dihidroksiaceton fosfat uz pomoć glicerol fosfat oksidaze stvarajući vodikov peroksid. U obojenoj reakciji kataliziranoj peroksidazom, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagira s 4-aminoantipirinom i 4-klorofenolom kako bi se dobilo crveno obojenje. Apsorbancija ovog obojenja proporcionalna je koncentraciji triglicerida prisutnih u uzorku.

### 3.7.3 Određivanje antioksidativnog statusa

#### 3.7.3.1 Određivanje reduciranog glutationa

Reducirani glutation (GSH) određen je optimizacijom metode kvantifikacije glutationa pomoću monoklorobiman (mBCI) fluorescentne probe. mBCI je nefluorescentan spoj koji nakon konjugacije s tiolnim skupinama molekula male molekulske mase stvara fluorescirajuće adukte. U takve molekule ubraja se i glutation, stoga se mBCI uobičajeno koristi kao biomarker za određivanje koncentracije GSH u stanici [162]. Konjugirani mBCI fluorescira na valnim duljinama ekscitacije od 355 nm i emisije 460 nm.

Kako bi se osigurali prikladni uvjeti za kvantifikaciju reduciranog GSH pomoću mBCI fluorescentne probe, potrebno je optimizirati metodu (odabir prikladnih slijepih proba, koncentracija seruma i vremena inkubacije). Kod optimizacije koncentracije seruma potrebno je utvrditi koncentraciju seruma prikladnu za metodu te ispitati fluorescira li serum na valnim duljinama korištenim za mjerenje fluorescencije mBCI-a kako bi pravilno odabrali slijepe probe. U crnoj mikrotitarskoj pločici pripremi se koncentracijski niz homogeniziranog seruma (u kvadrilikatu) te se uzorcima doda mBCI (konačne koncentracije 40  $\mu$ M u jažici). Slijepe probe pripremaju se na isti način, dodatkom ultračiste vode (umjesto mBCI-a). Fluorescencija se mjeri na valnim duljinama od 355 nm i 460 nm nakon inkubacije 20 min. na temperaturi od 37°C. Za kvantifikaciju se koristi baždarni dijagram koji se izrađuje pomoću GSH otopljenog u dimetil sulfoksidu.

#### 3.7.3.2 Određivanje malondialdehida

Metoda koja se koristi za određivanje malondialdehida (MDA) temelji se na reakciji tiobarbituratne kiseline (TBA) i MDA. MDA u kiselim uvjetima reagira sa TBA u omjeru 1:2 pri čemu nastaje crveni pigment čija apsorbancija se mjeri pri 532 nm [163]. Specifičnost reakcije povećava se uporabom antioksidansa butiliranog hidroksitoluena (BHT) i primjenom visokorazdjelne tekućinske kromatografije (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) koji omogućuje odvajanje kompleksa MDA-TBA od ostalih komponenti u reakcijskoj smjesi koje također apsorbiraju na istoj valnoj duljini.

Baždarni pravac priprema se razrjeđivanjem matične otopine standarda MDA koncentracije 3,035 mM iz koje se pripremaju različite koncentracije standarda: 30,35  $\mu$ M, 15,175  $\mu$ M, 6,07  $\mu$ M, 3,035  $\mu$ M, 1,5175  $\mu$ M, 0,607  $\mu$ M i 0,3035  $\mu$ M. 0,2 % otopina BHT priprema se razrjeđivanjem matične otopine u etanolu. Analize su provedene u četveroplikatu u mikrotitarskim pločama. Apsorbancija se mjeri na 532 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (Viktor). Koncentracija MDA u nepoznatom uzorku izračunata je pomoću baždarnog dijagrama standarda poznate koncentracije.

### 3.7.3.3 Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta seruma (ORAC metoda)

ORAC test (engl. *Oxygen radical absorbance capacity assay*, ORAC) je antioksidativni test koji mjeri sposobnost antioksidansa da ugasi slobodne radikale doniranjem vodika. Gašenje radikala prati se promjenom fluorescencije, a dinamička promjena fluorescencije tijekom vremena uzima se u obzir izračunavanjem površine ispod krivulje opadanja fluorescencije (engl. *Area under the curve*, AUC). Metoda je jedinstvena po tome što mjeri sposobnost antioksidansa da u potpunosti ugasi slobodni radikal (za razliku od niza drugih koje mjere aktivnost u jednoj vremenskoj točki) te se često smatra najboljom *in vitro* metodom za mjerenje antioksidativne učinkovitosti. Uspoređujući integral gubitka fluorescencije, uzrokovanog uzorkom, standardom, slijepom probom, ORAC test uzima u obzir i stupanj inhibicije i vrijeme inhibicije, što je poboljšanje u odnosu na prethodne testove ukupnog antioksidativnog kapaciteta koji koriste kinetiku nultog reda u njihovoj kvantifikaciji.

Za potrebe analize unaprijed se pripreme ishodna otopina Trolox<sup>®</sup>-a (1 g/L u etanolu), fosfatni pufer (slijepa proba), natrijeva sol fluoresceina i AAPH (2,2-azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid) do konačne koncentracije od 150 mM. Uzorci se razrijede 400 puta puferom. Kinetičko očitavanje fluorescencije, s valnom duljinom pobude od 485 nm i valnom duljinom emisije od 530 nm, vrši se na čitaču mikrotitarskih pločica od 96 jažica s više detekcija pri 37 °C. Za svaki uzorak izračunaju se neto AUC vrijednosti te se provjerava koeficijent varijacije slijepih uzoraka i svakog Trolox standarda (koji mora biti < 10 %). Baždarni pravac dobiva se iz odnosa koncentracija Trolox-a u mjerenim otopinama i odgovarajućeg prosječnog AUC za svaku mjernu otopinu. Konačne vrijednosti ORAC izračunavaju se pomoću regresijske jednadžbe između Trolox ekvivalenta i neto AUC.

### 3.7.3.4 Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta seruma (TEAC metoda)

Antioksidativni potencijal seruma pacijentica određen je modificiranom TEAC metodom (*engl. Trolox equivalent antioxidant capacity*) [164]. Otopina ABTS-a (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-sulfonska kiselina) miješa se s otopinom kalijeva persulfata kako bi se generirao kromofor i radikalni kation (ABTS<sup>•+</sup>), plavo-zelene boje. U prisutnosti antioksidanasa iz uzorka dolazi do redukcije ABTS<sup>•+</sup>, a uslijed toga i do dekolorizacije te pada apsorbancije. Apsorbancija se mjeri pri 750 nm, a iz mjerenja se mogu dobiti informacije o antioksidativnoj sposobnosti gašenja radikalnog kationa izraženo kao Trolox ekvivalenti.

Za potrebe analize potrebno je pripremiti 7mM otopina ABTS-a, 2,45 mM otopina kalijeva persulfata (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) i ishodnu otopinu ABTS<sup>•+</sup>. Otopina ABTS<sup>•+</sup> koja se koristi u ispitivanjima treba biti razrijeđena 20 puta u odnosu na stock otopinu, odnosno toliko da apsorbancija otopine ABTS<sup>•+</sup> bude 0,700 ± 0,020. Reakcijska smjesa izrađuje se na način da se u jažicu mikrotitarske ploče pipetira razrijeđeni uzorak u kvadrilikatu te razrijeđena otopina ABTS<sup>•+</sup>. Antioksidativni kapacitet uzoraka računa se kao postotak inhibicije (%I) ABTS radikala mjeren pri 750 nm. Za izradu baždarnog dijagrama pripremi se koncentracijski niz otopina Trolox<sup>®</sup>-a te se za svaki izračuna postotak inhibicije apsorbancije otopine ABTS<sup>•+</sup>.

### 3.7.3.5 Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji katalizira dismutaciju superoksidnog aniona (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) u vodikov peroksid i molekularni kisik, važan je endogeni antioksidans. Za utvrđivanje aktivnosti SOD-a razvijeno je nekoliko izravnih i neizravnih metoda. U praksi se najčešće koristi NBT neizravna metoda (*engl. nitroblue tetrazolium*, NBT), zbog svoje praktičnosti i jednostavnosti. Međutim, postoji nekoliko nedostataka NBT metode, kao što su slaba topljivost obojenog formazana u vodi i interakcija s reduciranim oblikom ksantin oksidaze. SOD Assay Kit-WST metoda omogućuje jednostavno ispitivanje aktivnosti SOD-a korištenjem Dojindove tetrazolijeve soli koja je vrlo topljiva u vodi (*2-(4-lodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium mononatrijeva sol-WST*) koja proizvodi u vodi topljiv obojeni formazan nakon redukcije sa superoksidnim anionom. Brzina redukcije s O<sub>2</sub> linearno je povezana s aktivnošću ksantin oksidaze i inhibirana je djelovanjem SOD. Stoga se IC<sub>50</sub> uzorka (50 % inhibicije aktivnosti SOD ili materijala sličnih SOD) može odrediti kolorimetrijski. Za

potrebu analiza potrebno je pripremiti radnu otopinu WST, mjernu otopinu uzorka i standardnu otopinu SOD-a. Apsorbancija se očitava na 450 nm koristeći čitač mikrotitarskih ploča.

### **3.8 Statistička obrada podataka**

Za statističku obradu podataka korišteni su programski paketi Medcalc v11.4 (Medcalc Software, Belgija) i GraphPad Prism v8.4.3 (Boston MA, SAD). Normalnost distribucije numeričkih varijabli ispitana je Kolmogorov-Smirnov testom. Varijable s normalnom distribucijom prikazane su kao srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD), te su za usporedbu podataka korišteni odgovarajući parametrijski testovi (Studentov t-test i jednosmjerna analiza varijance (ANOVA)). Podatci koji nisu bili normalno distribuirani prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon, a za njihovu usporedbu korišteni su odgovarajući neparametrijski testovi (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test). Kategoričke varijable uspoređivane su  $\chi^2$ -testom. Statistički značajnom smatrana je razlika  $p \leq 0,05$ .

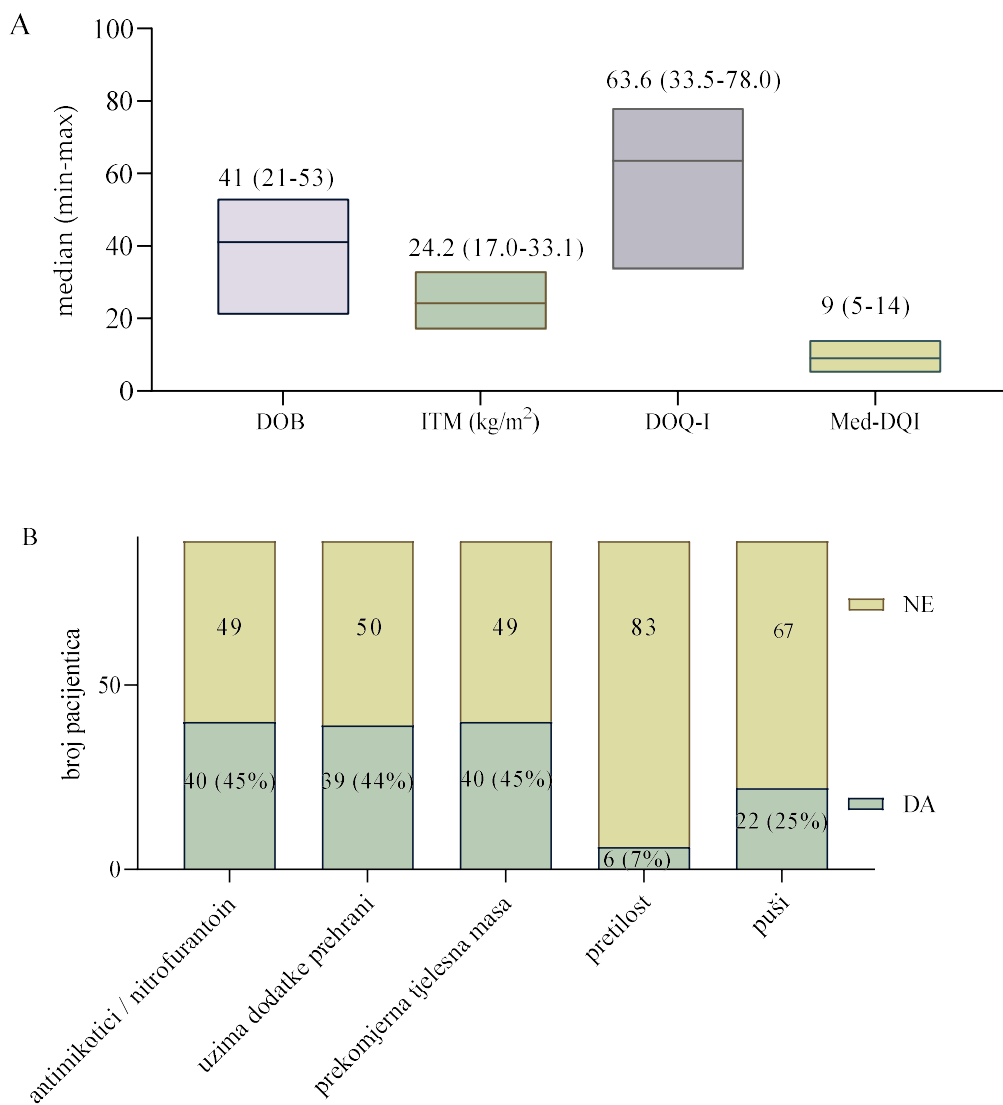
# **4 REZULTATI**



## 4.1 Karakteristike obrazaca prehrane ispitanica uključenih u studiju

Kao što je prethodno napomenuto, studijom je obuhvaćeno ukupno 100 ispitanica u dobi od 18-55 godina kod kojih su PAPA testom potvrđene abnormalnosti LSIL u citološkom obrisku vrata maternice. Ispitivanje prehranbenih i životnih navika ispitanica provedeno je pomoću standardiziranog i validiranog FFQ-a [149], a prikupljeni podatci pružili su osnovne informacije o nutritivnom statusu (ITM; udio ispitanica povećane tjelesne mase i pretilih ispitanica), kvaliteti prehrane (koja je procijenjena na temelju izračunatih DOQ-I i Med-DQI), farmakoterapiji, korištenju dodataka prehrani, pušenju i fizičkoj aktivnosti ispitanica.

Rezultati su prikazani grafički na Slici 5. Medijan dobi ispitanica uključenih u studiju iznosio je 41 godinu (što je više nego u većini drugih dostupnih studija koje su istraživale intervencije u slučajevima dijagnoza LSIL). Od ukupnog broja ispitanica njih 40 (45 %) je imalo prekomjernu tjelesnu masu (ITM od 25 do 30), od kojih je 6 ispitanica (7 %) bilo pretilo (ITM > 30). Kod preostalih 49 ispitanica tjelesna masa se kretala u okvirima prihvatljivih granica. Na slici 5B vidljivo je da, od ukupno 89 ispitanica koje su završile studiju, njih 40 (45 %) je uzimalo antimikotike (nitrofurantoin) dok 49 ispitanica nisu uzimale nikakav antimikotik. Što se pušenja cigareta tiče, 22 ispitanice (25 %) su bile pušači a 67 nepušači. Unos suplemenata je zabilježen kod 39 (44 %) ispitanica dok 50 ispitanica nisu uzimale nikakve dodatke prehrani. Kako je prikazano u Tablici 1., u trenutku prvog pregleda sedamnaest ispitanica je uzimalo multivitaminsko-mineralnu formulaciju, njih šest je uzimalo vitamin D ili kombinaciju vitamina D i kalcija, tri ispitanice su uzimale preparate željeza ili željezo u kombinaciji s vitaminom C, pet ispitanica je uzimalo magnezij, jedna ispitanica glukozamin, dvije su uzimale B kompleks, 5 vitamin C, tri kalcij i jedna ispitanica koenzim Q10.



**Slika 5.** Osnovne karakteristike ispitanica uključenih u studiju

ITM-indeks tjelesne mase; DOQ-I-indeks kvalitete prehrane; Med-DQI-indeks usklađenosti s mediteranskom prehranom

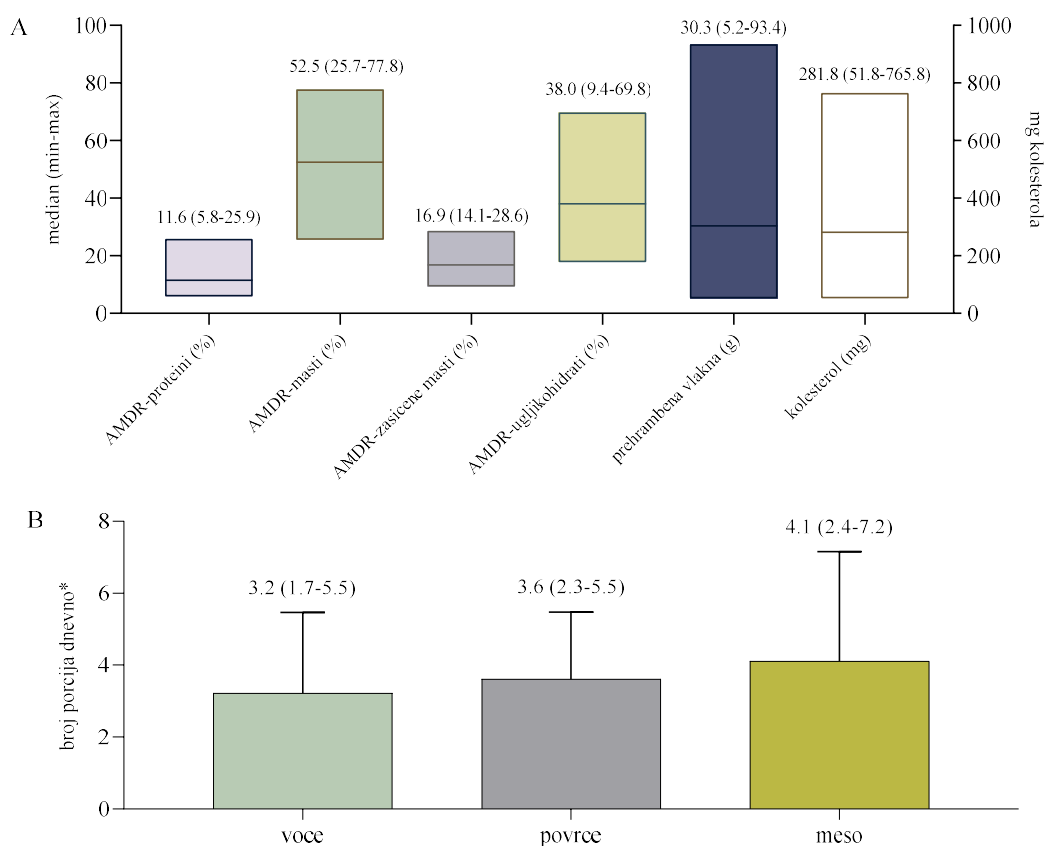
**Tablica 1.** Dodatci prehrani koje ispitanice uključene u studiju konzumiraju u trenutku prvog (inicijalnog) pregleda.

<b>Dodatak prehrani</b>	<b>Broj ispitanica (n)</b>	<b>Napomena</b>
<b>Multivitaminsko-mineralna formulacija</b>	17	Maksimalan sadržaj pojedinog vitamina/minerala do 200% preporučenog dnevnog unosa*
<b>Vitamin D / Vitamin D + kalcij</b>	6	Do najviše 25 µg vitamina D i 1000 mg kalcija
<b>Željezo/ željezo + vitamin C</b>	3	Do najviše 30 mg željeza i najviše 500 mg vitamina C
<b>Magnezij</b>	5	Do najviše 300 mg magnezija
<b>Glukozamin</b>	1	1500 mg glukozamin-hidroklorida
<b>B-kompleks</b>	2	Maksimalan sadržaj pojedinog B vitamina do 200% preporučenog dnevnog unosa*
<b>C vitamin</b>	5	Do najviše 1000 mg
<b>Kalcij</b>	3	Do najviše 1000 mg
<b>Koenzim Q10</b>	1	30 mg

\*prema Pravilniku o dodacima prehrani- (NN 46/2011) [165].

Na Slici 5A prikazani su dob, indeks tjelesne mase te kvaliteta prehrane ispitanica (prikazano pomoću vrijednosti DQI-I i Med-DQI). Na Slici 5B prikazane su i vrijednosti indeksa koji ukazuju na opću kvalitetu prehrane (DQI-I) te stupanj usklađenosti prehrambenih navika s obrascima mediteranske prehrane (Med-DQI). Različiti prehrambeni vodiči gotovo univerzalno navode konzumiranje raznovrsne hrane kao preporuku broj jedan te osobito naglašavaju važnost adekvatnog unosa voća i povrća, složenih ugljikohidrata i proteina iz raznovrsnih nutritivnih izvora [166]. Smjernice također potiču umjerenost, osobito u unosu masti, zasićenih masti, kolesterola, natrija i šećera. Mediteranski indeks prehrane predstavlja još jedan od vrijednih indeksa za procjenu kvalitete prehrane te je osobito prilagođen populaciji Mediterana. Procjenjuje se unos osam glavnih sastavnica prehrane: zasićenih masnih kiselina (engl. *Saturated fatty acids*, SFA), kolesterola, mesa, maslinovog ulja, ribe, žitarica, povrća i voća te broja popušanih cigareta.

U provedenoj studiji medijan DQI-I vrijednosti ispitanica uključenih u studiju bio je 63,6 (33,5 do 78,0) dok je medijan vrijednosti Med-DQI bio 9 (5 do 14). Navedeno ukazuje na osrednju-lošu kvalitetu prehrane odnosno lošu usklađenost s obrascima mediteranske prehrane što je karakteristično za obrasce zapadnjačke prehrane. Tome u prilog govore i ostale karakteristike prehrane ispitanica uključenih u studiju koje su prikazane na Slici 6.



**Slika 6.** Obrasci unosa makronutrijenata i osnovnih skupina namirnica ispitanica uključenih u studiju

AMDR – prihvatljivi raspon unosa makronutrijenata (engl. *Acceptable Macronutrient Distribution Range*). \*Podatci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon).

Preporučeni dnevni unos za proteine iznosi 0,8 g/kg tjelesne težine uz uvjet da uneseni proteini sadrže sve aminokiseline u odgovarajućim količinama. Također, 50 % proteina bi trebalo biti iz biljnih izvora, a 50 % iz životinjskih. Dopuštena razina unosa makronutrijenata AMDR za proteine iznosi 10 % do 15 % ukupnog kalorijskog unosa [167]. Potrebe za proteinima rastu u

stanjima poput bolesti i pojačanog stresa. Vrijednost AMDR za proteine kod naših ispitanica kretala se od 5,8 do 25,9 dok je srednja vrijednost iznosila 11,6 % što znači da je u tom smislu unos proteina bio u skladu sa smjernicama. S obzirom na visok unos mesa - medijan dnevnog unosa iznosio je 4,1 (2,4-7,2) moguće je zaključiti da su u prehrani ispitanica visoko zastupljeni proteini animalnog podrijetla.

Masti u prehrani primarno se sastoje od triglicerida (98 %), manje količine fosfolipida i sterola [168]. Preporuke naglašavaju važnost konzumiranja biljnih ulja bogatih mononezasićenim i omega-3 masnim kiselinama te ograničenja unosa zasićenih masti i ulja bogatih omega-6 polinezasićenim masnim kiselinama. Dopušten doprinos masti ukupnom kalorijskom unosu iznosi 20-35 % od ukupnog dnevnog energetskeg unosa, a manje od 10 % bi trebalo biti iz zasićenih masti. Unos trans-masti trebalo bi u potpunosti ograničiti na najmanju moguću vrijednost dok bi unos kolesterola trebao biti manji od 300 mg/dne. AMDR vrijednosti za masti kretale su se od 25,7 do 77,8 % dok je medijan iznosio 52,5 %. Za zasićene masti vrijednost AMDR se kretala od 14,1 do 28,6 % a medijan je iznosio 16,9 %. Iz navedenog je vidljivo da prehranu ispitanica uključenih u studiju karakterizira previsok unos masti te zasićenih masti. Unos kolesterola kretao se od 51,8 do 765,8 mg/dne s medijanom koji je iznosio 281,8 mg, što je u skladu s preporukama. AMDR za ugljikohidrate iznosi 45 % do 65 % ukupnog kalorijskog unosa, od čega najviše 25 % smije potjecati od jednostavnih šećera. Kod naših ispitanica unos ugljikohidrata bio je u skladu sa smjernicama - AMDR za ugljikohidrate kretao se od 9,4 do 69,8 %, s medijanom od 38,0 %.

Sve navedene karakteristike unosa makronutrijenata ispitanica uklapaju se u karakteristike obrazaca zapadnjačke prehrane osim visokog unosa prehrambenih vlakana, što nije u skladu s očekivanjima. Naime, prehrambena vlakna su neprobavljivi ugljikohidrati prisutni u većini namirnica biljnog podrijetla: u voću, povrću i žitaricama nalaze se u koncentraciji 1-3 %, dok orašasti proizvodi, leguminoze i žitarice bogate vlaknima sadrže više od 3 % vlakana [168]. Preporuka za unos prehrambenih vlakana za žene u dobi od 19 do 50 godina je 25 g/dne, dok je preporuka dnevnog unosa za žene iznad 51 godinu nešto manje od 21 gram vlakana dnevno. Medijan unosa prehrambenih vlakana u ispitanica iznosio je 30,3 grama. Navedeni podatci posljedica su vrlo visokog procijenjenog unosa prehrambenih vlakana od strane nekoliko ispitanica pri čemu su kao najvažniji izvori prehrambenih vlakana kokice i grahorice, a nakon toga voće. Jedna od slabosti FFQ-a kao metodološkog alata je upravo mogućnost pogreške u procjeni unosa te bi navedeni podatak o unosu broja porcija voća/prehrambenih vlakana trebalo provjeriti metodom 24-satnog prisjećanja odnosno dnevnika prehrane. Ipak, čak i uz moguće

precijenjen unos voća i povrća, ukupan broj porcija voća i povrća bio je prenizak. Naime, prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije za unos svježeg voća i povrća potrebno je unijeti 400 g ili 8-10 porcija na dan. U ovom istraživanju medijan broja porcija voća iznosio je 3,2 ( 1,7- 5,5), a povrća 3,6 ( 2,3 - 5,5) [169].

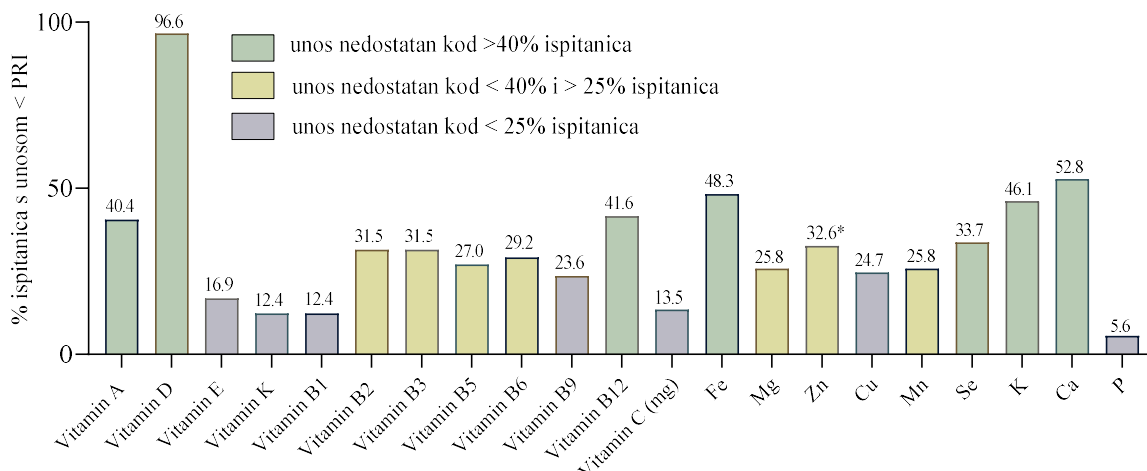
Usljed nedostatka preciznih podataka o prehranbenim navikama u Bosni i Hercegovini kao i u susjednim zemljama, bilo je teško procijeniti jesu li prehrambene navike ispitanica usporedive s prosječnim navikama opće populacije. Dobiveni podatci su uspoređeni s prehranbenim navikama žena iz zemalja Istočne i Središnje Europe koji su istraženi u okvirima HAPIEE studije [170]. Opće prehrambene karakteristike u pogledu kvalitete prehrane, skupina namirnica, energije, kao i prosječni unos mikronutrijenata bili su usporedivi, dok je unos masti, zasićenih masnih kiselina i prehranbenih vlakana bio nešto veći u ovom istraživanju. Prehranu ispitanica karakterizirao je visok energetska unos (3160 kcal), visok unos masti i zasićenih masti, niski omjeri unosa polinezasićenih i zasićenih masti (PUFA/SF) te mononezasićenih i zasićenih masti (MUFA)/SF). Unos ribe, voća i povrća je bio znatno niži od preporučenog, osobito što se unosa ribe tiče. Općenito se može zaključiti da su ispitanice konzumirale prehranu zapadnog tipa koju karakterizira nizak DQI-I i Med-DQI (63,5 (od 100) i 9 (kategoriziran kao srednji prema oskudnom)).

Istraživanje Rippina i suradnika (2017) pokazuje da je u Europi, kod svih dobnih skupina ispitanika, unos proteina bio blago iznad donje vrijednosti preporučene vrijednosti unosa proteina [171]. Više od pola država koje su sudjelovale ispunilo je ili premašilo gornju vrijednost preporučenog unosa, iako nije bilo regionalnog obrasca. Nijedna država nije ispunila nižu vrijednost preporučenog unosa ugljikohidrata. Srednja vrijednost unosa ugljikohidrata je iznosila 209 g (raspon 156–265 g) za žene. Većina država je podbacila u preporučenom unosu vlakana za sve dobne skupine - samo su Norveška (sve dobne skupine), Njemačka (žene dobi od 51–64 godine) i Mađarska ispunile cilj od 25 g unesenih prehranbenih vlakana dnevno. Srednje vrijednosti unosa vlakana su bile 19 g (raspon 13–26 g) za žene. Sve države koje su prijavile unos dodanih šećera, bile su iznad 5% od preporučenog unosa, iako su u Estoniji i Finskoj bile preko maksimuma od 10 %. Srednje vrijednosti dodanog šećera su iznosile 41 g (raspon 30–49 g) za žene. Sve države su premašile preporuku Svjetske zdravstvene organizacije što se tiče gornjeg limita unosa masti od 30 %, osim starijih muškaraca portugalcima. Srednji unos ukupnih masti je bio 73 g (51–95 g) kod žena. U većina država obuhvaćenih studijom unos zasićenih masti prelazio je preporučenih 10 % (srednja vrijednost unosa zasićenih masti u žena iznosila je 25 g (16–33 g)).

**Tablica 2.** Unosi vitamina, minerala i karotenoida ispitanica uključenih u istraživanje.

	medijan (interkvartilni raspon)	PRI (AI)	AR	UL
<b>Vitamin A (µg RAE)</b>	744 (448-1016)	650	490	3000
<b>Vitamin D (µg)*</b>	3.4 (2.1-5-8)	15	-	100
<b>Vitamin K (µg)*</b>	196 (98.3-340)	70	-	-
<b>Vitamin E (mg)*</b>	29.2 (13.5-47.3)	11	-	300
<b>Tiamin (mg/1000 kcal)</b>	0.55 (0.45-0.69)	0.4	0.3	-
<b>Riboflavin (mg)</b>	2.2 (1.4-3.2)	1.6	1.3	-
<b>Niacin (mg/1000 kcal)</b>	7.3 (6.2-9.7)	6.6	5.5	900
<b>Pantotenska kiselina (mg)*</b>	6.4 (4.8-9.3)	5	-	-
<b>Piridoksin (mg)</b>	2.1 (1.4-2.8)	1.6	1.3	25
<b>Folat (µg)</b>	368 (252-495)	250	330	1000
<b>Kobalamin (µg)*</b>	4.6 (3.1-6.9)	4	-	-
<b>Vitamin C (mg)</b>	186 (111-305)	80	95	-
<b>K (g)*</b>	3.8 (2.6-5.2)	3.5	-	-
<b>Ca (mg)</b>	921 (660-1462)	950	750	2500
<b>Mg (mg)*</b>	403 (287-526)	300	-	250
<b>Fosfor (mg)*</b>	1343 (941-1934)	550	-	-
<b>Željezo (mg)</b>	16.1 (11.5-21.9)	16	11	-
<b>Cink (mg)**</b>	10.6 (7.5-15.6)	6.2-10.2	7.5-12.7	25
<b>Bakar (mg)*</b>	1.8 (1.3-2.5)	1.3	-	5
<b>Mangan (mg)*</b>	4.1 (2.9-5.4)	3	-	-
<b>Selen (µg)*</b>	94.7 (62.0-129)	70	-	300
<b>Karotenoidi</b>	11.4 (5.5-17.0)	-	-	-

PRI-referentni unos (engl. *population reference intake*); AI-zadovoljavajući unos (engl. *adequate intake*); AR-prosječne potrebe (engl. *average requirement*); UL-gornja granica sigurnog unosa (engl. *upper limit*). \* određen je AI; \*\*ovisi o unosu fitinske kiseline; - vrijednosti nisu definirane od strane EFSA (*European Food Safety Authority*)



**Slika 7.** Udio ispitanica s unosom pojedinog mikronutrijenta < PRI

\*PRI za Zn ovisi o unosu fitinske kiseline – za potrebe izračuna korištena je vrijednost PRI=8.2 mg.

Unosi mikronutrijenata (vitamina, minerala i karotenoida) ispitanica koje su sudjelovale u istraživanju prikazani su u Tablici 2. dok je na Slici 7 prikazan udio ispitanica s unosom pojedinog mikronutrijenta koji je manji od referentnog unosa (engl. *population reference intake*, PRI).

Što se tiče vitamina A, kod više od 40 % ispitanica je bio nedostatan unos. Dobivena srednja vrijednost je bila 744  $\mu\text{g}$  dok se interkvartilni raspon kretao od 448 do 1016  $\mu\text{g}$ . PRI, odnosno zadovoljavajući unos (engl. *adequate intake*, AI) za vitamin A iznosi 650  $\mu\text{g}$ . Prosječne potrebe (engl. *average requirement*, AR) za ovim vitaminom iznose 490  $\mu\text{g}$ , dok je gornja granica sigurnog unosa (engl. *upper limit*, UL) 3000  $\mu\text{g}$ . Unos vitamina D je također kod više od 40 % ispitanica bio nedostatan. Srednja vrijednost iznosila je 3,4  $\mu\text{g}$  a raspon se kretao od 2,1 do 5,8  $\mu\text{g}$ . PRI (AI) za vitamin D je 15  $\mu\text{g}$ , dok je UL 3000  $\mu\text{g}$ . Unos vitamina K je bio nedostatan kod manje od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost iznosila je 196  $\mu\text{g}$  a interkvartilni raspon se kretao od 98,3 do 340  $\mu\text{g}$ . PRI (AI) je 70  $\mu\text{g}$  dok vrijednosti AR i UL nisu navedene. Unos vitamina E je također bio nedostatan kod manje od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost iznosila je 29,2 mg a interkvartilni raspon se kretao od 13,5 do 47,3 mg. Vrijednost PRI (AI) iznosi 11 mg a vrijednost UL 300 mg. Vrijednost vitamina B1 (tiamin) je bila nedostatna kod manje od 25 % ispitanica. Dobivena srednja vrijednost je 0,55 mg/1000 kcal. Interkvartilni raspon iznosio je od 0,45 do 0,69 mg/1000 kcal. PRI (AI) vrijednost je 0,4 mg/1000 kcal, dok je AR vrijednost



0,3 mg/1000 kcal. Unos vitamina B2 (riboflavin) je bio nedostatan kod manje od 40 % i više od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost je iznosila 2,2 mg, interkvartilni raspon se kretao od 1,4 do 3,2 mg. PRI (AI) za vitamin B2 iznosi 1,6 mg, dok su prosječne potrebe 1,3 mg. Gornja granica sigurnog unosa za vitamin B2 nije navedena. Unos vitamina B3 (niacin) je bio nedostatan kod manje od 40 % i više od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost je iznosila 7,3 mg/1000 kcal a interkvartilni raspon se kretao od 6,2 do 9,7 mg/1000 kcal. Vrijednost PRI (AI) iznosi 6,6 mg/1000 kcal, vrijednost AR 5,5 mg/1000 kcal, dok vrijednost UL za vitamin B3 iznosi 900 mg/1000 kcal. Što se tiče vitamina B5 (pantotenska kiselina) i njegov unos je bio nedostatan kod manje od 40 % i više od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost iznosila je 6,4 mg, dok je interkvartilni raspon iznosio od 4,8 do 9,3 mg. Vrijednost PRI (AI) za vitamin B5 iznosi 5 mg dok vrijednosti AR i UL nisu navedene. Za vitamin B6 (piridoksin) unos je također bio nedostatan kod manje od 40 % a više od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost iznosila je 2,1 mg a interkvartilni raspon je iznosio od 1,4 do 2,8 mg. Vrijednost PRI (AI) za vitamin B6 je 1,6 mg, dok su vrijednosti AR 1,3 mg i UL 25 mg. Unos vitamina B9 (folat) je bio nedostatan kod manje od 25 % ispitanica. Srednja dobivena vrijednost je bila 368 µg a interkvartilni raspon od 252 do 495 µg. PRI (AI) vrijednost iznosi 250 µg a vrijednosti AR 330 µg i UL 1000 µg. Što se tiče unosa vitamina B12 (kobalamin), bio je nedostatan kod više od 40 % ispitanica. Srednja vrijednost iznosila je 4,6 µg, dok je interkvartilni raspon iznosio od 3,1 do 6,9 µg. Vrijednost PRI (AI) iznosi 4 µg. Unos vitamina C je bio nedostatan kod manje od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost unosa iznosila je 186 mg, dok se interkvartilni raspon kretao od 111 mg do 305 mg. PRI (AI) iznosi 80 mg, dok je prosječna potreba za ovim vitaminom 95 mg. Unos kalija je bio nedostatan kod više od 40 % ispitanica. Srednja dobivena vrijednost unosa iznosila je 3,8 g a interkvartilni raspon se kretao od 2,6 do 5,2 g. Vrijednost PRI (AI) iznosi 3,5 g. Vrijednosti AR i UL nisu navedene. Unos kalcija je bio nedostatan kod više od 40 % ispitanica. Srednja dobivena vrijednost je iznosila 921 mg, interkvartilni raspon se kretao od 660 do 1462 mg. PRI (AI) za kalcij iznosi 950 mg, dok su vrijednosti AR 750 mg i UL 2500 mg. Unos magnezija je bio nedostatan kod manje od 40 % i više od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost unosa bila je 403 mg a interkvartilni raspon je bio od 287 do 526 mg. Vrijednost PRI (AI) iznosi 300 mg dok je gornja granica sigurnog unosa 250 mg. Što se unosa fosfora tiče, bio je nedostatan kod manje od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost unosa iznosila je 1343 mg, dok se interkvartilni raspon kretao od 941 do 1934 mg. PI (AI) za fosfor jeste 550 mg. Unos željeza je bio nedostatan kod više od 40 % ispitanica. Srednja vrijednost unosa iznosila je 16,1 mg a interkvartilni raspon se kretao od 11,5 do 21,9 mg. Vrijednost PRI (AI) za željezo iznosi 16 mg, a prosječne potrebe su 11 mg. Unos cinka je bio nedostatan kod manje od 40 % a više od 25 % ispitanica. Srednja

vrijednost unosa iznosila je 10,6 mg dok se interkvartilni raspon kretao od 7,5 do 15,6 mg. PRI (AI) za cink iznosi od 6,2 do 10,2 mg. Vrijednost AR je od 7,5 do 12,7 mg, dok je gornja granica sigurnog unosa za cink 25 mg. Unos bakra je bio nedostatan kod manje od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost unosa iznosila je 1,8 mg a interkvartilni raspon se kretao od 1,3 do 2,5 mg. PRI (AI) vrijednost je 1,3 mg dok je gornja granica sigurnog unosa 5 mg za bakar. Unos mangana bio je nedostatan kod manje od 40 % a više od 25 % ispitanica. Srednja vrijednost unosa bila je 4,1 mg a interkvartilni raspon bio je od 2,9 do 5,4 mg. Vrijednost PRI (AI) iznosi 3 mg. Što se unosa selena tiče, bio je nedostatan kod više od 40 % ispitanica. Srednja vrijednost unosa iznosila je 94,7 µg, dok se interkvartilni raspon kretao od 62,0 do 129 µg. Vrijednost PRI (AI) za selen iznosi 70 µg a gornja granica sigurnog unosa iznosi 300 µg.

Na temelju svega navedenog može se zaključiti da je, što se tiče vitamina, najproblematičniji unos vitamina D, vitamina A i vitamina B kompleksa, dok je, što se tiče minerala, najproblematičniji unos željeza, kalcija, kalija i selena. Navedeno je u skladu s podacima o najčešćim mikronutritivnim deficitima u Europi [172, 173]. Primjerice, većina europskih zemalja ima problem s niskim unosom vitamina D osim Finske koja provodi uspješne javnozdravstvene politike vezane uz vitamin D [174]. Unos željeza u žena ispod je razine preporučenog unosa u svim zemljama obuhvaćenim studijom. [175, 176]. Nizak unos vitamina K bilježimo u Švedskoj i na Islandu, kao i u Baltičkim zemljama [176]. Nizak unos vitamina B12 koji je utvrđen u našoj studiji nije toliko uobičajen - većina europskih država ima zadovoljavajući unos s iznimkom starije populacije iz Litve i Turske. Nedostatan unos selena u skladu je s činjenicom da je tlo u Europi relativno siromašno selenom što se reflektira na nutritivni sastav namirnica. Zemlja s najvišim unosom selena u Europi je Finska koja za usjeve koristi gnojiva obogaćena selenom, što je povećalo i unos selena i status selena u finskoj populaciji [177].

Razlike u prijavljenim unosima hranjivih tvari između zemalja uzrokovane su stvarnim razlikama u sadržaju hranjivih tvari u hrani, utvrđenom politikom, kao i razlikama u kulturi prehrane, što se odražava u razlikama u podacima o unosu koji se odnose na prehrambene pogodnosti i kulinarske tradicije. Vrijednosti baze podataka i postupak preračuna unosa hranjivih tvari u anketama također utječu na unose i doprinose razlikama među zemljama.

## 4.2. Usporedba ulaznih karakteristika kontrolne i ispitivane skupine

Ukupno 100 ispitanica je bilo randomizirano u ispitivanu ( $n = 50$ ) i kontrolnu (placebo) skupinu ( $n = 50$ ). Jedanaest ispitanica (dvije ispitanice iz kontrolne skupine i devet iz ispitivane skupine) nije završilo istraživanje uslijed osobnih razloga. Nije bilo prijavljenih nuspojava uslijed unosa ALA-e ili placeba.

Brojne demografske, životne i prehrambene karakteristike, kao što su dob, ITM, pušenje, unos voća i povrća, energetske unos, konzumiranje crvenog mesa i životinjskih proteina, mogu utjecati na pojavu rizika za nastanak ginekoloških abnormalnosti uključujući HSIL ili karcinom vrata maternice [178-180]. Usporedba navedenih karakteristika kontrolne i ispitivane skupine prikazana je u Tablici 3. Dob ispitanica u obje skupine je bila slična ( $p = 0,082$ ). Medijani indeksa tjelesne mase u tretiranoj i ispitivanoj skupini su bili slični ( $23,9$  i  $25 \text{ kg/m}^2$ ,  $p = 0,508$ ). Postotak pušača u kontrolnoj i ispitivanoj skupini je bio  $29,2 \%$  i  $19,5 \%$ , a uočene razlike nisu bile statistički značajne ( $p = 0,333$ ). Unos voća i povrća je bio znatno manji od preporučenog, dok je unos mesa i životinjskih proteina bio iznad aktualnih preporuka u obje skupine, a dobiveni medijani unosa nisu se značajno razlikovali između kontrolne i ispitivane skupine ispitanica. Adherencija ispitanica određena je prebrojavanjem neiskorištenih tableta koje su prebrojane prilikom drugog posjeta ginekologu. Medijani broja vraćenih tableta prilikom zadnje posjete bili su  $35$  u kontrolnoj i  $28$  u ispitivanoj skupini, a uočene razlike nisu bile statistički različite ( $p = 0,405$ ) što ukazuje na usporedivu adherenciju obje skupine ispitanica.

Kontrolna i ispitivana skupina ispitanica uspoređene su i s obzirom na karakteristike prehrane koje su prema literaturnim navodima relevantne za antioksidativni status i lipidni profil: unos voća i povrća, vitamina C, vitamina E i karotenoida (kao antioksidativnih, zaštitnih čimbenika); energetske unos, unos mesa, crvenog mesa, životinjskih proteina, zasićenih masti, nezasićenih masti i kolesterola (kao čimbenika koji bi eventualno mogli doprinijeti oksidativnom stresu i dislipidemiji). Opća usklađenost prehrambenih navika ispitanica s općim smjernicama ili principima mediteranske prehrane (kvantificirana i izražena kao DQI-I i Med-DQI) također je uspoređena između kontrolne i ispitivane skupine. Analizom je pokazano kako nije bilo statistički značajnih razlika između kontrolne i ispitivane skupine u pogledu bilo koje promatrane karakteristike prehrane.

**Tablica 3.** Usporedba ulaznih karakteristika kontrolne i ispitivane skupine.

	Kontrolna skupina (n=48)	Ispitivana skupina (n=41)	P
	<b>Stil života i navike</b>		
Dob (godine)	37 (28-46)	43 (34-47)	0.082
Pušenje cigareta*	14	8	0.333
Adherencija* (vraćene tablete)	35	28	0.405
<b>Indeks tjelesne mase</b>	25 (21,6-27,1)	23.9 (21.6-26.9)	0,508
	<b>Način prehrane**</b>		
Energija (kcal)	3104 (1937-4249)	3530 (2015-4404)	0.374
Voće (tjedna porcija)	2.78 (1.90-5.45)	3.66 (1.56-5.88)	0.365
Povrće (tjedna porcija)	3.49 (2.21-4.67)	4.17 (2.83-5.86)	0.252
Bjelančevine životinjskog porijekla (g/dan)	40.61 (24.33-62.90)	36.05 (23.29-54.07)	0.315
Meso (tjedna porcija)	3.95 (2.25-7.37)	4.20 (2.54-7.24)	0.558
Crveno meso (tjedna porcija)	2.66 (0.00-14.36)	4.05 (0.00-33.76)	0.852
Masti (g)	167.9 (99.7-252.5)	190.6 (103.6-293.8)	0.176
Zasićene masti (g)	53.4 (29.6-85.5)	69.75 (34.26-103.7)	0.202
Kolesterol (mg)	290.4 (178.3-473.4)	291.6 (188.8-422.4)	0.809
Vitamin C (mg)	199.3 (139.0-302.4)	175.7 (95.91-321.1)	0.570
Vitamin E (mg)	21.44 (12.5-44.4)	33.61 (17.17-48.06)	0.262
Karotenoidi (mg) <sup>#</sup>	7.58 (4.54-15.0)	14.43 (6.363-18.65)	0.064
DQI-I <sup>***</sup>	63.55 (57.4-67.7)	63.64 (55.00-68.79)	0.308
Med-DQI <sup>***</sup>	9.00 (7.25-10.0)	9.00 (7.00-10.00)	0.516

Rezultati su izraženi kao medijani (interkvartilni raspon); testirano Wilcoxonovim parametrijskim testom \*Rezultati su izraženi brojčano; testirano Fisherovim ekzaktnim testom. \*\*Rezultati su izraženi kao prosječni dnevni unos. #suma beta karotena, luteina, zeaksantina i likopena. \*\*\*Izračunato pomoću podataka dobivenih semikvantitativnim FFQ-om. DQI-I (engl. *Diet Quality Index-International*); Med-DQI (engl. *Mediterranean Diet Quality Index*).

### **4.3. Utjecaj suplementacije ALA-om na stupanj SIL-a, HPV infekciju i parametre upale**

Osnovni ciljevi provedene studije bili su istražiti učinkovitost suplementacije ALA-om na LSIL (primarni rezultat), prisutnost HPV infekcije, te upalu (vrijednost sedimentacije, visoko osjetljivog CRP-a i fibrinogena). U Tablici 4. uspoređene su vrijednosti navedenih parametara između kontrolne i ispitivane skupine prilikom inicijalnog pregleda te nakon intervencije. Sve ispitanice, koje su bile uključene u studiju, imale su dijagnozu LSIL-a prilikom prvog dolaska te se kontrolna i ispitivana skupina na inicijalnom pregledu po tom parametru nisu razlikovale. Do završetka istraživanja ovaj broj ispitanica je reducirana u obje skupine. U kontrolnoj skupini 44 ispitanice su i dalje imale dijagnozu LSIL-a, dok su u ispitivanoj skupini s dijagnozom LSIL-a ostale dvije ispitanice ( $p < 0,001$ ) što ukazuje na visoku razinu značajnosti odnosno učinkovitost ALA-e u poticanju regresije LSIL-a.

Zastupljenost ispitanica s pozitivnim nalazom HPV-a bio je usporediv u obje skupine ispitanica i prilikom inicijalnog pregleda i nakon provedene intervencije – suplementacija ALA-om nije utjecala na prisutnost HPV infekcije. Prilikom inicijalnog pregleda, vrijednosti hsCRP i FI kontrolne i ispitivane skupine značajno su se razlikovale (redom,  $p = 0,0344$  i  $p = 0,0130$ ). Medijani vrijednosti bili su značajno viši u ispitivanoj skupini, ali su se vrijednosti i dalje nalazile unutar referentnog intervala. Vrijednosti SE bile su usporedive u obje skupine ( $p = 0,0785$ ). Prilikom drugog pregleda nije bilo razlike u vrijednostima hsCRP-a dok su vrijednosti FI ovaj put bile više u kontrolnoj skupini ( $p = 0,044$ ).

**Tablica 4.** Razlike u pojavnosti LSIL-a, broja HPV pozitivnih ispitanica i parametara upale između kontrolne i ispitivane skupine na inicijalnom pregledu i nakon 3 mjeseca intervencije.

	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina	P	Kontrolna skupina	Ispitivana skupina	P
	Prvi dolazak			Dolazak nakon 3 mjeseca		
<sup>1</sup> LSIL broj pacijentica	48	41	1.00	44	2	<0.001
<sup>1</sup> HPV broj pacijentica	18 (37.5%)	19 (46.3%)	0.5178	18 (37.5%)	19 (46.3%)	0.518
<sup>2</sup> hsCRP (mg/L)	0.86 (0.47-1.32)	1.77 (0.82-2.44)	0.034	1.11 (0.61-1.98)	0.89 (0.39-1.68)	0.241
<sup>2</sup> FI (g/L)	3.30 (2.4-3.9)	3.9 (3.1-4.4)	0.013	3.7 (2.7-4.5)	3.3 (2.6-3.8)	0.044
<sup>2</sup> SE (mm/h)	16 (12-23)	20 (15-26)	0.079	20 (16-26)	16 (12-22)	0.005

Rezultati su izraženi kao medijani (interkvartilni raspon). <sup>1</sup>Testirano Fisherovim egzaktnim testom; usporedba vrijednosti kod prvog dolaska i dolaska nakon 3 mjeseca u kontrolnoj i ispitivanoj skupini. <sup>2</sup>Testirano Mann-Whitneyevim testom; poređenje vrijednosti kod prvog dolaska i dolaska nakon 3 mjeseca u kontrolnoj i ispitivanoj skupini. LSIL-skvamozna intrepitelna lezija niskog stupnja; HPV-humani papiloma virus; hsCRP-visko osjetljivi C-reaktivni protein, FI-fibrinogen; SE-sedimentacija.

**Tablica 5.** Promjena pojavnosti LSIL-a, broja HPV pozitivnih ispitanica i parametara upale između inicijalnog pregleda i pregleda nakon 3 mjeseca intervencije u kontrolnoj i ispitivanoj skupini.

	Kontrolna skupina			Ispitivana skupina		
	Inicijalni pregled	Pregled nakon 3 mjeseca	P	Inicijalni pregled	Pregled nakon 3 mjeseca	P
<sup>1</sup> LSIL broj ispitanica	48	44	0.1171	41	2	<0.001
<sup>1</sup> HPV broj ispitanica	18	18	1.000	19	19	1.000
<sup>2</sup> hsCRP (mg/L)	0.86 (0.47-1.32)	1.11 (0.61-1.98)	<0.001	1.77 (0.82-2.44)	0.89 (0.39-1.68)	<0.001
<sup>2</sup> FI (g/L)	3.30 (2.4-3.9)	3.7 (2.7-4.5)	<0.001	3.9 (3.1-4.4)	3.3 (2.6-3.8)	<0.001
<sup>2</sup> SE (mm/h)	16 (12-23)	20 (16-26)	<0.001	20 (15-26)	16 (12-22)	<0.001

Rezultati su izraženi kao medijani (interkvartilni raspon). <sup>1</sup>Testirano Fisherovim egzaktnim testom; usporedba kontrolne i ispitivane skupine ispitanica prilikom prvog dolaska/ponovljenog dolaska. <sup>2</sup>Testirano Mann-Whitneyevim testom; usporedba kontrolne i ispitivane skupine ispitanica prilikom prvog dolaska/ponovljenog dolaska. LSIL-skvamozna intrepitelna lezija niskog stupnja; HPV-humani papiloma virus; hsCRP-visko osjetljivi C-reaktivni protein, FI-fibrinogen; SE-sedimentacija.

Tablica 5. prikazuje statističku značajnost opaženih promjena promatranih parametara tijekom tromjesečne suplementacije placebo (kontrolna skupina) odnosno ALA-om (ispitivana skupina). Primarni ishod studije bio je regresija LSIL-a koja je u ispitivanoj skupini bila vrlo izražena - u skupini koja je tretirana s ALA-om potpuna regresija LSIL-a utvrđena je čak kod 95,12 % ispitanica ( $p < 0,0001$ ). Broj LSIL pozitivnih ispitanica u kontrolnoj skupini smanjio se s 48 na 44 što pokazuje oporavak 8,33 % ispitanica te se takva promjena pokazala statistički beznačajnom ( $p = 0,1171$ ). Niti u jednoj skupini nije došlo do progresije u HSIL.

Kao što je ranije napomenuto, udio ispitanica s pozitivnom HPV infekcijom nije se mijenjao tijekom perioda intervencije niti u kontrolnoj niti u ispitivanoj skupini. U kontrolnoj skupini je u razdoblju između dva pregleda došlo do blagog, ali statistički značajnog porasta svih promatranih parametara upale ( $p < 0,001$ ). Naprotiv, u skupini tretiranoj s ALA svi praćeni parametri upale su se blago smanjili (promjene su bile statistički značajne; ( $p < 0,0001$ )).

Na temelju prikazanih rezultata moguće je zaključiti da je suplementacija s 600 mg ALA-om kroz 3 mjeseca potaknula regresiju LSIL-a te dovela do blagog, ali statistički značajnog smanjenja parametara upale, a bez učinka na infekciju HPV-om.

#### **4.4. Utjecaj suplementacije ALA-om na parametre oksidativnog stresa i lipemiju**

U okviru istraživanja utjecaja suplementacije ALA-om na parametre oksidativnog stresa odabrani su oni biomarkeri koji su se u prethodno provedenim istraživanjima pokazali primjenjivima za praćenje učinkovitosti unosa antioksidanasa prehranom [181-183]. Stoga je provedeno istraživanje bilo usmjereno na istraživanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta seruma (TEAC, ORAC, FRAP i FC redukcijски potencijal), aktivnost antioksidativnih enzima (SOD), status endogenih antioksidanasa (GSH) i biljege lipidne peroksidacije (MDA) pacijentica s LSIL-om nakon tromjesečne suplementacije ALA-om. Za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta seruma kombinirane su četiri različite kemijske metode u kojim se antioksidativni potencijal uzorka određuje na temelju kinetike ili postizanja stanja ravnoteže oksido-reduktivne reakcije, uglavnom korištenjem spektrofotometrijskih ili spektrofluometrijskih metoda. Vrlo često se primjenjuju zbog svoje niske cijene, točnosti, jednostavnosti i reproducibilnosti, međutim zbog postojanja određenih metodoloških ograničenja preporučuje se njihova kombinirana primjena radi točnije interpretacije dobivenih

rezultata [184]. Za procjenu lipidnog statusa odabrani su uobičajeni biomarkeri koji se koriste u kliničkoj praksi (LDL, HDL, TGC).

U Tablici 6. prikazane su razlike promatranih parametara antioksidativnog statusa i lipemije u kontrolnoj i ispitivanoj skupini ispitanica prilikom inicijalnog pregleda i nakon tri mjeseca suplementacije. Pri inicijalnom mjerenju nisu utvrđene značajne razlike između medijana koncentracija MDA ( $p = 0,1938$ ), FRAP ( $p = 0,5371$ ), SOD ( $p = 0,3650$ ), ORAC ( $p = 0,2203$ ) i GSH ( $p = 0,3093$ ) niti u kontrolnoj niti u ispitivanoj skupini.

**Tablica 6.** Razlike u vrijednostima parametara oksidativnog stresa i lipemije između kontrolne i ispitivane skupine ispitanica na inicijalnom pregledu i nakon 3 mjeseca intervencije.

	KS	IS	P*	KS	IS	P**
	inicijalni pregled			pregled nakon 3 mjeseca		
<b>MDA</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	0.566 (0.373-0.819)	0.604 (0.444-1.011)	0.151	0.546 (0.346-1.072)	0.617 (0.462-1.13)	0.472
<b>FRAP</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ TE)	395.5 (336.2-445.1)	398.3 (360.9-449.1)	0.381	403.9 (345.0-462.8)	392.7 (374.6-428.8)	0.768
<b>SOD</b> (inhibicija (%))	58.35 (51.64-64.16)	59.21 (54.23-66.31)	0.180	59.45 (52.15-63.89)	59.43 (53.15-64.12)	0.348
<b>ORAC</b> ( $\text{mgL}^{-1}$ TE)	5471 (4583-6295)	4741 (3600-6447)	0.488	4759 (3978-6310)	5222 (4145-6119)	0.184
<b>TEAC</b> ( $\text{mgL}^{-1}$ TE)	296.7 (272.1-328.5)	322.7 (282.5-352.8)	0.048	299.7 (273.4-326.0)	321.9 (298.3-351.0)	0.003
<b>FC</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ GAE)	1316 (1181-1426)	1028 (697.3-1289)	0.005	1310 (1164-1454)	1157 (710.3-1291)	0.047
<b>GSH</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	48.33 (44.54-54.60)	47.19 (44.21-51.63)	0.389	48.46 (45.37-54.29)	45.72 (42.04-50.57)	0.050
<b>CHO</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	5.295 (4.658-6.110)	5.190 (4.680-6.220)	0.502	5.240 (4.753-6.083)	5.690 (5.225-6.650)	0.057
<b>LDL</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	3.160 (2.473-3.700)	2.890 (2.600-3.895)	0.712	3.115 (2.543-3.668)	3.460 (2.840-4.080)	0.033
<b>HDL</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	1.400 (1.270-1.633)	1.420 (1.185-1.740)	0.941	1.435 (1.200-1.620)	1.450 (1.235-1.890)	0.118
<b>TGC</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	1.120 (0.850-1.785)	1.260 (0.795-1.945)	0.320	1.040 (0.843-1.750)	1.180 (0.820-2.050)	0.402

Rezultati su izraženi kao medijani (interkvartilni raspon). Testirano Wilcoxonovim parametrijskim rang testom. \*Usporedba kontrolne i ispitivane skupine ispitanica pri inicijalnom pregledu. \*\* Usporedba kontrolne (KS) i ispitivane skupine (IS) ispitanica nakon 3 mjeseca praćenja. MDA-udio malondialdehida; FRAP-moć redukcije željeza; SOD-aktivnost superoksid dismutaze; ORAC-kapacitet vezanja kisikovih radikala; TEAC-Trolox ekvivalentni antioksidativni učinak; FC-Folin-Ciocalteu redukcijski potencijal; GSH-reducirani glutation; CHO-ukupni kolesterol; LDL-lipoproteini niske gustoće; HDL-lipoproteini visoke gustoće; TGC-trigliceridi; KS-kontrolna skupina; IS-ispitivana skupina.



Vrijednosti TEAC su bile značajno više ( $p = 0,027$ ) a FC reduksijska moć je bila značajno niža u ispitivanoj skupini ( $p = 0,005$ ). Nakon tri mjeseca suplementacije ALA-om situacija je ostala nepromijenjena osim vrijednosti GSH za koje je utvrđeno da su u ispitivanoj skupini bile značajno niže nego u kontrolnoj ( $p = 0,017$ ). Što se tiče parametara lipemije, pri inicijalnom pregledu nisu utvrđene značajne razlike u vrijednostima lipidnih parametara između kontrolne i ispitivane skupine. Ipak, nakon tromjesečne intervencije, u skupini ispitanica suplementiranih ALA-om utvrđene su značajno više vrijednosti LDL-a u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p = 0,033$ ), dok između ostalih parametara lipemije nisu utvrđene značajne razlike.

**Tablica 7.** Promjene parametara lipemije i markera antioksidativnog statusa nakon 3 mjeseca intervencije u kontrolnoj i ispitivanoj skupini.

	KS		P*	IS		P**
	inicijalni pregled	pregled nakon 3 mjeseca		inicijalni pregled	pregled nakon 3 mjeseca	
<b>MDA</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	0.566 (0.373-0.819)	0.546 (0.346-1.072)	0.420	0.604 (0.444-1.011)	0.617 (0.462-1.13)	0.327
<b>FRAP</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ TE)	395.5 (336.2-445.1)	403.9 (345.0-462.8)	0.207	398.3 (360.9-449.1)	392.7 (374.6-428.8)	0.972
<b>SOD</b> (inhibicija (%))	58.35 (51.64-64.16)	59.45 (52.15-63.89)	0.875	59.21 (54.23-66.31)	59.43 (53.15-64.12)	0.291
<b>ORAC</b> ( $\text{mgL}^{-1}$ TE)	5471 (4583-6295)	4759 (3978-6310)	0.264	4741 (3600-6447)	5222 (4145-6119)	0.226
<b>TEAC</b> ( $\text{mgL}^{-1}$ TE)	296.7 (272.1-328.5)	299.7 (273.4-326.0)	0.593	322.7 (282.5-352.8)	321.9 (298.3-351.0)	0.581
<b>FC</b> ( $\text{mg L}^{-1}$ GAE)	1316 (1181-1426)	1310 (1164-1454)	0.996	1028 (697.3-1289)	1157 (710.3-1291)	0.888
<b>GSH</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	48.33 (44.54-54.60)	48.46 (45.37-54.29)	0.703	47.19 (44.21-51.63)	45.72 (42.04-50.57)	0.411
<b>CHO</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	5.295 (4.658-6.110)	5.240 (4.753-6.083)	0.941	5.190 (4.680-6.220)	5.690 (5.225-6.650)	0.001
<b>LDL</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	3.160 (2.473-3.700)	3.115 (2.543-3.668)	0.277	2.890 (2.600-3.895)	3.460 (2.840-4.080)	0.006
<b>HDL</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	1.400 (1.270-1.633)	1.435 (1.200-1.620)	0.020	1.420 (1.185-1.740)	1.450 (1.235-1.890)	0.002
<b>TGC</b> ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	1.120 (0.850-1.785)	1.040 (0.843-1.750)	0.301	1.260 (0.795-1.945)	1.180 (0.820-2.050)	0.447

Rezultati su izraženi kao medijani (interkvartilni raspon). Testirani Wilcoxonovim parametrijskim rang testom. \*Usporedba kontrolne skupine pri prvom dolasku i nakon 3 mjeseca suplementacije. \*\*Usporedba ispitivane skupine pri prvom dolasku i nakon 3 mjeseca suplementacije. MDA-udio malondialehida; FRAP-moć redukcije željeza; SOD-aktivnost superoksid dismutaze; ORAC-kapacitet vezanja kisikovih radikala; TEAC-Trolox ekvivalentni antioksidativni učinak; FC-Folin-Ciocalteu redukcijски potencijal; GSH-reducirani glutation; CHO-ukupni kolesterol; LDL-lipoproteini niske gustoće; HDL-lipoproteini visoke gustoće; TGC-trigliceridi; KS-kontrolna skupina; IS-ispitivana skupina.

U Tablici 7. prikazane su promjene parametara lipemije i markera antioksidativnog statusa nakon 3 mjeseca intervencije u kontrolnoj i ispitivanoj skupini. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da u kontrolnoj skupini nije došlo do značajnih promjena vrijednosti biomarkera antioksidativnog statusa niti lipemije. U skupini pacijentica suplemetiranih ALA-om došlo je do porasta antioksidativnog kapaciteta seruma (ORAC i FC) te blagog smanjenja vrijednosti GSH međutim niti jedna od navedenih promjena nije bila statistički značajna. Učinak ALA-e na parametre lipemije bio je puno izraženiji. Suplementacija ALA-om rezultirala je značajnim porastom vrijednosti CHO ( $p = 0,001$ ), LDL ( $p = 0,006$ ) i HDL ( $p = 0,002$ ).

Zaključno, na temelju rezultata prikazanih u Tablicama 6. i 7. moguće je zaključiti da suplementacija sa 600 mg ALA-om kroz 3 mjeseca ne utječe značajno na parametre antioksidativnog statusa, međutim dovodi do blagog, ali statistički značajnog porasta vrijednosti LDL-a, HDL-a i ukupnog kolesterola.

#### **4.5. Utjecaj obrazaca prehrane na učinkovitost ALA-e u djelovanju na parametre antioksidativnog statusa**

Prehrambene navike i nutritivni status mogu značajno utjecati na antioksidativni status [185-187] ali i modulirati učinke dodataka prehrani s antioksidativnim/imunomodulatornim dodacima prehrani. Dva osnovna mehanizma koja sudjeluju u navedenim procesima su djelovanje na osnovni antioksidativni status domaćina [188] te stupanje bioaktivnih sastavnica hrane u interakcije s aktivnim komponentama dodataka prehrani pri čemu su mogući utjecaji na bioraspoloživost dodatnih antioksidanasa ili pojava sinergističkih/antagonističkih učinaka [189].

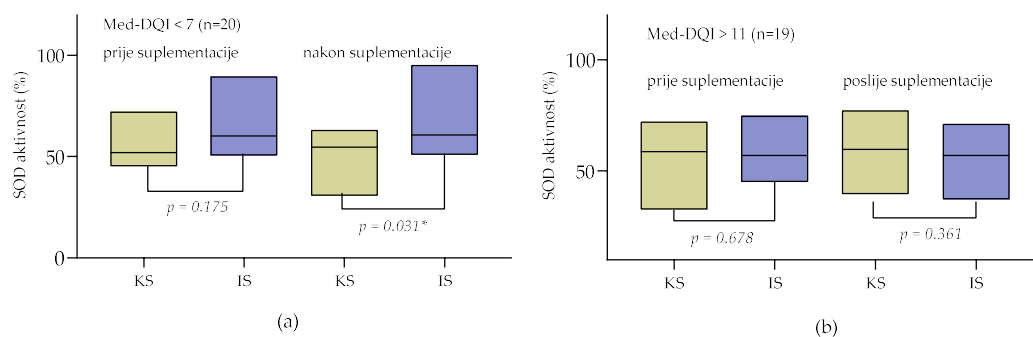
Zdrava prehrana u smislu pridržavanja mediteranske prehrane bogate voćem, mahunarkama, povrćem, maslinovim uljem, biljem, začinima ima izražena protuupalna i antioksidativna svojstva što značajno doprinosi poboljšanju različitih aspekata zdravlja te smanjenju rizika od bolesti koje u svojoj podlozi imaju upalu i oksidativni stres [189-192]. Kao što je prethodno navedeno, do danas je definiran veći broj prehrambenih indeksa koji reflektiraju stupanj pridržavanja mediteranske prehrane među kojima se kao izvrstan pokazatelj stupnja pridržavanja mediteranske prehrane osobito ističe Med -DQI.

Iako je ALA poznata kao potentan antioksidans, rezultati u provedenoj studiji nisu pokazali značajan učinak tromjesečne suplementacije niti na jedan od promatranih parametara oksidativnog stresa. Jedan od uzroka takvih ishoda mogle bi biti prehrambene navike ispitanica uključenih u studiju i to primarno oni aspekti prehrane koji se odnose na unos prooksidansa/antioksidansa. Kako bismo potvrdili hipotezu da je učinkovitost djelovanja ALA-e na parametre upale/oksidativnog stresa dijelom uvjetovana prehrambenim navikama ispitanica, provedena je analiza podskupina kako bi se usporedio utjecaj ALA-e na promatrane parametre i parametre oksidativnog stresa u podskupinama ispitanica s visokim (Med-DQI >11) i niskim (Med-DQI <7) Med-DQI (što ukazuje na nizak i visok stupanj pridržavanja mediteranskih obrazaca prehrane). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 8. i na Slikama 8 i 9.

**Tablica 8.** P vrijednosti dobivene usporedbom vrijednosti parametara oksidativnog stresa između kontrolne i ispitivane skupine ispitanica u podskupinama s Med-DQI <7 i Med-DQI >11.

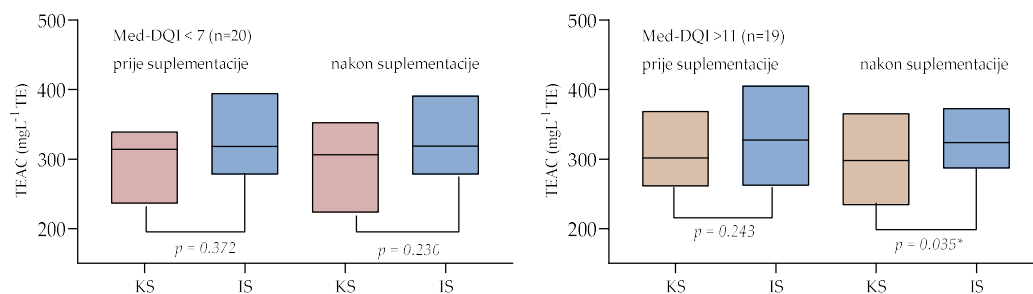
	Med-DQI <7 (n=20) (loše pridržavanje MD)		Med-DQI >11 (n=19) (dobro pridržavanje MD)	
	<i>p</i> (KS vs. IS)			
	<i>prije supl.</i>	<i>nakon supl.</i>	<i>prije supl.</i>	<i>nakon supl.</i>
<b>MDA</b>	0.809	0.984	0.661	0.604
<b>FRAP</b>	0.999	0.882	0.400	0.661
<b>SOD</b>	<b>0.175</b>	<b>0.031*</b>	0.549	0.095
<b>ORAC</b>	0,710	0.331	0.604	0.968
<b>TEAC</b>	0.370	0.300	<b>0.243</b>	<b>0.035*</b>
<b>FC</b>	0.370	0.095	<b>0.004*</b>	<b>0.004*</b>
<b>GSH</b>	0.286	0.261	0.113	0.156

Rezultati su izraženi kao p vrijednosti nakon provedenog Wilcoxon-ovog testa. Vrijednosti označene zvjezdicom označavaju statistički značajnu razliku ( $p > 0.05$ ). MDA-udio malondialehida; FRAP-moć redukcije željeza; SOD-aktivnost superoksid dismutaze; ORAC-kapacitet vezanja kisikovih radikala; TEAC-Trolox ekvivalentni antioksidativni učinak; FC-Folin-Ciocalteu redukcijjski potencijal; GSH-reducirani glutation; KS-kontrolna skupina; IS-ispitivana skupina.



**Slika 8.** Utjecaj suplementacije ALA-om na aktivnost SOD u podskupini ispitanica s niskim (a) i visokim (b) stupnjem pridržavanja obrazaca mediteranske prehrane. Testirano Mann-Whitneyevim testom

SOD- superoksid dismutaza; KS-kontrolna skupina; IS-ispitivana skupina; Med-DQI-indeks koji ukazuje na stupanj pridržavanja obrazaca mediteranske prehrane.



**Slika 9.** Utjecaj suplementacije ALA-om na TEAC antioksidativni kapacitet seruma u podskupini ispitanica s niskim (a) i visokim (b) stupnjem pridržavanja obrazaca mediteranske prehrane

TEAC- engl. *Trolox*<sup>®</sup> *equivalent antioxidant capacity*; KS-kontrolna skupina; IS-ispitivana skupina; TE-ekvivalenti Trolox-a<sup>®</sup>; Med-DQI-indeks koji ukazuje na stupanj pridržavanja obrazaca mediteranske prehrane.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da stupanj usklađenosti obrazaca prehrane ispitanica s obrascima mediteranske prehrane (što se primarno odnosi na značajnost unosa antioksidanasa prehranom) uglavnom nije utjecao na učinke ALA-e na parametre oksidativnog statusa. Ipak, kako je prikazano u Tablici 8., statistički značajne razlike utvrđene su kod dva promatrana parametra – aktivnosti SOD i ukupnog antioksidativnog potencijala seruma određenog TEAC testom gdje je značajan učinak utvrđen isključivo u podskupini ispitanica s niskim (aktivnost

SOD), odnosno visokim Med-DQI (TEAC vrijednost seruma). Analizom podskupine pokazano je da prehrambene karakteristike ispitanica mogu značajno utjecati na učinke suplementacije antioksidansima što utječe i na biomarkere oksidativnog statusa. Kao što je prikazano na Slici 9, u podskupini ispitanica koje su se više pridržavale mediteranskih prehrambenih obrazaca (Med-DQI < 7), suplementacija alfa lipoičnom kiselinom je pokazala pozitivne učinke na SOD aktivnost (spriječila je smanjenje SOD aktivnosti koje je uočeno u kontrolnoj skupini). To se može objasniti činjenicom da ALA povećava ekspresiju gena primarnih antioksidativnih enzima kao što je SOD, a što se može pratiti kao povećanje aktivnosti [193]. Ovo nije uočeno u podskupini ispitanica koje su se manje pridržavale mediteranskih prehrambenih obrazaca (Med-DQI > 11). Moguće objašnjenje dobivenih rezultata jeste da kod stanja povećanog oksidativnog stresa, povećana ekspresija SOD ne rezultira povećanom aktivnošću seruma, iz razloga što se pojačano koristi u staničnim oksidativnim reakcijama. Suprotno tome, visok unos drugih antioksidanasa prehranom, koji reduciraju formiranje ROS (uključujući superoksidni anion), smanjuje depleciju SOD što rezultira vidljivim i značajnim učinkom alfa lipoične kiseline. Navedena opažanja govore u prilog hipotezi o ovisnosti antioksidativnog djelovanja ALA-e o inicijalnom oksidativnom statusu/karakteristikama prehrane ispitanice. Značajnost navedenih opažanja ograničena je malim brojem ispitanica u podskupinama te je dobivene rezultate potrebno potvrditi istraživanjima na većem broju ispitanica.

#### **4.6. Utjecaj lipidnog statusa na učinkovitost ALA-e u djelovanju na lipidne parametre**

Kao što je prethodno navedeno, nakon tromjesečne suplementacije ALA-om razine LDL-a u ispitivanoj skupini bile su značajno više u usporedbi s rezultatima kod ispitivane skupine prilikom inicijalnog dolaska ( $p = 0,033$ ), dok u kontrolnoj skupini nisu primjećene statistički značajne razlike. Tablica 7. pokazuje da su tijekom tromjesečnog perioda suplementacije razine ukupnog kolesterola i LDL-a u kontrolnoj skupini ostale nepromijenjene, dok je u ispitivanoj skupini došlo do značajnog porasta, redom s 5,19 na 5,69 ( $p = 0,001$ ) (ukupni kolesterol) i s 2,89 na 3,46 ( $p = 0,006$ ) (LDL).

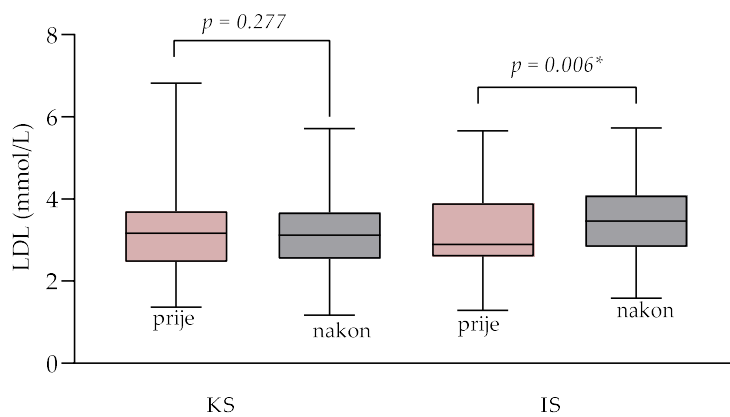
Dobiveni rezultati nisu konzistentni s rezultatima drugih autora koji su pokazali da suplementacija ALA-om ili smanjuje LDL ili ne pokazuje ili je pokazala značajan učinak [194]. Važno je naglasiti da su studije koje su se bavile istraživanjem utjecaja ALA-e na lipemiju

uglavnom bile usmjerene na pacijente s metaboličkim bolestima i karakterističnom slikom dislipidemije (hiperkolesterolemije). Na temelju rezultata dobivenih u okviru ovog istraživanja i uvida u rezultate drugih dostupnih interventnih kliničkih studija postavljena je hipoteza prema kojoj učinak ALA-e na razine LDL-a ovisi o inicijalnom lipidnom statusu ispitanika. Stoga je provedena usporedba učinaka suplementacije ALA-om u podskupini ispitanica s hiperkolesterolemijom ( $LDL > 3 \text{ mmolL}^{-1}$ ) i skupini normolipemičnih ispitanica ( $LDL \leq 3,00 \text{ mmolL}^{-1}$ ). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 9. i na Slici 10.

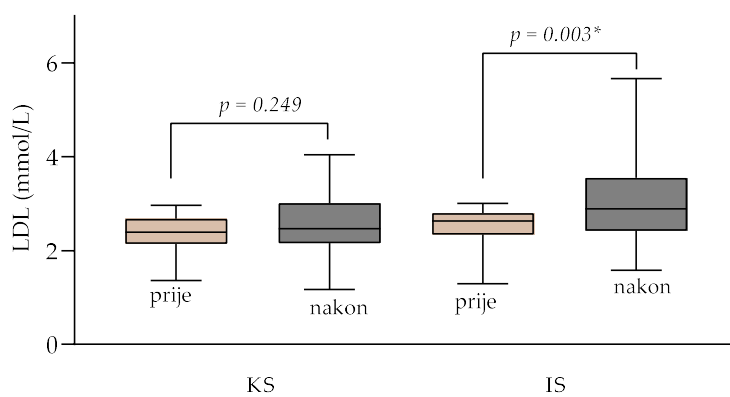
**Tablica 9.** Usporedba vrijednosti parametara LDL-a prije i nakon suplementacije ALA-om u kontrolnoj i ispitivanoj skupini u podskupinama ispitanica (s obzirom na razine LDL-a).

		KS		IS	
		inicijalni pregled	pregled nakon 3 mjeseca	inicijalni pregled	pregled nakon 3 mjeseca
Svi ispitanici	LDL ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	3.160 (2.473-3.700)	3.115 (2.543-3.668)	2.890 (2.600-3.895)	3.460 (2.840-4.080)
$LDL \leq 3 \text{ mmolL}^{-1}$		2.390 (2.138-2.675)	2.465 (2.158-3.005)	2.625 (2.340-2.195)	2.890 (2.425-2.553)
$LDL > 3 \text{ mmolL}^{-1}$		3.605 (3.280-3.918)	3.610 (3.103-3.788)	3.950 (3.450-4.470)	3.890 (3.440-4.360)

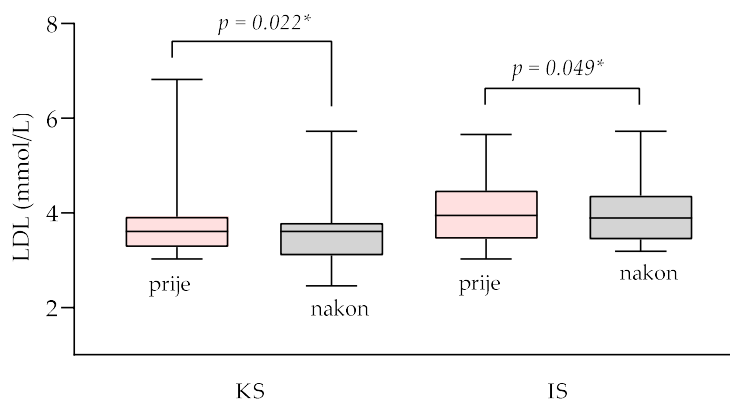
Rezultati su izraženi kao medijani (interkvartilni raspon); LDL-lipoproteini niske gustoće; KS-kontrolna skupina; IS-ispitivana skupina.



(a)



(b)



(c)

**Slika 10.** Utjecaj suplementacije ALA-om na razine LDL kolesterola (a); u podskupini ispitanica s normalnim razinama kolesterola (KS n=20; IS n=22) (b); te u skupini ispitanica s hiperkolesterolemijom (KS n=28; IS n=19) (c)

KS-kontrolna skupina; IS-ispitivana skupina. Rezultati su uspoređeni provedbom Wilcoxonovog testa. Vrijednosti označene zvjezdicom označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ).



Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je utjecaj suplementacije ALA-om na LDL u ispitanica s hiperkolesterolemijom drugačiji nego u normolipemičnih ispitanica. U normolipemičnih ispitanica (n = 22) suplementacija ALA-om rezultirala je blagim, ali statistički značajnim porastom serumskih vrijednosti LDL-a (sa 2,625 na 2,890 mmol/L;  $p < 0,003$ ) dok je u ispitanica s hiperkolesterolemijom (n = 19) došlo do vrlo malog, ali statistički značajnog smanjenja vrijednosti LDL-a (sa 3,95 na 3,89 mmol/L). Navedena opažanja govore u prilog hipotezi o ovisnosti djelovanja ALA-e o inicijalnom lipidnom statusu ispitanica. Značajnost navedenih opažanja ograničena je malim brojem ispitanica u podskupinama te je dobivene rezultate potrebno potvrditi istraživanjima na većem broju ispitanica.

# **5 RASPRAVA**

## 5.1 Povezanost životnih navika ispitanica i stopa spontane regresije LSIL-a

Stope spontane regresije LSIL-a utvrđene u kontrolnoj skupini ispitanica bile su vrlo niske – kao što je prikazano u Tablici 5. Od ukupno 48 ispitanica koje su bile dio kontrolne skupine, spontana regresija primijećena je kod samo 4 ispitanice što iznosi malih 8,33 %. Broj studija koje su se bavile proučavanjem stopa regresije LSIL-a je malen, ali na temelju dostupnih podataka može se zaključiti da vrlo niske stope spontane regresije utvrđene u ovom ispitivanju nisu u skladu s dostupnim literaturnim podatcima. Dostupni literaturni podatci ukazuju na puno više stope spontanog povlačenja LSIL-a te navode da se one uglavnom kreću od 40 do 70 % za period praćenja od jedne do pet godina [18].

Vremenski period unutar kojeg dolazi do spontane regresije LSIL-a izuzetno je bitan. Velika kohort studija koja je obuhvatila 17000 ispitanica pokazala je da se LSIL spontano povlači u 44 % ispitanica unutar 2 godine od dijagnoze dok za period praćenja od 5 godina stope regresije rastu na 74 % [195]. Slično recentnije istraživanje [196] potvrdilo je visoke stope spontanog povlačenja LSIL-a unutar 12 mjeseci praćenja (potpuna regresija LSIL-a utvrđena u 52 % ispitanica).

Čimbenici koji utječu na regresiju/progresiju prekanceroznih lezija vrata maternice nisu dobro istraženi [197-199]. Dostupni literaturni podatci pokazuju da duže trajanje lezije povećava vjerojatnost njezinog perzistiranja i sljedećih 6 mjeseci, što ukazuje na mogući benefit terapije kojom bi se ubrzala regresija LSIL-a [197]. Također, vrijeme potrebno za progresiju LSIL-a u HSIL ili karcinom značajno je kraće kod prisutnosti onkogenih tipova HPV-a, dok je vrijeme potrebno za regresiju LSIL-a kod infekcija onkogenim tipovima virusa duže te iznosi u prosjeku 26 mjeseci (za razliku od lezija uzrokovanih neonkogenim tipovima virusa gdje je vrijeme potrebno za spontanu regresiju oko 10 mjeseci) [198].

Recentnija studija koja je obuhvatila kohortu od 200 žena i pratila spontane promjene LSIL-a u periodu od 9 godina utvrdila je da su tip virusa i dob ključni čimbenici koji utječu na stope/brzine regresije prekanceroznih lezija [200].

Na temelju svega navedenog može se zaključiti da su niske stope spontane regresije LSIL-a, u istraživanju provedenom u ovom doktorskom radu, zamijećene u kontrolnoj skupini ispitanica posljedica kratkog perioda praćenja od 3 mjeseca što, prema dostupnim istraživanjima, nije dovoljan period za spontanu regresiju čak niti kod ispitanica mlađe životne dobi gdje je LSIL uzrokovan infekcijom neonkogenim tipom HPV-a. Osim toga, važno je dodatno naglasiti da je

prosječna dob ispitanica uključenih u studiju bila relativno visoka (medijan dobi je bio 41 godina) što je jedan od čimbenika koji doprinose nižim stopama regresije odnosno dužem vremenskom periodu potrebnom za regresiju.

Čimbenici životnog stila koji bi mogli utjecati na spontanu regresiju LSIL-a (ili prevenciju progresije u HSIL ili karcinom) manje su istraženi. Istraživanje Matsumota i suradnika (2010) usmjereno je na utjecaj pušenja na perzistentnost prekanceroznih lezija niskog stupnja i obuhvatilo je 515 žena s dijagnozom LSIL-a [201]. Vjerojatnost regresije LSIL-a unutar 2 godine analizirana je u odnosu na naviku pušenja, pri čemu je regresija definirana kao dobivena najmanje dva uzastopna negativna PAPA testa i normalan nalaz kolposkopije. Dob žena, početni rezultati biopsije i genotipovi HPV-a uključeni su u multivarijantne modele za prilagodbe. Rezultati studije pokazali su da rizik od perzistencije LSIL-a korelira s intenzitetom i trajanjem pušenja te početkom pušenja u mlađoj životnoj dobi. Kod pušača je utvrđen veći rizik od trajne infekcije HPV-om u usporedbi s pasivnim pušačima koji nikad nisu pušili. Kod mladih žena, pasivno pušenje od djetinjstva značajno je smanjilo vjerojatnost regresije unutar 2 godine. Zaključno, pušenje može negativno utjecati na regresiju prekanceroznih lezija dok izloženost pasivnom pušenju u djetinjstvu može povećati rizik od trajnih cervikalnih abnormalnosti kod mladih žena. Nedavna meta-analiza je potvrdila da je izloženost pasivnom pušenju povezana s povećanim rizikom od pojave karcinoma vrata maternice [202, 203]. Pretpostavljeni mehanizam povezanosti pušenja i cervikalne karcinogeneze je odgađanje pravovremene imunodne reakcije i smanjenje broja Langerhansovih stanica u genitalnom epitelu što za posljedicu ima smanjenje učinkovitosti lokalnog imuniteta u djelovanju na HPV infekciju [204, 205].

S obzirom na ograničen broj ispitanica u našoj studiji, činjenicu da je samo 25 % ispitanica konzumiralo cigarete te vrlo niske stope spontane regresije LSIL-a, nije bilo moguće analizirati utjecaj pušenja na perzistentnost lezija u kontrolnoj skupini ispitanica. Ipak, interesantan je podatak da je jedna ispitanica u kontrolnoj skupini kod koje je utvrđena spontana regresija LSIL-a bila pušač dok su ostale 3 bile nepušači.

Jedan od relevantnih čimbenika životnog stila koji može imati značajan učinak na rizik od pojave i progresije premalignih promjena epitela rodnice je i prehrana. Većim brojem observacijskih studija istražena je povezanost pojedinih karakteristika obrazaca prehrane (odnosno adekvatnog unosa pojedinih esencijalnih mikronutrijenata i drugih bioaktivnih

spojeva iz hrane) s rizikom za pojavu perzistentne infekcije onkogenim tipovima HPV-a te pojavu LISL/HSIL, odnosno raka vrata maternice [206-210].

Iako je na temelju navedenih studija vidljivo da učinak obrazaca prehrane i mikronutritivnih deficita na razvoj SIL-a nije jednoznačan niti potpuno jasan te ovisi o brojnim genetskim i okolišnim kofaktorima, jasna je značajna uloga nekih nutrijenata. Općenito, niži rizik razvoja perzistentne HPV infekcije, razvoja i progresije SIL-a odnosno razvoja maligniteta povezuje se s:

- višim indeksima kvalitete prehrane i višim stupnjem sličnosti obrazaca prehrane mediteranskoj prehrani [206, 210], odnosno nižim stupnjem sličnosti obrascima zapadnjačke prehrane. Pri tome se negativni učinci zapadnjačke prehrane povezuju s utjecajima na sastav mikrobiote rodnice [207] te visokim glikemijskim indeksom prehrane [208];
- visokim unosom antioksidanasa, osobito u vidu konzumiranja značajnih količina raznovrsnog voća i povrća [206, 210];
- adekvatnim unosom/statusom vitamina B kompleksa-osobito vitamina B3, B6 i B9 [83, 209, 211];
- adekvatnim unosom/statusom drugih esencijalnih mikronutrijenata (vitamina C, vitamina A, vitamina D), odnosno optimizacijom mikronutritivnog statusa [209, 210];
- visokim unosom karotenoida odnosno konzumiranjem hrane koja je bogata karotenoidima [212, 213].

Iako neke studije pokazuju povećanu incidenciju pretilosti u žena s dijagnozom SIL-a ili karcinomom vrata maternice [214], stupanj pretilosti nije se za sada pokazao značajnim čimbenikom koji doprinosi perzistenciji HPV-a, progresiji LSIL-a ili nastanku karcinoma [210, 214-216]. Usprkos tome, normalizacija indeksa tjelesne mase i metaboličkog statusa u svakom se slučaju preporučuje.

Navedene činjenice koje ukazuju na važnost prehrambenih navika i nutritivnog statusa na tijek HPV infekcije, pojavnost i progresiju prekanceroznih lezija i nastanak karcinoma uzete su u obzir tijekom planiranja tjeka studije u okviru ovog doktorskog rada, te su razlog što su tijekom inicijalnog posjeta ginekologu prehrambene navike ispitanica istražene ispunjavanjem validiranog semikvantitativnog upitnika o učestalosti konzumiranja namirnica što je omogućilo stjecanje konkretnijeg uvida u obrasce prehrane ispitanica uključenih u studiju. Kako je prethodno navedeno, prehranu ispitanica uključenih u studiju karakterizirala je relativno niska kvaliteta prehrane što se vidi iz vrijednosti istraživanih indeksa kvalitete: DQI-I pokazao je

vrijednost 63,6 (33,5 do 78,0), dok je pomoću Med-DQI dobivena vrijednost bila 9 (5 do 14) (Slika 1), što je vjerojatno doprinijelo niskim stopama spontane regresije LSIL-a, kao i činjenici da nijedna ispitanica tijekom tromjesečnog praćenja nije imala eradikaciju HPV-a. Naime, povezanost indeksa kvalitete prehrane i perzistentne infekcije HPV-om istražena je u studiji Naresh-a i suradnika (2021) te je pokazano da prehrana koju karakterizira viši indeks kvalitete prehrane, a osobito u kontekstu visokog unosa voća, povrća, morske hrane i biljnih proteina, povoljno djeluje na eradikaciju HPV-a [210]. Prehranu ispitanica karakterizirao je i visok unos masti, zasićenih masti, mesa i animalnih proteina što doprinosi proinflamatornim karakteristikama prehrane koja se ubraja u čimbenike rizika za pojavu ginekoloških karcinoma [217].

Kao što je ranije spomenuto, mehanizmi koji najviše povezuju karcinogenezu i obrasce prehrane su oksidativni stres i upala. Značajan unos biološki aktivnih spojeva prehranom (polifenoli, karotenoidi, antocijani i drugi) smanjuje markere upale, osobito CRP-a i IL-6 [218-220] te smanjuje oksidativni stres [61, 221]. S druge strane, visoka zastupljenost proinflamatornih čimbenika u prehrani imati će drugačiji učinak.

Među najvažnije proinflamatorne sastavnice prehrane ubrajaju se meso i mesne prerađevine [222] čiji je unos u ispitanica uključenih u studiju bio viši od preporučenog (Slika 6B). Previsok unos mesa povezuje se s karcinogenezom te može doprinijeti smanjenim stopama regresije LSIL-a. Studija provedena među 3690 medicinskih sestara, u kojoj je između ostaloga praćen unos prerađenog i neprerađenog crvenog mesa i utjecaj na razinu CRP-a u krvi, pokazala je kako je kod tih ispitanica povećan unos crvenog mesa bio izravno povezan s porastom razine CRP-a u krvi. U istoj studiji ispitanice koje su češće konzumirale ribu, leguminoze i orašaste plodove imale su nižu razinu CRP-a [223]. Jedna od preporuka mediteranske prehrane jeste konzumiranje ribe. Studija provedena u Italiji, kojom se nastojao dokazati utjecaj mediteranske prehrane na metabolički sindrom i predijabetes, pokazala je kako češće konzumiranje bijelog u odnosu na crveno meso kod ispitanika, rezultira nižim vrijednostima CRP-a [224]. Konzumiranje ribe povezuje se s mnogo povoljnih učinaka na zdravlje ljudi, između ostaloga dovodi do smanjenja upalnih biljega. Protuupalno djelovanje ribe, osobito riba sjevernih mora, kao što su losos i skuša, zasniva se na sadržaju polinezasićenih masnih kiselina kao što su omega-3 i omega-6 masne kiseline. Brojnim studijama potvrđeno je pozitivno djelovanje konzumiranja ribe kroz sadržaj polinezasićenih masnih kiselina na smanjenje upalnih biljega [221]. U provedenom istraživanju, srednja vrijednost broja porcija mesa koje su ispitanice

konzumirale dnevno a gdje su rezultati prikazani kao medijan, iznosila je 4,1 dok se raspon kretao od 2,4 do 7,2.

Kako je prikazano na Slici 7, unos brojnih vitamina i minerala bio je manji od preporučenih vrijednosti unosa što je osobito izraženo u slučaju vitamina D gdje je neadekvatan unos utvrđen kod 96,6 % ispitanica što je u skladu s podacima koji pokazuju da je i status vitamina D u populaciji Bosne i Hercegovine loš te je u nedavnoj studiji utvrđen nedostatak vitamina D kod 60,6 % ispitanika, a manjak kod 21,4 % ispitanika uključenih u studiju [225]. Navedeni podatak važan je u kontekstu ove studije jer se adekvatan status vitamina D povezuje sa zaštitnim učinkom protiv karcinoma vrata maternice, osobito u ranim fazama bolesti. Mehanizmi za koje se smatra da primarno pridonose zaštitnom učinku vitamina D su učinci na smanjenje stanične proliferacije, poticanje apoptoze, imunosnog odgovora te izravnog učinka vitamina D na HPV što dovodi do povlačenja lezija [226].

Unos folata i drugih vitamina B kompleksa bio je neadekvatan kod čak 30-40 % ispitanica uključenih u studiju. To bi moglo imati nepovoljan učinak na povlačenje LSIL-a s obzirom da prema zaključcima nekih autora upravo vitamini B kompleksa (a osobito folat i vitamin B12) imaju potencijal da spriječe integraciju virusnog genoma (što je osnovni preduvjet njegove perzistentnosti) [211, 227, 228]. Ziegler i suradnici (2002) smatraju kako povišene razine homocisteina, koje u nekim studijama koreliraju s većom incidencijom karcinoma vrata maternice, primarno ukazuju na neadekvatni status folata što je povezano s karcinogenezom vrata maternice [229]. U studiji Piyathilake i suradnika (2014) pokazano je da su žene s višom razinom folata u plazmi i visokoonkogenim HPV-om 16 ili one s višom razinom vitamina B12 u plazmi i visokoonkogenim HPV-om 16 imale 75 % ( $p < 0,01$ ) i 60 % ( $p = 0,02$ ) manju vjerojatnost dijagnoze HSIL-a [230], iako su rezultati do sada provedenih studija vrlo varijabilni [231].

Unos vitamina A bio je neadekvatan kod čak 40,4 % ispitanica. Uloga vitamina A u razvoju prekanceroznih lezija vrata maternice nije u potpunosti razjašnjena, a studije o povezanosti statusa/unosa vitamina A s progresijom LSIL-a su malobrojne. Meta analiza Zhang-a i suradnika (2012) koja je obuhvatila 15 studija pokazala je da je unos vitamina A prehranom odnosno status retinola obrnuto proporcionalan s rizikom od karcinoma vrata maternice [31]. Vitamin A (retinol) potreban je za replikaciju bazalnih mukoznih stanica i sintezu proteinskih blokova te se stoga nedostatak vitamina A može povezati s povećanim rizikom od razvoja skvamozne metaplazije i HPV infekcije [232]. Yeo i suradnici (2000) pokazali su da je niska

razina retinola u serumu povezana s povećanim rizikom od razvoja CIN I [30]. French i suradnici (2000) također su pokazali da deficit retinola (retinol < 1,05  $\mu$ mol/L) može doprinijeti razvoju SIL-a u pacijentica zaraženih HPV-om [233]. S obzirom na činjenicu da je deficit vitamina A u populaciji Bosne i Hercegovine rijedak te se nizak unos vitamina A prehranom kompenzira unosom karotenoida s provitamin A aktivnošću, upitno je doprinosi li nizak unos vitamina A (koji je primijećen kod više od 40 % ispitanica uključenih u studiju) niskim stopama spontane regresije LSIL-a.

Jedan od važnih čimbenika koji doprinose razvoju premalignih promjena vrata maternice je i oksidativni stres s obzirom da predstavlja važan aspekt patogeneze različitih karcinoma [234]. U bolesnica s rakom vrata maternice utvrđene su povećane stope lipidne peroksidacije kao i promjene u aktivnosti enzimskih i raspoloživosti neenzimskih sustava antioksidativne obrane [235-237]. I kod pacijentica s premaligim lezijama vrata maternice dokazane su povećane stope lipidne peroksidacije, što govori u prilog činjenici da oksidativni stres ima važnu ulogu u ranoj fazi karcinogeneze [90, 238]. Mogući zaštitni učinak karotenoida na cervikalnu karcinogenezu objašnjava se između ostalog i njihovom antioksidativnom aktivnošću. Medijan ukupnog unosa karotenoida kod ispitanica uključenih u studiju izračunat je kao zbroj pet glavnih karotenoida u prehrani (alfa-karotena, beta-karotena, luteina, likopena i beta kriptoksantina) i iznosio je 11,4 mg/dne (Tablica 2.) što je niže nego u većini europskih zemalja gdje je prosječni unos oko 14 mg/dne. Visok unos karotenoida, a osobito luteina i zeaksantina prehranom povezuje se s regresijom LSIL-a [213] te je vjerojatno i niži unos karotenoida prehranom jedan od čimbenika koji pridonosi niskim stopama spontane regresije LSIL-a i perzistentnosti HPV infekcije. Navedeno potvrđuje i opsežna pregledna studija Potishman i Brinton-a (1996) koja zaključuje da postoji mogućnost povećanja rizika za pojavu raka vrata maternice kod niskog unosa karotenoida i vitamina C [239]. Pronašli su manje dosljednu povezanost s niskim unosom vitamina E i folata. U studiji provedenoj u ovom doktorskom radu prenizak unos folata, vitamina E i vitamina C zabilježen je kod 23,6 %, 16,9 % i 13,5 % ispitanica (Slika 7). Važan antioksidans u prehrani je i selen čiji je unos bio neadekvatan kod čak 33,7 % ispitanica – nedavna meta-analiza pokazala je da je u pacijentica s nižim serumskim razinama selena rizik za pojavu karcinoma vrata maternice značajno veći te da se selen može smatrati zaštitnim čimbenikom u smislu pojavnosti karcinoma vrata maternice [240].

Važno je napomenuti da usprkos brojnim indicijama rezultati istraživanja o utjecaju obrazaca prehrane i nutritivnog statusa na progresiju premalignih promjena vrata maternice nisu konzistentni. Općenito se može zaključiti kako ne postoje čvrsti dokazi o tome da bilo koji



nutrijent sam za sebe značajno utječe na rizik od razvoja karcinoma, ali da prehrana s visokim udjelom povrća i voća, karotenoida, vitamina C, vitamina E, nekih vitamina B-kompleksa i Se najvjerojatnije ima zaštitnu ulogu [240-242].

Imajući na umu značaj karakteristika prehrane, statusa pojedinih nutrijenata odnosno njihovog unosa prehranom na tijek HPV infekcije i razvoj premalignih promjena vrata maternice, pretpostavljeno je da bi značajne razlike u navedenim karakteristikama prehrane/nutritivnog statusa mogle utjecati na učinkovitost suplementacije ALA-om. Stoga su ispitivana i kontrolna skupina uspoređene s obzirom na navedene karakteristike prehrane (Tablica 3.) te nisu utvrđene značajne razlike kod niti jednog od promatranih parametara.

## **5.2 Utjecaj $\alpha$ -lipoične kiseline na regresiju LSIL-a**

Rezultati provedenog istraživanja pokazuju da suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom u dozi od 600 mg/dne značajno povećava stope regresije LSIL-a u ispitivanih pacijentica. Kako je prikazano u Tablici 4., suplementacija je rezultirala povlačenjem simptoma LSIL-a u 39 od 41 ispitanice (95,1 % ispitanica) dok je u kontrolnoj skupini koja je uzimala placebo povlačenje LSIL-a utvrđeno kod 4 od ukupno 48 ispitanica (8,3 %). Iako je s obzirom na dostupne literaturne podatke vjerojatno da bi došlo do spontane regresije LSIL-a, važno je naglasiti korist liječenja koje ubrzava regresiju LSIL-a, s obzirom da duže trajanje lezije povećava vjerojatnost njezinog perzistiranja i sljedećih 6 mjeseci, i razvoj karcinogeneze [197].

Kao što je prethodno spomenuto, istraživanja o mogućnosti utjecaja prehrane na LSIL su manjkava i dobiveni rezultati su prilično kontradiktorni. Ovo je prvo istraživanje o učinkovitosti ALA-e u induciranju regresije LSIL-a. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju da je tromjesečna suplementacija s 600 mg ALA-om znatno smanjila omjer ispitanica s citološkim abnormalnostima niskog stupnja, u usporedbi s ispitanicama u kontrolnoj skupini koje su uzimale placebo. Obzirom na dobivenu razinu značajnosti ( $p < 0,001$ ), prezentirani rezultati indiciraju da bi kratkoročna suplementacija s ALA-om mogla imati klinički značajan učinak na citologiju vrata maternice.

U kontrolnoj skupini, spontana regresija LSIL-a zapažena je samo kod 8,3 % ispitanica, što je prilično nisko uzimajući u obzir predviđanje da će se stope kretati od 40 % do 70 % tijekom perioda od jedne do pet godina [243]. Pored toga, u dostupnim intervencijskim studijama koje

su istraživale mogućnosti nutritivne suplementacije u induciranju regresije LSIL-a, stope spontane regresije uočene u kontrolnoj skupini bile su više (52,0-56,0 %) [87, 243-245]. Razlozi uočenog neslaganja s rezultatima dobivenim u ovoj studiji mogli bi uključiti kratak period praćenja (3 mjeseca naspram 6 mjeseci u intervencijskim studijama ili 1-5 godina u opservacijskim studijama) i visoku srednju vrijednost starosne dobi ispitanica (37 i 41 godina). Dob se smatra nezavisnim čimbenikom rizika za progresiju LSIL-a, gdje se sa svakih pet godina starosti smanjuju izgledi regresije za 21 % neovisno o stupnju CIN-a i prisustvu HPV visokorizične infekcije [246].

Prehrambene navike ispitanica koje su sudjelovale u ovoj studiji također su mogle doprinijeti niskim stopama regresije LSIL-a u kontrolnoj skupini. Rezultati istraživanja Huia i koautora (2013) naglasili su benefite povećanog konzumiranja cjelovitog voća i povrća, oraštih plodova i ribe u pogledu njihovog zaštitnog djelovanja protiv perzistentne HPV infekcije i SIL-a [247]. S druge strane, smanjeno konzumiranje cjelovitog povrća i voća bilo je povezano s trostrukim povećanjem rizika od CIN II i CIN III kod ispitanica s visoko rizičnom HPV infekcijom. Stoga se ispitanicama s dijagnosticiranim SIL-om uvijek savjetuje da povećaju prehrambeni unos zaštitnih nutrijenata. Analiza FFQ-a u ovoj studiji pokazala je nizak unos i voća i povrća, koji su poznati kao glavni zaštitni čimbenici protiv progresije LSIL-a (2,78 i 3,49 porcija tjedno). Ovaj unos je ostao smanjen tijekom perioda suplementacije budući da je ispitanicama savjetovano da ne mijenjaju prehrambene navike tijekom perioda suplementacije.

Reakcija na suplementaciju u ispitivanoj skupini ispitanica je bila visoka. Regresija LSIL-a zabilježena je kod 95 % ispitanica, dok su stope HPV infekcije ostale nepromijenjene (19 ispitanica koje su bile HPV pozitivne prilikom prvog dolaska ostale su pozitivne unatoč suplementaciji). Dobiveni rezultati su konzistentni s rezultatima prezentiranim u nekoliko drugih kliničkih studija koje su istraživale učinkovitost nutrijenata u induciranju regresije LSIL-a. Za razliku od ove, te studije su uključivale manji broj ispitanica i pratile su promjene tijekom dužeg perioda suplementacije (6 mjeseci). Vahedpoor i suradnici (2018) pokazali su da je kod pacijentica s LSIL-om suplementacija vitaminom D u trajanju od 6 mjeseci (jedna doza od 50,000 IU suplementa vitamina D svaka dva tjedna) rezultirala regresijom CIN I kod 84,6 % ispitanica (n = 29) [245]. Slično, suplementacija s 5 mg folne kiseline u trajanju od 6 mjeseci rezultirala je s 83,3 % regresije CIN I (n = 29) [244], kao i dugoročna suplementacija (6 mjeseci) s 200 µg organskog selena u 88 % žena u tretiranoj skupini (n = 28) [87].

Mehanizmi potencijalne učinkovitosti ALA-e u regresiji LSIL-a mogu se samo nagađati. Obzirom da je ALA moćan antioksidans, objašnjenje njenog zaštitnog mehanizma može biti u sličnosti sa zaštitnim mehanizmima ostalih prehrambenih antioksidanasa kod karcinoma vrata maternice (inhibicija proliferacije stanica karcinoma, stabiliziranje proteina p53, preveniranje oštećenja DNA i redukcija u imunosupresiji) [180]. Protuupalni učinak ALA-e vjerojatno doprinosi njenoj učinkovitosti, obzirom da je upala snažno povezana s karcinomom i može predisponirati tumoru. Stoga, stavljanje fokusa na upalu i molekule koje su uključene u upalni proces, moglo bi predstavljati dobru strategiju za preveniranje karcinoma kao i za terapiju [248]. Nedavna studija pokazala je da je visoka razina hsCRP-a značajno povezana s nižom stopom regresije SIL-a i sugerirala je da bi praćenje hsCRP-a moglo pomoći u praćenju LSIL-a [249]. Poznata protuupalna učinkovitost ALA-e također je podržana rezultatima ove studije, kao što je i prikazano značajnim smanjenjem svih ispitivanih parametara upale (hsCRP, FI, SE) u ispitivnoj skupini ispitanica (što je suprotno upalnim parametrima u kontrolnoj skupini). Dobiveni rezultati su konzistentni s najnovijim literaturnim podacima, iako su dostupni podatci u pogledu učinka suplementacije alfa lipoičnom kiselinom na upalne biljege kontroverzni. Provedena meta analiza u skorije vrijeme pokazala je obećavajući utjecaj ALA-e na smanjenje upalnih biljega, kao što su CRP, IL-6 i TNF- $\alpha$  kod pacijenata s metaboličkim poremećajima [250]. Terapijski režimi korišteni u studijama uključenim u meta analizu bili su usporedivi s dozama korištenim u ovom radu (300-600 mg ALA, 2 tjedna-12 mjeseci). Ovo je također moglo doprinijeti njenoj učinkovitosti u induciranju regresije LSIL-a.

Uočeni zaštitni učinci ALA-e pokazani u ovoj studiji također bi se mogli objasniti njenim antiproliferativnim djelovanjem kojeg su ispitali drugi autori: sposobnost induciranja apoptoze putem aktiviranja piruvat dehidrogenaze u tumorskim stanicama, sposobnost djelovanja na različite signalne puteve (aktivacija AMPK i naknadne donje regulacije signalnog puta mTOR-S6 ili Grb2-posredovane donje regulacije EGFR), ili induciranje produkcije ROS-a u tumorskim stanicama [144-146, 251].

Iako je poznato da ALA ima antivirusne učinke protiv nekih virusa [252], njena učinkovitost vjerojatno nije uslijed antivirusnih svojstava. Naime, stope HPV-a su ostale nepromijenjene u obje ispitivane skupine, što je konzistentno s rezultatima proučavanja djelovanja drugih antioksidanasa u prevenciji karcinoma vrata maternice koji su dobiveni od drugih autora [253].

Unatoč očiglednim prednostima (randomizirana, dvostruko slijepa placebo kontrolirana studija te veliki broj ispitanika, u usporedbi s drugim sličnim intervencijskim studijama), ovo

istraživanje je imalo neka ograničenja. Glavna ograničenja su bila kratak period suplementacije (3 mjeseca, što je bilo uslijed financijskih i organizacionih ograničenja) te relativno visoka srednja dob ispitanica uključenih u studiju. To je rezultiralo niskim stopama spontane regresije u kontrolnoj skupini. Pored toga, uslijed financijskog ograničenja bilo je nemoguće pratiti koncentraciju ALA-e u serumu kod ispitanica, što bi značajno doprinijelo kvaliteti provedenog istraživanja, naročito ako se uzme u obzir kratak poluživot i bioraspoloživost ALA-e (oko 30 %) što je izazvano njenom hepatičkom degradacijom i reduciranom topljivošću kao i nestabilnošću u želudcu [254]. Buduće studije trebale bi se usmjeriti na uporabu inovativnih formulacija ALA-e koje bi mogle potaknuti terapijsku učinkovitost ALA-e protiv HPV infekcije, te na istraživanje sinergističkih učinaka modifikacije prehrane i suplementacije alfa lipoičnom kiselinom, kako kod regresije LSIL-a, tako i kod regresije HSIL-a.

### **5.3 Utjecaj suplementacije ALA-om na parametre antioksidativnog statusa**

Utjecaj tromjesečne suplementacije ALA-om (600 mg/dne) na parametre antioksidativnog statusa (antioksidativni potencijal seruma, GSH, aktivnost SOD, MDA u serumu) prikazan je u Tablicama 6.-8. i na Slikama 8-9. Iako je ALA prepoznata kao moćan antioksidans koji svoje učinke ostvaruje kroz niz izravnih i neizravnih mehanizama [102], rezultati ove studije su pokazali da ALA nema značajan učinak niti na jedan od istraživanih parametra oksidativnog stresa.

Dostupni literaturni podatci o utjecaju ALA-e na antioksidativni status su oskudni i nekonzistentni, te međusobno vrlo raznoliki u smislu različitih ciljanih skupina pacijenata (indikacija), promatranih biomarkera te primijenjene doze i trajanja terapije. Stoga je vrlo teško izvlačiti zaključke o potencijalu suplementacije ALA-om u prevenciji/ublažavanju oksidativnog stresa. ALA je kao antioksidans najčešće istraživana kod dijabetičara [255, 256], pacijenata s multiplom sklerozom [257] i nealkoholnom bolešću jetre [258], kao i kod pacijenata koji su na hemodijalizi [259, 260]. Dobiveni rezultati znatno su se razlikovali, ovisno o biljezima oksidativnog stresa i značaja uočenog učinka (neke studije su pokazale značajan utjecaj suplementacije, dok ostale nisu).

Klinički podatci dobiveni od drugih autora su pokazali da je suplement koji sadrži 600 mg ALA-e znatno reducirao razine MDA i povećao aktivnost razina SOD i GSH kod dijabetičara

nakon tri mjeseca suplementacije [255]. Uočili su smanjenje upalnih biljega kod tretirane skupine, što je konzistentno s našim rezultatima [261]. Khalil i suradnici (2014) otkrili su da na aktivnost SOD-a, aktivnost glutacione peroksidaze, i razine MDA nije utjecala suplementacija 1200 mg ALA-e u trajanju od tri mjeseca kod pacijenata s multiplom sklerozom, međutim pozitivno je djelovala na TEAC vrijednosti što je djelomično u skladu s rezultatima ove studije [257]. Kod pacijenata s nealkoholnom bolešću jetre, tromjesečna suplementacija s 1200 mg ALA-e značajno je smanjila razine MDA i povećala ukupnu antioksidativnu sposobnost seruma, dok su drugi parametri antioksidativnog statusa ostali nepromijenjeni suplementacijom ALA-om. Kod pacijenata s bubrežnim bolestima koji su na hemodijalizi, suplementacija ALA-om nije utjecala na parametre oksidativnog statusa [259, 260]. U pilot studiji Huang i Gitelman-a (2008), ALA nije bila učinkovita u smanjenju oksidativnog oštećenja kod adolescenata s dijabetesom tipa 1 [256]. Nedosljednosti u rezultatima dobivenih od različitih autora mogu se dijelom objasniti razlikama u osnovnim karakteristikama ispitanika (prisutnost određene patologije, metabolički status, starosna dob, spol), protokolima suplementacije (600 mg naspram 1200 mg) i sastava suplemenata koji su se koristili u istraživanju (na primjer Derosa i suradnici (2016) su testirali višekomponentu formulaciju, dok nijedna studija nije izvijestila o omjerima izomera ALA-e u formulacijama koje su se koristile u istraživanju) [255].

Važno je naglasiti da, iako prehrana ima značajnu ulogu u moduliranju cjelokupne učinkovitosti antioksidativnih suplemenata [192], nijedna od prethodno spomenutih studija nije istražila prehranbene karakteristike ispitanika te uzela u obzir dobivene podatke prilikom rasprave o dobivenim rezultatima. Poznato je da karakteristike prehrane mogu imati značajnu ulogu u moduliranju sveukupne učinkovitosti antioksidativnih suplemenata [262], djelujući na osnovni antioksidativni status domaćina ili kroz određene interakcije nutrijenata što može utjecati na bioraspoloživost i metabolizam suplementarnih antioksidanasa ili rezultirati pojavom sinergističkih/antagonističkih reakcija. Pretpostavka je bila da bi jedan od važnih aspekata prehrane koju treba povezati s reakcijom pacijenata na suplementaciju antioksidansima bio upravo unos antioksidanasa prehranom. Indeks kvalitete prehrane koji primarno uzima u obzir upravo ovaj aspekt ishrane je Med-DQI. Stoga je u okviru ovog rada provedena analiza podskupina ispitanica s obzirom na njihov način prehrane, odnosno stupanj usklađenosti prehrane s mediteranskim obrascima prehrane (Med-DQI). Dobiveni rezultati su pokazali da je suplementacija ALA-om pozitivno utjecala na SOD aktivnost u podskupini ispitanica s visokim stupnjem pridržavanja mediteranskog tipa prehrane. Opaženi učinak u skladu je s postojećim saznanjima o potencijalu ALA-e da poveća ekspresiju gena primarnih antioksidativnih enzima

kao što je superoksid dismutaza (SOD), a što se može pratiti kroz povećanje aktivnosti [193]. U ovoj studiji učinkovitost je bila vidljiva samo u ispitanica s adekvatnim unosom antioksidanasa prehranom što je moguće objasniti niskom razinom oksidativnog stresa kod tih ispitanica. Naime u stanju povećanog oksidativnog stresa povećana SOD ekspresija ne rezultira povećanom aktivnošću seruma iz razloga što se ekstenzivno koristi u staničnim oksidativnim reakcijama. Suprotno tomu, povećan prehrambeni unos drugih antioksidanasa koji reduciraju formiranje ROS-a (uključujući superoksidni anion) smanjuje depleciju SOD, tako da je učinak ALA-e vidljiv i značajan. Značajnost ovog rezultata ograničena je malim brojem ispitanika u podskupini, ali svakako upućuje na potrebu daljnjih istraživanja.

#### **5.4 Utjecaj suplementacije ALA-om na parametre lipidnog statusa**

Utjecaj tromjesečne suplementacije ALA-om (600 mg/dne) na parametre lipidnog statusa (ukupni kolesterol, HDL, LDL, trigliceride) prikazan je u Tablicama 6., 7. i 9. i na Slici 10. Uzimajući u obzir činjenicu da bi ALA mogla ostvariti klinički značajnu korist kod niza indikacija, koje nisu primarno povezane s poremećajima lipidnog profila (kao što je LSIL), od velike je važnosti istražiti njeno djelovanje na lipidne parametre kod metabolički zdravih pacijenata. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da suplementacija ALA-om (600 mg, 3 mjeseca) rezultira blagim, ali statistički značajnim povećanjem serumskih razina LDL-a, dok ostali parametri (HDL, trigliceridi) ostaju nepromijenjeni. Blagi hiperlipemični učinak suplementacije ALA-om uglavnom je nekonzistentan s rezultatima drugih autora koji ili ukazuju na izostanak ikakvog značajnog učinka ili pokazuju da bi suplementacija ALA-om mogla dovesti do blagog smanjenja razina LDL-a [194]. Objašnjenje uočenih učinaka vezano je za mehanizme izravnog djelovanja ALA-e na smanjenje lipidnih parametara, što do sada nije u potpunosti objašnjeno. Smatra se kako je mehanizam multifaktorijalan što znači da je ALA vjerojatno sposobna inicirati sintezu receptora za LDL u jetri, čime se povećava ulazak kolesterola natrag u jetreni sustav i povećava se sinteza apolipoproteina A [263]. Također se razmatra i mogući utjecaj na aktivnost lipoproteinske lipaze i inhibiciju HMG-CoA reduktaze [264, 265].

Usljed heterogenosti populacija uključenih u studije i režima doziranja (400-1200 mg/dne) teško je procijeniti njenu stvarnu kliničku učinkovitost kod hiperkolesterolemije. Meta analiza

Haghighatdoost i Hariri-ja (2019) je pokazala da ALA može značajno smanjiti ukupnu koncentraciju CHO-a, LDL-a i TGC-a, ali su do sada dobiveni rezultati kontradiktorni te je potrebno daljnje istraživanje [194]. Recentnija meta analiza [266] otkrila je da hipolipemijski učinak ALA-e kod dijabetičara nije bio klinički značajan.

Iako je dostupan veći broj istraživanja utjecaja suplementacije ALA-om na parametre lipidnog statusa važno je naglasiti da su dostupna istraživanja usmjerena uglavnom na pacijente s metaboličkim bolestima i posljedičnom hiperlipidemijom, dok učinak ALA-e na lipidni profil normolipemičnih pacijenata uglavnom nije istražen. Neusklađenost ovdje prikazanih rezultata s dostupnim literaturnim podacima mogla bi se objasniti činjenicom da učinak ALA-e na lipidni status ovisi o inicijalnom lipidnom statusu pacijenta.

Kako bi se ispitala hipoteza, provedena je analiza podskupina gdje su posebno istraženi učinici suplementacije ALA-om u ispitanica s hiperkolesterolemijom ( $LDL > 3 \text{ mmolL}^{-1}$ ) te normolipemičnih ispitanica ( $LDL \leq 3,00 \text{ mmolL}^{-1}$ ). Kod ispitanica s hiperlipemijom, suplementacija ALA-om rezultirala je veoma malim, ali statistički značajnim smanjenjem vrijednosti LDL-a (srednja vrijednost se smanjila s 3,95 na 3,89  $\text{mmolL}^{-1}$ ;  $p = 0,0496$ ). Međutim, isto je zapaženo i u kontrolnoj skupini (smanjenje s 3,76 na 3,54  $\text{mmolL}^{-1}$ ;  $p = 0,022$ ) pa bi opaženi učinak mogao biti i posljedica promjene prehrambenih navika ispitanica nakon uključenja u studiju (unatoč jasnoj instrukciji da se prehrambene navike i način života ne bi trebali mijenjati tijekom studije) [267]. U podskupini ispitanica s normalnim razinama LDL-a značajno povećanje razine LDL-a je primijećeno u ispitivanoj, ali ne i u kontrolnoj skupini (medijan vrijednosti LDL-a se povećao s 4,01 na 4,07  $\text{mmolL}^{-1}$ ;  $p = 0,003$ ) što govori u prilog hipotezi da bi na učinak suplementacije ALA-om na lipidni status mogao utjecati početni lipidni status ispitanica.

Iako je značajnost ovih rezultata analize podskupina ograničena malim brojem ispitanica u skupinama, oni su u skladu sa zaključcima nekoliko kliničkih studija koje su uključivale normolipemične pacijente ili pacijente s nižim stupnjem dislipidemije. Na primjer, Gosselin i suradnici (2019) su pokazali da ALA nije učinkovita u moduliranju serumskih lipida kod pacijenata s predijabetesom [268], dok su Iannuzzo i koautori (2022) pokazali kako ALA nije imala učinka na razine tjelesne mase i lipidnih parametara u krvi (uglavnom kod normolipemičnih) shizofrenih pacijenata [269]. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se objasnili točni mehanizmi učinkovitosti ALA-e na sniženje lipidnih parametara, te značaj početnog lipidnog statusa i režima doziranja na kliničke učinke suplementacije.

# 6 ZAKLJUČCI



- o Demografske-, antropometrijske- i karakteristike životnog stila ispitanica kao i inicijalne vrijednosti biomarkera obuhvaćenih studijom nisu se razlikovale između kontrolne i ispitivane skupine što ukazuje na adekvatno proveden postupak randomizacije ispitanica
- o Prehranu ispitanica kontrolne i ispitivane skupine karakterizirala je usklađenost s obrascima zapadnjačke prehrane te slaba usklađenost s obrascima mediteranske prehrane (mala raznolikost prehrane; visok unos jednostavnih ugljikohidrata, masti i crvenog mesa; slab unos ribe i maslinovog ulja). Utvrđeno je da je unos određenih vitamina i minerala (vitamin D, vitamin B12, Fe, Se, Ca i K) kod više od 40% ispitanica ispod granica preporučenih vrijednosti.
- o Suplementacija ALA-om u dozi od 600 mg kroz 3 mjeseca značajno je poboljšala stope povlačenja LSIL-a. Značajne razlike ( $p < 0,001$ ) u stopama povlačenja LSIL-a između ispitivane (95,12 %) i kontrolne skupine (8,33 %) ukazuju na učinkovitost ALA-e u ovoj indikaciji
- o Suplementacija ALA-om u dozi od 600 mg kroz 3 mjeseca nije utjecala na prisutnost HPV infekcije s obzirom da nisu uočene značajne promjene HPV pozitivnih ispitanica nakon suplementacije ALA-om (placebom) u odnosu na inicijalni pregled
- o U interventnoj skupini svi praćeni parametri upale su se blago smanjili (promjene su bile statistički značajne;  $p < 0,0001$ ) dok je u kontrolnoj skupini u razdoblju između dva pregleda došlo do blagog, ali statistički značajnog porasta svih promatranih parametara upale ( $p < 0,001$ ). Navedeno ukazuje na protuupalni učinak ALA-e
- o Suplementacija sa 600 mg ALA-om kroz 3 mjeseca ne utječe značajno na promatrane parametre antioksidativnog statusa. Utjecaj ALA-e na neke od promatranih biomarkera antioksidativnog statusa (TEAC antioksidativna aktivnost seruma i aktivnost SOD-a) ovisio je o stupnju usklađenosti obrazaca prehrane ispitanica sa smjernicama mediteranske prehrane
- o Nakon tromjesečne suplementacije ALA-om razine LDL-a u ispitivanoj skupini bile su značajno više u usporedbi s rezultatima prilikom inicijalnog dolaska ( $p = 0,033$ ) dok u kontrolnoj skupini nisu primijećene statistički značajne razlike. Rezultati post-hoc analize podskupina pokazali su da utjecaj ALA-e na lipemiju ovisi o inicijalnom

lipidnom statusu ispitanica. U normolipemičnih ispitanica suplementacija ALA-om rezultirala je blagim, ali statistički značajnim porastom serumskih vrijednosti LDL-a dok je u ispitanica s hiperkolesterolemijom došlo do vrlo malog, ali statistički značajnog smanjenja vrijednosti LDL-a.

# **7 LITERATURA**

1. Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
2. Moore K. Clinically oriented anatomy. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. str. 382-400.
3. Križan Z. Kompendij anatomije čovjeka III. dio. Zagreb: Školska knjiga; 1997.
4. Apgar BS, Zoschnick L. The 2001 Bethesda system terminology. American Family Physician. 2003;68(10):1992-1999.
5. Tota J, Mahmud SM, Ferenczy A, Coutlée F, Franco EL. Promising strategies for cervical cancer screening in the post-human papillomavirus vaccination era. Sex Health. 2010;7(3): 376-382.
6. Kurjak A. Ginekologija i perinatologija. 2. Dopunjeno i prošireno izdanje. Varaždinske toplice: Znanstvena biblioteka/Golden time; 1995.
7. Green GH: The progression of pre-invasive lesions of the cervix to invasion. The New Zealand Medical Journal. 1974;80:279.
8. Iftner T, Holz B. HPV und zervixkarzinom-fragen und antworten. Frauenarzt. 2002;43(4):438-441.
9. Moss EL, Pearmain P, Askew S, Owen G, Reynolds TM, Prabakar IM, Douce G, Parkes J, Menon V, Todd RW, Redman CW. Implementing the national invasive cervical cancer audit: a local perspective. An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. 2010;117(11):1411-1416.
10. Adimora AA, Schoenbach VJ, Bonas DM, Martinson FEA, Donaldson KH, Stancil TR. Concurrent sexual partnerships among women in the United States. Epidemiology. 2002;13(3):320-327.
11. Audy-Jurković S, Grgurević-Batinica A, Mahovlić V, Krivak I. Ginekološka citologija vrata maternice. Gynaecology and Perinatology. 2003;12(1):1-9.
12. Blake DR. Adolescent sexually transmitted diseases: recent developments. Current Infectious Disease Reports. 2004;6(2):141-148.
13. Eversole GM, Moriarty AT, Schwartz MR, Clayton AC, Souers R, Fatheree LA, Chmara BA, Tench WD, Henry MR, Wilbur DC. Practices of participants in the college of american

pathologists interlaboratory comparison program in cervicovaginal cytology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2010;134(3):331-335.

14. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>

15. Bosch FX, De Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;31:3-13.

16. Anderson J 2012; Marinho-Dias & Sonza 2013; Ononogbu et al. 2014; Wright et al. 2007. Virus and cervical cancer: role and implication: a review. *Biomedical Research and Therapy* 2015;2(3):220-230.

17. Chen HC, Schiffman M, Lin CY, Pan MH, You SL, Chuang LC, Hsieh CY, Liaw KL, Hsing AW, Chen CJ. Persistence of type-specific human papillomavirus infection and increased long-term risk of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(18):1387-1396.

18. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *International Journal of Gynecological Pathology*. 1993;12(2):186–192

19. Pretorius RG, Peterson P, Azizi F, Burchette RJ. Subsequent risk and presentation of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 3 or cancer after a colposcopic diagnosis of CIN 1 or less. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2006;195(5):1260–1265.

20. Cox JT, Schiffman M, Solomon D, ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group. Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2003;188:1406–1412.

21. Zhu D, Jiang XH, Jiang YH, Ding WC, Zhang CL, Shen H, Wang XL, Ma D, Hu Z, Wang H. Amplification and overexpression of TP63 and MYC as biomarkers for transition of cervical intraepithelial neoplasia to cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2014;24(4):643-648.

22. Koeneman MM, Kruitwagen RF, Nijman HW, Slangen BF, Van Gorp T, Kruse AJ. Natural history of high-grade cervical intraepithelial neoplasia: a review of prognostic biomarkers. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2015;15: 527-546.

23. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *The Journal of Pathology*. 2006;208:152-164.
24. Satterwhite CL, Tortrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MC, Su J, Xu F, Weinstock H. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates 2008. *Sexually Transmitted Diseases*. 2013;40(3):187-193.
25. Meijer CJ, Snijders PJ, van den Brule AJ. Screening for cervical cancer: should we test for infection with high-risk HPV? *Canadian Medical Association Journal*. 2000;163:535-538.
26. Choi YJ, Park JS. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. *Journal of Gynecologic Oncology*. 2016;7:e21.
27. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R; Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(7):513-517.
28. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human papillomaviruses: epithelial tropisms and the development of neoplasia. *Viruses*. 2015;7:3863-3890.
29. Pathak S, Bajpai D, Banerjee A, Bhatla N, Jain SK, Jayaram HN, Singh N. Serum onecarbon metabolites and risk of cervical cancer. *Nutrition and Cancer*. 2014;66(5):818-824.
30. Yeo AS, Schiff MA, Montoya G, Masuk M, Van Asselt-King L, Becker TM. Serum micronutrients and cervical dysplasia in Southwestern American Indian women. *Nutrition and Cancer*. 2000;38:141-150.
31. Zhang X, Dai B, Zhang B, Wang Z. Vitamin A and risk of cervical cancer: a meta-analysis. *Gynecologic Oncology*. 2012;124:366-373.
32. Kim J, Kim MK, Lee JK, Kim JH, Son SK, Song ES, Lee KB, Lee PJ, Lee JM, Yun YM. Intakes of vitamin A, C, and E, and beta-carotene are associated with risk of cervical cancer: a case-control study in Korea. *Nutrition and Cancer*. 2010;62(2):181-189.
33. Raju K. Virus and cervical cancer: role and implication: a review. *Biomedical Research and Therapy*. 2015;2(3):220-230.

- 34.Sorbara MT, Girardin SE. Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell research*. 2011;21(4):558-560.
- 35.Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju. Cervikalne intraepitelne lezije. S3 Smjernice za dijagnostiku i liječenje. Terapijski algoritmi. 2012. (Preuzeto s: <http://www.hdgo.hr/userFiles/upload/documents/aktualne-teme/CX/CX-TH-HDGO.pdf>)
- 36.Cotran RS, Robbins SL, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1998. str. 71-113.
- 37.Pajtler M. Metode detekcije, rane dijagnoze i prevencije neoplastičnih promjena vrata maternice. Medicinski fakultet. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja. Osijek: Madura. 2007.
- 38.Koss GL. Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
- 39.Dasari P, Rajathi S, Kumar SV. Colposcopic evaluation of cervix with persistent inflammatory Pap smear: A prospective analytical study. *Cytojournal*. 2010;7:16.
- 40.Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Roitt's essential immunology. 12th edition. A John Wiley & Sons. Ltd. Publication. 2011;23-29.
- 41.Saklatvala J, Dean J, Clark A. Control of the expression of inflammatory response genes. *Biochemical Society Symposia*. 2003;70:95-106.
- 42.Tibbles LA, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999;55(10):1230-1254.
- 43.Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF- $\kappa$ B in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol*. 2002;2:1509-1520.
- 44.Siomek A. NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *Biochemica polonica*. 2012;59(3):323-331.
- 45.Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6910-6924.

46. Bonizzi G, Karin M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*. 2004;25:280-288.
47. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B: a friend or a foe in cancer? *Biochemical Pharmacology*. 2004;15:1071-1080.
48. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Research*. 2011;21:103-115.
49. Kos M, Sarkanj-Golub R, Cupić H, Balicević D. The correlation of inflammation and epithelial changes in the Pap smears of cervix uteri. *Acta Medica Croatica*. 2005;59(4):297-302.
50. Pavlović Lj, Habek D. Učestalost preinvazivnih i invazivnih lezija vrata maternice na području Našica. *Sestrinski glasnik/Nursing journal*. 2016;21:226-228.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Oxford Science Publications. 1999.
52. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. *Biohemija slobodnih radikala*. Niš: Sirius Print; 2000.
53. Latz E. The inflammasomes: Mechanisms of activation and function. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22:28-33.
54. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*. 2007;43:84-93.
55. Wanatabe Y, Nakanashi H, Goto N, Otsuka K, Kimura T, Adachi S. Antioxidative properties of ascorbic acid and acyl ascorbates in ML/W emulsion. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2010;85:1475-1480.
56. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology* 2013;1:244-257.
57. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, DeTata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*. 2003;66:1499-1503.
58. Mari M, Colell A, Morales A, Von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010;12:1295-1331.



59. Chai W, Novotny R, Maskarinec G, Marchand LL, Franke AA, Cooney RV. Serum coenzyme Q10,  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol, and C-reactive protein levels and body mass index in adolescent and premenopausal females. *Journal of the American College of Nutrition*. 2014;33(3):192-197.
60. Pravst I, Zmitek J. Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010;50(4):269-280.
61. Hardman WE. Diet components can suppress inflammation and reduce cancer risk. *Nutrition Research and Practice*. 2014;8(3):233-240.
62. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;79:727-747.
63. Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Planta Medica*. 2008;74:1656-1665.
64. Horia E, Watkins BA. Complementary actions of docosahexaenoic acid and genistein on COX-2, PGE2 and invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2007;28:809-815.
65. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Reviews*. 2010;29: 405-434.
66. Chen AY, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chemistry*. 2013;138: 2099-2107.
67. Delgado L, Fernandes I, González-Manzano A, De Freitas V, Mateus N, Santos-Buelga C. Anti-proliferative effects of quercetin and catechin metabolites. *Food & Function journal*. 2014;5:797-803.
68. Al Hanbali M, Ali D, Bustami M, Abdel-Malek S, Al-Hanbali R, Alhussainy T, Qadan F, Matalaka KZ. Epicatechin suppresses IL-6, IL-8 and enhances IL-10 production with NF-kappaB nuclear translocation in whole blood stimulated system. *Neuroendocrinology Letters*. 2009;30: 131-138.
69. Aggarwall BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009;30:85-94.

- 70.Liu T, Bohlken A, Kuljaca S, Lee M, Nguyen T, Smith S, Cheung B, Norris MD, Haber M, Holloway AJ, Bowtell DD, Marshall GM. The retinoid anticancer signal: mechanisms of target gene regulation. *British Journal of Cancer*. 2005;93:310-318.
- 71.Tamimi RM, Hankinson SE, Campos H, Spiegelman D, Zhang S, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. *American Journal of Epidemiology Oxford Academic*. 2005;161:153-160.
- 72.Rao AV, Rao LG. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 2007;55:207-216.
- 73.Wang L, Li B, Pan MX, Mo XF, Chen YM, Zhang CX. Specific carotenoid intake is inversely associated with the risk of breast cancer among Chinese women. *British Journal of Nutrition*. 2014;111:1686-1695.
- 74.Takeshima M, Ono M, Higuchi T, Chen C, Hara T, Nakano S. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Cancer Science*. 2014;105: 252-257.
- 75.Zu K, Mucci L, Rosner BA, Clinton SK, Loda M, Stampfer MJ, Giovannucci E. Dietary lycopene, angiogenesis, and prostate cancer: a prospective study in the prostate-specific antigen era. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106:430.
- 76.Zhou XF, Ding ZS, Liu NB. Allium vegetables and risk of prostate cancer: evidence from 132,192 subjects. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013;14:4131-4134.
- 77.Borkowska A, Knap N, Antosiewicz J. Diallyl trisulfide is more cytotoxic to prostate cancer cells PC-3 than to noncancerous epithelial cell line PNT1A: a possible role of p66Shc signaling axis. *Nutrition and Cancer*. 2013;65:711-717.
- 78.Schäfer G, Kaschula CH. The immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014;14:233-240.
- 79.Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2013;28(4):314-328.
- 80.Powell SR. The Antioxidant Properties of Zinc. *The Journal of Nutrition*. 2000;130:1447-1454.

81. Ebrahimi S, Soltani A, Hashemy SI. Oxidative stress in cervical cancer pathogenesis and resistance to therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;120(5):6868-6877.
82. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11(9):1135-1146.
83. Chih J, Lee AH, Colville L, Binns CW, Xu D. A review of dietary prevention of human papillomavirus-related infection of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition and Cancer*. 2013;65(3):317-328.
84. Ghosh C, Baker JA, Moysich KB, Rivera R, Brasure JR, McCann SE. Dietary intakes of selected nutrients and food groups and risk of cervical cancer. *Nutrition and Cancer*. 2008;60:331-341.
85. Ahn WS, Yoo J, Huh SW, Kim CK, Lee JM, Namkoong SE, Bae SM, Lee IP. Protective effects of green tea extracts (polyphenon E and EGCG) on human cervical lesions. *European Journal of Cancer Prevention*. 2003;12(5):383-390.
86. Bell MC, Crowley-Nowick P, Bradlow HL, Sepkovic DW, Schmidt-Grimminger D, Howell P, Mayeaux EJ, Tucker A, Turbat-Herrera EA, Mathis JM. Placebo-controlled trial of indole-3-carbinol in the treatment of CIN. *Gynecologic Oncology*. 2000;78(2):123-129.
87. Karamali M, Nourgostar S, Zamani A, Vahedpoor Z, Asemi Z. The favourable effects of long-term selenium supplementation on regression of cervical tissues and metabolic profiles of patients with cervical intraepithelial neoplasia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition*. 2015;114(12):2039-2045.
88. Myung SK, Ju W, Kim SC, Kim H. Korean Meta-analysis (KORMA) Study Group. Vitamin or antioxidant intake (or serum level) and risk of cervical neoplasm: a meta-analysis. *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2011;118:1285-1291.
89. Gupta S, Jaworska-Bieniek K, Lubinski J, Jakubowska A. Can selenium be a modifier of cancer risk in CHEK2 mutation carriers? *Mutagenesis*. 2013;28(6):625-629.
90. Kim SY, Kim JW, Ko YS, Koo JE, Chung HY, Lee-Kim YC. Changes in lipid peroxidation and antioxidant trace elements in serum of women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Nutrition and Cancer*. 2003;47:126-130.

91. Cunzhi H, Jiexian J, Xianwen Z, Jingang G, Shumin Z, Lili D. Serum and tissue levels of six trace elements and copper/zinc ratio in patients with cervical cancer and uterine myoma. *Biological Trace Element Research*. 2003;94(2):113–122.
92. Katdare M, Osborne M, Telang N. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncology Reports*. 1998;5:311–315.
93. Hamel E, Lin CM, Flynn E, D'Amato RJ. Interactions of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, with unpolymerized tubulin and with tubulin polymers. *Biochemistry*. 1996;35(4):1304–1310.
94. Hecht SS, Chung FL, Richie Jr. JP, Akerkar SA, Borukhova A, Skowronski L, Carmella SG. Effects of watercress consumption on metabolism of a tobacco-specific lung carcinogen in smokers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1995;4(8):877–884.
95. Taioli E, Garbers S, Bradlow HL, Carmella SG, Akerkar S, Hecht SS. Effects of indole-3-carbinol on the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1997;6(7):517–522.
96. Ding B, Sun W, Han S, Cai Y, Ren M, Shen Y. Cytochrome P450 1A1 gene polymorphisms and cervical cancer risk. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(13):p e0210.
97. Taioli E, Bradlow HL, Garbers SV, Sepkovic DW, Osborne MP, Trachman J, Ganguly S, Garte SJ. Role of estradiol metabolism and CYP<sub>1A1</sub> polymorphisms in breast cancer risk. *Cancer Detection and Prevention*. 1999;23(3):232-237.
98. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*. 1997;29(3):315-331.
99. Evans JL, Goldfine ID. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*. 2000;2(3):401-413.
100. Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*. 2011;63:849-858.
101. Li Y, Zhao Y, Yu W, Jiang S. Scavenging ability on ROS of alpha –lipoic acid (ALA). *Food Chemistry*. 2004;84:563-567.

102. 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.
103. Gleiter CH, Schug BS, Hermann R, Elze M, Blume HH, Gundert-Remy U. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers (letter). *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1996;50:513-514.
104. Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2003;43(11):1257-1267.
105. Cakatay U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Medical Hypotheses*. 2006;66(1):110-117.
106. Tibullo D, Li Volti G, Giallongo C, Grasso S, Tomassoni D, Anfuso CD, Lupo G, Amenta F, Avola R, Bramanti V. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflammation Research*. 2017;66(11):947-959.
107. Merry BJ, Kirk AJ, Goyns MH. Dietary lipoic acid supplementation can mimic or block the effect of dietary restriction on life span. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2008;129:341-348.
108. Singh U, Jialal I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutrition Reviews*. 2008;66(11):646-657.
109. Lodge JK, Youn HD, Handelman GJ, Konishi T, Matsugo S, Mathur VV, Packer L. Natural sources of lipoic acid: determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection. *Journal of Applied Nutrition*. 1997;49(1-2):3-11.
110. Golbidi S, Badran M, Laher I. Diabetes and alpha lipoic acid. *Frontiers in Pharmacology*. 2011;2:69.
111. 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 Journal*. 2002;33(1):83-93.

- 112.Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thioctic (lipoic) acid: A therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochemical Pharmacology*. 1995;50:123–126.
- 113.Bast A, Haenen GR. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors*. 2003;17:207-213.
- 114.Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101:3381–3386.
- 115.Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *The Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2015;93(12):1021-1027.
- 116.Petersen SK, Moreau RF, Smith EJ, Hagen TM. Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life*. 2008;60(6):362-367.
- 117.Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*. 1992;42(6):829-831.
- 118.Yaworsky K, Somwar R, Ramlal T, Tritschler HJ, Klip A. Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by alpha-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*. 2000;43(3):294-303.
- 119.Vajdi M, Abbasalizad FM. Alpha-lipoic acid supplementation significantly reduces the risk of obesity in an updated systematic review and dose response meta-analysis of randomised placebo-controlled clinical trials. *International Journal of Clinical Practice*. 2020;74(6):e13493.
- 120.Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology Medicine Journal*. 1995;19:227-250.
- 121.Zhang WJ, Wei H, Hagen T, Frei B. Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104:4077-4082.
- 122.Park S, Karunakaran U, Jeoung NH, Jeon JH, Lee IK. Physiological effect and therapeutic application of alpha lipoic acid. *Current Medicinal Chemistry*. 2014;21:3636–3645.

- 123.El Barky AR, Hussein SA, Mohamed TM. The potent antioxidant alpha lipoic acid. *Journal of Plant Chemistry and Ecophysiology*. 2017;2:1016.
- 124.Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L. Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2009;54:391–398.
- 125.Eason RC, Archer HE, Akhtar S, Bailey CJ. Lipoic acid increases glucose uptake by skeletal muscles of obesediabetic ob/ob mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2002;4:29–35.
- 126.Konrad D, Somwar R, Sweeney G, Yaworsky K, Hayashi M, Ramlal T, Klip A. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes*. 2001;50:1464–1471.
- 127.Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Li J, Wehr CM, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames AB. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function. decreased oxidative damage. and increased metabolic rate. *The FASEB Journal*. 1999;13:411–418.
- 128.Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, Butterfield DA, Morley JE. The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *Journal of Neurochemistry*. 2003;84(5):1173–1183.
- 129.Ono K, Hirohata M, Yamada M.  $\alpha$ -Lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;341:1046–1052.
- 130.Zhang WJ, Frei B. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *The FASEB Journal*. 2001;15:2423–2432.
- 131.Lovell MA, Xie C, Xiong S, Markesbery W. Protection against amyloid beta peptide and iron/hydrogen peroxide toxicity by alpha lipoic acid. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2003;5:229–239.

132. Holmquist L, Stauchbury 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. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007;113:154–164.
133. Meraz-Ríos MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V. Inflammatory process in Alzheimer's disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2013;7:59.
134. Ooi L, Patel M, Münch G. The thiol antioxidant lipoic acid and Alzheimer's disease. In: I. Laher, eds. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Germany Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2014. str. 2275–2288.
135. Suh JH, Wang H, Liu RM, Liu JK, Hagen TM. (R)- $\alpha$ -Lipoic acid reverses the age-related loss in GSH redox status in post-mitotic tissues: evidence for increased cysteine requirement for zGSH synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015;423:126–135.
136. Hardas, SS, Sultana R, Clark AM, Beckett TL, Szwedda LI, Murphy P, Butterfield DA. Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain. *Redox Biology*. 2013;1:80–85.
137. Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 4-Hydroxy-2-nonenal: A critical target in oxidative stress? *American Journal of Physiology*. 2016;311:537–543.
138. Wong A, Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Schinzel R, Wiesinger H, Riederer P, Münch G. Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation endproducts in murine microglia. *European Journal of Neuroscience*. 2001;14:1961–1967.
139. Dinicola S, Proietti S, Cucina A, Bizzarri M, Fusco AJA. Alpha-lipoic acid downregulates IL-1 $\beta$  and IL-6 by DNA hypermethylation in SK-N-BE neuroblastoma cells. *Antioxidant*. 2017;6:74.
140. Schwartz L, Abolhassani M, Guais A, Sanders E, Steyaert JM, Campion F, Israël MA. Combination of alpha lipoic acid and calcium hydroxycitrate is efficient against mouse cancer models: preliminary results. *Oncology Reports*. 2010;23:1407–1420.
141. Na MH, Seo EY, Kim WK. Effects of alpha-lipoic acid on cell proliferation and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cells. *Nutr. Res. Pract*. 2009;3:265–271.



142. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Molecular Cancer*. 2013;12:152.
143. Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, Lin M, Yu H, Liu L, Levine AJ, Hu W, Feng Z. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature Communications*. 2013;4:2935.
144. Feuerecker B, Pirsig S, Seidl C, Aichler M, Feuchtinger A, Bruchelt G, Senekowitsch-Schmidtke R. Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy*. 2012;13:1425–1435.
145. Jeon MJ, Kim WG, Lim S, Choi HJ, Sim S, Kim TY, Shong YK, Kim WB. Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells. *Molecular Cellular Endocrinology*. 2016;419:113–123.
146. Yang L, Wen Y, Lv G, Lin Y, Tang J, Lu J, Zhang M, Liu W, Sun X.  $\alpha$ -lipoic acid inhibits human lung cancer cell proliferation through Grb2-mediated EGFR down regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communicatio*. 2017;494:325–331.
147. Kucukgoncu S, Zhou E, Lucas KB, Tek C. Alpha-lipoic acid (ALA) as a supplementation for weight loss: results from a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*. 2017;18(5):594-601.
148. Amara F, Hafez S, Orabi A, El Etriby A, Abdel Rahim AA, Zakaria E, Koura F, Talaat FM, Gawish H, Attia I, Abdel Aziz MF, El Hefnawy MHMF, Kamar M, Halawa MR, El-Sayed MS, El Kafrawy NA, Khalil SHA, Assaad SN. Review of diabetic polyneuropathy: pathogenesis, diagnosis and management according to the consensus of Egyptian experts. *Current Diabetes Reviews*. 2019;15(4):340-345.
149. Babić D, Sindik J, Missoni S. Development and validation of a self-administered food frequency questionnaire to assess habitual dietary intake and quality of diet in healthy adults in the Republic of Croatia. *Collegium Antropologicum*. 2014;38(3):1017-1026.
150. U.S. Department of agriculture and U.S. Department of health and human services. Dietary guidelines for Americans. 2020-2025. 9th Edition. (pristupljeno 18.12.2023.). Dostupno na: [www.DietaryGuidelines.gov](http://www.DietaryGuidelines.gov)

151. Gerber M. Qualitative methods to evaluate mediterranean diet in adults. *Public Health Nutrition*. 2006;9(1A):147-151.
152. Data4Diets: building blocks for diet-related food security analysis, version 2.0. (2023). Tufts University, Boston, MA. <https://inddex.nutrition.tufts.edu/data4diets>. (pristupljeno 15.02.2024).
153. Kim S, Haines PS, Siega-Riz AM, Popkin BM. The diet quality index-International (DQI-I) provides an effective tool for cross-national comparison of diet quality as illustrated by China and the United States. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(11):3476–3484.
154. Ovanin-Rakić A, Pajtler M, Stanković T. Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice „Zagreb 2002“. Modifikacija klasifikacija „Zagreb 1990“ i „NCI Bethesda system 2001“. *Gynaecologia et Perinatologia*. 2003;12:148-153
155. Bornstein J, Bentley J, Bösze P, Girardi F, Haefner H, Menton M, Perrotta M, Prendiville W, Russell P, Sideri M, Strander B, Tatti S, Torne A, Walker P. 2011 colposcopic terminology of the international federation for cervical pathology and colposcopy. *Obstetrics & Gynecology*. 2012;120(1):166-172.
156. Grubišić G. Nova kolposkopska klasifikacija Rio de Janeiro. *Gynaecologia et Perinatologia*. 2011;21:22-30.
157. Nayar R, Wilbur DC. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathology*. 2015;5:272-281.
158. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*. 1974;20(4):470-475.
159. Roeschlau P, Bernt E, Gruber WA. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie*. 1974;12(5):226.
160. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry*. 1982;28:2077-2080.
161. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clinical Chemistry*. 1983;29(3):538-542.

- 162.Machado M.D, Soares EV. Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *Journal of Applied Phycology*. 2012;24:1509-1516.
- 163.Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. *Patho-Biological Sciences*. 1996;44:25-28.
- 164.Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine Journal*. 1999;26:1231-1237.
- 165.Pravilnik o dodacima prehrani. Pravilnik, NN 46/2011-1066. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi. *Narodne novine br.46/07. Službeni list Republike Hrvatske*. 2011. (pristupljeno 23.12.2023.). Dostupno na: [www.eli/sluzbeni/2011/46/1066](http://www.eli/sluzbeni/2011/46/1066).
- 166.Verger EO, Port AL, Borderon A, Bourbon G, Moursi M, Savy M, Mariotti F, Prevel YM. Dietary diversity indicators and their associations with dietary adequacy and health outcomes: a systemic scoping review. *Advances in Nutrition*. 2021;12(5):1659-1672.
- 167.WHO. Diet, nutrition and prevention of chronic disease: report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO technical report series 916. (pristupljeno 24.12.2023.). Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/924120916X>.
- 168.Trumbo P, Schlicher S, Yates AA, Poos M, Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *Journal of the American Dietetic Association*. 2002;102(11):1621-1630.
- 169.World health organisation-WHO. WHO guidelines on nutrition. 2012. (pristupljeno 20.12.2023.).Dostupno na:<http://www.who.int/publications/guidelines/nutrition/en/index.html>.
- 170.Boylan S, Welch A, Pikhart H, Maljutina S, Pajak A, Kubinova R, Bragina O, Simonova G, Stepaniak U, Januszewska AG, Milla L, Peasey A, Marmot M, Bobak M. Dietary habits in three Central and Eastern European countries. The HAPIEE study. *BMC Public Health*. 2009;9(1):1-13.
- 171.Rippin HL, Hutchinson J, Jewell J, Breda JJ, Cade JE. Adult nutrient intakes from current national dietary surveys of European populations. *Nutrients*. 2017;9(12):1288.

172. Viñas BR, Barba LR, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, Cavelaars A, CPGM de Groot L, Van't Veer P, Matthys C, Majem LS. Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011;59(2-4):84-95.
173. Rer Borg S, Verlaan S, Hemsworth J, Mijnders DM, MGA Schols J, Luiking YC, CPGM de Groot L. Micronutrient intakes and potential inadequacies of community-dwelling older adults: a systematic review. *British Journal of Nutrition*. 2015;113(8):1195-1206.
174. Itkonen ST, Andersen R, Björk AK, Brugård Konde Å, Eneroth H, Erkkola M, Holvik K, Madar AA, Meyer HE, Tetens I, Torfadóttir JE, Thórisdóttir B, Lamberg-Allardt CJE. Vitamin D status and current policies to achieve adequate vitamin D intake in the Nordic countries. *Scandinavian Journal of Public Health*. 2021;49(6):616–627.
175. Nordic Nutrition Recommendations 2012: integrating nutrition and physical activity. 5th ed. 2014. (pristupljeno 23.12.2023.). Dostupno na: <https://dx.doi.org/10.6027/Nord2014-002>.
176. Amcoff E, Edberg A, Enghardt BH, Lindroos A, Nälsén C, Pearson M, Lemming EW. Riksmaten–vuxna 2010–11, Livsmedels-och näringsintag bland vuxna i Sverige (Food and nutrient intake among adults in Sweden). 2012. (pristupljeno 23.12.2023). Dostupno na: [www.livsmedelsverket.se](http://www.livsmedelsverket.se)
177. Alfthan G, Euroala M, Ekholm P, Venäläinen ER, Root T, Korkalainen K, Hartikainen H, Salminen P, Hietaniemi V, Aspila P, Antti A, Selenium Working Group. Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: from deficiency to optimal selenium status of the population. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015;31:142-147.
178. Harry W, Haverkos GS, Stacey L, Steckley WP. Cigarette smoking and cervical cancer: part I: a meta-analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003;57:67–77.
179. Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, Natarajaseenivasan K. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2012;285:771–777.

- 180.Koshiyama M. The effects of the dietary and nutrient intake on gynecologic cancers. *Healthcare*. 2019;7:88.
- 181.Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(3):933S-940S.
- 182.De Carvalho MCM, Suellenn da Silva ASO, da Silva LAA, Primo MGS, de Lira VBC. Biological indicators of oxidative stress [malondialdehyde, catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase] and their application in nutrition. U: Vinood B Patel, Victor R. Preedy. *Biomarkers in nutrition*. London: Springer Cham; 2022. str. 833-856.
- 183.Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29(11):1106-1114.
- 184.Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of comon testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*. 2015;49(5):633-649.
- 185.El Sherbiny S, Squillacioti G, Colombi N, Ghelli F, Lenta E, Costa CD, Bono R. The effect of dietary patterns and nutrient intake on oxidative stress levels in pregnant women: a systematic review. *Journals Antioxidants*. 2023;12(7):1427.
- 186.Neale EP, Batterham MJ, Tapsell LC. Consumption of a healthy dietary pattern results in significant reductions in C-reactive protein levels in adults: a meta-analysis. *Nutrition Research*. 2016;36(5):391-401.
- 187.Pirouzeh R, Heidarzadeh-Esfahani N, Morvaridzadeh M, Izadi A, Yosae S, Potter E, Heshmati J, Pizarro AB, Omidi A, Heshmati S. Effect of DASH diet on oxidative stress parameters: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2020;14(6):2131-2138.
- 188.Zirilli A, Ruggeri RM, Barbalace MC, Hrelia S, Giovanella L, Campennì A, Cannavò S, Alibrandi A. The influence of food regimes on oxidative stress: a permutation- based approach using the NPC test. *Healthcare (Basel)*. 2023;11(16):2263.

- 189.Fung TT, McCullough ML, Newby P, Manson JE, Meigs JB, Rifai N, Willett WC, Hu FB. Diet-quality scores and 616 plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;82(1):163-173.
- 190.Gantenbein KV, Kanaka-Gantenbein C. Mediterranean Diet as an Antioxidant: The impact on metabolic health and overall wellbeing. *Nutrients*. 2021;13(6):1951.
- 191.Bettermann EL, Hartman TJ, Easley KA, Ferranti EP, Jones DP, Quyyumi AA, Vaccarino V, Ziegler TR, Alvarez JA. Higher mediterranean diet quality scores and lower body mass index are associated with a less-oxidized plasma glutathione and cysteine redox status in adults. *The Journal of Nutrition*. 2018;148(2):245-253.
- 192.Kim JY, Yang YJ, Yang YK, Oh SY, Hong YC, Lee EK, Kwon O. Diet quality scores and oxidative stress in Korean adults. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2011;65(12):1271–1278.
- 193.Fayez AM, Zakaria S, Moustafa D. Alpha lipoic acid exerts antioxidant effect via Nrf2/HO-1 pathway activation and suppresses hepatic stellate cells activation induced by methotrexate in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018;105:428-433.
- 194.Haghighatdoost F, Hariri M. Does alpha-lipoic acid affect lipid profile? A meta-analysis and systematic review on randomized 546 controlled trials. *European Journal of Pharmacology*. 2019;847(1):10.
- 195.Holowaty P, Miller AB, Rohan T, TO T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(3):252-258.
- 196.Bansal N, Wright JD, Cohen CJ, Herzog TJ. Natural history of established low grade cervical intraepithelial (CIN 1) lesions. *Anticancer Research*. 2008;28(3B):1763-1766
- 197.Plummer M, Schiffman M, Castle PE, Maucort-Boulch D, Wheeler CM; ALTS Group. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *The Journal of Infectious Diseases*. 2007;195(11):1582-1589.
- 198.Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JCM, Ferenczy A, Rohan TE, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infection and time to progression

and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(17):1336-1343.

199.Nobbenhuis MA, Helmerhorst TJ, Van den Brule AJ, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, Verheijen RH, Meijer CJ. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet*. 2001;358(9295):1782-1783.

200.Molano M., González M., Gamboa Ó, Ortiz N, Luna J, Hernandez G, Posso H, Murillo R, Muñoz N, for the INC HPV Study Group. Determinants of LSIL regression in women from a Colombian cohort. *Revista Colombiana de Cancerología*. 2010;14(4):199-209.

201.Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, Yasuo H, Mitsuhashi A, Fujii T Tsuyoshi I, Yaegashi N, Watanabe Y, Yutaka N, Kitagawa T, Yoshikawa H, for the Japan HPV And Cervical Cancer (JHACC) Study Group. Tobacco smoking and regression of low-grade cervical abnormalities. *Cancer science*. 2010;101(9):2065-2073.

202.Su B, Qin W, Xue F, Wei X, Guan Q, Jiang W, Wang S, Xu M, Yu S. The relation of passive smoking with cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(46):e13061.

203.Zeng XT, Xiong PA, Wang F, Li CY, Yao J, Guo Y. Passive smoking and cervical cancer risk: a meta-analysis based on 3,230 cases and 2,982 controls. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(6):2687-2693.

204.Hawthorn RJ, Murdoch JB, McLean AB, McKie RM. Langerhan's cells and subtypes of human papillomavirus in cervicalintraepithelial neoplasia. *The BMJ*. 1988;297:643-646.

205.Viac J, Guerin-Reverchon I, Chardonnet Y, Bremond A. Langerhan's cells and epithelial modifications in cervical intraep-ithelial neoplasia: correlation with human papillomavirus infection. *Immunobiology*. 1990;180:328-338.

206.Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Agrifoglio O, Scalisi A, Agodi A. The association of dietary patterns with high-risk human papillomavirus infection and cervical cancer: a cross-sectional study in Italy. *Nutrients*. 2018;10(4):469.

- 207.Seo SS, Oh HY, Lee JK, Kong JS, Lee DO, Kim MK. Combined effect of diet and cervical microbiome on the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Clinical Nutrition*. 2016;35(6):1434-1441.
- 208.Sreeja SR, Seo SS, Kim MK. Associations of dietary glycemic index, glycemic load and carbohydrate with the risk of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: a case-control study. *Nutrients*. 2010;12(12):3742.
- 209.Wang Z, Yang A, Yang J, Zhao W, Wang Z, Wang W, Wang J, Song J, Li L, Lv W, Li D, Liu H, Wang C, Hao M. Dietary nutrient intake related to higher grade cervical intraepithelial neoplasia risk: a Chinese population-based study. *Nutrition & Metabolism*. 2020;17:1-14.
- 210.Naresh A, Hagensee M, Myers L, Cameron J. Association of diet quality and dietary components with clinical resolution of HPV. *Nutrition and cancer*. 2021;73(11-12):2579-2588.
- 211.Hernandez BY, McDuffie K, Wilkens LR, Kamemoto L, Goodman MT. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B 12. *Cancer Causes & Control*. 2003;14:859-870.
- 212.Tomita LY, Filho AL, Costa MC, Andreoli M.A.A, Villa LL, Franco EL, Cardoso MA. Diet and serum micronutrients in relation to cervical neoplasia and cancer among low-income Brazilian women. *International journal of cancer*. 2010;126(3):703-714.
- 213.Fujii T, Takatsuka N, Nagata C, Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Kawana K, Mitsuhashi A, Hirai Y, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H. Association between carotenoids and outcome of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. *International journal of clinical oncology*. 2013;18(6):1091-1101.
- 214.Ssedyabane F, Ngonzi J, Kajabwangu R, Najjuma JN, Tusubira D, Randall TC. Association between obesity and cervical intraepithelial neoplasia: results from a case control study in south western Uganda. *BMC Women's Health*. 2023;23:159.
- 215.Lee JK, So KA, Piyathilake CJ, Kim MK. Mild obesity, physical activity, calorie intake, and the risks of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *PLOS One*. 2013;8(6):e66555.



216. Frontela-Noda M, Cabrera-Rode E, Hernández-Menéndez M, Duran-Bornot R. Could metabolic risk factors contribute to the development of cervical cancer? *Annals of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2019;3:001-006.
217. Koshiyama M. The effects of the dietary and nutrient intake on gynecologic cancers. *Healthcare (Basel)*. 2019;7(3):88.
218. Ock KC, Chung S, Claycombe KJ, Song WO. Serum C-reactive protein concentrations are inversely associated with dietary flavonoid intake in U.S. adults, *Journal of Nutrition*. 2008;138(4):753-760.
219. Walston J, Xue Q, Semba RD, Ferrucci L, Cappola AR, Ricks M, Guralnik J, Fried LP. Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. *American Journal of Epidemiology*. 2006;163(1):18-26.
220. Stoner GD, Wang LS, Zikri N, Chen T, Hecht SS, Huang C, Sardo C, Lechner JF. Cancer prevention with freeze-dried berries and berry components. *Seminars in Cancer Biology*. 2007;17(5):403-410.
221. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, Adams SH, Hwang DH. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of Lipid Research*. 2013;53:2002-2013.
222. Labonte ME, Couture P, Richard C, Desroches S, Lamarche B. Impact of dairy products on biomarkers of inflammation: a systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013;97:706-717.
223. Ley SH, Sun Q, Willett WC, Eliassen AH, Wu K, Pan A, Grodstein F, Hu FB. Associations between red meat intake and biomarkers of inflammation and glucose metabolism in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2014;99(2):352-360.
224. Viscogliosi G, Cipriani E, Liguori ML, Marigliano B, Saliola M, Ettore E, Andreozzi P. Mediterranean dietary pattern adherence: associations with prediabetes, metabolic syndrome, and related microinflammation. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2013;11(3):210-216

- 225.Sokolovic S, Alimanovic-Alagic R, Dzananovic L, Cavaljuga S, Beslic N, Ferhatbegovic-Opankovic E. Vitamin D status in Bosnia and Herzegovina: the cross-sectional epidemiological analysis. *Osteoporosis International*. 2017;28(3):1021-1025.
- 226.Avila E, Noriega-Mejía BJ, González-Macías J, Cortes-Hernández U, García-Quiroz J, García-Becerra R, Díaz L. The preventive role of the vitamin D endocrine system in cervical cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(10):8665.
- 227.Toledo Silva NN, Silva Santos AC, Carneiro CM, Alves Lima A. Association of serum folate and vitamin B12 with pre-neoplastic cervical lesions. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2020;38:223-228.
- 228.Laganà AS, Chiantera V, Gerli S, Proietti S, Lepore E, Unfer V, Carugno J, Favilli A. Preventing persistence of HPV infection with natural molecules. *Pathogens*. 2023;12(3):416.
- 229.Ziegler RG, Weinstein SJ, Fears TR. Nutritional and genetic inefficiencies in one-carbon metabolism and cervical cancer risk. *The Journal of Nutrition*. 2002;132(8):2345-2349.
- 230.Piyathilake CJ, Macaluso M, Chambers MM, Badiga S, Siddiqui NR, Bell WC, Edberg JC, Partridge EE, Alvarez RD, Johanning GL. Folate and vitamin B12 may play a critical role in lowering the HPV 16 methylation associated risk of developing higher grades of CIN. *Cancer Prevention Research-AACR Journals*. 2014;7(11):1128-1137.
- 231.Sedjo RL, Fowler BM, Schneider A, Henning SM, Hatch K, Giuliano AR. Folate, vitamin B12, and homocysteine status: findings of no relation between human papillomavirus persistence and cervical dysplasia. *Nutrition*. 2003;19(6):497-502.
- 232.Ono A, Koshiyama M, Nakagawa M, Watanabe Y, Ikuta E, Seki K, Oowaki M. The preventive effect of dietary antioxidants on cervical cancer development. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(11):604.
- 233.French AL, Kirstein LM, Massad LS, Semba RD, Minkoff H, Landesman S, Palefsky J, Young M, Anastos K, Cohen MH. Association of vitamin A deficiency with cervical squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus-infected women. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;182(4):1084-1089.

234. Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R, Perluigi M. Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1822:737-747.
235. Ario DT, Camuzcuoglu H, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O. Assessment of serum paraoxonase and arylesterase activity in patients with endometrial cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2009;30:679-682.
236. Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*. 2007;375:119-123.
237. Balci H, Genc H, Papila C, Can G, Papila B, Yanardag H, Uzun HJ. Serum lipid hydroperoxide levels and paraoxonase activity in patients with lung, breast, and colorectal cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2012;26:155-160.
238. Looi ML, Mohd Dali AZ, Md Ali SA, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA. Oxidative damage and antioxidant status in patients with cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma of the cervix. *European Journal of Cancer Prevention*. 2008;17:555-560.
239. Potischman N, Brinton LA. Nutrition and cervical neoplasia. *Cancer Causes Control*. 1996;7:113-26.
240. He D, Wang Z, Huang C, Fang X, Chen D. Serum selenium levels and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Biological Trace Element Research*. 2017;179:195-202.
241. World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer. A global perspective. Washington, DC: American Institute for Cancer Research. 1997;301-308.
242. Working Group on Diet and Cancer of the Committee of Medical Aspects of Food and Nutrition Policy. Department of Health. Nutritional aspects of the development of cancer. 48th Report on Health and Social Subjects. Norwich: The Stationery Office. 1998;136-140.
243. Stefani C, Liverani CA, Bianco V, Penna C, Guarnieri T, Comparetto C, Monti E, Valente I, Pieralli AL, Fiaschi C, Origoni M. Spontaneous regression of low-grade cervical intraepithelial lesions is positively improved by topical bovine colostrum preparations (GINEDIE®). A multicentre, observational, Italian pilot study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2014;18(5):728-733.

244. Asemi Z, Vahedpoor Z, Jamilian M, Bahmani F, Esmailzadeh A. Effects of long-term folate supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*. 2016;32:681–686.
245. Vahedpoor Z, Mahmoodi S, Samimi M, Gilasi HR, Bahmani F, Soltani A, Sharifi EM, Asemi Z. Long-term vitamin D supplementation and the effects on recurrence and metabolic status of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2018;72:151–160.
246. Bekos C, Schwameis R, Heinze G, Gärner M, Grimm C, Joura E, Horvat R, Polterauer S, Polterauer M. Influence of age on histologic outcome of cervical intraepithelial neoplasia during observational management: results from large cohort, systematic review, meta-analysis. *Scientific Reports*. 2018;8:6383.
247. Hui JC, Andy HL, Linda C, Colin WB, Daniel X. A review of dietary prevention of human papillomavirus-related infection of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. *Nutrition and Cancer*. 2013;65:317–328.
248. Zappavigna S, Cossu AM, Grimaldi A, Bocchetti M, Ferraro GA, Nicoletti GF, Filosa R, Caraglia M. Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21:2605.
249. Sangjeong A, Gi JK, Sung ID, Kyunge K, Hyunjoo L, In GD, Dong HK, Seung WC, Seungho R, Jin HS. High sensitivity C-reactive protein and regression of low-grade squamous intraepithelial lesion: the role of low-grade inflammation in cervical carcinogenesis. *International Journal of Epidemiology*. 2021;31:615–620.
250. Akbari M, Ostadmohammadi V, Tabrizi R, Mobini M, Lankarani KB, Moosazadeh M, Heydari ST, Chamani M, Kolahehdooz F, Asemi Z. The effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition & Metabolism*. 2018;5:15–39.
251. Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, Chanvorachote P, Rojanasakul Y. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006;319:1062–1069.

- 252.Cure E, Cumhur CM. Alpha-lipoic acid may protect patients with diabetes against COVID-19 infection. *Medical Hypotheses*. 2020;143:110–185.
- 253.Castañon A, Tristram A, Meshher D, Powell N, Beer H, Ashman S, Rieck G, Fielder H, Fiander A, Sasieni P. Effect of diindolylmethane supplementation on low-grade cervical cytological abnormalities: Double-blind, randomised, controlled trial. *British Journal of Cancer*. 2012;106:45–52.
- 254.Salehi B, Berkay YY, Antika G, Boyunegmez TT, Fawzi MM, Lobine D, Akram M, Riaz M, Capanoglu E, Sharopov F, Martins N, Cho WC, Sharifi-Rad J. Insights on the use of  $\alpha$ -lipoic acid for therapeutic purposes. *Biomolecules*. 2019;9(8):356.
- 255.Derosa G, D'Angelo A, Romano D, Maffioli PA. Clinical trial about a food supplement containing  $\alpha$ -lipoic acid on oxidative stress markers in type 2 diabetic patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1802.
- 256.Huang EA, Gitelman SE. The effect of oral alpha-lipoic acid on oxidative stress in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*. 2008;9(3Pt2):69-73.
- 257.Khalili M, Eghtesadi S, Mirshafiey A, Eskandri G, Sanoobar M, Sahraian MA, Motevalian A, Norouzi A, Moftakhar S, Azimi A. Effect of alpha-lipoic acid consumption on oxidative stress among multiple sclerosis patients: a randomized controlled clinical trial. *Nutritional Neuroscience*. 2014;17(1):16-20.
- 258.Farshad A, Soudabeh HS, Sonya HA, Elnaz VM, Mehrangiz EM. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress status in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Iranian Red Crescent Medical Journal In Press*. 2018;e67615.
- 259.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):461-467.
- 260.Khabbazi T, Mahdavi R, Safa J, Pour-Abdollahi P. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammation, oxidative stress, and serum lipid profile levels in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Journal of Renal Nutrition*. 2012;22(2):244-250.

- 261.Divković A, Radić K, Sabitović D, Golub N, Rajković MG, Samarin IR, Karasalihović Z, Šerak A, Trnačević E, Turčić P, Butorac D, Vitali Čepo D. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on low-grade squamous intraepithelial lesions-double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Healthcare Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. 2022;10(12):2434.
- 262.Draeger CL, Naves A, Marques N, Baptistella AB, Carnauba RA, Paschoal V, Nicastro H. Controversies of antioxidant vitamins supplementation in exercise: ergogenic or ergolytic effects in humans? *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2014;11(1):4.
- 263.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 Journal*. 1999;27(9-10):1114-1121.
- 264.Tomonaga I, Jingyan L, Shuji K, Tomonari K, Xiaofei W, Huijun S, Massatoshi M, Hisataka S, Teruo W, Nobuhiro Y, Jianglin F. Macrophage-derived lipoprotein lipase increases aortic atherosclerosis in cholesterol-fed Tg rabbits. *Atherosclerosis*. 2005;179(1):87-95.
- 265.Matsugo S, Yan LJ, Konishi T. An antioxidant, inhibits protein oxidative modification of human low density lipoprotein and reduces plasma cholesterol levels by the inhibition of HMG-CoA reductas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;243:819-824.
- 266.Jibril AT, Jayedi A, Shab-Bidar S. Efficacy and safety of oral alpha-lipoic acid supplementation for type 2 diabetes management: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized trials. *Endocrine Connections*. 2022;11(10):e220322.
- 267.Mirmiran P, Bahadoran Z, Gaeini Z. Common limitations and challenges of dietary clinical trials for translation into clinical practices. *International journal of endocrinology and metabolism*. 2021;19(3).
- 268.Goselin LE, Chrapowitzky L, Rideout TC. Metabolic effects of  $\alpha$ -lipoic acid supplementation in pre-diabetics: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Food and Function journal*. 2019;10(9):5732-5738.
- 269.Iannuzzo F, Basile GA, Campolo D, Genovese G, Pandolfo G, Giunta L, Ruggeri D, Di Benedetto A, Bruno A. Metabolic and clinical effect of alpha-lipoic acid administration in schizophrenic subjects stabilized with atypical antipsychotics: A 12-week, open-label, uncontrolled study. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2022;3:100116

## PRILOZI

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski  
fakultet

Povjerenstvo za etičnost  
eksperimentalnog rada

### INFORMIRANI PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

Poštovani,  
pozivamo Vas da u svojstvu ispitanika sudjelujete u dvostruko-slijepom, placebo-kontroliranom istraživanju pod nazivom „**Učinkovitost suplementacije  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom kod premalignih promjena vrata maternice**“ koje će se provoditi u okviru izrade doktorske disertacije Anje Divković, mag.pharm., pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo (Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, email:dvitali@pharma.hr) i doc. dr. sc. Zinaide Karasalihović (Univerziteti klinički centar Tuzla, , email: zinaida.karasalihovic@ukctuzla.ba). Istraživanje će se provoditi u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra u Tuzli, a njegova osnovna svrha je utvrditi može li suplementacija  $\alpha$ -lipoičnom kiselinom potaknuti regresiju cervikalne intraepitelne neoplazije. Istraživanje će se u cijelosti financirati sredstvima Sveučilišta u Zagrebu i Univerziteta u Tuzli. Razlog što ste pozvani da sudjelujete u istraživanju je činjenica da Vam je dijagnosticirana cervikalna intraepitelna neoplazija, te kod Vas nisu prisutni faktori isključenja iz istudije (stupanj CIN-a, dob i ostalo). Ispitanicama koje se odluče sudjelovati u istraživanju neće se isplaćivati financijska naknada. Istraživači koji provode ovo istraživanje neće primati financijsku naknadu.

Molimo Vas pažljivo pročitajte ovaj Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju u kojem se objašnjava zašto se ispitivanje provodi, kako se provodi i koja je vaša uloga u istraživanju te koji bi mogli biti rizici za Vaše zdravlje ukoliko pristanete sudjelovati. U slučaju da ne razumijete bilo koji dio Informiranog pristanka molimo Vas da se za objašnjenje obratite ispitivaču u istraživanju. Vaše sudjelovanje u ovom ispitivanju je dobrovoljno i možete se u bilo kojem trenutku povući. Ukoliko odlučite sudjelovati u ovom istraživanju od Vas će se tražiti da potpišete Informirani pristanak uz naznaku datuma. Informirani pristanak potpisuju i Vaš ispitivač u istraživanju i istraživač, a potpisan preslik Informiranog pristanka dobit ćete osobno prije početka navedenog istraživanja. Original Informiranog pristanka nalazi se kod istraživača ovog ispitivanja.

#### 1. PODACI O ISTRAŽIVANJU

##### SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Cervikalne intraepitelne neoplazije su premaligne promjene na vratu maternice iz kojih mogu nastati maligne promjene tj. rak vrata maternice. Alfa-lipoična kiselina je masna kiselina koju prirodno nalazimo u hrani, a zbog svog se dokazanog antioksidacijskog i protuupalnog djelovanja sve više koristi kao dodatak prehrani, najčešće za ublažavanje simptoma različitih neuropatskih stanja. U okviru ovog istraživanja promatrat će se utjecaj suplementacije pacijentica alfa-lipoičnom kiselinom kroz 3 mjeseca na postojanje odnosno stupanj cervikalne intraepitelne neoplazije. Pacijentice će biti, slučajnim odabirom, podijeljene u dvije skupine – tretiranu skupinu koja će kroz 3 mjeseca uzimati suplemente alfa-lipoične kiseline i kontrolnu skupinu koja će kroz 3 mjeseca uzimati placebo. Suplementi će biti označeni šifrom; obzirom da se radi o dvostruko-slijepoj studiji, ni ispitanice ni istraživači do završetka studije neće znati koja je skupina kontrolna, a koja tretirana.



#### ULOGA VAS KAO ISPITANICA U ISTRAŽIVANJU

- Sve ispitanice koje sudjeluju u istraživanju su pacijentice sa promjenama u citološkom nalazu što se utvrđuje rutinskim dijagnostičkim pregledom u ginekološko-kolposkopskoj ambulanti. Postupak je standardan i neovisan o tome sudjelujete li u istraživanju ili ne.
- Sve ispitanice koje pristanu sudjelovati u istraživanju ispuniti će upitnik o prehranbenim i životnim navikama
- Nakon ginekološkog pregleda ispitanicama se iz kubitalne vene standardnim načinom uzimaju dvije epruvete krvi od 6 i 9 ml radi laboratorijskih analiza, nužnih za istraživanje.
- Svaka ispitanica zatim ispunjava standardizirani prehranbeni upitnik koji će istraživačima dati uvid u njene prehranbene navike.
- Svaka ispitanica će zatim dobiti pakiranje označeno šifrom u kojem se nalazi 90 tableta suplementa. Tablete sadrže ili alfa-lipoičnu kiselinu (tretirana skupina) ili placebo/samo pomoćnu tvar (kontrolna skupina). Pacijentice kroz slijedećih 90 dana uzimaju po dvije tablete dnevno; ujutro i navečer, uz obrok.
- Nakon isteka 90 dana ispitanica ponavlja dijagnostički pregled u ginekološko-kolposkopskoj ambulanti te joj se ponovno iz kubitalne vene standardnim načinom uzimaju dvije epruvete krvi od 6 i 9 ml radi dobivanja laboratorijskih nalaza nužnih za istraživanje.
- Nakon isteka 90 dana ispitanice su dužne, prilikom ponovljenog posjeta ginekologu, vratiti preostale tablete suplementa u originalnoj ambalaži kako bi se moglo utvrditi pridržavanje terapiji.

#### KOJI SU ZA VAS MOGUĆI RIZICI SUDJELOVANJA U ISTRAŽIVANJU?

- Tijekom ginekološkog pregleda se koriste standardni postupci, dakle neovisno o tome sudjelujete li u istraživanju ili ne.
- Pri izvođenju dijagnostičkog postupka postupka vađenja krvi iz kubitalne vene možete osjetiti bol i neugodu.
- Pri izvođenju ginekološkog pregleda ispitanica možete osjetiti neugodu izazvanu ginekološkim položajem, pritiskom spekula u rodnici, moguće oskudno krvarenje radi struganja drvenom špatulom ili plastičnom četkicom po sluznici vrata maternice tijekom uzimanja uzorka za citološki probir.
- Neugoda ili komplikacija kolposkopskog pregleda može se javiti iz istih razloga kao i kod uzimanja uzoraka za citološki probir.
- Uzimanje uzorka tkiva vrata maternice (biopsije) može izazvati neugodu, manju bol ili krvarenje.
- Bol se nastoji prevenirati ili umanjiti Lydocain sprejem, a krvarenje pritiskom tampon gaze na vrat maternice.
- U slučaju jačeg krvarenja, zaustavljanje krvarenja se čini korištenjem otopinom ferosulfata, te ponovnim pritiskom tampon gazom.
- Sve ove neugode i komplikacije su izuzetno rijetke, a iste su neovisno o ovom istraživanju i ovisne u mnogočemu o pripremi ispitanice i njenom stavu.
- Alfa-lipoična kiselina je prirodna sastavnica brojnih namirnica i ne izaziva nikakve nuspojave u dozama manjim od 1800 mg dnevno što je višestruko veća doza od onih koje će se koristiti u istraživanju.



#### KOJE SU ZA VAS MOGUĆE PREDNOSTI I KORISTI OD SUDJELOVANJA?

- Ispitanica neće imati nikakve osobne koristi od sudjelovanja u istraživanju i može ga odbiti odmah ili u bilo kojoj fazi istraživanja.

#### POVJERLJIVOST I PRAVO UVIDA U DOKUMENTACIJU

- Svi Vaši osobni podaci kao i podaci o Vašim životnim i prehrambenim navikama (iz upitnika) biti će pohranjeni i obrađivani u elektroničkom obliku, a voditelj projekta i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. U naše baze podataka Vi ćete biti uneseni prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati samo voditelj projekta i njegovi suradnici, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji mogu imati i predstavnici Etičkog povjerenstva u ustanovi u kojoj se liječite (JZU Univerzitetški klinički centar Tuzla) te predstavnici Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog istraživanja.

#### TKO JE ODOBRILO OVO ISTRAŽIVANJE?

- Ovo istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Etički komitet za naučno-istraživački rad Univerzitetškog kliničkog centra u Tuzli nakon temeljite analize dostavljenog prijedloga istraživanja i prateće dokumentacije. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući «Osnove dobre kliničke prakse» i «Helsinšku deklaraciju».

#### KOGA MOŽETE KONTAKTIRATI ZA DODATNE OBAVIJESTI I UPITE?

- Ako su Vam potrebne bilo kakve dodatne informacije, ili imate dodatnih pitanja, slobodno se obratite voditeljima projekta ili suradnicima na projektu, kako slijedi:

prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo  
Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
email: [dvitali@pharma.hr](mailto:dvitali@pharma.hr)

doc.dr.med.sc. Zinaida Karasalihović  
Univerzitetški klinički centar Tuzla  
email: [zinaida.karasalihovic@ukctuzla.ba](mailto:zinaida.karasalihovic@ukctuzla.ba)

Anja Divković, mag.pharm  
email: [anja-divkovic@hotmail.com](mailto:anja-divkovic@hotmail.com)

## 2. PRISTANAK ZA SUDJELOVANJE

- Potvrđujem da sam dana \_\_\_\_\_ u \_\_\_\_\_  
(dan/mjesec/godina) (mjesto)  
pročitala Obavijest za ispitanika za gore navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
- Razumijem da je moje sudjelovanje dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za moje zdravstveno stanje ili pravni status.
- Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditelj istraživanja i njegovi suradnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.
- Pristajem da moj obiteljski liječnik (odnosno član obitelji) bude upoznat s mojim sudjelovanjem u navedenom znanstvenom istraživanju.
- Želim i pristajem sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika: \_\_\_\_\_  
(upisati štampanim slovima)

Vlastoručni potpis: \_\_\_\_\_

Mjesto i datum: \_\_\_\_\_

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak informiranja pacijenata i prikupljanja informiranih  
pristanaka za sudjelovanje u istraživanju \_\_\_\_\_  
(upisati štampanim slovima)

Ime i prezime voditelja projekta: \_\_\_\_\_  
(upisati štampanim slovima)

Vlastoručni potpis: \_\_\_\_\_

Mjesto i datum: \_\_\_\_\_

PREHRAMBENI UPITNIK ZA  
PROCJENU KVALITETE  
PREHRANE



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

#### **UPUTE ZA ISPUNJAVANJE UPITNIKA:**

1. Odgovoriti na svako pitanje najtočnije moguće. Ukoliko niste sigurni, probajte procijeniti.  
Bolje je probati pogoditi nego ostaviti pitanje neodgovoreno.
2. Na neka pitanja je potrebno odgovoriti nadopunjavanjem, na neka zaokruživanjem slova ispred odgovora, a na neka stavljanjem križića u stupac ispod točnog dogovora.  
  
Ukoliko Vaš točan odgovor nije ponuđen, molim Vas da upišete točan odgovor koji vrijedi za Vas na praznu crtu ispod određenog pitanja.
3. Prije prelaska na sljedeću stranicu, molim Vas da odgovorite na sva pitanja na prethodnoj stranici.

**OPĆI UPITNIK**

1. Ime i prezime/Inicijali(Šifra: \_\_\_\_\_)

2. Današnji datum: \_\_\_\_\_

3. Datum rođenja: \_\_\_\_\_

4. Spol: M  Ž

5. Stupanj obrazovanja:

osnovna škola

fakultet, prvostupnik

3-godišnja srednja škola

fakultet, magistar struke

4-godišnja srednja škola

magistar / doktor znanosti

viša škola (veleučilište)

ostalo \_\_\_\_\_

6. Broj osoba u domaćinstvu:

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

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

8. Da li bolujete od neke bolesti?      DA      NE

9. Da li redovito uzimate lijekove?    DA    NE

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

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

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

11. Da li pušite?      DA      NE

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

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

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

**13. Da li se bavite tjelesnom aktivnosti?** DA NE

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

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

Koliko prosječno traje? \_\_\_\_\_

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

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

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

Zašto ste se odlučili za alternativan način prehrane?

---

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

a) svu vidljivu mast      b) većinu vidljive masti      c) malu količinu vidljive masti

d) ne uklanjam vidljivu mast      e) ne jedem meso

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

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

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

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_ čajnih žličica

**21. Na koji način najčešće konzumirate doručak radnim danom?**

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

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

**22. Na koji način najčešće konzumirate ručak radnim danom?**

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

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



Prehrambeni upitnik za procjenu kvalitete prehrane

---

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							

Prehrambeni upitnik za procjenu kvalitete prehrane

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
68.Pommes frites							
<b>VOĆE</b>							
69.Citrusi (naranča, mandarina, grejp, limun)							
70.Jabuke, kruške							
71.Banane							
72.Jagode, grožđe, borovnice							
73.Bobičasto voće, svježe (borovnice, kupine, maline)							
74.Trešnje, višnje, šljive							
75.Ananas, svježi							
76.Konzervirano voće (ananas, marelice)							
77.Suhe šljive, suhe smokve							
78.Orašasti plodovi (bademi, orasi, lješnjaci)							
79.Lubenica, dinja							
<b>MAHUNARKE I LEGUMINOZE</b>							
80.Bob							
81.Grašak							
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							

Prehrambeni upitnik za procjenu kvalitete prehrane

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
98. Tuna u konzervi							
99. Tuna, svježa							
100. Jaje, sa žumanjkom							
101. Jaje, samo bjelanjak							
<b>MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI</b>							
102. Mlijeko, 0.9% m.m.							
103. Mlijeko, 1.5% m.m.							
104. Mlijeko, 2.8% m.m.							
105. Mlijeko, punomasno (>3.5% m.m.)							
106. Jogurt, tekući							
107. Jogurt, punomasni							
108. Jogurt, voćni							
109. Kiselo vrhnje							
110. Svježi kravliji 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							

Prehrambeni upitnik za procjenu kvalitete prehrane

	svaki dan	4-6 / tjedan	2-3 / tjedan	1 / tjedan	2-3 / mjesec	1/mjesec	nikada
130. Čokoladno mlijeko							
131. Sok od povrća, svježe iscjeđen							
132. Sok od voća, svježe iscjeđen							
133. Voćni sok, 50% voća							
134. Voćni sok, 100% voća							
135. Cedevisa							
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



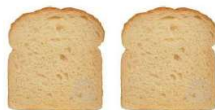
C) 350 g

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

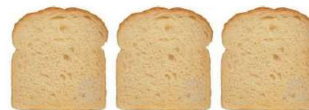
**145. KRUH**



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

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

**149. ZELENO LISNATO POVRĆE**



A) 46 g



B) 84 g



C) 146 g

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

**150. RAJČICA, SVJEŽA**



A) 80 g



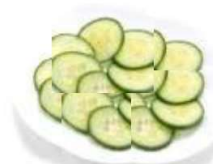
B) 180 g

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

**151. KRSTAVAC, SVJEŽI**



A) 80 g



B) 180 g

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

**152. LUK, CRVENI**



A) 80 g



B) 120 g



C) 200 g

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

**153. LUK, BIJELI**



A) 15 g



B) 30 g

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

**154. GLJIVE, SVJEŽE**



A) 100 g



B) 200 g

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

**155. SALATA, ZELENA, KRISTAL, ENDIVIJA**



A) 15 g



B) 35 g

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

**156. TIKVICE, SVJEŽE**



A) 100 g



B) 200 g

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

**157. PATLIDŽANI**



A) 100 g



B) 200 g

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

**158. RAJČICA, KONZERVIRANA**

A) ¼ paketa (125 ml)

B) ½ paketa (250 ml)

C) 1 pakiranje (500 ml)

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

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

A) ¼ konzerve ( 125 g )

B) ½ konzerve ( 250 g )

C) 1 konzerva (500 g)

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

**160. KUPUS**



A (100 g)



B (200 g)

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

**161. KRUMPIR**



A) 150 g



B) 300 g



C) 500 g

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

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

A) 1 komad

B) 2 komada

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

**163. JABUKE, KRUŠKE**

A) 1 komad

B) 2 komada

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

**164. BANANE**

A) 1 komad

B) 2 komada

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

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

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

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

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

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

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

168. ANANAS, SVJEŽI

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

169. KONZERVIRANO VOĆE (ananas, marelice)

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

170. SUHE ŠLJIVE, SUHE SMOKVE

- A) 2-3 komada    B) 10 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

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



C) 200 g

174. MAHUNE



A) 50 g



B) 125 g

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



C) 200 g

175. MESO, PERAD, RIBA, IZNUTRICE



A) 100 g

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



B) 200 g

**176. RAKOVI, ŠKOLJKE**



A) 100 g



B) 200 g

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

**177. MESNI NARESCI**



A) 20 g



B) 75 g



C) 125 g

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

**178. HRENOVKE, KOBASICE**

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

**179. JAJA**

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

**180. MLIJEKO, JOGURT, KISELO VRHNJE**

A) 1 dl    B) 2 dl    C) 1 šalica (2,5 dl)    D) ½ L    E) 1 L    F) \_\_\_\_\_

181. SVJEŽI KRAVLJI SIR, POSNI SIR



A) 25 g



B) 50 g



C) 100 g

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

182. SIR, PUNOMASNI I POLUMASNI



A) 20 g



B) 50 g



C) 100 g

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

183. SIRNI NAMAZ

A) 1 čajna žličica

B) 2 čajne žličice

C) \_\_\_\_\_ čajne žličice

184. ULJE

A) \_\_\_\_\_ jušnih žlica

B) 1 šalica (2,5 dl)

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

185. MASLAC, MARGARIN, MAJONEZA

A) 1 čajna žličica

B) 2 čajne žličice

C) \_\_\_\_\_ čajne žličice

**186. ČOKOLADA**

A) \_\_\_\_\_ redova    B) ½ čokolade (50 g)    C) 1 čokolada (100 g)    D) \_\_\_\_\_

**187. BISKVIT**

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

**188. KEKSI**

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

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

A) 1 čajna 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) \_\_\_\_\_

Article

---

# Effect of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Low- Grade Squamous Intraepithelial Lesions— Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial

---



Anja Divković, Kristina Radić, Damir Sabitović, Nikolina Golub, Marija Grdić Rajković,  
Ivana Rumora Samarin, Zinaida Karasalihović, Adnan Šerak, Emir Trmačević,  
Petra Turčić et al.



<https://doi.org/10.3390/healthcare10122434>

Article

# Effect of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions—Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial

Anja Divković<sup>1</sup>, Kristina Radić<sup>2</sup> , Damir Sabitović<sup>1</sup>, Nikolina Golub<sup>2</sup>, Marija Grdić Rajković<sup>2</sup>, Ivana Rumora Samarin<sup>3</sup>, Zinaida Karasalihović<sup>1</sup>, Adnan Šerak<sup>1</sup>, Emir Trnačević<sup>1</sup>, Petra Turčić<sup>2</sup>, Dražan Butorac<sup>4</sup> and Dubravka Vitali Čepo<sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Laboratory Diagnostics, University Clinical Centre Tuzla, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>4</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Sestre Milosrdnice University Hospital Centre, 10000 Zagreb, Croatia

\* Correspondence: [dvitali@pharma.hr](mailto:dvitali@pharma.hr); Tel.: +38-59-1947-1064



**Citation:** Divković, A.; Radić, K.; Sabitović, D.; Golub, N.; Rajković, M.G.; Rumora Samarin, I.; Karasalihović, Z.; Šerak, A.; Trnačević, E.; Turčić, P.; et al. Effect of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions—Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Healthcare* 2022, 10, 2434. <https://doi.org/10.3390/healthcare10122434>

Academic Editor: Joaquim Carreras

Received: 8 October 2022

Accepted: 29 November 2022

Published: 2 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Low-grade squamous intraepithelial lesion (SIL) is a cytologic diagnosis etiologically related to human papilloma virus (HPV) infection that leads to the release of inflammation mediators, the formation of reactive oxygen species (ROS) and decreased levels of antioxidants in tissues, which is why antioxidants might be considered effective against SIL progression. This randomized double-blind placebo-controlled study aimed to investigate the effectiveness of alpha-lipoic acid (ALA) supplementation (600 mg/day) on the regression of low-grade SIL in 100 patients. Low-grade SIL was determined after the cytological screening, colposcopic examination and targeted biopsy and histological confirmation of cytological–colposcopic diagnosis. Inflammation parameters and the presence of HPV were determined by standard laboratory methods. Dietary and lifestyle habits were investigated using a standardized and validated semi-quantitative food questionnaire (FFQ). ALA supplementation significantly reduced the proportion of patients with low-grade cytological abnormalities, in comparison to placebo. Given the obtained level of significance ( $p < 0.001$ ), the presented results indicate that short-term ALA supplementation shows a clinically significant effect on cervical cytology. Future studies should focus on the use of innovative formulations of ALA that might induce bioavailability and therapeutic efficiency against HPV infection and the investigation of synergistic effects of concurrent dietary/lifestyle modification and ALA supplementation in both low-grade and high-grade SIL.

**Keywords:** low-grade squamous intraepithelial lesion; human papilloma virus; alpha lipoic acid; inflammation; dietary patterns

## 1. Introduction

Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) is a cytologic diagnosis for patients with smears showing cytologic criteria of permissive HPV infection or cervical interepithelial neoplasia I (CIN I); the same classification is used for histopathologic diagnosis where low-grade SIL and low-grade CIN are used synonymously [1]. LSILs account for most of the cytological anomalies for screening cervical cancer and they usually regress spontaneously within a year from the diagnosis. However, the exact rates of spontaneous regression of LSIL are hard to predict due to the heterogeneity of conducted studies: regression percentages observed in different studies ranged between 7% and 95%. The rates of progression to a high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) increase significantly if LSIL is caused by high-risk, oncogenic human papilloma virus (HPV) genotypes [2].



In the etiology of the formation of squamous intraepithelial lesions (SIL), HPV infection leads to the release of different inflammation mediators, resulting in the formation of reactive oxygen species (ROS) and causing a decrease in the level of antioxidants. HPV integration in combination with oxidative stress causes oxidative damage to the genome and different epigenetic alterations that altogether hinder apoptosis and alter cellular proliferation [3]. Therefore, diet components exerting antiviral, anti-inflammatory and antioxidant actions could be considered protective against the progression of SIL and the development of cervical cancer.

Observational studies confirm that Western dietary patterns increase the possibility of HPV infection, while high adherence to the Mediterranean diet decreases the risk [4]. Numerous observational studies indicate that the consumption of a wide variety of whole foods rich in vitamins, minerals and nonessential bioactive compounds (especially those with antioxidant and antiviral properties) can be effective in preventing the progression of LSILs to HSIL or cervical cancer, and, therefore, a balanced-diet prevention strategy should be recommended to patients upon LSIL diagnosis [3,5–7].

Investigating dietary supplementation with antioxidants (and other vitamins) for cervical cancer prevention and treatment has recently gained considerable interest [8]. Long-term oral beta carotene (30 mg, 2 years) or folate (10 mg, 6 months) did not significantly impact the regression of HSIL [9,10]. On the other hand, taking selenium supplements (200 µg for 6 months) among patients with LSIL led to its regression and had beneficial effects on their metabolic profiles [11]. Folate supplementation (5 mg/day, 6 months) was efficient in inducing the regression of LSIL [12], and vitamin D (50,000 IU every two weeks for 6 months) prevented the recurrence of HSIL [13].

Due to a low number of high-quality intervention studies, the level of evidence for the efficiency of vitamin/antioxidant supplements in LSIL is low and there are currently no official recommendations for patients. Therefore, additional investigations into efficient approaches for inducing the regression/preventing the progression of LSIL are necessary.

Alpha lipoic acid (ALA), also known as 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, thioctic acid, or its reduced form—dihydrolipoic acid, are potent nutritional antioxidants and perform pleiotropic actions on different pathways linked to numerous diseases, including direct antiradical activity or modulating the signalling transduction of several pathways (such as insulin and nuclear factor kappa B (NFκB)). It is, therefore, used as a potential therapeutic agent in diabetic neuropathy, brain disease and cognitive dysfunction, cardiovascular diseases, endothelial dysfunction, hemorrhoidal illness, obesity and cancer [14–17]. The majority of clinical studies conducted so far were focused on its antioxidant activity and potential effectiveness in diabetic neuropathy, Alzheimer's disease and cancer [18].

As mentioned, the majority of its therapeutic effects are contributed to direct antioxidant activity—a scavenging capacity for ROS and metal chelating abilities. Additionally, ALA regulates numerous signalling pathways—insulin pathway, NFκB and adenosine monophosphatase protein kinase (AMPK)—but the clinical significance of these actions still needs to be confirmed [16].

This study aimed to investigate the impact of supplementing patients with diagnosed LSIL with alpha lipoic acid (ALA) and observe the effects on the progression/regression of LSIL after a 3-month supplementation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Participants and the Study Design

Criteria for inclusion of patients in the study were histological confirmation of low-grade SIL and age (18–55 years). Exclusion criteria were pregnancy; malignant diseases; diabetes; chronic inflammatory diseases; hysterectomy, destructive therapy of the cervix, or previous abortion; HPV vaccination and menopause; and regular use of dietary supplements (except multivitamin/multimineral dietary supplements containing the amounts of nutrients below or equal to current recommended dietary allowances (RDAs)). Patients who met the above-mentioned criteria were introduced to the purpose and the manner

of conducting the study and were included in the study after giving informed consent. Recruitment for the trial was performed at the University Clinical Centre Tuzla between January 2020 and March 2022.

The study was a double-blind (participants and care-providers), randomized, placebo-controlled trial, where 100 participants aged 19–51 years were asked to self-administer either 600 mg of alpha lipoic acid in the form of two 300 mg capsules (Zada Pharmaceuticals, Lukavac, Bosnia and Herzegovina) or a placebo (provided as identical oral capsules containing rice starch) per participant, per day for 3 months. Participants were distributed in a ratio of 1:1 for ALA:placebo. Block randomization was performed to ensure balance using an in-house computer program; patients were randomly allocated a patient number that determined their supplement allocation, and two bottles of capsules pre-labelled with their study number were dispensed. The two bottles contained sufficient capsules for 3 months. Compliance to treatment was encouraged by weekly phone calls and text messages. Patients were asked to return the remaining capsules after the 3-month period in order to assess the adherence. Active participation in the study ended on June 2022 after the last enrolled participant attended their 3-month appointment.

All participants gave their written informed consent for inclusion in the study. The informed consent and the research protocol were approved by the Ethics Committee of the University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry (no: 251-62-03-18-23) and the Ethics Committee of the University Clinical Centre Tuzla (no: 02-09/2-61-16). An independent Data and Safety Monitoring Committee was in place throughout the trial to review the progress of the study and potential side effects. The trial is registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) ([Clinical-Trials.gov](https://clinicaltrials.gov), number NCT05485259) and complies with the CONSORT guidelines. It was performed in accordance with the international, national and institutional guidelines pertaining to clinical studies and biodiversity rights.

## 2.2. Data Collection

All recruited patients had a confirmed diagnosis of LSIL. LSIL was determined after the performed cytological screening, colposcopic examination of the cervix and targeted biopsy and histological confirmation of cytological–colposcopic diagnosis. At the first appointment, patients were introduced to the study design, and they provided written consent to be enrolled in the study. They filled out a baseline questionnaire and provided information on reproductive history and current medication. Examination of patients' dietary and lifestyle habits was conducted using a standardized and validated semi-quantitative food questionnaire (FFQ) [19] with the help of trained staff. The data were collected to obtain basic information on dietary patterns, antioxidant intake, use of dietary supplements, smoking, and physical activity of patients. Patients were advised not to change their diet and level of physical activity during the study. They received two bottles prelabelled with their study number, containing enough capsules of either ALA or placebo, sufficient for 3 months of therapy. The appearances of the bottles and capsules were identical in the two groups.

During the supplementation period, participants were contacted twice by telephone by a research team member to check possible adverse effects and to improve adherence. Three months after entry, participants were invited to a follow-up appointment, where cytological screening, colposcopic examination of the cervix and targeted biopsy and histological confirmation of cytological–colposcopic diagnosis were conducted. At both appointments (initial and 3 months appointment), blood samples were taken from the patients' cubital vein by the standard. Blood samples were collected by venipuncture after a 10 h fasting period.

## 2.3. Assessment of Primary Outcomes

The primary outcome of the study was LSIL, which was determined after the performed cytological screening, colposcopic examination of the cervix and targeted biopsy and histological confirmation of cytological–colposcopic diagnosis at the study baseline



and after the 3 months intervention. The findings of cytological screenings were qualified according to the internationally recognized form “Zagreb 2002” [20]. The colposcopic form “Rio de Janeiro-Zagreb 2011” (<https://www.hdgo.hr/userFiles/upload/documents/aktualne-teme/kolposkopija/Rio-Zagreb-2011.pdf>, accessed on 12 August 2021) was used to classify the colposcopic findings. Uterine tissue samples obtained by targeted colposcopic biopsy were processed by a standard histological method. Assessment of the pathological diagnosis was done as blindness by a single experienced pathologist at baseline and after the intervention. The classification of premalignant and invasive cervical squamous epithelial lesions was determined according to the WHO tumor classification [21].

#### 2.4. Assessment of Secondary Outcomes

Secondary outcomes of the study were high-risk human papillomavirus (HPV) positivity after the 3-month follow-up visit and the biomarkers of inflammation (high-sensitive C-reactive protein, fibrinogen and sedimentation). Detection of the presence of high-risk HPV in cervical smears was made using the Hybrid Capture II HPV Test (Qiagen, Germantown, MD, USA). The samples were tested for the presence of HRHPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68. For the assessment of other secondary outcomes blood samples were collected before and after the treatment at three months in the experimental group by venipuncture after a 10 h fasting period. Blood was placed in siliconized test tubes without anticoagulant for biochemical determinations. The blood sedimentation rate was measured according to standard protocol in BD Vacutainer® blood collection tubes (Becton, Dickinson and Company, New York, USA). Fibrinogen was determined by standard methodology, using an automated hemostasis analyzer (BCS® XP System, Siemens, Marburg, Germany). High-sensitive CRP was determined by the immunoturbidimetric method using Multigent CRP Vario® reagent on Architect ci8200 integrated system (Abbott, Chicago, IL, USA).

#### 2.5. Analysis of Diet Characteristics

A semiquantitative food frequency questionnaire (FFQ) was used for the assessment of food intake. FFQ was designed as a 192-item questionnaire with one month as the reference period of intake. There were 100 dietary items listed, and the remaining items were questions about supplementation use and eating habits. The questionnaire was constructed as a modification of a previously published questionnaire [22], with regard to serving sizes and the national specificity of foods. The participants filled out the questionnaire under the supervision of a researcher. Average daily food intake in grams, as well as in serving sizes, was calculated for each participant based on the frequency and portion size reported in the FFQ. Nutrient intake for selected nutrients was calculated using national food composition tables [23] and serving sizes, according to USDA Dietary Guidelines for Americans, 2020–2025 [24].

#### 2.6. Sample Size Assessment and Statistical Analysis

To determine the sample size, we used a randomized clinical trial sample size formula where type one ( $\alpha$ ) error was set at 5% and the study power was set at 85%. The ratio of the case to control was 1, and the expected dropout was 2%. LSIL was the main outcome of the study; the expected proportion of LSIL regression in the control group was 50%, and in the treated group it was 80%. Assuming a dropout of 2% in the final sample size and superiority margin of 5%, the total population study was determined to be 96 (48 subjects per group) (<http://www.riskcalc.org/samplesize/>, accessed on 12 August 2021).

The main statistical analyses were performed on all randomized women for whom outcome data were available. The primary outcome was histologically confirmed LSIL vs. histology without LSIL, or negative colposcopy (and no histology). The secondary outcomes were HPV infection, sedimentation rate (SE) and fibrinogen (FI).

The comparison of binary outcomes between treatment groups was made by  $2 \times 2$  tabulation and a risk ratio (RR), 95% confidence intervals (CIs) and calculated

*p*-values. For the analysis of numerical variables, nonparametric statistical tests were used, due to a low number of patients in the placebo or the treated group ( $n \leq 50$ ), and the results were presented as medians and interquartile ranges. To identify statistically significant differences between the groups, the Mann–Whitney test for the independent group or the Wilcoxon’s test for the dependent group was used. The Fisher’s exact test was used for contingency analysis. Statistical analyses were done using GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software LLC, San Diego CA, USA) and MedCalc statistical software MedCalc ver.14.8.1.0., MedCalc Software Lcd., Ostend, Belgium). The *p* level  $<0.05$  was considered statistically significant.

### 3. Results

A total of 100 patients were randomized into the placebo ( $n = 50$ ) or the treatment group ( $n = 50$ ). Eleven patients did not finish the trial due to personal reasons (two patients from the placebo group and nine patients from the treatment group). (Figure 1). No side effects were reported following the intake of ALA supplements or placebo throughout the study. Additional description of the study design and more detailed flow diagram of the progress through the phases of a trial (CONSORT checklist and CONSORT flow diagram) are presented as Table S1 and Figure S1, respectively (Supplementary Materials). Raw experimental data obtained during the study are presented in Table S2 (Supplementary Materials).

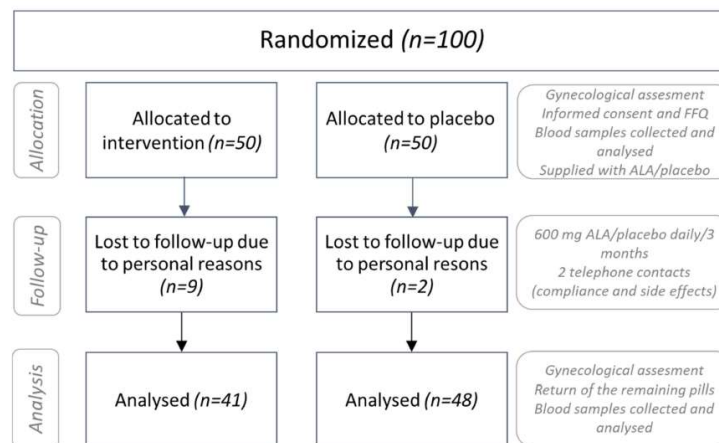
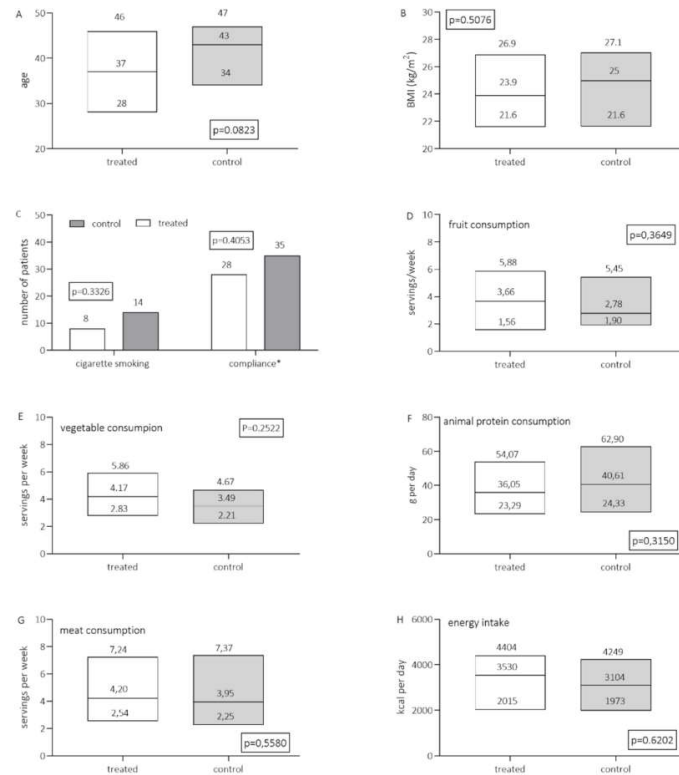


Figure 1. Patient flow diagram.

Numerous demographic, lifestyle and diet characteristics (such as age; body mass index (BMI); cigarette smoking; low intake of fruit and vegetables; and high intake of energy, red meat and animal protein) that have been determined as risk factors for the occurrence of gynecological abnormalities, including HSIL or cervical cancer [25–27], were compared between the two groups (Figure 2). The age of participants in the two study groups was similar ( $p = 0.0823$ ). Medians of the body mass index (BMI) in the placebo and the intervention group were similar (23.89 and 24.98 kg/m<sup>2</sup>, respectively;  $p = 0.5086$ ). The percentage of smokers in the placebo and the intervention group was 29.2% and 19.5%, respectively, and observed differences were not statistically significant ( $p = 0.3326$ ). The intake of fruit and vegetables was significantly lower than recommended, and intake of meat and animal proteins was above current recommendations in both groups (US recommendations) and obtained medians of intake did not differ significantly between the placebo and the treated group of patients. Compliance was self-reported on the final visit,

and, in addition, unused capsules were counted upon return. The medians of the numbers of returned capsules at the final visit were 35 and 28 in the placebo and the treated group, respectively, and observed differences were also not statistically different ( $p = 0.4054$ ).



**Figure 2.** Characteristics of study groups at baseline regarding age (A), BMI (B), cigarette smoking and compliance (C) and dietary habits (D–H). Results are expressed as medians (min–max range). Results were tested by Mann–Whitney’s test (A, B, D–H) and by Fisher’s exact test (C) and respective  $p$  values are indicated in each figure. Data on dietary habits are obtained by validated semiquantitative FFQs. \* Expressed as the average number of returned capsules at the end of the study.

The primary and secondary outcomes of this study were diagnosis of LSIL (primary outcome), HPV infection, SE rate, hsCRP and FI (secondary outcomes), and they were compared between the placebo and the treated group at two time-points (initial visit and 3-month follow-up visit) (Table 1). Additionally, the differences between the values obtained in the placebo or the treated group at the initial and the 3-month follow-up visit were also compared and presented in Table 2. Odds ratio indicating the efficiency of 3 month ALA supplementation on the recovery of LSIL-positive patients and its precision are presented in Table 3.



Table 1. Comparison of primary and secondary outcomes (placebo vs. treated) at the initial visit and 3-month follow-up.

	Placebo n = 48	Treated n = 41	<i>p</i>	Placebo n = 48	Treated n = 41	<i>p</i>
	Initial Visit			3-Month Follow-Up Visit		
<sup>1</sup> LSIL number of patients	48	41	1.000	44	2	<0.0001
<sup>1</sup> HPV number of patients	18 (37.5%)	19 (46.3%)	0.5178	18 (37.5%)	19 (46.3%)	0.5178
<sup>2</sup> hsCRP (mg/L)	0.86 (0.47–1.32)	1.77 (0.82–2.44)	0.0344	1.11 (0.61–1.98)	0.89 (0.39–1.68)	0.2408
<sup>2</sup> FI (g/L)	3.30 (2.4–3.9)	3.9 (3.1–4.4)	0.0130	3.7 (2.7–4.5)	3.3 (2.6–3.8)	0.0437
<sup>2</sup> SE (mm/h)	16 (12–23)	20 (15–26)	0.0785	20 (16–26)	16 (12–22)	0.0046

Results are expressed as medians (interquartile range). <sup>1</sup> Tested by Fisher's exact test, comparing the placebo and the treated group of patients at the initial visit/follow up visit. <sup>2</sup> Tested by Mann-Whitney's test, comparing the placebo and the treated group of patients at the initial visit/follow up visit.

Table 2. Changes in primary and secondary outcomes between the initial and the 3-month appointment in placebo and treated group.

	Placebo		<i>p</i>	Treated		<i>p</i>
	Initial	3-Month Follow-Up		Initial	3-Month Follow-Up	
<sup>1</sup> LSIL number of patients	48	44	0.1171	41	2	<0.001
<sup>1</sup> HPV number of patients	18	18	1.000	19	19	1.000
<sup>2</sup> hsCRP (mg/L)	0.86 (0.47–1.32)	1.11 (0.61–1.98)	<0.001	1.77 (0.82–2.44)	0.89 (0.39–1.68)	<0.001
<sup>2</sup> FI (g/L)	3.30 (2.4–3.9)	3.7 (2.7–4.5)	<0.001	3.9 (3.1–4.4)	3.3 (2.6–3.8)	<0.001
<sup>2</sup> SE (mm/h)	16 (12–23)	20 (16–26)	<0.001	20 (15–26)	16 (12–22)	<0.001

Results are expressed as medians (interquartile range). <sup>1</sup> Tested by Fisher's exact test, comparing the values in the initial and the 3-month follow-up visit in placebo treated group. <sup>2</sup> Tested by Mann-Whitney's test, comparing the values in the initial and the 3-month follow-up visit in placebo treated group.

Table 3. Efficiency of 3-month ALA supplementation on the recovery of LSIL-positive patients (odds ratio and 95% CI intervals).

	Placebo n = 48 (Final Visit)	Treated n = 41 (Final Visit)	Odds Ratio	95% CI	<i>p</i>
Recovery (n)	4	39	0.004662	0.0008091–	<0.0001
LSIL (n)	44	2		0.02686	

Results are expressed as number of participants (n). Tested by Fisher's exact test.

All patients recruited for the study had a diagnosis of LSIL at the initial visit; by the end of the study, this number of patients was reduced in both groups—in the placebo group 44 patients still had an LSIL diagnosis; in the treated group of patients only 2 of them still had an LSIL diagnosis ( $p < 0.0001$ ). The percentage of patients with positive HPV findings

remained the same during the 3 months of study; 37.5% in the placebo and 46.3% in the treated group of patients were HPV-positive and observed differences were not statistically significant. At the initial visit, hsCRP and FI were significantly lower in the placebo group ( $p = 0.0344$  and  $p = 0.0130$ , respectively) but still within the normal range, while SE rates were comparable ( $p = 0.0785$ ). At the 3-month follow-up visit, the situation was reversed: inflammation parameters were higher in the placebo group and observed differences were statistically significant for FI and SE rates ( $p = 0.0437$  and  $0.0046$ , respectively).

Table 2 shows the significance of observed changes in primary and secondary outcomes that occurred during the 3 months of ALA/placebo supplementation. The number of LSIL-positive patients decreased from 48 to 44 in the placebo group (8.33% of patients recovered), but the observed change was found to be statistically insignificant ( $p = 0.1171$ ). On the other hand, in the ALA-treated group as much as 95.12% of patients recovered ( $p < 0.0001$ ). None of the patients in either of the investigated groups progressed to the higher grade of SIL. The percentage of HPV-infected patients remained the same in both groups. All inflammation parameters increased during 3 months of supplementation in the placebo group and observed changes were statistically significant ( $p < 0.001$ ). On the contrary, in the ALA-treated group all observed inflammation parameters decreased moderately but significantly ( $p < 0.0001$ ). There were no adverse effects reported in the study.

#### 4. Discussion

As mentioned previously, investigations on the possibility of dietary intervention in LSIL are scarce and the obtained results are rather contradictory. This is the first investigation of the effectiveness of ALA in inducing the regression of LSIL. Results obtained within this research show that three-month supplementation with 600 mg of ALA significantly reduced the proportion of patients with low-grade cytological abnormalities, in comparison to placebo. Given the obtained level of significance ( $p < 0.001$ ), the presented results indicate that short-term ALA supplementation might have a clinically significant effect on cervical cytology.

In the placebo group, spontaneous LSIL regression was observed in only 8.3% of patients, which is rather low considering that rates are predicted to be ranging from 40% to 70% over a period of 1–5 years [28]. Additionally, in available intervention studies that investigated the possibilities of nutritional supplementation in inducing the regression of LSIL, the rates of spontaneous regression observed in placebo groups were higher (52.0–56.0%) [11–13,28]. The reasons for the observed disagreement with the results obtained in this study might include the short monitoring period (3 months vs. 6 months in intervention trials or 1–5 years in observational studies) and a high median age of participants (37 and 41). Namely, age is considered an independent risk factor for LSIL progression, where with every five years of age, the odds for regression are reduced by 21% independently of CIN grade and presence of HPV high-risk infection [29].

The dietary habits of the participants included in this study might also have contributed to the low LSIL regression rates in the placebo group. Namely, the results of the recent review of Hui and co-authors [5] highlighted the benefits of high consumption of whole fruits and vegetables, nuts and fish in terms of their protectiveness against persistent HPV infection and SIL. On the other hand, the low consumption of whole vegetables and fruits was associated with a three-fold increase in the risk of CIN 2 and 3 in subjects with high HPV viral load. Therefore, patients with diagnosed SIL are always advised to increase their dietary intake of protective nutrients. Analysis of FFQs in this study showed a low intake of both fruits and vegetables that are known to be major protective factors against LSIL progression (2.78 and 3.49 portions per week, respectively). This intake remained low during the supplementation period as patients were advised not to change dietary habits during the period of intervention.

The response to supplementation in the treated group of patients was high; the regression of LSIL has been observed in 95% of participants, while the rates of HPV infection remained intact (19 patients that were HPV-positive at baseline remained positive



despite supplementation). The obtained results are consistent with the results presented in several other clinical trials investigating the efficiency of nutrients in the induction of LSIL regression. Unlike ours, those studies included a lower number of patients and investigated long-term supplementation protocols (6 months). Vahedpoor and co-workers [13] showed that 6-month vitamin D supplementation of patients with LSIL (one dose of 50,000 IU vitamin D supplement every 2 weeks) resulted in the regression of cervical intraepithelial neoplasia grade 1 (CIN1) in 84.6% of patients ( $n = 29$ ). Similarly, supplementation with 5 mg of folic acid for 6 months resulted in 83.3% regression of CIN 1 ( $n = 29$ ) [12], as well as the long-term supplementation (6 months) with 200  $\mu\text{g}$  of organic form of selenium in 88% of women in the supplemented group ( $n = 28$ ) [11].

The mechanisms of potential efficiency of ALA in the regression of LSIL can only be speculated. Since ALA is a powerful antioxidant, the explanation of its protective mechanism can be similar to the protective effects of other dietary antioxidants against cervical cancer (inhibition of the proliferation of cancer cells, stabilization of the p53 protein, prevention of DNA damage and reduction in immunosuppression) [27]. The anti-inflammatory effects of ALA probably contribute to its efficiency, since inflammation is strongly associated with cancer and can predispose to tumours. Therefore, targeting inflammation and the molecules involved in the inflammatory process could represent a good strategy for cancer prevention and therapy [30]. A recent study showed that high hsCRP levels are significantly associated with a lower rate of SIL regression and suggested that monitoring hsCRP might help in monitoring LSIL [31]. ALA's known anti-inflammatory efficiency has also been supported by the results of this study, as shown by a significant reduction in all investigated inflammatory parameters (hsCRP, FI, SE) in the supplemented group of patients (as opposed to the inflammatory markers in the placebo group). The obtained results are consistent with the latest literature data, even though available data regarding the effects of alpha-lipoic acid (ALA) supplementation on inflammatory markers are controversial, the recent meta-analysis showed the promising impact of ALA administration on decreasing inflammatory markers, such as CRP, IL-6 and TNF- $\alpha$  among patients with metabolic disorders [32]. Therapeutic regimes used in the studies included in the meta-analysis were comparable to ours (300–600 mg ALA, 2 weeks–12 months). This could also have contributed to its efficiency in inducing the regression of LSIL.

Observed protective effects of ALA showed in this study might also be explained by its antiproliferative actions investigated by other authors: the ability to induce apoptosis through activating pyruvate dehydrogenase in tumour cells, the ability to act on different signalling pathways (activation of AMPK and subsequent down-regulation of mTOR-S6 signalling pathway or Grb2-mediated EGFR down-regulation), or the induction of ROS production in tumour cells [33–36].

Even though ALA is known to have antiviral effects against some viruses [37], its efficiency is probably not due to antiviral properties. Namely, HPV rates remained intact in both investigated groups, which is consistent with the results of studying other antioxidants in the prevention of cervical cancer, obtained by other authors [38].

Despite obvious advantages (randomized, placebo-controlled design and relatively high numbers of participants, in comparison to other similar intervention studies), this investigation had some limitations. The major limitations are short-period supplementation (3 months, which was due to financial and organizational limitations) and a relatively high median age of patients recruited for the study, resulting in low rates of spontaneous regression in the placebo group. Additionally, due to budget limitations, it was impossible to monitor the serum ALA levels of the participants, which would contribute significantly to the quality of conducted research, especially if we consider the short half-life and bioavailability of ALA (about 30%) triggered by its hepatic degradation and reduced solubility, as well as instability in the stomach [18]. Future studies should focus on the use of innovative formulations of ALA that might induce the therapeutic efficiency of ALA

against HPV infection and investigation of synergistic effects of dietary modification and ALA supplementation in both LSIL and HSIL regression.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/healthcare10122434/s1>, Table S1: Raw experimental data. Table S2: CONSORT 2010 checklist. Figure S1.: CONSORT 2010 Flow Diagram.

**Author Contributions:** Conceptualization A.D., I.R.S., Z.K. and D.V.Č.; investigation and methodology D.V.Č.; A.D., N.G., K.R., D.S., A.Š., P.T. and E.T.; statistical analysis and interpretation: M.G.R.; writing—original draft preparation, A.D. and D.V.Č.; writing—review and editing, D.V.Č. supervision, D.B.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry (no: 251-62-03-18-23; 19.04.2018.) and the Ethics Committee of the University Clinical Centre Tuzla (no: 02-09/2-61-16; 19.10.2016.). The trial is registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) ([Clinical-Trials.gov](https://clinicaltrials.gov), number NCT05485259).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author [D.V.C.] upon reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank to Zada Pharmaceuticals d.o.o. (Lukavac, Bosnia and Herzegovina) for the donation of alpha lipoic acid (ALA) and the formulation of placebo.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Richart, R.M. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet. Gynecol.* **1990**, *75*, 131–133.
2. Silveira, F.A.; Almeida, G.; Furtado, Y.L.; Cavalcanti, S.; Silva, K.S.; Maldonado, P.; Carvalho, M.G. The association of HPV genotype with the regression, persistence or progression of low-grade squamous intraepithelial lesions. *Exp. Mol. Pathol.* **2015**, *99*, 702–706. [[CrossRef](#)]
3. Koshiyama, M.; Nakagawa, M.; Ono, A. The Preventive Effect of Dietary Antioxidants Against Cervical Cancer Versus the Promotive Effect of Tobacco Smoking. *Healthcare* **2019**, *7*, 162. [[CrossRef](#)]
4. Barchitta, M.; Mageri, A.; Quattrocchi, A.; Agrifoglio, O.; Scalisi, A.; Agodi, A. The association of dietary patterns with high-risk human papillomavirus infection and cervical cancer: A cross-sectional study in Italy. *Nutrients* **2018**, *10*, 469. [[CrossRef](#)]
5. Hui, J.C.; Andy, H.L.; Linda, C.; Colin, W.B.; Daniel, X. A Review of Dietary Prevention of Human Papillomavirus-Related Infection of the Cervix and Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Nutr. Cancer* **2013**, *65*, 317–328. [[CrossRef](#)]
6. Erin, M.S.; Jason, L.S.; Luisa, L.V.; Alex, F.; Eduardo, L.F.; Anna, R.G. Dietary consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.* **2010**, *118*, 289–294. [[CrossRef](#)]
7. Feng, C.Y.; Lin, M.; Lakhany, D.; Sun, H.K.; Dai, X.B.; Zhao, F.H.; Qiao, Y.L. The association between dietary intake and cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or higher among women in a high-risk rural area of China. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2011**, *284*, 973–980. [[CrossRef](#)]
8. Jiang, B.; Xiao, S.; Khan, M.A.; Xue, M. Defective antioxidant systems in cervical cancer. *Tumor Biol.* **2013**, *34*, 2003–2009. [[CrossRef](#)]
9. Keefe, K.A.; Schell, M.J.; Brewer, C.; McHale, M.; Brewster, W.; Chapman, J.A.; Rose, G.S.; McMeeken, D.S.; Lagerberg, W.; Peng, Y.M.; et al. A randomized, double blind, Phase III trial using oral beta-carotene supplementation for women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2001**, *10*, 1029–1035.
10. Butterworth, C.E., Jr.; Hatch, K.D.; Soong, S.J.; Cole, P.; Tamura, T.; Sauberlich, H.E.; Borst, M.; Macaluso, M.; Baker, V. Oral folic acid supplementation for cervical dysplasia: A clinical intervention trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1992**, *166*, 803–809. [[CrossRef](#)]
11. Karamali, M.; Nourgostar, S.; Zamani, A.; Vahedpoor, Z.; Asemi, Z. The favourable effects of long-term selenium supplementation on regression of cervical tissues and metabolic profiles of patients with cervical intraepithelial neoplasia: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 2039–2045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Asemi, Z.; Vahedpoor, Z.; Jamilian, M.; Bahmani, F.; Esmailzadeh, A. Effects of long-term folic acid supplementation on metabolic status and regression of cervical intraepithelial neoplasia: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* **2016**, *32*, 681–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vahedpoor, Z.; Mahmoodi, S.; Samimi, M.; Gilasi, H.R.; Bahmani, F.; Soltani, A.; Sharifi, E.M.; Asemi, Z. Long-Term Vitamin D Supplementation and the Effects on Recurrence and Metabolic Status of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 or 3: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann. Nutr. Metab.* **2018**, *72*, 151–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



14. Tibullo, D.; Li Volti, G.; Giallongo, C.; Grasso, S.; Tomassoni, D.; Anfuso, C.D.; Lupo, G.; Amenta, F.; Avola, R.; Bramanti, V. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: Antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm. Res.* **2017**, *66*, 947–959. [CrossRef] [PubMed]
15. Harding, S.V.; Rideout, T.C.; Jones, P.J. Evidence for using alpha-lipoic acid in reducing lipoprotein and inflammatory related atherosclerotic risk. *J. Diet. Suppl.* **2012**, *9*, 116–127. [CrossRef] [PubMed]
16. Gomes, M.B.; Negrato, C.A. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2014**, *6*, 80. [CrossRef]
17. Šabanović, M.; Jašić, M.; Odobašić, A.; Aleksovska, E.S.; Pavljašević, S.; Bajraktarević, A.; Čepo, D.V. Alpha Lipoic Acid Reduces Symptoms and Inflammation Biomarkers in Patients with Chronic Hemorrhoidal Illness. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2018**, *88*, 281–290. [CrossRef]
18. Salehi, B.; Berkay, Y.Y.; Antika, G.; Boyunegmez, T.T.; Fawzi, M.M.; Lobine, D.; Akram, M.; Riaz, M.; Capanoglu, E.; Sharopov, F.; et al. Insights on the Use of  $\alpha$ -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules* **2019**, *9*, 356. [CrossRef]
19. Babić, D.; Sindik, J.; Missoni, S. Development and validation of a self-administered food frequency questionnaire to assess habitual dietary intake and quality of diet in healthy adults in the Republic of Croatia. *Coll. Antropol.* **2014**, *38*, 1017–1026.
20. Ovanin-Rakić, A.; Pajtler, M.; Stanković, T.; Audy-Jurković, S.; Ljubojević, N. Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice »ZAGREB 2002« Modifikacija klasifikacija »Zagreb 1990« i »NCI Bethesda system 2001«. *Gynaecol. Perinatol.* **2003**, *12*, 148–153.
21. Female Genital Tumors. Available online: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Female-Genital-Tumours-2020> (accessed on 11 November 2022).
22. Willett, W.C.; Sampson, L.; Stampfer, M.J.; Rosner, B.; Bain, C.; Witschi, J.; Hennekens, C.H.; Speizer, F.E. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Am. J. Epidemiol.* **1985**, *122*, 51–65. [CrossRef] [PubMed]
23. Kaić, R.A.; Antonić, K. *Tablice o Sastavu Namirnica i Pica*; Zavod za Zaštitu Zdravlja SR Hrvatske: Zagreb, Croatia, 1990.
24. U.S. Department of Agriculture; U.S. Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans. Available online: <https://health.gov/our-work/nutrition-physical-activity/dietary-guidelines/current-dietary-guidelines> (accessed on 11 November 2022).
25. Harry, W.; Haverkos, G.S.; Stacey, L.; Steckley, W.P. Cigarette smoking and cervical cancer: Part I: A meta-analysis. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 67–77.
26. Vinodhini, K.; Shanmughapriya, S.; Das, B.C.; Natarajaseenivasan, K. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2012**, *285*, 771–777. [CrossRef] [PubMed]
27. Koshiyama, M. The Effects of the Dietary and Nutrient Intake on Gynecologic Cancers. *Healthcare* **2019**, *7*, 88. [CrossRef]
28. Stefani, C.C.A.; Liverani, V.; Bianco, C.; Penna, T.; Guarnieri, C.; Comparetto, E.; Monti, I.; Valente, A.L.; Pieralli, C.; Fiaschi, M.; et al. Spontaneous regression of low-grade cervical intraepithelial lesions is positively improved by topical bovine colostrum preparations (GINEDIE®). A multicentre, observational, italian pilot study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2014**, *18*, 728–733.
29. Bekos, C.; Schwameis, R.; Heinze, G.; Gärner, M.; Grimm, C.; Joura, E.; Horvat, R.; Polterauer, S.; Polterauer, M. Influence of age on histologic outcome of cervical intraepithelial neoplasia during observational management: Results from large cohort, systematic review, meta-analysis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6383. [CrossRef]
30. Zappavigna, S.; Cossu, A.M.; Grimaldi, A.; Bocchetti, M.; Ferraro, G.A.; Nicoletti, G.F.; Filosa, R.; Caraglia, M. Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2605. [CrossRef]
31. Sangjeong, A.; Gi, J.K.; Sung, I.D.; Kyunge, K.; Hyunjoon, L.; In, G.D.; Dong, H.K.; Seoung, W.C.; Seungho, R.; Jin, H.S. High-sensitivity C-reactive Protein and Regression of Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion: The Role of Low-grade Inflammation in Cervical Carcinogenesis. *J. Epidemiol.* **2021**, *31*, 615–620. [CrossRef]
32. Akbari, M.; Ostadmohammadi, V.; Tabrizi, R.; Mobini, M.; Lankarani, K.B.; Moosazadeh, M.; Heydari, S.T.; Chamani, M.; Kolahdooz, F.; Asemi, Z. The effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammatory markers among patients with metabolic syndrome and related disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr. Metab.* **2018**, *5*, 15–39. [CrossRef]
33. Feuerecker, B.; Pirsig, S.; Seidl, C.; Aichler, M.; Feuchtinger, A.; Bruchelt, G.; Senekowitsch, S.R. Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 1425–1435. [CrossRef]
34. Jeon, M.J.; Kim, W.G.; Lim, S.; Choi, H.J.; Sim, S.; Kim, T.Y.; Shong, Y.K.; Kim, W.B. Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2016**, *419*, 113–123. [CrossRef] [PubMed]
35. Yang, L.; Wen, Y.; Lv, G.; Lin, Y.; Tang, J.; Lu, J.; Zhang, M.; Liu, W.; Sun, X.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits human lung cancer cell proliferation through Grb2-mediated EGFR down regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *494*, 325–331. [CrossRef]
36. Mounjaroen, J.; Nimmannit, U.; Callery, P.S.; Wang, L.; Azad, N.; Lipipun, V.; Chanvorachote, P.; Rojanasakul, Y. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 1062–1069. [CrossRef] [PubMed]
37. Cure, E.; Cumhur, C.M. Alpha-lipoic acid may protect patients with diabetes against COVID-19 infection. *Med. Hypotheses* **2020**, *143*, 110–185. [CrossRef] [PubMed]
38. Castañón, A.; Tristram, A.; Mesher, D.; Powell, N.; Beer, H.; Ashman, S.; Rieck, G.; Fielder, H.; Fiander, A.; Sasieni, P. Effect of diindolylmethane supplementation on low-grade cervical cytological abnormalities: Double-blind, randomised, controlled trial. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 45–52. [CrossRef] [PubMed]





Article

---

# Effect of Alpha Lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress and Lipid Parameters in Women Diagnosed with Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSILs): A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial

---

Anja Divković, Zinaida Karasalihović, Ivana Rumora Samarina, Damir Sabitović, Kristina Radić, Nikolina Golub, Lovorka Vujić, Marija Grdić Rajković and Dubravka Vitali Čepo

## Special Issue

Women's Special Issue Series: Antioxidants in Human Health

Edited by

Dr. Ruth Edge, Dr. Malgorzata Rozanowska and Dr. Simone Van Breda



<https://doi.org/10.3390/antiox12091670>



Article

# Effect of Alpha Lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress and Lipid Parameters in Women Diagnosed with Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSILs): A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial

Anja Divković<sup>1</sup>, Zinaida Karasalihović<sup>1</sup>, Ivana Rumora Samarin<sup>2</sup>, Damir Sabitović<sup>1</sup>, Kristina Radić<sup>3</sup>,  
Nikolina Golub<sup>3</sup>, Lovorka Vujić<sup>3</sup>, Marija Grdić Rajković<sup>3</sup> and Dubravka Vitali Čepo<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> University Clinical Centre Tuzla, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina; anja.divkovic1@gmail.com (A.D.); zinaida.karasalihovic@ukctuzla.ba (Z.K.)

<sup>2</sup> University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, 10000 Zagreb, Croatia; irumora@pbf.hr

<sup>3</sup> University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, 10000 Zagreb, Croatia; kradic@pharma.hr (K.R.); ngolub@pharma.hr (N.G.); lvujic@pharma.hr (L.V.); mgrdic@pharma.hr (M.G.R.)

\* Correspondence: dvitali@pharma.hr; Tel.: +385-919-471-064



Citation: Divković, A.; Karasalihović, Z.; Rumora Samarin, I.; Sabitović, D.; Radić, K.; Golub, N.; Vujić, L.; Rajković, M.G.; Vitali Čepo, D. Effect of Alpha Lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress and Lipid Parameters in Women Diagnosed with Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSILs): A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Antioxidants* 2023, 12, 1670. <https://doi.org/10.3390/antiox12091670>

Academic Editors: Malgorzata Rozanowska, Ruth Edge and Simone Van Breda

Received: 20 July 2023

Revised: 16 August 2023

Accepted: 22 August 2023

Published: 25 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Limited scientific evidence shows that alpha lipoic acid (ALA) can induce regression rates of low-grade squamous intraepithelial lesions (LSILs), but the mechanisms of these effects have not been elucidated. To gain a broader insight into its therapeutic potential and mechanisms of action, the effects of 3 months of supplementation with 600 mg of ALA on antioxidant and lipid status parameters in 100 patients with LSILs were investigated in a randomized, placebo-controlled study. The obtained results are discussed in terms of patients' initial metabolic status and diet quality (particularly nutritional intake of antioxidants). The obtained results showed that oxidative status biomarkers were not significantly affected by ALA supplementation. However, serum superoxide dismutase (SOD) activity was positively affected in the subgroup of patients with higher dietary antioxidant intake. Surprisingly, ALA supplementation resulted in a small but statistically significant increase in serum low density lipoprotein (LDL), and the observed effect was significantly affected by the initial lipid status of the participants. Larger studies are necessary to gain additional insights on the clinical significance of ALA as an antioxidant and hypolipemic agent and to optimize its potential application in LSIL treatment.

**Keywords:** alpha lipoic acid; lipid status parameters; oxidative stress parameters; LSIL; diet quality index

## 1. Introduction

Alpha lipoic acid (1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, 1,2-dithiolane-3-valeric acid or 6,8-thioctic acid—ALA) has recently generated considerable clinical interest as a biologically active agent that can be effective in relieving symptoms related to numerous diseases (diabetes, age-related cardiovascular illness, metabolic obesity, etc.). ALA functions as the cofactor of oxidative decarboxylation reactions in glucose metabolism; the function that requires the disulfide group of the lipoic acid to be reduced to its dithiol form, dihydrolipoic acid, DHLA. It has been proven that the same process contributes to its efficiency as an antioxidant in biological systems—ALA has specific structural properties characterized by a dithiolane ring, enabling the existence of both the oxidized and reduced form that together create a potent redox couple that has a standard reduction potential of  $-0.32$  V. This makes ALA a potent direct antioxidant capable of scavenging a variety of reactive oxygen species. Furthermore, it regenerates other antioxidants, chelates redox-active transition metals, and induces the uptake (or enhances the synthesis) of endogenous low molecular weight antioxidants or antioxidant enzymes [1]. Additionally, it has been proven to exert the wide

range of anti-inflammatory activities, including the reduction in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated release of inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, and LPS-induced expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) [2]. Recent investigation shows that by the combination of antioxidative and anti-inflammatory mechanisms, and through regulation of glucose homeostasis, ALA could also ameliorate lipid abnormalities in the hyper-lipemic and atherosclerotic environment *in vivo* [3,4].

The highest rates of clinical evidence exist for ALA's application for improving the symptoms of peripheral neuropathy in patients with diabetes, in dosages ranging from 600 to 1800 mg per day [5]. It can positively affect the lipid profile in certain groups of patients, primarily by affecting increased low-density lipoprotein (LDL) levels [6]. Recent meta-analyses of clinical research also showed that supplementation with ALA for 2–48 weeks can modestly reduce body weight by 0.7–2.3 kg and body mass index (BMI) by up to 0.5 kg/m<sup>2</sup> when compared with placebo in overweight individuals or patients with obesity [7]. Smaller studies indicate that ALA might be useful in the treatment of other diseases such as hemorrhoidal disease [8], Alzheimer disease [9] and male infertility [10].

A recent placebo-controlled study conducted by our research group proved the efficiency of a 3-month ALA supplementation (600 mg per day) in significantly inducing the rates of low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) regression, and its effect has been attributed, in part, to the significant anti-inflammatory effects observed in the intervention group [11]. These results are particularly significant in the context of the general lack of therapeutic guidelines and scarce literature data on the effectiveness of nutritive intervention for patients with LSILs that might prevent progression of this condition into higher-grade SIL or cervical cancer.

The major hypothesis of this follow-up investigation was that the observed effectiveness of ALA in inducing LSIL regression can also be attributed to its antioxidant activity. Therefore, the effect of a 3-month supplementation with 600 mg of ALA on the parameters of antioxidant status was investigated in the same group of women diagnosed with LSILs. Additionally, observed responses to supplementation were discussed in relation to diet characteristics of the study participants, having in mind that the human antioxidant defense system resists modulation by dietary antioxidants and might depend on nutritional intake of antioxidants [12]. The secondary goal of the study was to investigate the impact of supplementation with ALA on lipid parameters of LSIL patients. Namely, ALA has been shown as a promising lipid lowering agent in patients diagnosed with diabetes type 2 or metabolic syndrome, while data on metabolically healthy patients are lacking. Obtained results would contribute to the limited knowledge of the possible modes of action of ALA in LSILs; the impact of dietary patterns on the effectiveness of supplementation with antioxidants (such as ALA); and the modes of the hypolipemic effect of ALA.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

This study was registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) ([Clinical-Trials.gov](https://clinicaltrials.gov), number NCT05485259) and was performed in accordance with the international, national and institutional guidelines pertaining to clinical studies and biodiversity rights, and it also complies with the CONSORT guidelines (Table S1, Figure S1). This study was approved by the Ethics Committee of the University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry (no: 251-62-03-18-23) and the Ethics Committee of the University Clinical Centre Tuzla (no: 02-09/2-61-16). The progress of the study and potential side effects of ALA were monitored by the independent Data and Safety Monitoring Committee. Only the members of this committee were not blinded throughout the study and knew which group of patients received the treatment.

This study was designed as a double-blind, randomized, placebo-controlled trial that recruited 100 female patients with the diagnosis of LSILs, which was determined after cytological screening, colposcopy and a targeted biopsy as described in detail previously [11].

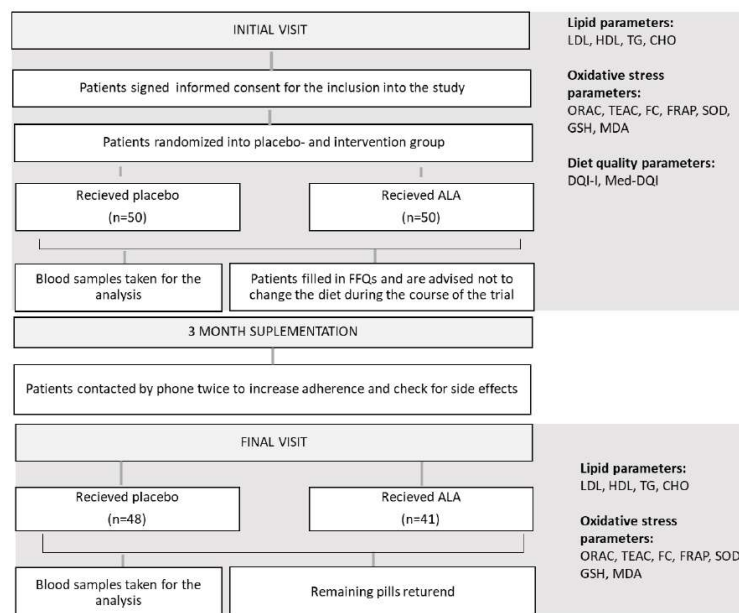


Exclusion criteria were diabetes, malignant diseases, chronic inflammatory diseases, hysterectomy, abortion, destructive therapy of the cervix, HPV vaccination and menopause. Patients who reported regular use of dietary supplements and lipid-lowering pharmacotherapy were also not eligible for inclusion into the study. All recruited patients signed the informed consent (Table S1) for inclusion in the study. Recruitment of study participants was conducted at the University Clinical Centre Tuzla in the period between January 2020 and March 2022.

The sample size was calculated by using a randomized clinical trial sample size formula ([www.rikcalc.org/samplesize](http://www.rikcalc.org/samplesize) (accessed on 15 May 2019)): type  $\alpha$  error was set at 5%; the study power was set at 85%; the ratio of the case to control was set to 1; and the expected dropout was 2%. The expected proportion of LSIL regression was set to 50% in the control group and in the treated group to 80%; the assumed dropout was 2%; and the superiority margin was set to 5%. Based on the used parameters, the total population study was determined to be 96 (48 subjects per group).

Block randomization was used to distribute participants to either the placebo or the intervention group in a 1:1 ratio. Patients were supplemented with either 600 mg per day of ALA (oral capsules containing all-rac ALA) or a placebo (provided as oral capsules containing rice starch, visually identical to ALA capsules) for 3 months. The capsules of both ALA and placebo were provided by Zada Pharmaceuticals (Lukavac, Bosnia and Herzegovina).

The organization and the chronological order of trial activities are schematically presented in Figure 1.



**Figure 1.** Flowchart of trial activities. ALA—alpha lipoic acid; LDL—low density lipoproteins; HDL—high density lipoproteins; TG—triglycerides; CHO—total cholesterol; ORAC—oxygen radical absorbance capacity; TEAC—Trolox equivalent antioxidant activity; FC—Folin-Ciocalteu reducing capacity; FRAP—ferric reducing activity; SOD—superoxide dismutase activity; GSH—reduced glutathione; MDA—malondialdehyde; DQI-I—Diet Quality Index-International; Med-DQI—Mediterranean Diet Quality Index; FFQ—Food Frequency Questionnaire.

At the initial appointment patients filled a standardized and validated semi-quantitative food questionnaire (FFQ) [13] with the help of trained staff to provide information on diet characteristics, use of dietary supplements, smoking, and physical activity. Through the course of the study, patients were contacted by telephone two times in order to improve the adherence and to check for the occurrence of any adverse effects. Three months after entry, participants were invited to the follow-up appointment.

At the initial and the follow-up appointment, blood samples were taken from the patients' cubital vein, using the standard procedure. Biochemical parameters (total cholesterol (CHO), LDL, high density lipoproteins (HDL), triglycerides (TG) and oxidative status indicators (oxygen radical absorbance capacity (ORAC); Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC); Folin–Ciocalteu reducing capacity (FC); ferric reducing activity (FRAP); superoxide dismutase (SOD) activity; reduced glutathione (GSH); and malondialdehyde (MDA) levels) were determined from the collected blood samples. Fasting venous blood was collected into a tube with serum separator gel at baseline and on the 90th day (BD Vacutainer, Becton Dickenson, NJ, USA). The serum was separated by centrifugation and multiple aliquots of each sample were either analyzed immediately (biochemical parameters) or stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for future analysis (oxidative stress parameters).

The capsules remaining after the 3-month supplementation period were to be returned for the adherence assessment. Patients were given advice not to change the level of physical activity or their eating habits throughout the course of the study.

## 2.2. Assessment of Biochemical Parameters

Biochemical parameters (CHO, LDL, HDL, and TG) were determined by standard laboratory procedures on an Architect ci8200 integrated system using the original reagents (Abbot Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

## 2.3. Assessment of Oxidative Status Parameters

### 2.3.1. Assessment of Total Antioxidant Capacity of Serum

Adequately diluted blood serums were used for all analyses. Spectrofluorometric and spectrophotometric measurements were conducted in 96-well plates using a Victor X3 plate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). ORAC assay was conducted according to the method of Ou and co-workers [14], which measures free radical oxidation of a fluorescent probe through the change in its fluorescence intensity. It is run to completion and the dynamic change in fluorescence of the probe over time is accounted for by calculating the area under the fluorescence decay curve (AUC). It compares the extent of the fluorescence quenching induced by the sample/standard/blank solution and considers both the inhibition degree and inhibition time, which is considered a methodological improvement. Fluorescence measurements were made at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Trolox was used for designing the calibration curves by plotting the AUC with corresponding Trolox concentrations. The results were expressed as  $\text{mg L}^{-1}$  of Trolox equivalents (TEs). A TEAC assay was performed according to the procedure of Re and co-workers [15], which measures the decrease in the absorbance of a preformed ABTS<sup>+</sup> solution in the presence of an antioxidant compound. The ABTS<sup>+</sup> chromophore (blue/green) is generated through the reaction between ABTS and potassium persulfate. The decolorization of ABTS<sup>+</sup> in the presence of an antioxidant, can be measured at 734 nm, and the results were expressed as  $\text{mg L}^{-1}$  TEs. The FC reducing capacity of the serum was determined according to the method of Ainswort and Gillespie [16], which relies on the transfer of electrons in alkaline medium from phenolic compounds to phosphomolybdic/phosphotungstic acid complexes, which are determined spectroscopically at 765 nm. Results were expressed as  $\text{mg L}^{-1}$  of gallic acid equivalents (GAE). The FRAP method [17] measures ferric to ferrous ion reduction in the presence of antioxidants at low pH, causing the formation of a ferrous-tripyridyl-triazine complex that can be measured spectrophotometrically at 593 nm. The obtained results are expressed as  $\mu\text{mol L}^{-1}$  TEs.



### 2.3.2. Assessment of the Activity of the Endogenous Antioxidant System

GSH was determined by the modified method of Machado and Soares [18], which measures the formation of the fluorescent complex between monochlorobimane and GSH that can be monitored at an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 460 nm. Results were expressed as  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . SOD activity was measured by using a 19160 SOD determination kit (Sigma-Aldrich St. Louis, MI, USA). This method measures the inhibition activity of SOD that can be monitored as a decrease in absorbance of a water-soluble formazan dye formed in the presence of the superoxide anion at 440 nm. Relative SOD activity is presented as % of absorbance inhibition (measured at 440 nm).

### 2.3.3. Assessment of Lipid Peroxidation

The determination of MDA was based on the method by [19] with a few modifications. The method is based on the reaction of thiobarbituric acid (TBA) and MDA. MDA under acidic conditions reacts with TBA in a ratio of 1:2, whereby a red pigment is formed, the absorbance of which is measured at 532 nm. 1,1,3,3 tetraethoxypropane has been used as the standard for the preparation of the calibration curve, and the obtained results were expressed as  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

## 2.4. Analysis of Dietary Characteristics and Calculation of Diet Quality Indexes

Semiquantitative FFQ used for the assessment of dietary characteristics was designed as a 192-item questionnaire with one month as the reference period of intake. It included questions on the frequency of consumption and the approximate amount of 100 dietary items listed, and additional queries about supplementation used and eating habits. The questionnaire was constructed as a modification of a previously published questionnaire [20] regarding serving sizes and the national specificity of foods. The study participants filled out the FFQ (with the help of a research team member if necessary). Average daily food intake was calculated for each participant based on the data reported in the FFQ. Dietary intake for selected nutrients was calculated using national food composition tables [21] and serving sizes according to USDA Dietary Guidelines for Americans, 2020–2025 [22].

The quality of dietary habits of participants was estimated by the calculation of specific indexes: the Diet Quality Index-International (DQI-I) that serves as a composite measure of general diet quality created to evaluate the healthfulness of a diet; and an index evaluating the compatibility of dietary habits to the concepts of the Mediterranean diet: Mediterranean Diet Quality Index (Med-DQI). For the DQI-I the defined score range is 0–100, where 100 indicates the highest quality of nutrition. The DQI-I focuses on four quality characteristics of a diet: variety (overall food group variety and within-group variety for protein), adequacy (vegetable, fruit and grain group; dietary fibre, protein, Fe, Ca and vitamin C), moderation (total fat, saturated fat, cholesterol, sodium and empty calorie foods) and overall balance (macronutrient ratio and fatty acid ratio) [23].

For the calculation of this index olive oil was added as particular category (with a score increasing with a lower intake, as opposed to cholesterol or saturated fat intake). The Protein intake category is divided into meat and fish intake (with intake of fish having an opposite gradient to meat). For the Med-DQI, every nutrient or food group is assigned three scores (0, 1 and 2) depending on either recommended guidelines or (where there was no specific recommendation for item) by dividing the population's consumption into tertials. The total Med-DQI for each subject is calculated by summing all scores. The best Med-DQI has a score of 0. Scores between 1 and 4 were considered as good; scores between 5 and 7 as medium to good; scores between 8 and 10 as under medium to poor; and scores between 11 and 13 as poor [24,25].

## 2.5. Statistical Analysis

GraphPad Prism Version 8.4.3 (GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA) and MedCalc statistical software ver.14.8.1.0. (MedCalc Software Lcd., Ostend, Belgium) were

used for statistical analysis. Results were presented as medians and interquartile ranges. For numerical variables nonparametric statistical tests were used (since the number of patients per group was rather low ( $n \leq 50$ )). To identify between-group differences either a Wilcoxon's paired-rank test or a Mann–Whitney's test was used. Comparison of binary outcomes was made by  $2 \times 2$  tabulation and a risk ratio (RR), 95% confidence intervals (CIs), and  $p$ -values were calculated.

### 3. Results

#### 3.1. The Baseline Characteristics of the Participants

A total of 100 female patients were included to this study and were allocated to placebo and intervention group in a 1:1 ratio. A total of 41 participants in the intervention group and 48 participants in the placebo group finished the study; the remaining patients ( $n = 11$ ) reported that they did not finish the study due to personal reasons.

The baseline characteristics of the study groups are presented in Table 1. Different lifestyle and selected diet characteristics that might have an impact on the antioxidant status of the participants were compared between the two arms. A complete list of diet characteristics of the study participants assessed by FFQ analysis is presented in Table S2.

**Table 1.** Baseline characteristics of placebo and intervention groups.

	Placebo Group ( $n = 48$ )	Intervention Group ( $n = 41$ )	$p$
Lifestyle characteristics			
<i>Age (years)</i>	37 (28–46)	43 (34–47)	0.082
<i>Cigarette smoking * (cigarettes per day)</i>	14	8	0.333
<i>Compliance * (returned tablets)</i>	35	28	0.405
Diet characteristics **			
<i>Energy (kcal)</i>	3104 (1937–4249)	3530 (2015–4404)	0.374
<i>Fruits (servings per week)</i>	2.78 (1.90–5.45)	3.66 (1.56–5.88)	0.365
<i>Vegetables (servings per week)</i>	3.49 (2.21–4.67)	4.17 (2.83–5.86)	0.252
<i>Animal protein (g/day)</i>	40.61 (24.33–62.90)	36.05 (23.29–54.07)	0.315
<i>Meat (servings per week)</i>	3.95 (2.25–7.37)	4.20 (2.54–7.24)	0.558
<i>Red meat (servings per week)</i>	2.66 (0.00–14.36)	4.05 (0.00–33.76)	0.852
<i>Fat (g)</i>	167.9 (99.7–252.5)	190.6 (103.6–293.8)	0.176
<i>Saturated fat (g)</i>	53.4 (29.6–85.5)	69.75 (34.26–103.7)	0.202
<i>Cholesterol (mg)</i>	290.4 (178.3–473.4)	291.6 (188.8–422.4)	0.809
<i>Vitamin C (mg)</i>	199.3 (139.0–302.4)	175.7 (95.91–321.1)	0.570
<i>Vitamin E (mg)</i>	21.44 (12.5–44.4)	33.61 (17.17–48.06)	0.262
<i>Carotenoids (mg)<sup>#</sup></i>	7.58 (4.54–15.0)	14.43 (6.363–18.65)	0.064
<i>DQI-I ***</i>	63.55 (57.4–67.7)	63.64 (55.00–68.79)	0.308
<i>Med-DQI ***</i>	9.00 (7.25–10.0)	9.00 (7.00–10.00)	0.516

Results are expressed as the medians (interquartile range); tested by Wilcoxon's paired-rank test. \* Results are expressed as numbers; tested by Fisher's exact test. \*\* Results are expressed as average daily intake. <sup>#</sup> Sum of beta carotene, Lutein, zeaxanthin and lycopene. \*\*\* Calculated using the data obtained by semiquantitative FFQ. DQI-I: Diet Quality Index-International; Med-DQI: Mediterranean Diet Quality Index. Part of the presented data that has been previously published [11] is written in italics.

As presented in Table 1, there were no significant differences in baseline characteristics or diet between the placebo and intervention groups. The age of participants, and the percentage of smokers in the two study groups were similar ( $p = 0.082$  and  $p = 0.332$ , respectively). The percentage of smokers in the placebo and the intervention group was 29.2% and 19.5%, respectively. Compliance was assessed based on the number of returned

unused capsules after a 3-month supplementation period and was high in both groups (80.6% and 84.4%, respectively).

Dietary characteristics relevant for antioxidant status and lipid profile were compared between the two groups of patients: intake of fruit and vegetables, vitamin C, vitamin E and carotenoids (as antioxidant, protective factors); intake of energy, meat, red meat, animal protein, saturated fat, unsaturated fat, and cholesterol (as factors that could possibly contribute to oxidative stress and dyslipidemia). General compliance of participants' dietary habits with general dietary guidelines or principles of the Mediterranean diet (quantified and expressed as the DQI-I and Med-DQI, respectively) has been compared between the groups. The analysis showed that there were no statistically significant differences between the placebo and intervention groups regarding any of the observed diet characteristics. Additional details on the intake of nutrients of study participants are presented in Table S2.

### 3.2. Impact of ALA Supplementation on Oxidative and Lipid Status Parameters

Impact of ALA supplementation on oxidative status parameters has been investigated previously in diabetic patients [26,27], patients with multiple sclerosis [28] and non-alcoholic liver disease [29] and patients on hemodialysis [30,31]. Obtained results varied significantly, depending on the oxidative stress marker and the significance of the observed effect (some studies showed significant impact of supplementation, others did not).

This investigation focused on serum total antioxidant capacity (TEAC, ORAC, FRAP and FC reducing potential), activity of antioxidant enzymes (SOD), status of endogenous antioxidants (GSH) and lipid peroxidation markers (MDA) of patients with LSILs after 3 months of ALA supplementation. Values between the placebo and the treated groups were compared at the initial visit and the 3-month follow-up visit and are presented in Table 2. The differences between the placebo and the treated group at the initial and the 3-month follow-up visits are presented in Table 3.

Table 2. Study outcomes at the initial visit and the 3-month follow-up (placebo vs. intervention).

	Placebo (n = 48)	Intervention (n = 41)	p*	Placebo (n = 48)	Intervention (n = 41)	p**
	initial measurement			3-month follow-up measurement		
MDA ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.566 (0.373–0.819)	0.604 (0.444–1.011)	0.151	0.546 (0.346–1.072)	0.617 (0.462–1.13)	0.472
FRAP ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ TE)	395.5 (336.2–445.1)	398.3 (360.9–449.1)	0.381	403.9 (345.0–462.8)	392.7 (374.6–428.8)	0.768
SOD (inhibition (%))	58.35 (51.64–64.16)	59.21 (54.23–66.31)	0.180	59.45 (52.15–63.89)	59.43 (53.15–64.12)	0.348
ORAC ( $\text{mg L}^{-1}$ TE)	5471 (4583–6295)	4741 (3600–6447)	0.488	4759 (3978–6310)	5222 (4145–6119)	0.184
TEAC ( $\text{mg L}^{-1}$ TE)	296.7 (272.1–328.5)	322.7 (282.5–352.8)	0.048	299.7 (273.4–326.0)	321.9 (298.3–351.0)	0.003
FC ( $\text{mg L}^{-1}$ GAE)	1316 (1181–1426)	1028 (697.3–1289)	0.005	1310 (1164–1454)	1157 (710.3–1291)	0.047
GSH ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	48.33 (44.54–54.60)	47.19 (44.21–51.63)	0.389	48.46 (45.37–54.29)	45.72 (42.04–50.57)	0.050
CHO ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	5.295 (4.658–6.110)	5.190 (4.680–6.220)	0.502	5.240 (4.753–6.083)	5.690 (5.225–6.650)	0.057
LDL ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	3.160 (2.473–3.700)	2.890 (2.600–3.895)	0.712	3.115 (2.543–3.668)	3.460 (2.840–4.080)	0.033
HDL ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	1.400 (1.270–1.633)	1.420 (1.185–1.740)	0.941	1.435 (1.200–1.620)	1.450 (1.235–1.890)	0.118
TG ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	1.120 (0.850–1.785)	1.260 (0.795–1.945)	0.320	1.040 (0.843–1.750)	1.180 (0.820–2.050)	0.402

Results are expressed as medians (interquartile range). Tested by Wilcoxon's paired-rank test. \* Comparing placebo and treated group of patients at initial visit. \*\* Comparing placebo and treated group of patients at the 3-month follow-up visit. MDA—malondialdehyde content; FRAP—ferric reducing power; SOD—superoxide dismutase activity; ORAC—oxygen radical absorbance capacity; TEAC—Trolox equivalent antioxidant activity; FC—Folin–Ciocalteu reducing capacity; GSH—reduced glutathione; CHO—total cholesterol; LDL—low-density lipoproteins; HDL—high density lipoproteins; and TG—triglycerides.

Changes in other anthropometric and biochemical parameters in the placebo and intervention groups are presented in Table S3.



Table 3. Changes in study outcomes between the initial and the 3-month follow-up appointments.

	Placebo Initial	Placebo 3-Month Follow-Up	<i>p</i> *	Intervention Initial	Intervention 3-Month Follow-Up	<i>p</i> **
MDA ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.566 (0.373–0.819)	0.546 (0.346–1.072)	0.420	0.604 (0.444–1.011)	0.617 (0.462–1.13)	0.327
FRAP ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ TE)	395.5 (336.2–445.1)	403.9 (345.0–462.8)	0.207	398.3 (360.9–449.1)	392.7 (374.6–428.8)	0.972
SOD (inhibition (%))	58.35 (51.64–64.16)	59.45 (52.15–63.89)	0.875	59.21 (54.23–66.31)	59.43 (53.15–64.12)	0.291
ORAC ( $\text{mg L}^{-1}$ TE)	5471 (4583–6295)	4759 (3978–6310)	0.264	4741 (3600–6447)	5222 (4145–6119)	0.226
TEAC ( $\text{mg L}^{-1}$ TE)	296.7 (272.1–328.5)	299.7 (273.4–326.0)	0.593	322.7 (282.5–352.8)	321.9 (298.3–351.0)	0.581
FC ( $\text{mg L}^{-1}$ GAE)	1316 (1181–1426)	1310 (1164–1454)	0.996	1028 (697.3–1289)	1157 (710.3–1291)	0.888
GSH ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	48.33 (44.54–54.60)	48.46 (45.37–54.29)	0.703	47.19 (44.21–51.63)	45.72 (42.04–50.57)	0.411
CHO ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	5.295 (4.658–6.110)	5.240 (4.753–6.083)	0.941	5.190 (4.680–6.220)	5.690 (5.225–6.650)	0.001
LDL ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	3.160 (2.473–3.700)	3.115 (2.543–3.668)	0.277	2.890 (2.600–3.895)	3.460 (2.840–4.080)	0.006
HDL ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	1.400 (1.270–1.633)	1.435 (1.200–1.620)	0.020	1.420 (1.185–1.740)	1.450 (1.235–1.890)	0.002
TGC ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	1.120 (0.850–1.785)	1.040 (0.843–1.750)	0.301	1.260 (0.795–1.945)	1.180 (0.820–2.050)	0.447

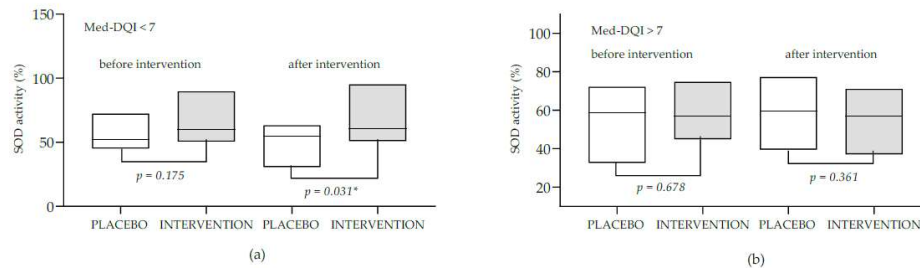
Results are expressed as medians (interquartile range). Tested by Wilcoxon's paired-rank test. \* Comparing placebo at initial visit and after a 3-month treatment. \*\* Comparing treated group at initial visit and after a 3-month treatment. MDA—malondialdehyde content; FRAP—ferric reducing power; SOD—superoxide dismutase activity; ORAC—oxygen radical absorbance capacity; TEAC—Trolox equivalent antioxidant activity; FC—Folin-Ciocalteu reducing capacity; GSH—reduced glutathione; CHO—total cholesterol; LDL—low-density lipoproteins; HDL—high density lipoproteins; and TG—triglycerides.

As presented in Table 2, at the initial measurement there were no significant differences between medians of MDA levels ( $p = 0.151$ ), FRAP ( $p = 0.381$ ), SOD ( $p = 0.180$ ), ORAC ( $p = 0.488$ ), or GSH ( $p = 0.389$ ) in the placebo and the intervention groups; TEAC was significantly higher ( $p = 0.048$ ) and FC reducing capacity was significantly lower in the intervention group ( $p = 0.005$ ). After the 3 months of supplementation the situation remained unchanged except for the GSH levels that were now significantly lower in the intervention group compared to the placebo ( $p = 0.050$ ). However, the apparent decrease of GSH values that was observed in the ALA-supplemented group after 3 months of supplementation was found to be statistically insignificant ( $p = 0.411$ ). Moreover, as presented in Table 3, none of the monitored oxidative status parameters were significantly changed, neither in the placebo nor in the intervention groups.

Diet characteristics can play a significant role in modulating the overall effectiveness of antioxidant supplements [32] by influencing the baseline host antioxidant status or through specific nutrient interactions—influencing the bioavailability of supplemental antioxidants or resulting in synergistic/antagonistic reactions. Therefore, a subgroup analysis was conducted to compare the ALA effectiveness in subgroups of patients with high (>11) and low (<7) Med-DQI (indicating low and high degree of adherence to Mediterranean dietary patterns). The Med-DQI was chosen because it quantifies the levels of adherence to the Mediterranean diet and dietary diversity, which are known to contribute to lower antioxidant and inflammation biomarkers [33–35].

Subgroup analysis showed that the effects of antioxidant supplementation on oxidative status biomarkers might be significantly affected by the patient's dietary characteristics. As presented in Figure 2, in the subgroup of patients with higher levels of compatibility with Mediterranean dietary patterns (Med-DQI < 7) supplementation with ALA showed positive effects on SOD activity (it prevented the decrease in SOD activity that was observed in the placebo group). This was not observed in the in the remaining patients (Med-DQI > 7).

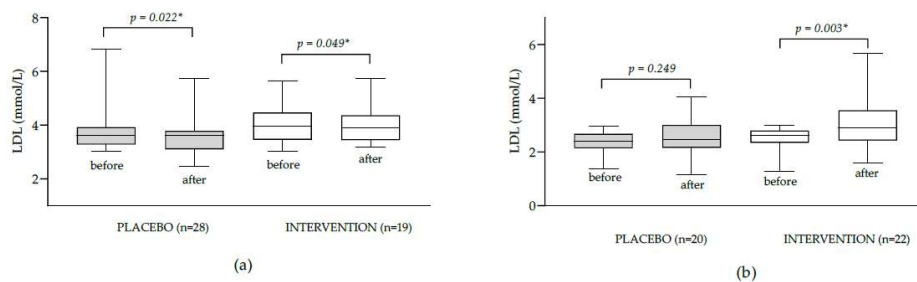
Impact of ALA on lipid parameters has been investigated to some extent with most available studies focused on patients with metabolic diseases showing that ALA might exert mild lipid lowering properties [6]. Considering ALA could provide clinically significant benefits in other indications not primarily associated with disturbances of the lipid profile (such as LSILs), it is of great importance to investigate its effect on lipid parameters in metabolically healthy patients. To investigate the effect of ALA supplementation on lipid parameters, LDL, HDL, TG and CHO values were investigated (Tables 2 and 3).



**Figure 2.** SOD activity in the subgroups of patients with Med-DQI < 7 (a) and Med-DQI > 7 (b) before and after ALA supplementation. Data are presented as medians (min to max values). Tested by Mann–Whitney test. \* The observed difference is statistically significant ( $p < 0.05$ ). SOD—superoxide dismutase activity; Med-DQI—Mediterranean Diet Quality Index.

As presented in Table 2, initially there were no significant differences in lipid parameters between the placebo and intervention groups. However, after 3 months, the supplementation LDL levels in the intervention group were significantly higher compared to the placebo group ( $p = 0.033$ ). Table 3 shows that during the 3-month supplementation period, CHO and LDL levels of the placebo group remained unchanged, while in the intervention group they increased from 5.19 to 5.69 ( $p = 0.001$ ) and from 2.89 to 3.46 ( $p = 0.006$ ). The obtained results are not consistent with the results of other authors who showed that ALA either decreased LDL or showed no significant effect [6]; however, those data were mostly obtained in studies focusing on patients with metabolic diseases and hyperlipidemia.

To test our hypothesis that ALA could have different effects on LDL levels depending on the initial lipid status, we conducted subgroup analyses focusing specifically on participants with hypercholesterolemia ( $LDL > 3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and specifically on normolipemic patients ( $LDL \leq 3.00 \text{ mmol L}^{-1}$ ). The obtained results are presented in Figure 3.



**Figure 3.** Impact of ALA supplementation on LDL status in subgroups of patients with hyperlipidemia ( $LDL > 3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (a) and normolipemic patients (b). Data are presented as medians (min to max values). Tested by Wilcoxon's paired-rank test. \* Difference is statistically significant ( $p < 0.05$ ).

In patients with hyperlipidemia supplementation with ALA resulted in a very small but statistically significant decrease in LDL values (the median decreased from 3.95 to 3.89  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $p = 0.049$ ); however, a more pronounced effect has been observed in the placebo group (with a decrease from 3.76 to 3.54  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $p = 0.022$ ). This might be explained by a possible positive modification of dietary and lifestyle habits of the patients upon recruitment into the dietary clinical study (despite clear instruction that dietary habits and lifestyle should not be changed during the study), which has been noted in the



literature [36]. In the subgroup of patients with normal LDL levels, a significant increase in LDL levels was observed in the intervention but not in the placebo group (median increased from 4.01 to 4.07 mmol L<sup>-1</sup>;  $p = 0.003$ ), which confirms our hypothesis that the effect of ALA supplementation on lipid status might be affected by the initial lipid status of the patient.

## 4. Discussion

### 4.1. Dietary Characteristics of Participants

Patient response to antioxidant supplementation is in great part conditioned by his general dietary habits and nutritional intake of antioxidants. For this purpose, it was important to investigate if dietary habits of the participants included in this study are comparable to the general population. As presented in Table S1, participants' diets were characterized with high median energy intake (3160 kcal), high medians of fat and saturated fat intake (186 g and 62.2 g, respectively), low medians of polyunsaturated fatty acid (PUFA)/saturated fatty acid (SF) and monounsaturated fatty acid (MUFA)/SF ratio (0.85 and 0.93, respectively). The intake of red meat was in line with recommendations (2.92 portions per week), but the intake of fish, fruits and vegetables were significantly lower, particularly for fish (0.54, 3.54 and 3.71 servings per week, respectively). Generally, it can be concluded that the participants of this study consumed a Western-type diet characterized with low DQI-I and Med-DQI (63.5 (out of 100) and 9 (categorized as medium to poor), respectively). This was reflected in the low intake of vitamins and minerals. While the intake of vitamin C, B-complex (except folate), vitamin E and vitamin A were above recommendations in >75% of patients, intake of vitamin D and folate was problematic and adequate intake was observed in only 3% and 38% of study participants, respectively. Among minerals, intake of Fe and Ca was particularly problematic and only a minority of patients had adequate intake (35% and 42%, respectively). Intake of sodium was higher than recommended in 28% of participants and intake of potassium was lower than recommended in 70% of participants.

Because this study has been conducted on women only, and due to the lack of precise data for nutritional habits in Bosnia and Herzegovina or surrounding countries, it was hard to assess if dietary habits of study participants are comparable to average habits of the general population. The obtained data were therefore compared to the dietary habits of women in eastern and central European countries, which were investigated previously in the frameworks of the HAPIEE study [37]. General dietary characteristics regarding nutritional quality, food group, energy and average micronutrient intakes were comparable; intake of fat, saturated fat and dietary fibers were somewhat higher in our study.

### 4.2. Impact of ALA Supplementation on Oxidative Status Parameters

Even though ALA has been recognized primarily as a potent antioxidant that exerts its action through different various direct and indirect mechanisms [1], our results showed that its application did not result in the significant change in any of the observed oxidative status parameters.

Clinical data obtained by other authors are scarce and inconsistent. Derosa and co-authors [26] showed that supplements containing 600 mg of ALA significantly reduced MDA levels and increased activities of SOD and GSH levels in diabetic patients after 3 months of supplementation. They observed a decrease in inflammation markers in the intervention group which is consistent with our previously published results [11]. Khalili and co-authors [27] found that SOD activity, glutathione peroxidase activity and MDA levels were not affected by consumption of 1200 mg of ALA for 3 months in patients with multiple sclerosis; however, TEAC values were positively affected. In patients with non-alcoholic liver disease 3 months of supplementation with 1200 mg of ALA significantly decreased MDA levels and increased the total antioxidant capacity of serum while other oxidative status parameters remained unaffected by ALA supplementation [28]. In patients with renal disease on hemodialysis, supplementation with ALA did not affect oxidative

status parameters [30,31]. In the pilot study by Huang and Gitelman [27], ALA was not an effective treatment for decreasing oxidative damage in adolescents with type 1 diabetes.

Inconsistencies in results obtained by various authors can be explained, in part, by differences in baseline characteristics of participants—pathologies, metabolic status, age, sex, supplementation protocols (600 mg vs. 1200 mg) or composition of tested supplements. For example, Derosa and co-workers [26] tested a multicomponent formulation, none of the studies included information about ALA isomer ratios in the tested formulations, etc.

Additionally, this study has been conducted exclusively on women which might have influenced the obtained results. Recent publications [38–40] have shown that the steady state redox status can differ significantly between men and women, showing higher antioxidant status in women, at least partially because of estrogen, even though the impact of other factors, such as age, diet, or smoking, seem to be of greater relevance. The impact of gender on the response to antioxidant supplementation has been investigated in two smaller studies indicating no significant differences in the responses between men and women [40,41].

It is important to emphasize that even though diet plays a significant role in modulating the overall effectiveness of antioxidant supplements [32], none of the above-mentioned studies investigated the diet characteristics of the participants and took those data into account when discussing study results. It was our assumption that the most important aspect of diet to be associated with the patient's response to antioxidant supplementation would be dietary intake of antioxidants, and the diet quality index that primarily considers this aspect of nutrition is the Med-DQI. Results of the conducted subgroup analysis based on the Med-DQI showed that supplementation with ALA positively affected SOD activity (Figure 2). This observation can be explained by the fact that ALA increases the gene expression of the primary antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) which can be monitored as the increase in activity in the serum [42]. In our study the effect was visible only in the subgroup of female patients with a high degree of adherence to a Mediterranean-type diet. A possible explanation of the obtained results is that in the state of higher oxidative stress increased SOD expression does not result in increased serum activity because SOD is being extensively used in cellular oxidative reactions. Contrary to that, high dietary intake of other antioxidants that reduce the formation of ROS (including superoxide anion) decreases the depletion of SOD so that the effect of ALA on SOD serum activity is visible and significant.

#### *4.3. Impact of ALA Supplementation on Lipid Parameters*

The obtained results pointing out a mild hyperlipidemic effect of ALA supplementation are partially inconsistent with the results obtained by other authors. Lipid-reducing properties of ALA have been proven in numerous studies, but due to heterogeneity of the studied populations and dosing regimens (400–1200 mg/day) it is hard to estimate its actual clinical effectiveness in hypercholesterolemia. A meta-analysis by Haghghatdoost and Hariri [6] showed that ALA may significantly decrease total CHO, LDL and TG levels but that the results obtained so far are contradictory and more research is needed to draw more specific conclusions. A more recent meta-analysis [43] found that the observed effects of ALA in diabetic patients were not clinically significant.

As mentioned previously, most of the available research has been focused on patients with metabolic diseases with pronounced dyslipidemia while our study focused on metabolically healthy patients which might have contributed to the observed lack of a hypocholesterolemic effect of ALA. The conducted subgroup analysis (Figure 3) revealed that the effect of ALA supplementation in patients with hyperlipidemia causes a slight, but statistically significant, decrease in LDL levels which is consistent with the results of other studies [6]. On the contrary, supplementation of patients with normal LDL levels led to significantly increased LDL levels, which has not been shown before (to our knowledge).

Additionally, since this study was conducted in exclusively female patients, gender-related differences might have contributed to differences of our results compared to the



other available research. Namely, to our knowledge, the impact of ALA on lipid parameters has not been investigated in exclusively female patients. According to Ordovas and co-workers [44] women may be less responsive to dietary intervention in terms of LDL cholesterol lowering. Additionally, men and women respond differently to statin therapy and the observed effects have not been thoroughly investigated. They are assumed to include multiple mechanism differences in therapy adherence, gene polymorphisms or hormonal differences [45,46] that might also be involved in the regulation of responses to ALA supplementation.

The observed effect of ALA supplementation is related to its mechanism of lipid-lowering action which has not been totally elucidated. The mechanism is thought to be multifactorial—ALA is probably capable of initiating LDL receptor synthesis in the liver which in turn increases the uptake of cholesterol back to the hepatic system and increases synthesis of apoprotein A component [47]. A possible impact on lipoprotein lipase activity and inhibition of HMG-CoA reductase have also been suggested [48,49]. It is possible to hypothesize that the lipid-lowering effects of ALA can only be manifested in patients with a certain level of dysfunction regarding the lipid metabolism and that it depends on the initial lipid status of the patients. This hypothesis is partially backed up by the conclusions of several clinical studies conducted in normolipemic patients or patients with a lower degree dyslipidemia. For example, Gosselin and co-authors [50] showed that ALA is not effective in modulating serum lipids in prediabetic patients, and Iannuzzo and co-authors [51] showed that ALA had no effect on body weight and blood lipid levels in (mainly normolipemic) schizophrenic subjects. Further studies are necessary to elucidate the exact mechanisms of the lipid-lowering effects of ALA and the importance of initial lipid status and dosing regimen on the clinical effects of supplementation.

## 5. Conclusions

The results of the conducted trial demonstrate that monitored oxidative stress biomarkers of patients with a LSIL diagnosis and adherence to a typical western-style diet are not significantly affected by 3 months of supplementation with 600 mg of ALA. Subgroup analysis showed that the impact of ALA supplementation on oxidative status parameters might be significantly affected by the diet quality of the participants, particularly by the degree of compliance to a Mediterranean dietary pattern. Unexpectedly, ALA supplementation resulted with a small but statistically significant increase in LDL and CHO levels, indicating that the lipid-lowering effect of ALA observed in some studies might depend on the initial lipid status of the participants (which has been confirmed by post-hoc subgroup analysis).

The obtained results contribute significantly to the current knowledge on the possibilities and limitations of the utilization of ALA as a dietary supplement and provide additional insight into the possible mechanisms of actions. Larger studies are necessary, that will enable a more comprehensive investigation of significant confounding factors. Additionally, having in mind the relatively low and variable bioavailability of ALA, the impact of supplementation of ALA levels/status should be monitored and considered when interpreting the obtained data.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox12091670/s1>. Figure S1: CONSORT 2010 Flow Diagram; Table S1: CONSORT 2010 checklist of information to include when reporting a randomized trial\*; Table S2: Diet characteristics of study participants as assessed by semiquantitative Food Frequency Questionnaire (FFQ); Table S3: Changes in other anthropological and biochemical markers between the initial and the 3-month follow-up appointment in placebo and intervention groups.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.D., I.R.S., Z.K. and D.V.Č.; investigation and methodology, D.V.Č., A.D., N.G., K.R., D.S. and L.V.; data analysis and interpretation, M.G.R. and D.V.Č.; writing—original draft preparation, D.V.Č.; writing—review and editing, K.R., M.G.R. and L.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the FarmInova project [grant number KK.01.1.1.02.0021] funded by the European Regional Development Fund. The work of doctoral student Nikolina Golub was fully supported by the “Young researchers’ career development project—training of doctoral students” of the Croatian Science Foundation [grant number HRZZ-DOK-2021-02-6801].

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University of Zagreb. Faculty of Pharmacy and Biochemistry (no: 251-62-03-18-23; 19 April 2018) and the Ethics Committee of the University Clinical Centre Tuzla (no: 02-09/2-61-16; 19 October 2016). The trial is registered at [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), number NCT05485259). Written informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author (D.V.Č.) upon reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Zada Pharmaceuticals d.o.o. (Lukavac, Bosnia and Herzegovina) for the donation of alpha lipoic acid (ALA) and formulation of the placebo. The authors would like to thank Gordana Blažinić for the technical assistance during the preparation of the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Shay, K.P.; Moreau, R.F.; Smith, E.J.; Smith, A.R.; Hagen, T.M. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* **2009**, *1790*, 1149–1160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, G.; Fu, J.; Zhao, Y.; Ji, K.; Luan, T.; Zang, B. Alpha-Lipoic Acid Exerts Anti-Inflammatory Effects on Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Mesangial Cells via Inhibition of Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) Signaling Pathway. *Inflammation* **2014**, *38*, 510–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, Y.; Han, P.; Wu, N.; He, B.; Lu, Y.; Li, S.; Liu, Y.; Zhao, S.; Liu, L.; Li, Y. Amelioration of Lipid Abnormalities by  $\alpha$ -Lipoic acid Through Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects. *Obesity* **2011**, *19*, 1647–1653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Theodosis-Nobelos, P.; Papagiouvanis, G.; Tziona, P.; Rekkas, E.A. Lipoic acid. Kinetics and pluripotent biological properties and derivatives. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 6539–6550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Abubaker, S.A.; Alonazy, A.M.; Abdulrahman, A. Effect of Alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Diabetic Neuropathy: A Systematic Review. *Cureus* **2022**, *14*, e25750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Haghighatdoost, F.; Hariri, M. Does alpha-lipoic acid affect lipid profile? A meta-analysis and systematic review on randomized controlled trials. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *847*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Namazi, N.; Larijani, B.; Azadbakht, L. Alpha-lipoic acid supplement in obesity treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clin. Nutr.* **2017**, *37*, 419–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Šabanović, M.; Jašić, M.; Odobašić, A.; Aleksovska, E.S.; Pavljašević, S.; Bajraktarević, A.; Čepo, D.V. Alpha Lipoic Acid Reduces Symptoms and Inflammation Biomarkers in Patients with Chronic Hemorrhoidal Illness. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2018**, *88*, 281–290. [[CrossRef](#)]
- Hager, K.; Kenklies, M.; McAfoose, J.; Engel, J.; Münch, G.  *$\alpha$ -Lipoic Acid as a New Treatment Option for Alzheimer’s Disease—A 48 Months Follow-Up Analysis*; Springer: Vienna, Austria, 2007; pp. 189–193. [[CrossRef](#)]
- Dong, L.; Yang, F.; Li, J.; Li, Y.; Yu, X.; Zhang, X. Effect of oral alpha-lipoic acid (ALA) on sperm parameters: A systematic review and meta-analysis. *Basic Clin. Androl.* **2022**, *32*, 23. [[CrossRef](#)]
- Divković, A.; Radić, K.; Sabitović, D.; Golub, N.; Rajković, M.G.; Samarina, I.R.; Karasalihović, Z.; Šerak, A.; Trnačević, E.; Turčić, P.; et al. Effect of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions—Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Healthcare* **2022**, *10*, 2434. [[CrossRef](#)]
- Halliwel, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *75*, 637–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rabić, D.; Sindik, J.; Missoni, S. Development and validation of a self-administered food frequency questionnaire to assess habitual dietary intake and quality of diet in healthy adults in the Republic of Croatia. *Coll. Antropol.* **2014**, *38*, 1017–1026. [[PubMed](#)]
- Ou, B.; Chang, T.; Huang, D.; Prior, R.L. Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2012.23. *J. AOAC Intern.* **2013**, *96*, 1372–1376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



16. Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 875–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. Available online: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796902924> (accessed on 24 July 2023). [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Machado, M.D.; Soares, E.V. Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 1509–1516. [[CrossRef](#)]
19. Drury, J.A.; Nycyk, J.A.; Cooke, R.W. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin. Chim. Acta* **1997**, *263*, 177–185. [[CrossRef](#)]
20. Al-Shaar, L.; Yuan, C.; Rosner, B.; Dean, S.B.; Ivey, K.L.; Clowry, C.M.; A Sampson, L.; Barnett, J.B.; Rood, J.; Harnack, L.J.; et al. Reproducibility and Validity of a Semiquantitative Food Frequency Questionnaire in Men Assessed by Multiple Methods. *Am. J. Epidemiol.* **2020**, *190*, 1122–1132. [[CrossRef](#)]
21. Kaić-Rak, A.; Antonić, K. *Tablice o Sastavu Namirnica i Pica*; Zavod Za Zaštitu Zdravlja SR Hrvatske: Zagreb, Croatia, 1990.
22. *Dietary Guidelines for Americans*, 9th ed; U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services: Washington, DC, USA, 2020; pp. 2020–2025.
23. Kim, S.; Haines, P.S.; Siega-Riz, A.M.; Popkin, B.M. The Diet Quality Index-International (DQI-I) Provides an Effective Tool for Cross-National Comparison of Diet Quality as Illustrated by China and the United States. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3476–3484. [[CrossRef](#)]
24. Gerber, M. Qualitative methods to evaluate Mediterranean diet in adults. *Public Health Nutr.* **2006**, *9*, 147–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Baldini, M.; Pasqui, F.; Bordonni, A.; Maranesi, M. Is the Mediterranean lifestyle still a reality? Evaluation of food consumption and energy expenditure in Italian and Spanish university students. *Public Health Nutr.* **2009**, *12*, 148–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. DeRosa, G.; D’Angelo, A.; Romano, D.; Maffioli, P. A Clinical Trial about a Food Supplement Containing  $\alpha$ -Lipoic Acid on Oxidative Stress Markers in Type 2 Diabetic Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1802. [[CrossRef](#)]
27. Huang, E.A.; Gitelman, S.E. The effect of oral alpha-lipoic acid on oxidative stress in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr. Diabetes* **2008**, *9*, 69–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Khalili, M.; Eghtesadi, S.; Mirshafiey, A.; Eskandari, G.; Sanoobar, M.; Sahraian, M.A.; Motevalian, A.; Norouzi, A.; Moftakhar, S.; Azimi, A. Effect of lipoic acid consumption on oxidative stress among multiple sclerosis patients: A randomized controlled clinical trial. *Nutr. Neurosci.* **2013**, *17*, 16–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Amirkhizi, F.; Hamed-Shahraki, S.; Hosseinpour-Arjmand, S.; Vaghef-Mehrabany, E.; Ebrahimi-Mameghani, M. Effects of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress Status in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Iran. Red Crescent Med. J.* **2018**, *20*, 11. [[CrossRef](#)]
30. Ahmadi, A.; Mazooji, N.; Roozbeh, J.; Mazloom, Z.; Hassanzadeh, J. Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients. *Iran. J. Kidney Dis.* **2013**, *7*, 461.
31. Khabbazi, T.; Mahdavi, R.; Safa, J.; Pour-Abdollahi, P. Effects of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Inflammation, Oxidative Stress, and Serum Lipid Profile Levels in Patients with End-Stage Renal Disease on Hemodialysis. *J. Ren. Nutr.* **2012**, *22*, 244–250. [[CrossRef](#)]
32. Draeger, C.L.; Naves, A.; Marques, N.; Baptistella, A.B.; Carnauba, R.A.; Paschoal, V.; Nicastró, H. Controversies of antioxidant vitamins supplementation in exercise: Ergogenic or ergolytic effects in humans? *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2014**, *11*, 4. [[CrossRef](#)]
33. Bettermann, E.L.; Hartman, T.J.; A Easley, K.; Ferranti, E.P.; Jones, D.P.; A Quyyumi, A.; Vaccarino, V.; Ziegler, T.R.; A Alvarez, J. Higher Mediterranean Diet Quality Scores and Lower Body Mass Index Are Associated with a Less-Oxidized Plasma Glutathione and Cysteine Redox Status in Adults. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 245–253. [[CrossRef](#)]
34. Kim, J.Y.; Yang, Y.J.; Yang, Y.K.; Oh, S.-Y.; Hong, Y.-C.; Lee, E.-K.; Kwon, O. Diet quality scores and oxidative stress in Korean adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2011**, *65*, 1271–1278. [[CrossRef](#)]
35. Fung, T.T.; McCullough, M.L.; Newby, P.; E Manson, J.; Meigs, J.B.; Rifai, N.; Willett, W.C.; Hu, F.B. Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 163–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mirmiran, P.; Bahadoran, Z.; Gaeini, Z. Common Limitations and Challenges of Dietary Clinical Trials for Translation into Clinical Practices. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **2021**, *19*, e108170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Boylan, S.; Welch, A.; Pikhart, H.; Malyutina, S.; Pajak, A.; Kubinova, R.; Bragina, O.; Simonova, G.; Stepaniak, U.; Gilis-Januszewska, A.; et al. Dietary habits in three Central and Eastern European countries: The HAPIEE study. *BMC Public Health* **2009**, *9*, 439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Weber, D.; Stuetz, W.; Toussaint, O.; Debaqç-Chainiaux, F.; Dollé, M.E.T.; Jansen, E.; Gonos, E.S.; Franceschi, C.; Sikora, E.; Hervonen, A.; et al. Associations between Specific Redox Biomarkers and Age in a Large European Cohort: The MARK-AGE Project. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1401452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Pinchuk, I.; Weber, D.; Kochlik, B.; Stuetz, W.; Toussaint, O.; Debaqç-Chainiaux, F.; Dollé, M.E.; Jansen, E.H.; Gonos, E.S.; Sikora, E.; et al. Gender- and age-dependencies of oxidative stress, as detected based on the steady state concentrations of different biomarkers in the MARK-AGE study. *Redox Biol.* **2019**, *24*, 101204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Goldfarb, A.H.; McKenzie, M.J.; Bloomer, R.J. Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: Influence of antioxidant supplementation. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2007**, *32*, 1124–1131. [[CrossRef](#)]

41. Actis-Goretta, L.; Carrasquedo, F.; Fraga, C.G. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *349*, 97–103. [[CrossRef](#)]
42. Fayez, A.M.; Zakaria, S.; Moustafa, D. Alpha lipoic acid exerts antioxidant effect via Nrf2/HO-1 pathway activation and suppresses hepatic stellate cells activation induced by methotrexate in rats. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 428–433. [[CrossRef](#)]
43. Jibril, A.T.; Jayedi, A.; Shab-Bidar, S. Efficacy and safety of oral alpha-lipoic acid supplementation for type 2 diabetes management: A systematic review and dose–response meta-analysis of randomized trials. *Endocr. Connect.* **2022**, *11*, e220322. [[CrossRef](#)]
44. Ordovas, J.M.; Shen, H. Pharmacogenetics of lipid-lowering therapies. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2002**, *4*, 183–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Cangemi, R.; Romiti, G.F.; Campolongo, G.; Ruscio, E.; Sciomer, S.; Gianfrilli, D.; Raparelli, V. Gender related differences in treatment and response to statins in primary and secondary cardiovascular prevention: The never-ending debate. *Pharmacol. Res.* **2017**, *117*, 148–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhang, R.; Zhao, L.; Liang, L.; Xie, G.; Wu, Y. Factors explaining the gender disparity in lipid-lowering treatment goal attainment rate in Chinese patients with statin therapy. *Lipids Health Dis.* **2012**, *11*, 59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. 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. Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 1114–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ichikawa, T.; Liang, J.; Kitajima, S.; Koike, T.; Wang, X.; Sun, H.; Morimoto, M.; Shikama, H.; Watanabe, T.; Yamada, N.; et al. Macrophage-derived lipoprotein lipase increases aortic atherosclerosis in cholesterol-fed Tg rabbits. *Atherosclerosis* **2005**, *179*, 87–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Matsugo, S.; Yan, L.J.; Konishi, T. An antioxidant inhibits protein oxidative modification of human low density lipoprotein and reduces plasma cholesterol levels by the inhibition of HMG-CoA reductas. *BBRC* **1997**, *243*, 819–824.
50. Gosselin, L.E.; Chrapowitzky, L.; Rideout, T.C. Metabolic effects of  $\alpha$ -lipoic acid supplementation in pre-diabetics: A randomized, placebo-controlled pilot study. *Food Funct.* **2019**, *10*, 5732–5738. [[CrossRef](#)]
51. Iannuzzo, F.; Basile, G.A.; Campolo, D.; Genovese, G.; Pandolfo, G.; Giunta, L.; Ruggeri, D.; Di Benedetto, A.; Bruno, A. Metabolic and clinical effect of alpha-lipoic acid administration in schizophrenic subjects stabilized with atypical antipsychotics: A 12-week, open-label, uncontrolled study. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* **2022**, *3*, 100116. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## ŽIVOTOPIS

Anja Divković rođena je 23.03.1990. godine u Tuzli gdje je završila osnovnu školu i opću gimnaziju Katolički školski centar „Sveti Franjo“ u Tuzli, kao i osnovnu i srednju muzičku školu „Čestmir Mirko Dušek“, nakon čega upisuje Farmaceutski fakultet u Tuzli 2008. godine. Diplomirala je 2013. godine a stručni ispit položila 2014. godine. Poslijediplomski doktorski studij, grana medicinska-biokemija, na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2015. godine. Od 2016. godine zaposlena je u JZU Univerzitetском kliničkom centru u Tuzli, u Poliklinici za laboratorijsku dijagnostiku u Zavodu za medicinsku biokemiju gdje obavlja poslove specijaliste medicinske biokemije i laboratorijske dijagnostike. Specijalizaciju iz medicinske biokemije i laboratorijske dijagnostike završila je 2021. godine. Učestvovala je na brojnim stručnim regionalnim i međunarodnim kongresima, konferencijama i seminarima kao i tečajevima trajne edukacije organiziranih od strane Hrvatske komore medicinskih biokemičara. Od 2019. godine sudjeluje u izvođenju vježbi iz laboratorijske nastave iz Kliničke biokemije na katedri za medicinsku biokemiju Farmaceutskog fakulteta i Medicinskog fakulteta u Tuzli kao asistent - stručnjak iz prakse. Aktivno poznaje engleski jezik te se služi i njemačkim jezikom. Član je Komore magistara farmacije Tuzlanskog kantona, Komore medicinskih biokemičara Bosne i Hercegovine, Udruženja medicinskih biokemičara Bosne i Hercegovine i Europske Federacije kliničke kemije i laboratorijske medicine (engl. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, EFLM).

### **Popis objavljenih znanstvenih radova i radova u zbornicima skupova:**

1. Halilčević M, Tvica A, Halilčević D, Mujagić S, Mešanović N, Mehmedović Z, Kozarević H, Božo J, Salihodžić A, Gulamović A, Divković A. D-dimer as a sensitive and a very nonspecific parameter for the diagnosis of pulmonary embolism. *Acta Medica Saliniana*. 2024; (rad prihvaćen za objavu 14.02.2024. godine).

2. Divković A, Karasalihović Z, Rumora Samarin I, Sabitović D, Radić K, Golub N, Vujić L, Grdić Rajković M, Vitali Čepo D. Effect of Alpha Lipoic Acid Supplementation on Oxidative Stress and Lipid Parameters in Women Diagnosed with Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (LSILs): A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Antioxidants*. 2023;12(9):1670.

- 3.Divković A, Radić K, Sabitović D, Golub N, Gedić Rajković M, Rumora Samarin I, Karasalihović Z, Šerak A, Trnačević E, Turčić P, Butorac D, Vitali Čepo D. Effect of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions-Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Healthcare*. 2022;10(12):2434.
- 4.Divković A, Bilić P, Ivanko M, Zonjić I, Radić K, Golub N, Grdić Rajković M, Rumora I, Stojanović I, Butorac D, Vitali Čepo D. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers in patients with lsil. *International Journal of Gynecological Cancer* 32(Suppl 2):A54.2-A54. Conference: RA-1340-ESGO 2022. Berlin Congress.
- 5.Divković A, Karasalihović Z, Šerak A, Trnačević E, Radić K, Golub N, Grdić Rajković M, Stojanović I, Butorac D, Vitali Čepo D. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on regression of low-grade squamous intraepithelial lesions. *International Journal of Gynecological Cancer* 32(Suppl 2):A39.2-A39. Conference: RA-1037-ESGO 2022. Berlin Congress.
- 6.Mustafić S, Jusufović E, Hukić F, Trnačević E, Divković A, Trnačević A. Early predictors of severity and mortality in COVID-19 hospitalized patients. *Medicinski glasnik*. 2021;18(2).
- 7.Trnačević E, Salkić N, Trnačević A, Divković A, Hukić F, Butković N, Šerak A, Mujkanović A. Concordance of non-invasive serology-based scoring indices and transient elastography for liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis C. *Medicinski glasnik*. 2021;18(1):70-76.
- 8.Jašić M, Salihefendić N, Zildžić M, Šubarić D, Divković A. Poremećaji u prehrani. *Deseti Štamparovi dani, Hranom do zdravlja*. Pleternica, 2018.
- 9.Divković A, Jašić M, Vitali Čepo D, Tursunović S, Azabagić A. Sastojci iz hrane i dodataka prehrani koji utječu na koagulaciju krvi. *Osmi internacionalni simpozijum, Hranom do zdravlja*. Osijek, 2015;18-19.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

### UČINKOVITOST SUPLEMENTACIJE A-LIPOIČNOM KISELINOM KOD PREMALIGNIH PROMJENA VRATA MATERNICE

Anja Divković

#### SAŽETAK

Premaligne lezije vrata maternice etiološki su vezane uz infekciju humanim papiloma virusom (HPV) i posljedičan razvoj upale i oksidativnog stresa zbog čega bi se antioksidansi mogli smatrati učinkovitim protiv progresije skvamozne intraepitelne lezije niskog stupnja (engl. *low grade SIL*, LSIL). Recentna istraživanja pokazuju da je  $\alpha$ -lipoična kiselina (ALA) jedan od najpotentnijih prirodnih antioksidanasa s još uvijek ograničenom terapijskom primjenom u liječenju bolesti povezanih s upalom i oksidativnim stresom. Cilj ove randomizirane, dvostruko slijepe placebom kontrolirane studije je istražiti učinkovitost suplementacije ALA-om (600 mg/dne) na regresiju LSIL-a na uzorku od 100 pacijentica te dobiti širi uvid u terapijski potencijal i mehanizme djelovanja ALA-e na oksidativni stres, upalne biljege i parametre lipidnog statusa. Prisutnost LSIL-a utvrđena je nakon citološkog probira, kolposkopskog pregleda i ciljane biopsije te histološke potvrde citološko-kolposkopske dijagnoze. Parametri oksidativnog stresa, upale, lipidnog statusa i prisustvo HPV-a su utvrđeni standardnim laboratorijskim metodama. Prehrambene i životne navike istražene su korištenjem standardiziranog i validiranog semikvantitativnog upitnika o konzumiranju hrane i pića (engl. *Food Frequency Questionnaire*, FFQ). Dobiveni rezultati pokazali su da je suplementacija ALA-om znatno reducirala broj pacijentica s citološkim abnormalnostima niskog stupnja u odnosu na pacijentice koje su uzimale placebo. Uzimajući u obzir dobivenu razinu značajnosti ( $p < 0,001$ ), prezentirani rezultati upućuju da kratkoročna suplementacija ALA-om pokazuje klinički značajan učinak na cervikalnu citologiju. Intervencija nije imala značajan utjecaj na parametre antioksidativnog statusa iako je antioksidativni kapacitet seruma (Trolox ekvivalentni antioksidativni učinak (engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*, TEAC),

kapacitet vezanja kisikovih radikala (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) i Folin-Ciocalteu redukcijski potencijal (engl. *Folin-Ciocalteu*, FC)) bio povećan nakon suplementacije kod određenih podskupina pacijentica u ovisnosti o njihovom unosu antioksidanasa hranom. Utjecaj suplementacije ALA-om na lipemiju ovisio je o inicijalnom lipidnom statusu pacijentica. Buduće studije bi trebale biti usmjerene na istraživanje učinkovitosti dugoročnije terapije ALA-om (duže od 3 mjeseca) te uključiti i pacijentice s visokim stupnjem SIL-a. Također bi se trebale usmjeriti na istraživanje inovativnih formulacija ALA-e s povećanom bioraspoloživošću, te na istraživanje sinergističkih učinaka modificiranog životnog stila i suplementacije ALA-om.

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

Rad sadrži: 172 stranice, 10 grafičkih prikaza, 9 tablica i 269 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: skvamozna intraepitelna lezija niskog stupnja (LSIL), humani papiloma virus (HPV),  $\alpha$ -lipoična kiselina (ALA), parametri antioksidativnog statusa, parametri upale, parametri lipidnog statusa, indeks kvalitete prehrane

Mentori: **Prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

**Doc. dr. med. sci. Zinaida Karasalihović**, specijalista patološke anatomije

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

**Doc. dr. sc. Alan Šerman**, specijalist ginekologije, opstetricije, subspecijalist ginekološke onkologije

**Prof. dr. sc. Dunja Rogić**, specijalist medicinske biokemije

Rad prihvaćen: srpanj, 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

### THE EFFICIENCY OF SUPPLEMENTATION WITH $\alpha$ -LIPOIC ACID IN PATIENTS WITH PRECANCEROUS CERVICAL LESIONS

Anja Divković

#### SUMMARY

Precancerous lesions of the cervix are etiologically related to human papilloma virus (HPV) infection and consequential development of inflammation and oxidative stress, which is why antioxidants might be considered effective against progression of low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL). Recent investigations show that  $\alpha$ -lipoic acid (ALA) is one of the most potent natural antioxidants with (still) limited therapeutic application in treatment of diseases related to inflammation and oxidative stress. This randomized, double-blind, placebo-controlled study aimed to investigate the effectiveness of ALA supplementation (600 mg/day) on the regression of LSIL in a sample of 100 patients and to gain a broader insight into therapeutic potential and mechanisms of action of ALA on oxidative stress, inflammatory markers and lipid status parameters. The presence of LSIL was determined after the cytological screening, colposcopic examination and targeted biopsy, as well as histological confirmation of cytological-colposcopic diagnosis. Parameters of oxidative stress, inflammation, lipid status and the presence of HPV were determined by standard laboratory methods. Dietary and lifestyle habits were investigated using a standardized and validated semi-quantitative food questionnaire (FFQ). Obtained results showed that ALA supplementation significantly reduced the proportion of patients with low-grade cytological abnormalities, in comparison to placebo. Given the obtained level of significance ( $p < 0.001$ ), the presented results indicate that short-term ALA supplementation shows a clinically significant effect on cervical cytology. Intervention did not have a significant influence on oxidative stress parameters although certain indicators of antioxidant status were increased after supplementation in particular subgroups of patients, depending on their dietary antioxidant intake. Influence of ALA supplementation on

lipemia depended on initial lipid status of patients. Future studies should focus on the investigation of effectiveness of long-term therapies (> 3 months) and also include patients with high-grade SIL; investigation of innovative formulations of ALA that might induce bioavailability and the investigation of synergistic effects of lifestyle modifications and ALA supplementation.

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

Thesis included: 172 pages, 10 figures, 9 tables and 269 references. Original is  
in Croatian language.

**Keywords:** Low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), human papilloma virus (HPV),  $\alpha$ -lipoic acid (ALA), oxidative stress parameters, inflammatory markers, lipid status parameters, diet quality index

**Mentors:** **Prof. Dubravka Vitali Čepo, PhD.** *Full professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ass. prof. Zinaida Karasalihović, MD, PhD.** *Specialist in pathological anatomy*

**Reviewers:** **Prof. Lidija Bach-Rojecky, PhD.** *Full professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ass. prof. Alan Šerman, MD, PhD.** *Specialist in gynecology, obstetrics, subspecialist in gynecological oncology*  
**Prof. Dunja Rogić, PhD.** *Specialist in medical biochemistry*

The thesis was accepted: July, 2024