

FUNKCIONALNA HRANA U SLUŽBI ZDRAVLJA – ŠTO SMO NAUČILI IZ RANDOMIZIRANIH KLINIČKIH STUDIJA?

Ines DRENJANČEVIĆ*

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,
Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska
ines.drenjancevic@mefos.hr

Ana STUPIN

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,
Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska
astupin@mefos.hr

Zrinka MIHALJEVIĆ

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,
Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska
zmihaljevic@mefos.hr

Nikolina KOLOBARIĆ

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,
Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska
nbdujmusic@mefos.hr

Ivana JUKIĆ

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,
Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska
ijukic@mefos.hr

Petar ŠUŠNJARA

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,
Osijek, Hrvatska

Kineziološki fakultet, Drinska 16a, Osijek, Hrvatska
psusnjara@mefos.hr

Marko STUPIN

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,
Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska

Klinički bolnički centar Osijek, Klinika za unutarnje bolesti, J. Huttlera 4, Osijek,
Hrvatska

mstupin@mefos.hr

Martina MIHALJ

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,

Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska

Klinički bolnički centar Osijek, Zavod za dermatologiju i venerologiju, J. Huttlera 4,

Osijek, Hrvatska

mmihalj@mefos.hr

Aleksandar KIBEL

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,

Osijek, Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska

akibel@mefos.hr

Brankica JURANIĆ

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,

Osijek, Hrvatska

Klinički bolnički centar Osijek, Klinika za unutarnje bolesti, J. Huttlera 4, Osijek,

Hrvatska

juranicbrankica@gmail.com

Kristina SELTHOFER-RELATIĆ

Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Trg sv. Trojstva 3,

Osijek, Hrvatska

Klinički bolnički centar Osijek, Klinika za unutarnje bolesti, J. Huttlera 4, Osijek,

Hrvatska

Medicinski fakultet Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Hrvatska

ksrelatic@mefos.hr

<https://dx.doi.org/10.21857/yl4okf8239>

**dopisni autor/corresponding author*

Sažetak

Tijekom razdoblja od 2017. do 2023. godine u okviru aktivnosti Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju provodio se projekt Europskih strukturnih i investicijskih fondova čiji je jedan od ciljeva bio istraživanje, proizvodnja i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane. Cilj dijela istraživanja provedenih na Medicinskom fakultetu Osijek bio je u okviru kliničkih randomiziranih kontroliranih intervencijskih studija ispitati učinak konzumacije funkcionalne hrane (obogaćenih jaja) na mikrovaskularnu funkciju, oksidativni status i upalu u mladima, zdravim ispitanicima i sportašima te bolesnika s akutnom i kroničnom koronarnom bolešću. Sve protokole odobrila su nadležna etička povjerenstva, a ispitanici su dali pisani informirani pristanak. Sudionici su u zasebnim kliničkim pokusima konzumirali dva ili tri obična jaja (75 – 250 mg/dan), dva ili tri jaja obogaćena samo n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PNMK) u različitim količinama (410 – 1050 mg/dan) ili tri jaja obogaćena n-3 PNMK (1050 mg/dan), selenom (0,06 mg/dan), luteinom (1,85 mg/dan) i vitaminom E (3,29

mg/dan). Obje vrste obogaćenih jaja promijenila su profil slobodnih masnih kiselina u svih ispitanika na povoljniji niži omjer $n6/n3$. Postoji značajna korist i pojačanje mikrovaskularne reaktivnosti nakon konzumacije jaja obogaćenih $n-3$ PNMK u mladim zdravim ispitanika i sportaša (Int J Mol Sci.2020 Jun 10;21(11):4149; Prev Nutr Food Sci.2021 Dec 31;26(4):388-399; Nutrients.2023 Mar 25;15(7):1599., Life (Basel).2023 Oct 31;13(11):2140.), dok u kardiovaskularnih bolesnika nije uočen takav učinak nakon jaja s $n-3$ PNMK, ali jest nakon jaja s $n-3$ PNMK i antioksidansima. Učinak je bio jače izražen pri dnevnim dozama $n-3$ PNMK > 770mg/dan. Istovremeno nisu zabilježene značajne promjene u krvnom tlaku, lipidnom profilu u bilo koje skupine ispitanika. U koronarnih bolesnika postignut je blagi protuupalni učinak (Biology (Basel). 2021 Aug 14;10(8):774.). Biokemijske analize pokazale su promjene na razini citokina, lipidnih medijatora upale i vaskularne reaktivnosti prema smanjenju proupalnih, vazokonstriktorskih, a povećanju protuupalnih, vazodilatatornih i resolvinskih medijatora (Front Biosci (Landmark Ed). 2022 Dec 27;27(12):332.; Nutrients. 2021 May 28;13(6):1851.). Konzumacija jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima, ponajprije $n-3$ PNMK, ima pozitivan učinak na zdravlje, i zdravim mladim ispitanika i sportaša, a i kardiovaskularnih bolesnika s postakutnim i kroničnim koronarnim sindromom. Posebice je izražen utjecaj na reaktivnost malih krvnih žila, smanjenje oksidativnog stresa i poboljšanje stanja upale. Stoga se jaja mogu preporučiti u svakodnevnoj prehrani, a obogaćena jaja ispunjavaju uvjet za funkcionalnu hranu.

Ključne riječi: funkcionalna hrana, kardiovaskularne bolesti, upala

Ključna poruka rada: Konzumacija jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima, ponajprije $n-3$ polinezasićenih masnih kiselina imaju pozitivan učinak na zdravlje, i zdravim mladim ispitanika i sportaša, ali i kardiovaskularnih bolesnika. Stoga se jaja mogu preporučiti u svakodnevnoj prehrani, a obogaćena jaja ispunjavaju uvjet za funkcionalnu hranu.

1. Uvod

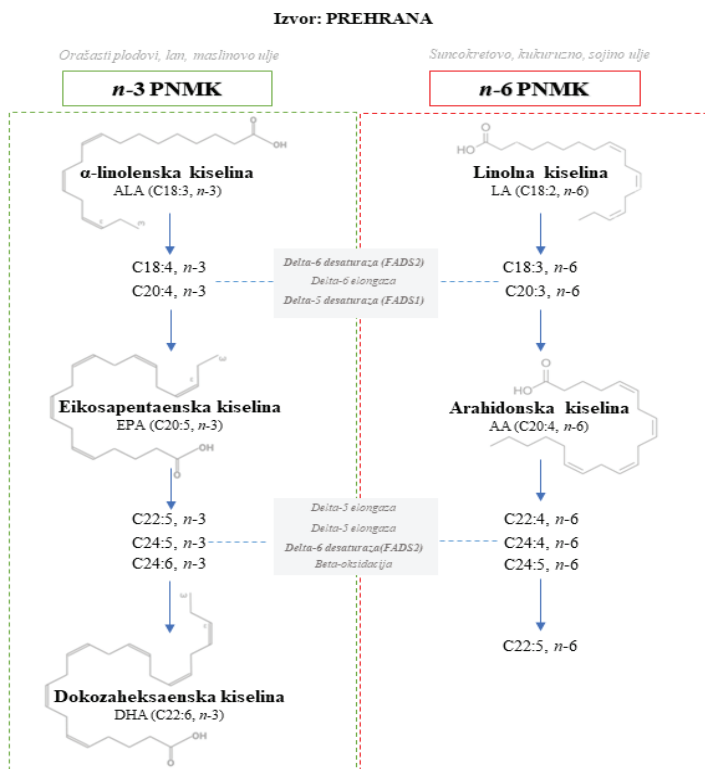
Prema dokumentu Europske komisije “Scientific Concepts of Functional Foods in Europe” funkcionalna hrana je ona hrana koja osim prikladnih nutritivnih svojstava ima pozitivne učinke na zdravlje u cjelini ili tako što smanje rizik od bolesti, konzumirana u količinama uobičajenim u dnevnoj prehrani (Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document, 1999). Funkcionalna hrana može biti prirodna ili obogaćena (na prirodan način) tvarima koje pogoduju zdravlju. Primjerice, jaja imaju prirodno visoka nutritivna svojstva jer sadržavaju visoke koncentracije visoko kvalitetnih i lako probavljivih proteina, a sastav aminokiselina je sličan sastavu proteina ljudskog organizma. Žumanjak jajeta sadrži esencijalne masne kiseline, minerale i vitamine. Jaja je lako obogatiti dodatno nutrijentima pažljivom prehranom kokoši-nesilica te su stoga jaja vrlo pogodna za razvoj funkcionalne hrane (Perić, Rodić i Milošević, 2011).

1.1. Metabolizam n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina

N-6 i n-3 polinezasićene masne kiseline (PNMK) se razlikuju po smještaju prve dvostruke veze na ugljiku. S obzirom da n-3 i n-6 PNMK s 18 ugljikovih atoma ne mogu biti sintetizirane u ljudskom organizmu, jer stanice sisavaca nemaju enzim omega-3 desaturazu, one su esencijalne. Alfa-linolenska kiselina (engl. *alpha-linoleic acid*, ALA, 18:3n-3), eikosapentaenska kiselina (engl. *eicosapentaenoic acid*, EPA, 20:5n-3) i dokozaheksaenska kiselina (engl. *docosahexaenoic acid*, DHA, 22:6n-3) su predstavnice n-3 PNMK, dok su linolna kiselina (engl. *linoleic acid*, LA, 18:2n-6) i arahidonska kiselina (engl. *arachidonic acid*, AA, 20:4n-6) tipične predstavnice n-6 PNMK. ALA i LA su prekursori ostalih PNMK i moraju se konzumirati prehranom (Albracht-Schulte i sur., 2018; Infante i Huszagh, 1998).

Biosinteza n-6 i n-3 PNMK iz njihovih prekursora alfa-linolenske kiseline (ALA; n-3 PNMK put) i linolne kiseline (LA; n-6 PNMK put) kroz procese desaturacije i elongacije izvedenih enzima prikazana je u Slici 1. Biosinteza DHA se odvija u mitohondrijima, dok se biosinteza AA, EPA i dokosapentaenoične kiseline (engl. *docosapentaenoic acid*, DPA, 22:5n-3) odvija u endoplazmatskoj mrežici (Infante i Huszagh, 1998). Daljnja pretvorba u hormonima slične tvari (eikozanoide) se odvija putem enzima ciklooksigenaze i lipooksigenaze (Slika 2). Zanimljivo je da ALA inhibira metabolizam n-6 PNMK i obrnuto, LA inhibira metabolizam n-3 PNMK, ali su potrebne deset puta veće koncentracije LA za taj učinak (Holman, 1998). Ljudskom organizmu potrebno je dnevno oko 100 – 200 mg EPA i DHA te 290-390 mg ALA u hrani. Izvori n-3 PNMK u prehrani su većina biljnih ulja (posebice laneno ulje), žitarice, orasi, meso plave ribe i riblje ulje. Dnevna konzumacija tih masnih kiselina u optimalnom omjeru važna je za sve stanične metaboličke procese (Drenjančević i sur., 2017).

Slika 1. Metabolizam dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina (PNMK). Shematski prikaz sinteze PNMK iz prekursora esencijalnih masnih kiselina, alfa-linolenske (ALA; n-3 PNMK put) i linolne kiseline (LA; n-6 PNMK put) kroz procese desaturacije i elongacije izvedenih enzima. PNMK – polinezasićene masne kiseline; FADS2 – desaturaza masnih kiselina 2; FADS1 – desaturaza masnih kiselina 1.



Zdrav omjer n-6 prema n-3 PNMK iznosi od 1:1 do 1:4. Međutim, tipična prehrana Europljanina uključuje omjere n-6 prema n-3 od 10:1 do 30:1 (Albracht-Schulte i sur., 2018). Iako su i n-6 i n-3 PNMK esencijalne, njihov omjer uvjetuje omjer stvorenih proupalnih i protuupalnih metabolita koji imaju izražene učinke na krvžilni sustav. Posljedice neuravnotežene prehrane s većim omjerom n-6 prema n-3 PNMK su povećana upala te kardiometaboličke bolesti koje predstavljaju najveći mortalitet i morbiditet. Naime, AA i EPA su prethodnice različitih vrsta proupalnih odnosno protuupalnih eikozanoida. Unos n-3 PNMK putem hrane može uravnotežiti proupalno djelovanje metabolita AA dijelom i zbog kompetitivne inhibicije s AA za ciklooksigenazu i lipooksigenazu, čime se smanjuje stvaranje proupalnih prostaglandina, leukotrijena i lipoksina. Proupalni prostaglandini (PG2) i leukotrieni (LT4) su derivati dugolančane n-6 PNMK AA, dok minimalno upalni eikosanoidi (PG3, LT5), rezolvini koji rješavaju upalu (Rv), protektini (PD) i marezini (MaR) potječu od dugolančanih n-3 PNMK, DHA i EPA. Biosinteza ovih medijatora ovisi o tome koja se dugolančana PNMK koristi kao enzimski supstrat za

ciklooksigenaze (COX) i lipooksigenaze (LOX), kao i o prisutnim upalnim podražajima (Araujo i sur., 2019; Demarquoy i Borgne, 2014; Drenjančević i sur., 2017; Schunck i sur., 2018). Derivati AA igraju ključnu ulogu u pokretanju i održavanju upale, dok derivati EPA i DHA imaju ulogu u prekidu upalnog odgovora i blokiranju daljnjeg regrutiranja stanica uz promicanje fagocitoze (Fabian, Kimler i Hursting, 2015; Li i sur., 2020). Zbog njihove izravne uključenosti u upalu i njezino rješavanje, omjer unosa između n-3 i n-6 PNMK od velike je važnosti za homeostazu i opću dobrobit. Ravnoteža između pro- i protuupalnih derivata koji su sintetizirani iz prekursora masnih kiselina i njihov omjer imaju ulogu u patogenezi niza kroničnih bolesti uključujući kardiovaskularne bolesti i rak (Husted i Bouzinova, 2016; Nindrea, Aryandono, Lazuardi i Dwiprahasto, 2019; Wijendran i Hayes, 2004; Yang i sur., 2016). Slika 2 prikazuje biosintezu eikosanoida i specijaliziranih pro-rezolucijskih medijatora.

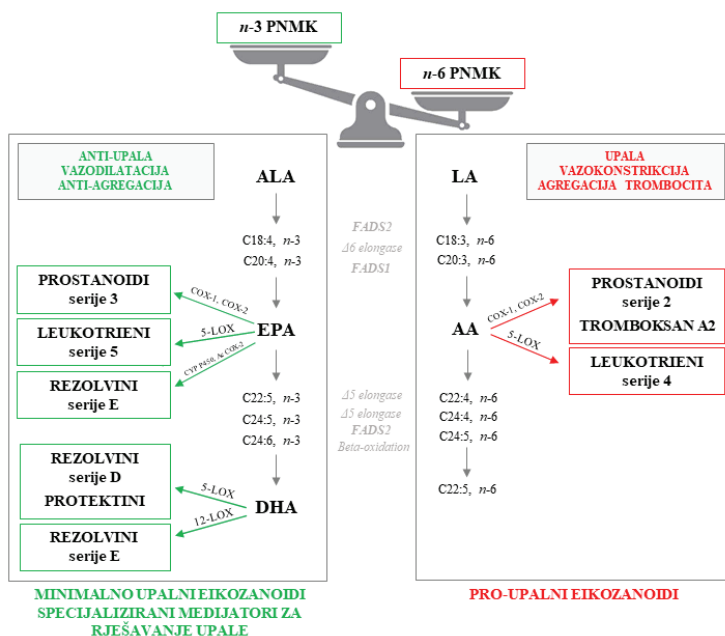
Na primjer, n-3 PNMK mogu prevenirati aritmije (Connor, 1994). S obzirom da imaju protu-upalne učinke i smanjuju razinu lipida u krvi, učinak im je i protutrombotički te usporavaju razvoj ateroskleroze. DHA se nalazi u fosfolipidima stanične membrane, posebice u mozgu i retini oka (Hasler, 2002). n-3 PNMK smanjuju kemotaksiju leukocita, izražaj staničnih adhezivnih molekula i interakciju leukocita s endotelom.

Slijedom navedenog, tijekom razdoblja od 2017. – 2023. godine u okviru aktivnosti Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju provodio se projekt Europskih strukturnih i investicijskih fondava #KK.01.1.1.01.0010 čiji je jedan od ciljeva bio istraživanje, proizvodnja i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane u okviru rada Istraživačke jedinice 2, koju su činili Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Odjel za kemiju Sveučilišta u Osijeku i Medicinski fakultet Osijek. Cilj dijela istraživanja provedenih na Medicinskom fakultetu Osijek bio je u okviru kliničkih randomiziranih kontroliranih intervencijskih studija ispitati učinak konzumacije funkcionalne hrane (obogaćenih jaja) na mikrovaskularnu funkciju, oksidativni status i upalu kod mladih, zdravih ispitanika i sportaša, te bolesnika s akutnom i kroničnom koronarnom bolešću. Za potrebe istraživanja izabrano je obogaćivanje jaja esencijalnim n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PNMK), odnosno n-3 PNMK, luteinom, selenijem i vitaminom E (detalji proizvodnje jaja su u nastavku teksta). Na primjer, n-3 PNMK mogu prevenirati aritmije (Connor, 1994). S obzirom da imaju protu-upalne učinke i smanjuju razinu lipida u krvi, učinak im je i protutrombotički te usporavaju razvoj ateroskleroze. DHA se nalazi u fosfolipidima stanične membrane, posebice u mozgu i retini oka (Hasler, 2002). n-3 PNMK smanjuju kemotaksiju leukocita, izražaj staničnih adhezivnih molekula i interakciju leukocita s endotelom.

Slijedom navedenog, tijekom razdoblja od 2017. do 2023. godine u okviru aktivnosti Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju provodio se projekt Europskih strukturnih i investicijskih fondava #KK.01.1.1.01.0010 čiji je jedan od ciljeva bio istraživanje, proizvodnja i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane u okviru rada Istraživačke jedinice 2, koju su činili Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Odjel

za kemiju Sveučilišta u Osijeku i Medicinski fakultet Osijek. Cilj dijela istraživanja provedenih na Medicinskom fakultetu Osijek bio je u okviru kliničkih randomiziranih kontroliranih intervencijskih studija ispitati učinak konzumacije funkcionalne hrane (obogaćenih jaja) na mikrovaskularnu funkciju, oksidativni status i upalu kod mladih, zdravih ispitanika i sportaša, te bolesnika s akutnom i kroničnom koronarnom bolešću. Za potrebe istraživanja izabrano je obogaćivanje jaja esencijalnim n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PNMK), odnosno n-3 PNMK, luteinom, selenijem i vitaminom E (detalji proizvodnje jaja su u nastavku teksta).

Slika 2. Biosinteza eikozanoida i specijaliziranih pro-rezolucijskih medijatora. Biosinteza lipidnih medijatora ovisi o tome koja se dugolančana polinezasićena masna kiselina (PNMK) koristi kao enzimski supstrat za enzime ciklooksigenazu (COX) i lipooksigenazu (LOX). Ovi enzimi kataliziraju pretvorbu n-3 (EPA, DHA) ili n-6 (AA) PNMK, ovisno o tome koji je supstrat prisutan u suvišku, u minimalno upalne eikozanoide i specijalizirane pro-rezolucijske medijatore odnosno pro-upalne eikozanoide.



Metodologija provedenih istraživanja

Proizvodnja obogaćenih jaja

I obična kokošja jaja, kako i ona obogaćena n-3 PNMK te n-3 PNMK i antioksidansima proizvedena su i osigurana od strane Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta u Osijeku, koji je razvio i standardizirao proizvodne protokole. Kokošja jaja obogaćena n-3 PNMK bila su proizvedena na način na da je sojino ulje (5%) u krmnim smjesama za kokoši nesilice bilo zamijenjeno mješavinom ribljeg (1,5%) i lanenog ulja (3,5%), ili mješavinom ribljeg (1,33%), lanenog (1,33%), repičinog (1,33%) i sojinog (1%) ulja (Stupin i sur., 2018; Stupin i sur., 2020). Kokoši koje su nesle jaja obogaćena n-3 PNMK i antioksidansima bile su hranjene krmnom smjesom u kojoj je sojino ulje (5%) zamijenjeno mješavinom ribljeg ulja (1,5%), repičinog (1,5%) i lanenog lanenog ulja (2%), s dodatkom 0,43 mg/kg selenija i po 100 mg/kg vitamina E i luteina (Kralik, Kralik, Košević, Galović i Samardžić, 2023). Profil masnih kiselina, kao i sadržaj selenija, vitamina E i luteina je bio određen u svim proizvedenim jajima od strane i prema protokolima istraživačke skupine s Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta u Osijeku (Kralik i sur., 2023). Obogaćivanje kokošjih jaja opisanim protokolima rezultiralo je povećanjem udjela n-3 PNMK, te smanjenju omjera n-6/n-3 PNMK u kokošjim jajima, kao i povećanim udjelom selenija, vitamina E i luteina u jajima dodatno obogaćenim antioksidansima.

Učinak konzumacije obogaćenih jaja na omjer n-6:n-3 PNMK u serumu ispitanika

U našim istraživanjima, sudionici su u zasebnim kliničkim pokusima konzumirali 2 ili 3 obična jajeta (75-250 mg/dan) i 2 ili 3 jaja obogaćena samo n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PNMK) u različitim količinama (od 410-1050 mg/dan) ili 3 jaja obogaćena n-3 PNMK (1050 mg/dan), selenijem (0,06 mg/dan), luteinom (1,85 mg/dan) i vitaminom E (3,29 mg/dan). Prilikom svakog kliničkog pokusa na svim skupinama ispitanika (zdravim mladima, sportašima, kardiovaskularnim bolesnicima) izvršena je analiza profila masnih kiselina. Za analizu profila masnih kiselina u serumu korištena je metoda plinske kromatografije – masene spektrometrije (GC-MS/MS), a analize su provedene u Bioanalitičkom laboratoriju BIOCentra, BIOCentar - inkubacijski centar za bioznanosti, Zagreb, Hrvatska.

Obje vrste obogaćenih jaja promijenila su profil slobodnih masnih kiselina kod svih ispitanika na povoljniji niži omjer n-6/n-3 kao što je vidljivo u Tablici 1.

Tablica 1. Omjer razine n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (n-6/n-3 PNMK) u serumu ispitanika nakon konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PNMK) ili -3 polinezasićenim masnim kiselinama i antioksidansima (n-3 PNMK + antioksidansi)

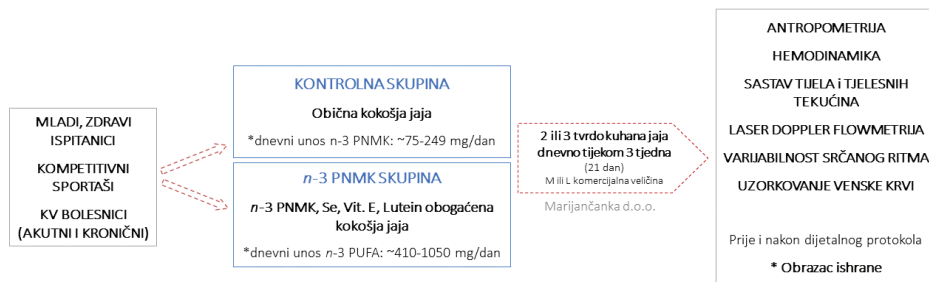
Ispitanici	Intervencija	n-6/n-3 PNMK		Izvor:
		prije	poslije	
zdravi mladi	n-3 PNMK (1050 g/dan)	13,1	9,3	Stupin i sur. IJMS 2020
sportaši	n-3 PNMK (1050 g/dan)	10,7	7,9	Kolar i sur. PNF 2021
KV bolesnici	n-3 PNMK (1050 g/dan)	8,3	5,5	Čurić i sur. Biology 2021
zdravi mladi	n-3 PNMK (1050 g/dan) + antioksidansi	10,5	6,3	Šušnjara i sur. FBL 2022
sportaši	n-3 PNMK (1050 g/dan) + antioksidansi	19,5	12,4	Kolar i sur. Life 2023
KV bolesnici (kronična CAD)	n-3 PNMK (1050 g/dan) + antioksidansi	26,7	17,5	Breškić Čurić i sur. Applied Sciences 2023
KV bolesnici (akutna CAD)	n-3 PNMK (1050 g/dan) + antioksidansi	17,8	11,5	Masle i sur. CIA 2024

KV - kardiovaskularni; CAD- koronarna bolest srca.

Biokemijske i molekularne analize iz uzoraka krvi

U svim istraživanjima prikupljani su uzorci venske krvi koji su dalje korišteni za izolaciju seruma i mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC) standardiziranim laboratorijskim protokolima. Biljezi oksidativnog stresa mjereni su korištenjem različitih metodoloških pristupa, uključujući mjerenje reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS) (za procjenu oksidativnog stresa) i redukcijske sposobnosti željeza u plazmi (FRAP) (za mjerenje antioksidativnog kapaciteta), protočnu citometriju za analizu unutarstanične proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), dok su komercijalno dostupni ELISA kitovi korišteni za kvantifikaciju 8-iso prostaglandina F2alfa. Spektrofotometrijska analiza provedena je za mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx) i katalaze (CAT), a genski izražaj ovih enzima analizirana je pomoću PCR-a. Nadalje, komercijalno dostupni ELISA i Luminex kitovi korišteni su za kvantifikaciju proupalnih i protuupalnih citokina, kemokina, čimbenika rasta, staničnih adhezivnih molekula te lipidnih medijatora u serumima i supernatantima stimuliranih stanica. Protočna citometrija korištena je za analize limfocitnih populacija s naglaskom na regulatorne i pomoćničke populacijama T-limfocita. Svi protokoli odobreni su od strane nadležnih etičkih povjerenstava i ispitanici su dali pisani informirani pristanak. Slika 3 pokazuje dizajn tih randomiziranih kontroliranih kliničkih pokusa.

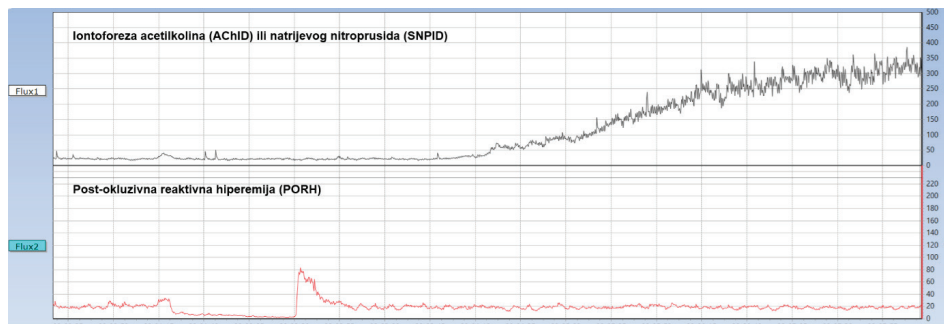
Slika 3. Shematski prikaz dizajna serije pokusa koji su provedeni u okviru istraživanja



Metode korištene u ispitivanju funkcije mikrocirkulacije

Reaktivnost mikrocirkulacije kože podlaktice procijenjena je metodom laserske Doppler floumetrije (engl. *laser Doppler flowmetry*, *LDF*) (MoorVMSLDF, Axminster, UK). Odgovor mikrocirkulacije ovisan o endotelu procijenjen je dvama testovima; izazivanjem post-okluzivne reaktivne hiperemije (PORH) ili izazivanjem dilatacije u odgovoru na aplikaciju acetilkolina (ACh) tehnikom iontoforeze. Odgovor mikrocirkulacije neovisan o endotelu (odnosno vazoreaktivnost ovisna o vaskularnom glatkom mišićju) procijenjen je testom izazivanja dilatacije u odgovoru na iontoforetsku aplikaciju natrijevog nitroprusida (SNP). Test PORH uključivao je mjerenje mikrovaskularnog protoka krvi prije, tijekom, te nakon otpuštanja 1-minutne okluzije krvne žile izazvane nadlaktičnom manžetom. Tijekom osnovnog protoka (B), okluzije (O) i reperfuzije (R), mikrocirkulacijski protok krvi određen je pomoću programa koji je izračunao površinu ispod krivulje (AUC) za intervale od 1 minute, a rezultat je izražen kao razlika između postotka promjene protoka tijekom reperfuzije ($R\% = R/B \times 100$) i okluzije ($O\% = O/B \times 100$) u odnosu na početnu vrijednost ($R-O\%$ povećanje = $R\%/O\%$). Što se tiče iontoforeze, nakon snimanja osnovnog mikrovaskularnog protoka krvi pomoću struje niske jakosti potkožno je apliciran bilo pozitivno nabijeni ACh (1%) ili negativno nabijeni SNP (1%) i to prema utvrđenom protokolu, kako bi se dobio stabilan plato maksimalnog mikrovaskularnog odgovora na zadani podražaj. Program za izračunavanje AUC (intervali od 1 minute) također je korišten za određivanje osnovnog mikrocirkulacijskog protoka krvi i protoka krvi tijekom stabilnog platoa nakon primjene ACh ili SNP. Rezultat je izražen kao povećanje protoka krvi u odnosu na početnu vrijednost nakon primjene ACh ili SNP (Barić i sur., 2019; Stupin i sur., 2021). Slika 4 pokazuje primjer originalnog zapisa mjerenja protoka u mikrocirkulaciji kože podlaktice tijekom PORH-a i iontoforeze acetilkolina ili natrijevog nitroprusida.

Slika 4. Originalni zapis mjerenja protoka u mikrocirkulaciji kože podlaktice metodom laserske Doppler floumetrije (LDF) u odgovoru na vaskularnu okluziju (post-okluzivna reaktivna hiperemija, PORH) (Flux 2) i iontoforezu acetilkolina (AChID) ili natrijevog nitroprusida (SNPID) (Flux 1).



2. Rezultati

Utjecaj konzumacije kokošijih jaja obogaćenih n-3 PNMK na mikrovaskularnu funkciju i imunološki status mladih zdravih ispitanika

Generalno, konzumacija n-3 PNMK obogaćenih jaja dovodi do značajne koristi i pojačanja mikrovaskularne reaktivnosti kod mladih zdravih ispitanika i sportaša (Kolar i sur., 2021; Kolar i sur., 2023; Stupin i sur., 2020; Šušnjara i sur., 2023). Konzumacija obogaćenih jaja ne samo da poboljšava vazodilataciju ovisnu o endotelu, već i utječe na upalne biljege, uključujući raspodjelu Treg/Th17 stanica. Tako su Stupin i suradnici (Stupin i sur., 2020) ispitali učinke konzumacije obogaćenih jaja na vazodilataciju u mikrocirkulaciji te aktivaciju endotela i upalu kod mladih zdravih osoba. Eksperimentalna skupina (N = 19) konzumirala je tri obogaćena jaja (1053 mg n-3 PNMK), dok je kontrolna skupina (N = 21) konzumirala tri obična jaja (249 mg n-3 PNMK) dnevno tijekom 3 tjedna. Rezultati su pokazali značajan porast n-3 PNMK u serumu te poboljšanje vazodilatacije u odgovoru na podražaj iontoforetski dopremljenog acetilkolina (vazodilatacija ovisna o endotelu (AChID)) u skupini koja je konzumirala obogaćena jaja. Serumska koncentracija proupalnog citokina IFN- γ se smanjila, dok se koncentracija protuupalnog citokina interleukina 10 (IL-10) povećala u skupini koja je konzumirala obogaćena jaja. Ove značajne promjene nisu zabilježene u kontrolnoj skupini. U nastavku istraživanja, Kolobarić i suradnici (2021) ispitivali su utjecaj istog dijetalnog protokola kod istih skupina ispitanika na razine lipidnih medijatora u serumu, kao i na distribuciju te funkcionalnost perifernih T-pomoćničkih limfocita. Oba dijetalna protokola značajno su promijenila razine proupalnih i protuupalnih lipidnih medijatora u serumu ispitanika, no samo je kod skupine koja je konzumirala obogaćena jaja došlo do značajnog porasta protuupalnih prostanoida i medijatora koji rješavaju upalu. U obje skupine zabilježeno je smanjenje Treg i Th17 stanica, dok je samo u skupini koja je konzumirala obogaćena jaja

došlo do povećanja sekrecije pleiotropnog citokina TGF- β 1 i smanjenja proupalnog IL-6. Zaključno, konzumacija funkcionalne hrane s n-3 PNMK mijenja imunološki odgovor prema uvjetima koji rješavaju upalu, utječući na lipidne medijatore i sekreciju citokina.

Utjecaj konzumacije kokošijih jaja obogaćenih n-3 PNMK, luteinom, selenijem i vitaminom E na mikrovaskularnu funkciju i imunološki status

Oksidativni stres ima značajan negativan utjecaj na mikrovaskularnu reaktivnost. On oštećuje endotel, smanjuje sposobnost endotela da proizvodi vazodilatacijske, protuupalne i anti-trombotske tvari. Stoga smo dizajnirali slijedeće istraživanje koje je proučavalo učinke konzumacije Nutri4 jaja, tj. jaja obogaćenih n-3 PNMK, luteinom, selenijem i vitaminom E. Navedene tvari su snažni antioksidansi. Istraživanje Šušnjare i suradnika (Šušnjara i sur., 2023) za cilj je imalo utvrditi potencijalne mehanizme vazodilatacije i ulogu enzima ciklooksigenaza u vazodilataciji u mikrocirkulaciji mladih zdravih pojedinaca tijekom post-okluzivne reaktivne hiperemije. Sudionici ove studije su konzumirali tri jaja dnevno tijekom tri tjedna: Kontrolna skupina (CTRL, N = 14) konzumirala je obična kokošja jaja (približno 0,330 mg luteina, 1,785 mg vitamina E, 0,054 mg selenija i 438 mg n-3 PNMK dnevno), a grupa Nutri4 (N = 20) konzumirala je obogaćena jaja (približno 1,85 mg luteina, 0,06 mg selenija, 3,29 mg vitamina E i 1026 mg n-3 PNMK dnevno). Mikrovaskularni protok kože kao odgovor na vaskularnu okluziju (post-okluzivna reaktivna hiperemija (PORH) i iontoforezu acetilkolina (AChID)) i natrijevog nitroprusid (SNPID; neovisan o endotelu) procijenjena je LDF-om prije i poslije dijetetskog protokola te u odvojenoj skupini sudionika koji su uzeli 100 mg indometacina prije mjerenja mikrovaskularne reaktivnosti i protoka krvi. U studiji je utvrđeno da su PORH i AChID značajno poboljšani, a SNPID je ostao nepromijenjen u Nutri4 skupini, dok u CTRL skupini nije bilo promjene nakon konzumacije običnih kokošijih jaja. PORH se smanjio nakon primjene indometacina u Nutri4 nakon dijetetskog protokola, a izražaj proteina enzima COX-2 bila je značajno viša u Nutri4 skupini u usporedbi s skupinom CTRL nakon dijetetskog protokola. Rezultati su pokazali da konzumacija obogaćenih jaja poboljšava mikrovaskularni o endotelu ovisni odgovor kod zdravih mladih ispitanika te da su uključeni metaboliti n-3 PNMK preko puta ciklooksigenaze u pojačanom odgovoru na vaskularnu okluziju (PORH).

Nadalje, druga studija (Šušnjara i sur., 2022) je imala za cilj procijeniti učinke konzumacije obogaćenih jaja na oksidativni status i upalna stanja kod zdravih ispitanika te eventualne promijene imunološkog odgovora zdravih odraslih osoba prema protuupalnim stanjima. U istraživanju je sudjelovalo 34 sudionika koji su konzumirali 3 tvrdo kuhana kokošja jaja dnevno (21 dan), a bili su podjeljeni u Kontrolnu skupina (CTRL, N = 14) i Nutri4 skupina (N = 20). Koncentracija proupalnog interleukina 17A (IL-17A) bila je snižena u serumu i bio je povećan izražaj neuronske sintaze dušikovog oksida (nNOS) u Nutri4 skupini što je sugeriralo pomak prema protuupalnim stanjima kod sudionika koji su konzumirali obogaćena kokošja jaja te da djelovanje n-3 PNMK i antioksidansa može imati zaštitnu ulogu u mirovanju, u odsustvu upalnih stanja.

S obzirom da su n-3 PNMK prisutne u retini, provedeno je oftalmološko istraživanje utjecaja funkcionalno obogaćenih jaja na stražnji očni segment pomoću optičke koherentne tomografije (OCT) na početku i na kraju dijetetskog protokola. Ovim istraživanjem je utvrđeno da je konzumacija Nutri4 jaja značajno povećala koncentracije n-3 PNMK, luteina i vitamina E u serumu, te da je se prosječna debljina makule (donji vanjski sloj makule) bila povećana u Nutri4 skupini, dok nije pronađena značajna promjena u debljini retine kontrolne skupine nakon dijetetskog protokola. Rezultati pokazuju da konzumacija obogaćenih kokošjih jaja ima povoljan učinak na debljinu i volumen mrežnice (Šušnjara i sur., 2023).

Utjecaj konzumacije kokošjih jaja obogaćenih n-3 PNMK te jaja obogaćenih n-3 PNMK, luteinom, selenijem i vitaminom E na mikrovaskularnu funkciju i imunološki status sportaša

Studija provedena 2021. godine (Kolar i sur., 2021) istraživala je učinak konzumacije jaja obogaćenih n-3 PNMK na vazodilataciju, mikrovaskularni odgovor na fizički stres te biljege oksidativnog stresa kod natjecateljskih sportaša. Sportaši su podijeljeni u kontrolnu skupinu (N = 9), koja je konzumirala tri obična jaja dnevno (249 mg n-3 PNMK/d), i skupinu koja je konzumirala tri n-3 PNMK obogaćena jaja dnevno (N = 14) (1053 mg n-3 PNMK/d) tijekom 3 tjedna. Evaluirani su endotel-ovisni odgovori (PORH i AChID) te endotel-neovisni odgovor (dilatacija posredovana natrijevim nitroprusidom (SNPID)) mikrocirkulacije kože podlaktice korištenjem LDF-a, prije i nakon akutnog iscrpljujućeg vježbanja (AEE). Mjerene su vrijednosti krvnog tlaka, serumskih lipida, serumski profil slobodnih masnih kiselina i biljezi oksidativnog stresa prije i nakon protokola. Konzumacija obogaćenih jaja značajno je smanjila omjer n-6/n-3 PNMK i poboljšala PORH i AChID, ali nije utjecala na SNPID u mirovanju. Nadalje, serumske aktivnosti enzima GPx i SOD značajno su se smanjile u skupini koja je konzumirala obogaćena jaja. U obje skupine, PORH, AChID i SNP značajno su se smanjili nakon AEE u odnosu na stanje prije AEE, a samo je AChID u odgovoru na AEE (Δ AChID) bio značajno povećan nakon konzumacije obogaćenih jaja. Zaključno, nadomjestak n-3 PNMK putem obogaćenih jaja poboljšava mikrovaskularnu endotelnu funkciju u mirovanju i može doprinijeti prilagodbi na AEE kod natjecateljskih sportaša.

Sljedeća studija imala je za cilj utvrditi učinke n-3 PNMK, selenija, vitamina E i luteina u obogaćenim kokošjim jajima na vazodilataciju ovisnu o endotelu, oksidativni stres i mikrovaskularni odgovor na akutni iscrpljujući trening (AEE) kod natjecateljskih sportaša. U studiji je sudjelovao 31 sportaš, a sudionici su bili podijeljeni u dvije skupine, kontrolnu (N = 17) i Nutri4 (N = 14) koji su konzumirali tri obična ili obogaćena kokošja jaja dnevno, tijekom 3 tjedna. Rezultati ove studije su pokazali poboljšanje o endotelu ovisan mikrovaskularni odgovor PORH i AChID u Nutri4 skupini, ali ne i u kontrolnoj skupini nakon konzumiranja jaja. Stvaranje peroksinitrita i vodikovog peroksida u mononuklearnim stanicama periferne krvi, kao i serumska koncentracija 8-izo prostaglandina F₂ α (biljezi oksidativnog stresa) smanjeni su u Nutri4 skupini, dok su

ostali nepromijenjeni u kontrolnoj skupini. PORH i AChID bili su smanjeni nakon AEE u usporedbi s vrijednostima prije AEE, i prije i nakon dijete, u obje skupine. Međutim, veličina promjene PORH-a nakon AEE (Δ PORH) povećao se nakon konzumiranja obogaćenih jaja. Zaključno, konzumacija obogaćenih kokošjih jaja ima povoljan učinak na vazodilataciju ovisnu o endotelu i smanjenje razine oksidativnog stresa kod natjecateljskih sportaša. Također, mikrovaskularna prilagodba na akutni iscrpljujući trening je poboljšana nakon konzumiranja Nutri4 jaja (Kolar i sur., 2023).

Utjecaj konzumacije kokošjih jaja obogaćenih n-3 PNMK na mikrovaskularnu funkciju i imunološki status kardiovaskularnih bolesnika

Koronarna bolest srca (engl. coronary artery disease, CAD), obilježena nakupljanjem aterosklerotskog plaka i posljedičnim suženjem epikardijalnih arterija, najčešća je vrsta bolesti srca i vodeći uzrok smrti u razvijenim zemljama i u muškaraca i u žena (Collet i sur., 2021; Knuuti i sur., 2020). Bolesnici s kroničnom CAD imaju stabilnu bolest s ili bez anamneze akutnog koronarnog sindroma (ACS), dok bolesnici s akutnom CAD imaju potpunu ili djelomičnu opstrukciju koronarne arterije zbog rupture plaka ili stvaranja tromba (Collet i sur., 2021; Knuuti i sur., 2020). CAD je često popraćena metaboličkim sindromom s hiperglikemijom rezistentnom na inzulin, dislipidemijom, centralnim tipom pretilosti i arterijskom hipertenzijom, što sve pridonosi etiopatogenezi CAD-a kao i njegovim komplikacijama, pogoršavajući ishod bolesti. Zajedničko obilježje i CAD-a i metaboličkog sindroma je prisutnost disfunkcije vaskularnog endotela (endotelne disfunkcije, ED), koja predstavlja jedan od najranijih simptoma prisutnog u podlozi različitih kardiovaskularnih bolesti (KVB) (npr. arterijske hipertenzija, dijabetes melitusa, pretilosti, hiperlipidemije i ateroskleroze) (Vanhoutte i sur., 2017; Widlansky i sur., 2003). ED karakteriziraju proupalni i protrombotski fenotip, oslabljeni vazodilatacijski odgovor, povećana propusnost endotela, agregacija trombocita i adhezija leukocita, što rezultira smanjenom vazodilatacijom ovisnom o endotelu, sistemskom aktivacijom endotela i interakcijom endotela i leukocita (Vanhoutte i sur., 2017; Widmer i Lerman, 2014). Ključni patofiziološki mehanizmi koji posreduju razvoj ED su povećana razina oksidativnog stresa (Li, Horke i Förstermann, 2014), kao i stvaranje visokih razina proupalnih citokina (npr. IL-1, IL-6 i TNF), što rezultira vaskularnom ili sistemskom upalom (Medina-Leyte i sur., 2021).

Istraživanja su pokazala da konzumacija n-3 PNMK, osobito EPA i DHA, ima snažan potencijal za smanjenje razine triglicerida u krvi, arterijskog krvnog tlaka, incidencije tromboze i rizika od iznenadne smrti uslijed infarkta miokarda te nastanka srčanih aritmija (Christensen i sur., 1996; Maki i sur., 2003). Također, pokazano je da konzumacija hrane bogate n-3 PNMK (plava riba, povrće, sjemenke i orašasti plodovi), farmakoloških pripravaka bogatih n-3 PNMK ili hrane obogaćene n-3 PNMK (koja se naziva funkcionalna hrana), može poboljšati vaskularnu reaktivnost upravo povećanjem antioksidativnog kapaciteta i kod bolesnika oboljelih od CAD-a i kod zdravih osoba (Shahidi, 2004). Štoviše, konzumacija približno 1 g n-3 PNMK dnevno preporučena je



kod bolesnika s kardiovaskularnim bolestima zbog njihovih pozitivnih kardiovaskularnih učinaka, posebno zato što ne postoje značajne interakcije između dodataka n-3 PNMK i brojnih lijekova koje ti bolesnici često uzimaju (Jain, Aggarwal i Zhang, 2015).

Prva studija u okviru ZCI-a za personaliziranu brigu o zdravlju na populaciji kardiovaskularnih bolesnika imala je za cilj utvrditi učinak konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PNMK na profil slobodnih masnih kiselina i lipida u serumu, biljege upale i razinu oksidativnog stresa te funkciju najmanjih krvnih žila (mikrocirkulacije) u populaciji bolesnika s CAD-om, uključujući one sa stabilnom bolešću i one s akutnim koronarnim sindromom (Čurić i sur., 2021). Konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PNMK značajno je smanjila omjer n-6/n-3 PNMK u serumu, kao i razinu hsCRP-a i proupalnog citokina IL-1 u bolesnika s CAD-om, dok je značajno smanjenje razine LDL kolesterola i proupalnog citokina IL-6 bilo prisutno samo u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. Dakle, iako je ostvario blage protu-upalne učinke i povoljniji profil slobodnih masnih kiselina u serumu, ovaj režim uzimanja funkcionalne hrane (1050 mg n-3 PNMK dnevno u obliku obogaćenih kokošnjih jaja kroz 3 tjedna) nije uzrokovao značajne promjene u mikrovaskularnoj funkciji bolesnika oboljelih od koronarne bolesti srca (akutnih i kroničnih) (Čurić i sur., 2021).

Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PNMK, luteinom, selenijem i vitaminom E na mikrovaskularnu funkciju i imunološki status kardiovaskularnih bolesnika

Kao nastavak ove studije, uslijedila je randomizirana intervencijska studija na populaciji bolesnika sa stabilnom koronarnom bolesti, čiji je cilj bio odrediti učinak kokošnjih jaja obogaćenih ne samo s n-3 PNMK već i trima antioksidansima (selenijem, vitaminom E i luteinom) na endotelnu funkciju i malih i velikih krvnih žila, enzime uključene u sintezu glavnog vazodilatatora porijeklom iz endotela, dušikovog oksida (NO), kao i na razinu oksidativnog stresa te razinu medijatora upale (Breškić Čurić i sur., 2023). Zanimljivo je da je konzumacija kokošnjih jaja obogaćenih n-3 PNMK i antioksidansima (n-3 PNMK (1050 mg/dan), selenijem (0,06 mg/dan), luteinom (1,85 mg/dan i vitaminom E (3,29 mg/dan)) u bolesnika sa stabilnom CAD poboljšala vazodilataciju ovisnu o endotelu i u mikro- i makrocirkulaciji te povećala koncentraciju enzima (iNOS) u serumu. Sukladno ranijim rezultatima, ovaj oblik funkcionalne hrane smanjio je razinu triglicerida u serumu, te koncentraciju proupalnih citokina IL-17A i TGF-1, ali nije značajno utjecala na biomarkere oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (TBARS, OxLDL, 8-iso-PGF2, AOPP, FRAP, aktivnost CAT, SOD i GPx u serumu) u pacijenata s kroničnom (stabilnom) koronarnom bolesti (Breškić Čurić i sur., 2023).

Učinak konzumacije jaja obogaćenih n-3 PNMK i antioksidansima na mikrovaskularnu funkciju, oksidativni stres i medijatore upale istraživana je i u bolesnika nakon akutnog koronarnog sindroma (AKS) (Masle i sur., 2024). Trotjedna konzumacija obogaćenih jaja značajno je smanjila razinu LDL kolesterola, hsCRP-a i fibrinogena, što ukazuje na smanjenje upale i koagulacije. Uz to, došlo je i do značajnog poboljšanja mikrovaskularne funkcije, odnosno vazodilatacije ovisne o endotelu u mikrocirkulacije kože podlaktice (PORH i AChID), dok trotjedna konzumacija običnih jaja nije utjecala na mikrovaskularnu funkciju. Nadalje, vrijednosti serumskih biljega oksidativnog stresa, odnosno antioksidativnog kapaciteta (TBARS i FRAP) ostale su nepromijenjene nakon 3-tjednog dijetetskog protokola, ali je došlo do značajnog povećanja aktivnosti antioksidativnog enzima SOD. Zajednički, ovi rezultati ukazuju na povoljan učinak obogaćenih jaja n-3 PNMK, luteinom, vitaminom E i selenijem na mikrovaskularnu funkciju, smanjenje proupalnih i prokoagulacijskih stanja kod bolesnika s AKS-om, podupirući hipotezu da je obogaćena prehrana korisna za ovu populaciju (Masle i sur., 2024).

Rezultati navedenih studija u populaciji kardiovaskularnih bolesnika, i to onih sa stabilnom koronarnom bolesti ali i onih s akutnim koronarnim sindromom, pokazali su da navedeni pacijenti mogu imati koristi od konzumacije kokošjih jaja obogaćenih n-3 PNMK, a posebice onih obogaćenih n-3 PNMK i antioksidansima u smislu poboljšanja lipidnog profila i poboljšane vaskularne relaksacije na mikro- i makrovaskularnoj razini. Važno je napomenuti da su se blagotvorni učinci ovih oblika funkcionalne hrane javili neovisno o standardnoj farmakološkoj terapiji koju su bolesnici s koronarnom bolesti primali. Rezultati ovih studija mogli bi biti korisni u davanju preporuka za planove prehrane pacijenata s koronarnom bolesti.

3. Zaključak

Postoji značajna korist i pojačanje mikrovaskularne reaktivnosti nakon konzumacije n-3 PNMK obogaćenih jaja kod mladih zdravih ispitanika i sportaša (Kolar i sur., 2021; Kolar i sur., 2023; Stupin i sur., 2020; Šušnjara i sur., 2023), dok kod kardiovaskularnih bolesnika nije uočen takav učinak nakon n-3 PNMK jaja, ali jest nakon jaja s n-3 PNMK i antioksidansima. Učinak je bio jače izražen pri dnevnim dozama n-3 PNMK >770mg/dan. Istovremeno nisu zabilježene značajne promjene u krvnom tlaku, lipidnom profilu kod bilo koje skupine ispitanika. Kod koronarnih bolesnika postignut je blagi protuupalni učinak (Čurić i sur., 2021). Biokemijske analize pokazale su promjene na razinu citokina, lipidnih medijatora upale i vaskularne reaktivnosti prema smanjenju proupalnih, vazokonstriktorskih, a povećanju protuupalnih, vazodilatatornih i resolvinskih medijatora (Šušnjara i sur., 2022, Kolobarić i sur., 2021).

Konzumacija jaja obogaćenih funkcionalnim sastojcima, prvenstveno n-3 PNMK imaju pozitivan učinak na zdravlje, kako zdravih mladih ispitanika i sportaša, tako i kardiovaskularnih bolesnika s post-akutnim i kroničnim koronarnim sindromom.



Posebice je izražen utjecaj na reaktivnost malih krvnih žila, smanjenje oksidativnog stresa i poboljšanje stanja upale. Stoga se jaja mogu preporučiti u svakodnevnoj prehrani, a obogaćena jaja ispunjavaju uvjet za funkcionalnu hranu.

Zahvala

Autori zahvaljuju svim ispitanicima koji su dobrovoljno sudjelovali u ovim istraživanjima. Zahvaljujemo i suradnicima s Fakulteta za agrobiotehničke znanosti Osijek te Odjela za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku koji su proizvodili i analizirali jaja korištena u ovim istraživanjima.

Potpora: Studija je provedena uz potporu Europskog strukturnog i investicijskog fonda putem bespovratnih sredstava za hrvatski nacionalni Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek # KK.01.1.1.01.0010.

Literatura

- Albracht-Schulte, K., Kalupahana, N. S., Ramalingam, L., Wang, S., Rahman, S. M., Robert-McComb, J. i Moustaid-Moussa, N. (2018). Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: A mechanistic update. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.02.012>
- Araujo, P., Belghit, I., Aarsæther, N., Espe, M., Lucena, E. i Holen, E. (2019). The Effect of Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids on the Production of Cyclooxygenase and Lipoxygenase Metabolites by Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Nutrients*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/nu11050966>
- Barić, L., Drenjančević, I., Matić, A., Stupin, M., Kolar, L., Mihaljević, Z., Lenasi, H., Šerić, V. i Stupin, A. (2019). Seven-Day Salt Loading Impairs Microvascular Endothelium-Dependent Vasodilation without Changes in Blood Pressure, Body Composition and Fluid Status in Healthy Young Humans. *Kidney and Blood Pressure Research*, 44(4), 835–847. <https://doi.org/10.1159/000501747>
- Breškić Ćurić, Ž., Stupin, A., Masle, A. M., Šušnjara, P., Kozina, N., Mihaljević, Z., Jukić, I., Kibel, A., Kolobarić, N., Juranić, B., Nejašmić, D., Šporec, A., Lovrić, M., Selthofer-Relatić, K. i Drenjančević, I. (2023). Patients with Chronic Coronary Syndrome Can Benefit from Consumption of Enriched Chicken Eggs: The Effects on Microvascular Function, Inflammatory Biomarkers, and Oxidative Status—Randomized Clinical Study. *Applied Sciences*, 13(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/app132212442>
- Christensen, J. H., Gustenhoff, P., Korup, E., Aarøe, J., Toft, E., Møller, J., Rasmussen, K., Dyerberg, J. i Schmidt, E. B. (1996). Effect of fish oil on heart rate variability in survivors of myocardial infarction: A double blind randomised controlled trial. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 312(7032), 677–678. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7032.677>
- Collet, J.-P., Thiele, H., Barbato, E., Barthélémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D. L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliquet, T., Gale, C. P., Gilard, M., Jobs, A., Jüni, P., Lambrinou, E., Lewis, B. S., Mehilli, J., Meliga, E., Merkely, B., ... ESC Scientific Document Group. (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 42(14), 1289–1367. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa575>
- Connor, W. (1994). N-3 Fatty acids and heart disease. In *Nutrition and Disease* (pp. 7–42). American Oil Chemists' Society (AOCS).



Ćurić, Ž. B., Masle, A. M., Kibel, A., Selthofer-Relatić, K., Stupin, A., Mihaljević, Z., Jukić, I., Stupin, M., Matić, A., Kozina, N., Šušnjara, P., Juranić, B., Kolobarić, N., Šerić, V. i Drenjančević, I. (2021). Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome—A Randomized Study. *Biology*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/biology10080774>

Demarquoy, J. i Borgne, F. L. (2014). Biosynthesis, metabolism and function of protectins and resolvins. *Clinical Lipidology*, 9(6), 683–693. <https://doi.org/10.2217/clp.14.44>

Drenjančević, I., Kralik, G., Kralik, Z., Mihalj, M., Stupin, A., Novak, S. i Grčević, M. (2017). The Effect of Dietary Intake of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health: Revealing Potentials of Functional Food. In *Superfood and Functional Food—The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine* (p. 256). IntechOpen.

Fabian, C., Kimler, B. i Hursting, S. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research : BCR*, 17, 62. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0571-6>

Hasler, C. M. (2002). Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3772–3781. <https://doi.org/10.1093/jn/132.12.3772>

Holman, R. T. (1998). The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *The Journal of Nutrition*, 128(2 Suppl), 427S-433S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.427S>

Husted, K. S. i Bouzinova, E. V. (2016). The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder. *Medicina*, 52(3), 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.medic.2016.05.003>

Infante, J. P. i Huszagh, V. A. (1998). Analysis of the putative role of 24-carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *FEBS Letters*, 431(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00720-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00720-0)

Jain, A. P., Aggarwal, K. K. i Zhang, P.-Y. (2015). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(3), 441–445.

Knuuti, J., Wijns, W., Saraste, A., Capodanno, D., Barbato, E., Funck-Brentano, C., Prescott, E., Storey, R. F., Deaton, C., Cuisset, T., Agewall, S., Dickstein, K., Edvardsen, T., Escaned, J., Gersh, B. J., Svitil, P., Gilard, M., Hasdai, D., Hatala, R., ... ESC Scientific Document Group. (2020). 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *European Heart Journal*, 41(3), 407–477. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz425>

Kolar, L., Stupin, M., Stupin, A., Šušnjara, P., Mihaljević, Z., Matić, A., Jukić, I., Kolobarić, N. i Drenjančević, I. (2021). Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(4), 388–399. <https://doi.org/10.3746/pnf.2021.26.4.388>

Kolar, L., Šušnjara, P., Stupin, M., Stupin, A., Jukić, I., Mihaljević, Z., Kolobarić, N., Bebek, I., Nejašmić, D., Lovrić, M. i Drenjančević, I. (2023). Enhanced Microvascular Adaptation to Acute Physical Stress and Reduced Oxidative Stress in Male Athletes Who Consumed Chicken Eggs Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Antioxidants-Randomized Clinical Trial. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(11), 2140. <https://doi.org/10.3390/life13112140>

Kolobarić, N., Drenjančević, I., Matić, A., Šušnjara, P., Mihaljević, Z. i Mihalj, M. (2021). Dietary Intake of n-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults—A Randomised Study. *Nutrients*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/nu13061851>

Kralik, Z., Kralik, G., Košević, M., Galović, O. i Samardžić, M. (2023). Natural Multi-Enriched Eggs with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Vitamin E, and Lutein. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(2), 321. <https://doi.org/10.3390/ani13020321>

Li, C., Wu, X., Liu, S., Shen, D., Zhu, J. i Liu, K. (2020). Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of Neurological Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00612>

Li, H., Horke, S. i Förstermann, U. (2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237(1), 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001>

Maki, K. C., Van Elswyk, M. E., McCarthy, D., Seeley, M. A., Veith, P. E., Hess, S. P., Ingram, K. A., Halvorson, J. J., Calaguas, E. M. i Davidson, M. H. (2003). Lipid responses in mildly hypertriglyceridemic men and women to consumption of docosahexaenoic acid-enriched eggs. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*, 73(5), 357–368. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.73.5.357>

Masle, A. M., Kibel, A., Jukić, I., Čičak, P., Selthofer-Relatić, K., Stupin, A., Mihaljević, Z., Šušnjara, P., Breškić Čurić, Ž., Bačun, T. i Drenjančević, I. (2024). Enhancing Endothelial Function with Nutrient-Enriched Table Hen Eggs: A Randomized Study in Patients Recovering from Acute Coronary Syndrome. *Clinical Interventions in Aging*, 19, 953–970. <https://doi.org/10.2147/CIA.S461821>

- Medina-Leyte, D. J., Zepeda-García, O., Domínguez-Pérez, M., González-Garrido, A., Villarreal-Molina, T. i Jacobo-Albavera, L. (2021). Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms22083850>
- Nindrea, R. D., Aryandono, T., Lazuardi, L. i Dwiprahasto, I. (2019). Association of Dietary Intake Ratio of n-3/n-6 Polyunsaturated Fatty Acids with Breast Cancer Risk in Western and Asian Countries: A Meta-Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(5), 1321–1327. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.5.1321>
- Perić, L., Rodić, V. i Milošević, N. (2011). Production of poultry meat and eggs as functional food: Challenges and opportunities. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(3), 511–520. <https://doi.org/10.2298/BAH1103511P>
- Schunck, W.-H., Konkel, A., Fischer, R. i Weylandt, K.-H. (2018). Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 183, 177–204. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.016>
- Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. (1999). *British Journal of Nutrition*, 81(4), S1–S27. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
- Shahidi, F. (2004). Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. *Journal of Food Science*, 69(5), R146–R149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10727.x>
- Stupin, A., Drenjančević, I., Šušnjara, P., Debeljak, Ž., Kolobarić, N., Jukić, I., Mihaljević, Z., Martinović, G. i Selthofer-Relatić, K. (2021). Is There Association between Altered Adrenergic System Activity and Microvascular Endothelial Dysfunction Induced by a 7-Day High Salt Intake in Young Healthy Individuals. *Nutrients*, 13(5), 1731. <https://doi.org/10.3390/nu13051731>
- Stupin, A., Mihalj, M., Kolobarić, N., Šušnjara, P., Kolar, L., Mihaljević, Z., Matić, A., Stupin, M., Jukić, I., Kralik, Z., Grčević, M., Kralik, G., Šerić, V. i Drenjančević, I. (2020). Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals—Clinical Trial. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms21114149>
- Stupin, A., Rasic, L., Matic, A., Stupin, M., Kralik, Z., Kralik, G., Grcevic, M. i Drenjancevic, I. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs consumption enhances microvascular reactivity in young healthy individuals. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, 43(10), 988–995. <https://doi.org/10.1139/apnm-2017-0735>

Šušnjara, P., Kolobarić, N., Matić, A., Mihaljević, Z., Stupin, A., Marczi, S. i Drenjančević, I. (2022). Consumption of Hen Eggs Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Selenium, Vitamin E and Lutein Incites Anti-Inflammatory Conditions in Young, Healthy Participants—A Randomized Study. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 27(12), 332. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2712332>

Šušnjara, P., Mihaljević, Z., Stupin, A., Kolobarić, N., Matić, A., Jukić, I., Kralik, Z., Kralik, G., Miloloža, A., Pavošević, T., Šerić, V., Lončarić, Z., Kerovec, D., Galović, O. i Drenjančević, I. (2023). Consumption of Nutritionally Enriched Hen Eggs Enhances Endothelium-Dependent Vasodilation via Cyclooxygenase Metabolites in Healthy Young People-A Randomized Study. *Nutrients*, 15(7), 1599. <https://doi.org/10.3390/nu15071599>

Šušnjara, P., Perić, L., Drenjančević, I., Vrbanić, M., Kolobarić, N., Mihaljević, Z., Kolar, M., Matić, S. i Vuković, M. J. (2023). Can an eye benefit from an egg? Addition of lutein in functional food products affects the macula lutea of young healthy individuals. *Proceeding of the Shevchenko Scientific Society. Medical Sciences*, 71(1), Article 1. <https://doi.org/10.25040/ntsh2023.01.10>

Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M. i Tang, E. H. C. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease—A 30th anniversary update. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 219(1), 22–96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>

Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J. F. i Vita, J. A. (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(7), 1149–1160. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00994-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00994-X)

Widmer, R. J. i Lerman, A. (2014). Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Global Cardiology Science & Practice*, 2014(3), 291–308. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.43>

Wijendran, V. i Hayes, K. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), 597–615. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132106>

Yang, L. G., Song, Z. X., Yin, H., Wang, Y. Y., Shu, G. F., Lu, H. X., Wang, S. K. i Sun, G. J. (2016). Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. *Lipids*, 51(1), 49–59. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4091-z>

FUNCTIONAL FOOD IN THE SERVICE OF HEALTH - WHAT HAVE WE LEARNED FROM RANDOMIZED CLINICAL STUDIES?

Ines DRENJANČEVIĆ*

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia

ines.drenjancevic@mefos.hr

Ana STUPIN

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia

astupin@mefos.hr

Zrinka MIHALJEVIĆ

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia

zmihaljevic@mefos.hr

Nikolina KOLOBARIĆ

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia

nbdujmusic@mefos.hr

Ivana JUKIĆ

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia

ijukic@mefos.hr

Petar ŠUŠNJARA

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Kinesiology Osijek, Drinska 16a Osijek, Croatia

psusnjara@mefos.hr

Marko STUPIN

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia

Clinical Hospital Centre Osijek, Clinic for internal diseases, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia
mstupin@mefos.hr

Martina MIHALJ

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia

Clinical Hospital Centre Osijek, Institute for dermatology and venerology, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia
mmihalj@mefos.hr

Aleksandar KIBEL

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia
akibel@mefos.hr

Brankica JURANIĆ

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttler 4, Osijek, Croatia

Clinical Hospital Centre Osijek, Clinic for internal diseases, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia
juranicbrankica@gmail.com

Kristina SELTHOFER-RELATIĆ

Scientific Centre of Excellence for Personalized Health Care, Trg sv. Trojstva 3, Osijek, Croatia

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, J. Huttler 4, Osijek, Croatia

Clinical Hospital Centre Osijek, Clinic for internal diseases, J. Huttlera 4, Osijek, Croatia
ksrelatic@mefos.hr

Summary

During the period from 2017 to 2023, as part of the activities of the Scientific Center of Excellence for Personalized Health Care, the European Structural and Investment Funds project #KK.01.1.1.01.0010, one of the objectives of which was research, production and



medical testing of functional food within the scope of Research Unit 2, which consisted of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, the Department of Chemistry of the University of Osijek and the Faculty of Medicine Osijek. The aim of part of the research carried out at the Faculty of Medicine in Osijek was to examine the effect of the consumption of functional food (enriched eggs) on microvascular function, oxidative status and inflammation in young, healthy subjects and athletes, as well as patients with acute and chronic coronary disease, within the framework of clinical randomized controlled intervention studies. All protocols were approved by the competent ethics commissions and subjects gave written informed consent.

Participants in separate clinical trials consumed 2 or 3 regular eggs (75-250 mg/day) or 2 or 3 eggs enriched only with n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) in different amounts (from 410-1050 mg/day) or 3 eggs enriched with n-3 PUFA (1050 mg/day), selenium (0.06 mg/day), lutein (1.85 mg/day and vitamin E (3.29 mg/day).

Both types of enriched eggs changed the profile of free fatty acids in all subjects to a more favorable lower n6/n3 ratio. There is a significant benefit and enhancement of microvascular reactivity after consumption of n-3 PUFA enriched eggs in young healthy subjects and athletes, while in cardiovascular patients no such effect was observed after n-3 PNMK eggs, but it was after eggs with n-3 PUFA and antioxidants. The effect was more pronounced at daily doses of n-3 PUFA >770mg/day. At the same time, there were no significant changes in blood pressure, lipid profile in any group of subjects. A mild anti-inflammatory effect was achieved in coronary patients. Biochemical analyzes showed changes in the level of cytokines, lipid mediators of inflammation and vascular reactivity towards a decrease in pro-inflammatory, vasoconstrictive, and an increase in anti-inflammatory, vasodilator and resolvins mediators.

The consumption of eggs enriched with functional ingredients, primarily n-3 PUFA, has a positive effect on the health of both healthy young subjects and athletes, as well as cardiovascular patients with post-acute and chronic coronary syndrome. The effect on the reactivity of small blood vessels, the reduction of oxidative stress and the improvement of inflammation is especially pronounced. Therefore, eggs can be recommended in the daily diet, and enriched eggs meet the requirement for functional food.

Key words: functional food, cardiovascular diseases, inflammation

Key message of the paper: Consumption of eggs enriched with functional ingredients, primarily n-3 polys of saturated fatty acids, has a positive effect on the health of both healthy young subjects and athletes, as well as cardiovascular patients. Therefore, eggs can be recommended in the daily diet, and enriched eggs meet the requirement for functional food.