DR.01 PRIJAVA NACRTA DOKTORSKOGA RADA

Molimo datoteku nazvati DR.01_-_Prezime_Ime.pdf
Ispunjeni obrazac DR.01 poslati u elektroničkom i tiskanom obliku, potpisan, u nadležnu referadu.

PODACI O DOKTORANDU/DOKTORANDICI

Ime i prezime doktoranda / doktorandice	Ines Peremin, mag. ing. bioproc.
Matični broj doktoranda / doktorandice	417/IBZ
Adresa	Presečno 186, Novi Marof, Hrvatska
Telefon / mobitel	0911605906
E-mail	iperemin@pbf.hr

OPĆI PODACI O STUDIJU

Nositelj studija	Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Naziv studija	Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
Naziv partnerske institucije (u slučaju da se radi o dvojnom doktoratu)	
Naziv upisanog doktorskog studija na partnerskoj instituciji (u slučaju da se radi o dvojnom doktoratu)	
Područje / polje / grana (ako se doktorski studij izvodi u grani)	biotehničke znanosti

ŽIVOTOPIS DOKTORANDA / DOKTORANDICE

Obrazovanje (kronološki od novijeg k starijem datumu)	1. **Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet**, *Bioprocesno inženjerstvo*, Diplomski, Hrvatska (2019./2020.) 2. **Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet**, *Biotehnologija*, Prijediplomski, Hrvatska (2016./2017.)
Radno iskustvo (kronološki od novijeg k starijem datumu)	**2020. – danas** Asistent u Laboratoriju za analitičku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
Popis radova i aktivnih sudjelovanja na znanstvenim skupovima ili javno predstavljenih umjetničkih radova	1. Emal, Lima M.; Tamminga, Sietske J.; Schaafsma, Frederieke G.; Jakasa, Ivone; Peremin, Ines; Kirschbaum, Clemens; van der Molen, Henk F.; Kezic, Sanja Exploring the potential of stratum corneum biomarkers for assessing psychological distress in health care workers: An observational pilot study // Health science reports, 7 (2024), 1; e1710, 9. doi: 10.1002/hsr2.1710 2. Peremin, Ines; Jakasa, Ivone; Gajski, Goran Utjecaj vegetarijanske prehrane na razine upalnih biomarkera u ljudskom organizmu // Dan doktorata biotehničkog područja 2021. Zagreb, Hrvatska, 16.09.2021-17.09.2021 3. Mikulec, Nataša; Domović, Dario; Oštarić, Fabijan; Plavljanić, Dijana; Horvat, Iva; Špoljarić, Jasminka; Peremin, Ines; Jakaša, Ivone

	Determining the mineral composition of „Paški sir“ cheese using inductively coupled plasma mass spectrometry method // Zbornik sažetaka 59. hrvatskog i 19. međunarodnog simpozija agronoma / Carović-Stanko, Klaudija; Kljak, Kristina (ur.). Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, 2024. str. 185-185 4. Peremin, Ines; Jakasa, Ivone HPLC method for determination of natural moisturizing factor components in the stratum corneum // 16th International conference, Laboratory competence 2021 Book of abstracts. 2021. str. 97-97 5. Peremin, Ines; Kezic, Sanja; Jurakic Toncic, Ruzica; Jakasa, Ivone Altered levels of dehydroepiandrosterone sulphate and cholesterol sulphate in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis // E2BRN Conference Edinburgh, Ujedinjeno Kraljevstvo, 28.09.2023-29.09.2023 6. Grubišić, Marina ; Galić Perečinec, Maja ; Peremin, Ines ; Mihajlovski, Katarina ; Beluhan, Sunčica ; Šantek, Božidar ; Ivančić Šantek, Mirela Optimization of Pretreatment Conditions and Enzymatic Hydrolysis of Corn Cobs for Production of Microbial Lipids by Trichosporon oleaginosus // Energies (Basel), 15 (2022), 9; 3208, 16. doi: 10.3390/en15093208 7. Gajski, Goran; Gerić, Marko; Jakasa, Ivone; Peremin, Ines; Domijan, Ana-Marija; Vučić Lovrenčić, Marijana; Kežić, Sanja; Bituh, Martina; Moraes de Andrade, Vanessa Inflammatory, oxidative and DNA damage status in vegetarians: is the future of human diet green? // Critical reviews in food science and nutrition, 63 (2023), 18; 3189-3221. doi: 10.1080/10408398.2021.1986464 8. Grubišić, Marina; Peremin, Ines; Djedović, Elvis; Šantek, Božidar; Ivančić Šantek, Mirela Cultivation of a Novel Strain of Chlorella vulgaris S2 under Phototrophic, Mixotrophic, and Heterotrophic Conditions, and Effects on Biomass Growth and Composition // Fermentation, 10 (2024), 6; 270-293. doi: 10.3390/fermentation10060270 9. Peremin, Ines; Gerić, Marko; Domijan, Ana-Marija; Kezic, Sanja; Jakaša, Ivone; Gajski, Goran Croatian vegetarian study: V2.0 // Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 75 Suppl. 1, 2024. str. 165-165 10. Sekovanić, Ankica; Kovačić, Jelena; Orct, Tatjana; Peremin, Ines; Pašalić, Daria; Crnjac, Fran; Kljaković-Gašpić, Zorana; Gerić, Marko; Jakaša, Ivone; Gajski Goran MTHFR 677C/T gene polymorphism influences trace element levels in non-vegetarians and vegetarians // Book of Abstracts of the 15th ISTERH Conference / Martínez López, Emma; Young, Jamie (ur.). Murcia: International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH), 2024. str. 51-52 11. Orct,Tatjana; Kovačić, Jelena; Sekovanić, Ankica; Peremin, Ines; Kljaković-Gašpić, Zorana; Gerić, Marko; Jakaša, Ivone; Gajski, Goran Element status of vegetarians in comparison to non-vegetarians from Zagreb, Croatia // Book of Abstracts of the 15th ISTERH Conference / Martínez López, Emma; Young, Jamie (ur.). Murcia: International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH), 2024. str. 56-56
PRIJEDLOG NASLOVA DOKTORSKOGA RADA	
Jezik pisanja rada	Hrvatski
Naslov na hrvatskom	Povezanost vegetarijanske i mješovite prehrane s upalom, oksidacijskim stresom i genomskim oštećenjima
Naslov na engleskom	Association of vegetarian and omnivorous diets with inflammation, oxidative stress, and genomic damage
Naslov na jeziku na kojem će se pisati rad (ako nije na hrvatskom ili engleskom)	
PREDLOŽENI MENTOR(I)	

(navesti drugog mentora ako se radi o interdisciplinarnom istraživanju ili ako postoji neki drugi razlog za dvostruko mentorstvo)			
	Ime i prezime, titula	**Ustanova, država**	**E-Mail**
Mentor	**prof. dr. sc. Ivone Jakaša**	**Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Hrvatska**	**ijakasa@pbf.hr**
Mentor	**dr. sc. Goran Gajski, viši znanstveni suradnik**	**Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska**	**ggajski@imi.hr**

KOMPETENCIJE MENTORA

Mentor

Popis do pet objavljenih relevantnih radova u posljednjih pet godina

1. Gether, L., Linares, H. P. I., Kezic, S., Jakasa, I., Forman, J., Sørensen, O. E. i sur. (2025) Skin and systemic inflammation in adults with atopic dermatitis before and after whole-body topical betamethasone 17-valerate 0.1% or tacrolimus 0.1% treatment: A randomized controlled study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **39**, 308–321.

2. Gajski, G., Gerić, M., Jakaša, I., Peremin, I., Domijan, A. M., Vučić Lovrenčić, M. i sur. (2023) Inflammatory, oxidative and DNA damage status in vegetarians: is the future of human diet green? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **63**, 3189–3221.

3. Rinnov, M. R., Halling, A., Gerner, T., Ravn, N. H., Knudgaard, M. H., Trautner, S. i sur. (2023) Skin biomarkers predict development of atopic dermatitis in infancy. *Allergy* **78**, 791–802.

4. Halling, A., Rinnov, M. R., Ruge, I. F., Gerner, T., Ravn, N. H., Knudgaard, M. H. i sur. (2022) Skin TARC/CCL17 increase precedes the development of childhood atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **151**, 1550–1557.

5. Keurentjes, A. J., Jakasa, I., Kezic, S. (2021) Research techniques made simple: stratum corneum tape stripping. *J. Invest. Dermatol.* **141**, 1129–1133.

Mentor

Popis do pet objavljenih relevantnih radova u posljednjih pet godina

1. Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D. i sur. (2023) Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat. Protoc.* **18**, 929–989.

2. Gajski, G., Matković, K., Delić, L., Gerić, M. (2023, 8. svibnja) Evaluation of primary DNA damage in young healthy females based on their dietary preferences. *Nutrients* **15**, 2218. https://doi.org/10.3390/nu15092218

3. Gajski, G., Gerić, M., Jakaša, I., Peremin, I., Domijan, A. M., Vučić Lovrenčić, M. i sur. (2023) Inflammatory, oxidative and DNA damage status in vegetarians: is the future of human diet green? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **63**, 3189–3221.

4. Gerić, M., Matković, K., Gajski, G., Rumbak, I., Štancl, P., Karlić, R. i sur. (2022, 9. rujna)

Adherence to Mediterranean diet in Croatia: Lessons learned today for a brighter tomorrow. *Nutrients* **14**, 3725. https://doi.org/10.3390/nu14183725

5. Vučić Lovrenčić, M., Gerić, M., Košuta, I., Dragičević, M., Garaj-Vrhovac, V., Gajski, G. (2020, 22. srpnja) Sex-specific effects of vegetarian diet on adiponectin levels and insulin sensitivity in healthy non-obese individuals. *Nutrition* **79**–**80**, 110862. https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110862

OBRAZLOŽENJE ZA DVOJNO MENTORSTVO

Dvojno mentorstvo neophodno je zbog interdisciplinarnog karaktera predloženog istraživanja koje prvenstveno zahtijeva kompetencije mentora iz područja imunologije, molekularne biologije i analitičke kemije. Za prvog mentora predlaže se prof. dr. sc. Ivone Jakaša, kemičarka i europski registrirani toksikolog (ERT), zaposlena u Laboratoriju za analitičku kemiju Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Njezina ekspertiza i objavljeni radovi uključuju istraživanja vezana uz razvoj analitičkih postupaka za određivanje biokemijskih markera funkcije kožne barijere i upale te istraživanja povezanosti razine ciljanih biokemijskih markera s kožnim oboljenjima. U skladu s navedenim, vodit će dijelove istraživanja koji obuhvaćaju analizu markera funkcije kožne barijere i markera upale u uzorcima rožnatog sloja kože i krvi. Za drugog mentora predlaže se dr. sc. Goran Gajski, viši znanstveni suradnik, molekularni biolog i europski registrirani toksikolog (ERT), zaposlen u Zavodu za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Njegova ekspertiza i objavljeni radovi uključuju istraživanja vezana uz genetičku i okolišnu toksikologiju odnosno biomonitoring populacija. Sukladno tome, vodit će dijelove istraživanja koji obuhvaćaju regrutaciju ispitanika, prikupljanje uzoraka te analizu markera oksidacijskog stresa, genomskih oštećenja i ostalih relevantnih biokemijskih markera i anorganskih elemenata. U skladu s navedenim, dio istraživanja koji se odnosi na uzorkovanje i rad sa ispitanicima provodit će se na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu uz odobrenje Etičkog povjerenstva Instituta. Kemijske analize će se provoditi na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i suradničkim nacionalnim i inozemnim znanstveno-istraživačkim ustanovama. Dvojno mentorstvo osigurat će razvoj interdisciplinarnih vještina doktorandice i povećati relevantnost odnosno primjenjivost dobivenih rezultata.

OBRAZLOŽENJE NACRTA DOKTORSKOGA RADA

Sažetak na hrvatskom jeziku (maksimalno 1000 znakova s praznim mjestima)	Predlaže se presječno istraživanje na uzorcima populacija zdravih odraslih vegetarijanaca i svejeda u svrhu analize povezanosti prehrambenih obrazaca s kroničnom upalom niskog intenziteta, oksidacijskim stresom i genomskim oštećenjima. Utvrdit će se razlike u sistemskim razinama C-reaktivnog proteina i širokog spektra citokina (određenih multipleks imunometodom), razinama aktivnosti antioksidacijskih enzima odnosno stupnju primarnih oštećenja DNA između vegetarijanaca i svejeda. Usporedit će se i sistemske razine slobodnih aminokiselina, njihovih derivata i anorganskih makro- i mikroelemenata, uključujući toksične metale. Također, istražit će se povezanost obrazaca prehrane s razinama markera upale u rožnatom sloju kože odnosno razinama čimbenika hidratacije kože koji predstavljaju ključnu skupinu markera funkcije kožne barijere. Multivarijatnim statističkim modelima analizirat će se odnosi između obrazaca prehrane i ispitivanih markera uz kontrolu kovarijata.
Sažetak na engleskom jeziku (maksimalno 1000 znakova s praznim mjestima)	A cross-sectional study is proposed on samples from healthy adult vegetarian and omnivorous populations to assess the associations between dietary patterns and chronic low-grade inflammation, oxidative stress, and genomic damage. Differences between vegetarians and omnivores will be determined with respect to systemic levels of C-reactive protein and a wide range of cytokines (quantified using a multiplex immunoassay), antioxidant enzyme activity, and the extent of primary DNA damage. In addition, systemic levels of free amino acids, their derivatives, and inorganic macro- and microelements, including toxic metals, will be compared. The study will also explore the association between dietary patterns and the levels of inflammatory markers in the outermost skin layer, along with natural moisturizing factors, a key group of skin barrier function markers. To analyze these relationships, multivariate statistical models will be applied while controlling for covariates.
Uvod i pregled dosadašnjih istraživanja (preporučeno 7000 znakova s praznim mjestima)	

Uzajamno djelovanje kronične upale i oksidacijskog stresa u ljudskom organizmu sve je češće prepoznato kao važan čimbenik u razvoju i progresiji mnogih bolesti i stanja, posebice metaboličkog sindroma koji se smatra gorućim globalnim zdravstvenim izazovom. Upala predstavlja biološki odgovor na ozljede tkiva i štetne podražaje poput patogena ili toksina. Osim akutnim podražajima, upala može biti izazvana i životnim stilom, a rizični čimbenici su ponajviše neuravnotežena prehrana, visceralna pretilost, sjedilački način života, psihološki i fizički stres i sl. Navedeni čimbenici u stanju su izazvati tzv. kroničnu upalu niskog intenziteta (engl. *chronic low-grade inflammation*) koja se opisuje kao blaga, tinjajuća sistemska upala karakterizirana odsutnošću tipičnih kliničkih manifestacija (Furman i sur., 2019). Oksidacijski stres i upala blisko su povezani patofiziološki procesi, skloni uzajamnom induciranju i amplificiranju. Iako je zadaća upalnog odgovora organizma neutralizirati štetne stimulanse, dugoročna upala može izazvati neprekidno generiranje reaktivnih kisikovih vrsta čije prekomjerno nastajanje uzrokuje nepoželjne oksidacijske promjene bioloških makromolekula, uključujući molekulu DNA. Obratno, posljedica oksidacijskog stresa može biti pokretanje unutarstanične signalne kaskade kojom se aktivira ekspresija proupalnih gena (Chatterjee, 2016). Dugotrajni oksidacijski stres može rezultirati raznim oštećenjima DNA, pri čemu oksidacijsku štetu u najvećoj mjeri uzrokuje hidroksilni radikal, što se najčešće očituje u modifikaciji dušikovih baza i lomovima lanaca DNA (Van Remmen i sur., 2003). U slučajevima teških ili nepopravljivih oštećenja DNA često dolazi do senescencije stanica, odnosno trajnog prestanka diobe. Drugim riječima, daljnja proliferacija stanica je spriječena što predstavlja svojevrsnu zaštitu od tumorigeneze (Rodier i sur., 2009). Međutim, takve stanice stječu tzv. sekretorni fenotip povezan sa starenjem (engl. *senescence associated secretory phenotype*), sklon sekreciji proupalnih citokina, kemokina, faktora rasta itd. Prehrana predstavlja jedan od važnijih čimbenika koji utječu na cjelokupno zdravlje pojedinca. Nameće se pitanje mogu li specifični obrasci prehrane, koji se prakticiraju dugoročno, izazvati kroničnu upalu niskog intenziteta odnosno oksidacijski stres, čije uzajamno djelovanje rezultira čak i ozbiljnim genomskim oštećenjima, čime se dalje propagira ovaj štetni ciklus.

Vegetarijanska prehrana oduvijek se promovirala kao vrsta prehrane čiji je učinak na zdravlje blagotvoran. Brojna istraživanja pokazala su da vegetarijanska prehrana, u odnosu na prehranu svejeda, smanjuje rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Key i sur., 1999; Satija i Hu, 2018), dijabetesa (Olfert i Wattick, 2018) i pretilosti (Newby i sur., 2005). Također, dijetalne intervencije koje su uključivale ovu vrstu prehrane istaknule su uspjeh u regulaciji tjelesne mase već pretilih pojedinaca (Bassin i sur., 2024). Trend vegetarijanske, a poglavito veganske prehrane izrazito jača od početka 21. stoljeća, posebice u razvijenim zemljama gdje se ovaj obrazac prehrane može smatrati vlastitim izborom pojedinca. U prilog jačanju ovog trenda, između ostalog, govore istraživanja koja sve više ističu proupalna svojstva prehrane bogate crvenim mesom i mesnim prerađevinama, karakteristične za zapadnjački način života, zahvaljujući visokom udjelu zasićenih masnih kiselina, kolesterola i prisutnosti heterocikličkih amina nastalih toplinskom obradom mesa (Carvalho i sur., 2015; Chai i sur., 2017). Pored navedenog, mesne prerađevine sadrže nitrite koji reakcijom s nekim aminima daju nitrozamine, spojeve koji potiču upalu i razvoj karcinoma (Schrenk i sur., 2023). Razumijevanje složenog međudjelovanja upale, oksidacijskog stresa i oštećenja DNA moglo bi rasvijetliti patogenezu kroničnih bolesti, ali i pridonijeti razjašnjavanju uloge prehrane u razvoju istih.

Većina dosad provedenih znanstvenih istraživanja bavila se izdvojenim, pojedinačnim aspektima opisane problematike. Drugim riječima, malobrojna su istraživanja istovremeno razmatrala upalu, oksidacijski stres i genomska oštećenja u kontekstu usporedbe vegetarijanske i mješovite prehrane koja uključuje meso i mesne proizvode. Zaključci o upalnim stanjima uglavnom su se izvodili na temelju proučavanja jednog markera upale i to najčešće C-reaktivnog proteina (CRP) koji spada u proteine akutne faze. Riječ je o pouzdanom markeru upale koji se u kliničkoj praksi primjenjuje u dijagnostici akutnih i kroničnih upalnih procesa. Povišene razine CRP-a, čak i u klinički normalnom rasponu, mogu upućivati na postojanje kronične upale, a služe i kao svojevrsni prediktori rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (Ridker, 2003). Stoga su u većinu epidemioloških studija ovog tipa uključeni ispitanici bez opisanih patologija, u svrhu mjerenja bazalne razine CRP-a u krvi. Izvođenje čvršćih zaključaka o latentnim upalnim procesima zahtijeva proučavanje većeg broja pouzdanih markera upale. Citokini, signalni peptidi male molekulske mase, imaju središnju ulogu u finoj modulaciji imunološkog odgovora koja se očituje u složenom proupalnom odnosno protuupalnom djelovanju. Ovi markeri pružaju slojevit uvid u kroničnu upalu zahvaljujući ciljanom djelovanju na specifične stanice imunološkog sustava ovisno o vrsti i trajanju podražaja. Broj znanstvenih radova u kojima su proučavane razine citokina u dijetalnim skupinama od interesa osjetno je manji, a istraživanja su uglavnom obuhvaćala ograničen broj citokina (Montalcini i sur., 2015; Menzel i sur., 2020; Jenko Pražnikar i sur., 2023).

Ponekad se lokalizirani upalni procesi slabo reflektiraju na sistemskoj razini. Koža, poglavito njezin površinski sloj, epidermis, čini prvu liniju obrane od štetnih okolišnih čimbenika te stoga predstavlja svojevrsni aktivni organ imunološkog sustava. Specijalizirane imunološke stanice epidermisa (Langerhansove stanice i tkivno-rezidentne memorijske stanice) i keratinociti, koji su po aktivaciji skloni sekreciji citokina, u stanju su pokrenuti i regulirati lokalne upalne odgovore (Guttman-Yassky i sur., 2019). Značaj kože kao organa imunološkog sustava očituje se ponajviše kod kroničnih bolesti i poremećaja kože poput atopijskog dermatitisa, psorijaze, akni i sl. Mehanizmi putem kojih prehrana djeluje na zdravlje kože još uvijek nisu razjašnjeni. Vegetarijanska prehrana pokazala se djelotvornom u ublažavanju simptoma kroničnih bolesti kože u okviru dijetalnih intervencija. Međutim, istraživanja bazalnih upalnih procesa u koži zdravih ispitanika u ovisnosti o obrascu prehrane do sada nisu provedena. Oksidacijski stres i upalni procesi u koži za posljedicu mogu imati razne fiziološke učinke (Tsuchida i Kobayashi, 2020). Primjerice, mogu se izmijeniti obrasci vlaženja kože promjenom omjera pojedinih komponenti kože

zaduženih za njenu hidrataciju (engl. *natural moisturizing factors*, NMF) i smanjenjem njihovih apsolutnih razina u koži. Neuravnotežena prehrana naizgled pridonosi oksidacijskom stresu ili pak upali kože, koji mogu poremetiti funkciju kožne barijere na prethodno opisan način. Međutim, logično je pretpostaviti i obratno, da prehrana izravno remeti razine NMF-a, što slabi funkciju kožne barijere i rezultira kožom podložnijom razvoju upale i oksidacijskog stresa. Usporedba utjecaja specifičnih obrazaca prehrane na razine ovih markera u rožnatom sloju kože do sada nije provedena.

Kada je riječ o istraživanju zdravstvene dobrobiti odnosno rizika vegetarijanske prehrane, opsegom objavljenih literaturnih radova prednjači područje koje se bavi oksidacijskim stresom. U prošlosti se vegetarijancima nespretno pripisivao povoljniji status po pitanju oksidacijskog stresa zahvaljujući povećanom unosu tzv. antioksidansa, koji podrazumijevaju male molekule poput vitamina, za koje se vjerovalo da pružaju zaštitu od štetnog djelovanja slobodnih radikala i posljedično mnogih bolesti. Međutim, velika klinička istraživanja s kraja 20. i početka 21. stoljeća dala su poražavajuće rezultate kod primjene antioksidansa s ciljem prevencije ili terapije raznih bolesti (Omenn i sur., 1996; Myung i sur., 2013). Za primarnu antioksidacijsku obranu stanice zaduženi su antioksidacijski enzimi koji neusporedivo većom brzinom reagiraju s oksidansima u odnosu na ranije spomenute male molekule (Forman i Zhang, 2021). Relevantna istraživanja iz područja nutrigenomike prvenstveno su usredotočena na evaluaciju primarnih oštećenja DNA, poput jednolančanih i dvolančanih lomova, ali se učestalo proučavaju i kromosomska oštećenja koja daju uvid u razinu genomske nestabilnosti. Utvrđeno je da višak odnosno manjak esencijalnih nutrijenata, koji sudjeluju u replikaciji, popravku i održavanju cjelovitosti DNA, utječe na razine oštećenja DNA, čak i do mjere u kojoj to čine kemijski i fizikalni mutageni (Fenech, 2019). Povezanost viška ili manjka pojedinih aminokiselina odnosno anorganskih makro- i mikroelemenata s upalom i oksidacijskim stresom utvrđena je *in vivo* i *in vitro* eksperimentalnim modelima (Foster & Samman, 2012; Derouiche et al., 2024). Međutim, u složenom sustavu poput ljudskog organizma, modulacija njihovih razina pod utjecajem cjelokupnih prehrambenih obrazaca, kao i njihova povezanost s navedenim procesima u nepatološkim (subkliničkim) uvjetima nije u potpunosti razjašnjena. Uz esencijalne i neesencijalne nutrijente, hranom u organizam često dospijevaju i toksični metali. Riječ je o elementima koji nemaju korisnu biološku funkciju; naprotiv, njihova se prisutnost u organizmu povezuje s aktivacijom upalnih signalnih puteva, oksidacijskim stresom i oštećenjem DNA (Haidar et al., 2023).

Istraživanja u navedenim područjima nisu dovela do konsenzusa o dobrobiti vegetarijanske prehrane (Gajski i sur., 2023). Oprečni rezultati istraživanja koja su obrađivala ovu tematiku najčešće su posljedica neuniformne definicije vegetarijanstva i manjkavog opisa istraživanih dijetalnih skupina. Važnu ulogu u interpretaciji rezultata ima i geopolitička značajka ispitivanih populacija budući da jednako definirana vrsta prehrane može podrazumijevati specifičan nutritivni unos ovisno o podneblju, kulturi i političkim prilikama u ispitivanoj populaciji.

Cilj i istraživačka pitanja i/ili hipoteze istraživanja (preporučeno 700 znakova s praznim mjestima)
Redoslijed navođenja cilja i hipoteza istraživačkih pitanja ovisi o području istraživanja

Hipoteza 1: Postoje značajne razlike u sistemskim profilima kronične upale niskog intenziteta, oksidacijskog stresa, primarnih oštećenja DNA odnosno esencijalnih i neesencijalnih nutrijenata i toksičnih metala između vegetarijanaca i svejeda.

Hipoteza 2: Postoje značajne razlike u lokaliziranim (u rožnatom sloju kože) profilima kronične upale niskog intenziteta i komponenti koje pridonose održavanju hidratacije rožnatog sloja kože između vegetarijanaca i svejeda.

Ciljevi predloženog istraživanja su:

(i) utvrditi razlike u razinama C-reaktivnog proteina i širokog spektra citokina kao pokazatelja upale, aktivnosti antioksidacijskih enzima kao pokazatelja oksidacijskog stresa odnosno razliku u stupnju fragmentacije DNA kao pokazatelja oštećenja DNA u perifernoj krvi između vegetarijanaca i svejeda,

(ii) utvrditi razlike u razinama C-reaktivnog proteina i širokog spektra citokina kao pokazatelja upale u rožnatom sloju kože te razini čimbenika hidratacije kože (degradacijskih produkata proteina filagrina, NMF) između vegetarijanaca i svejeda,

(iii) utvrditi razlike u razinama slobodnih aminokiselina, njihovih derivata i anorganskih makro- i mikroelemenata, uključujući toksične metale, u perifernoj krvi između vegetarijanaca i svejeda.

Materijal, ispitanici, metodologija i plan istraživanja (preporučeno 6500 znakova s praznim mjestima)

Presječno istraživanje (engl. *cross-sectional study*) provest će se na uzorcima dviju populacija – 1. vegetarijanci i vegani, i 2. pojedinci čija je prehrana mješovita, tj. svejedi. Vegetarijanska i veganska prehrana definirat će se u skladu s prijedlogom Europske vegetarijanske unije (EVU, 2019). U istraživanje će biti uključeno ukupno 140 punoljetnih ispitanika, po 70 iz svake populacije, pri čemu će biti zastupljeni ispitanici oba spola. Analiza potrebne veličine uzorka provedena je na temelju triju ključnih markera: CRP-a (pokazatelj kronične upale niskog intenziteta), glutation peroksidaze (pokazatelj oksidacijskog stresa) i stupnja fragmentacije DNA (pokazatelj oštećenja DNA). Analiza je provedena u programu G*Power, uz razinu statističke značajnosti (α) = 0.05, snagu testa 0.80 i veličinu učinka temeljenu na dostupnim podacima iz prethodne studije provedene na hrvatskoj populaciji (Gajski i sur., 2018). Konačna veličina uzorka određena je na temelju rezultata analize snage testa za CRP, koji je identificiran kao limitirajući pokazatelj s najvećim procijenjenim minimalnim brojem potrebnih ispitanika. Potrebno je najmanje 59 ispitanika po skupini (ukupno 118) za postizanje željene statističke snage. U svrhu nadoknade mogućih gubitaka podataka (npr. neispunjavanje kriterija za uključenje zbog netočno prijavljenog prehrambenog obrasca, neprikladnosti ili kontaminacije uzoraka), broj ispitanika povećan je za približno 15 % te će se u studiju uključiti ukupno 140 ispitanika. Time je osigurano zadržavanje dovoljne statističke snage i pouzdanosti rezultata, uzimajući u obzir moguće isključenje dijela ispitanika iz konačne analize. Za sudjelovanje u studiji ispitanici moraju zadovoljavati sljedeće kriterije: (i) ispitanik u trenutku uzorkovanja mora biti zdrav (bez simptoma akutne upale i relevantnih dijagnoza), (ii) ispitanik nije bio izložen ionizirajućem zračenju, ultrazvuku i/ili magnetskom polju unazad 3 mjeseca od datuma uzorkovanja, (iii) ispitanik nije uzimao lijekove koji mogu utjecati na rezultate (kortikosteroidi, antibiotici i dr.) unazad mjesec dana od datuma uzorkovanja, (iv) indeks tjelesne mase ispitanika nije veći od 30 kg/m^2 i (v) u skupini vegetarijanaca i vegana, prakticiranje vegetarijanske prehrane unazad najmanje 12 mjeseci od datuma uzorkovanja. U obzir će se uzeti ispitanici s područja grada Zagreba i okolice, po potrebi i šire. Istraživanje će biti provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom uz odobrenje Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ispitanici će prije sudjelovanja u istraživanju biti upoznati sa svrhom istraživanja, rizicima i prednostima te će svoj pristanak na sudjelovanje potvrditi potpisivanjem informiranog pristanka. Sudjelovanje u istraživanju podrazumijeva ispunjavanje upitnika te jednokratno uzorkovanje periferne krvi i rožnatog sloja kože (lat. *stratum corneum*). Upitnik sadrži sociodemografske podatke, podatke o učestalosti konzumiranja pojedinih skupina namirnica, obiteljskoj i osobnoj anamnezi, kao i podatke o životnom stilu poput pušenja, fizičke aktivnosti i sl. Upitnik također obuhvaća Skalu depresivnosti, anksioznosti i stresa (DASS-21). Za potrebe istraživanja izuzet će se maksimalno 20 mL periferne krvi. Rožnati sloj kože izuzimat će se pomoću adhezivne vrpce (engl. *adhesive tape stripping*). Riječ je o bezbolnoj metodi koja se često primjenjuje u dermatološkim istraživanjima zbog svoje minimalne invazivnosti i značajno smanjene neugode za ispitanika (McAleer i sur., 2019). Uzorkovanje će se provesti na unutrašnjoj strani podlaktice, na dva mjesta, primjenom D-Squame adhezivnih vrpci kružnog oblika, površine 3,8 cm^2, pri čemu će se na svakom mjestu uzastopno izuzeti 12 adhezivnih vrpci rožnatog sloja kože. Uzorci krvi prikladno će se obraditi u najkraćem mogućem roku u svrhu izdvajanja krvne plazme. Nakon obrade svakog ispitanika, prikupljeni uzorci pune krvi, krvne plazme i rožnatog sloja kože pohranit će se na -80 °C do analize.

U uzorcima krvne plazme ispitanika, standardiziranim kliničkim metodama, odredit će se razine osnovnih biokemijskih markera: glukoza, ukupni kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, trigliceridi, folati i cijanokobalamin. Markeri upale koji će se proučavati u okviru ove disertacije su CRP i 14 relevantnih citokina. U uzorcima krvne plazme odredit će se razina sljedećih markera upale: CRP, čimbenik nekroze tumora α (TNF-α), timusni stromalni limfopoetin (TSLP), interleukin 5 (IL-5), interleukin 6 (IL-6), interleukin 13 (IL-13), interferon γ (IFN-γ), vaskularni endotelni čimbenik rasta A (VEGF-A) i kemokin povezan s kožom aktiviranim T-stanicama (CTACK/CCL27). U ekstraktima rožnatog sloja kože odredit će se razina sljedećih markera upale: CRP, čimbenik nekroze tumora α (TNF-α), timusni stromalni limfopoetin (TSLP), timusom i aktivacijski regulirani kemokin (TARC/CCL17), interleukin 1α (IL-1α), interleukin 1β (IL-1β), antagonist interleukin-1 receptora (IL-1RA), interleukin 8 (IL-8) i interleukin 18 (IL-18). Analiza markera upale provest će se multipleks imunometodom temeljenom na detekciji elektrokemiluminiscencijom koja omogućava simultanu kvantifikaciju većeg broja analita prisutnih u istom uzorku. Ovaj rad će se usredotočiti na enzimski sustav uključen u obranu od oksidacijskog stresa. Aktivnost superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze u krvnoj plazmi ispitanika odredit će se prikladnim UV-Vis spektrometrijskim metodama. Primarna oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama pune krvi analizirat će se alkalnim komet testom. Osim markera koji su izravni pokazatelji upale, oksidacijskog stresa i genomskih oštećenja, analizirat će se markeri koji u ovim procesima sudjeluju kao kofaktori enzima, posredno ili su njihove razine odraz navedenih procesa. Iz uzoraka kože ekstrahirat će se i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti kvantificirati komponente NMF-a (degradacijski produkti proteina filagrina): piroglutaminska kiselina, *trans*-urokanska kiselina, *cis*-urokanska kiselina, histidin i tirozin. Anorganski makro- i mikroelementi, uključujući toksične metale (Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, I, Se, Co, Hg, Cd, Pb, As), analizirat će se spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) u uzorcima pune krvi ili plazme, ovisno o primjerenosti uzorka za analizu. Nadalje, u krvnoj plazmi, uz prethodnu derivatizaciju, plinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (GC-MS) odredit će se razina slobodnih aminokiselina i njihovih derivata (glutamat, ornitin, aspartat, lizin, cistein, metionin, tirozin, histidin, triptofan, serin, glicin, alanin, sarkozin).

U statističkoj obradi podataka koristit će se softverski paketi GraphPad Prism i SPSS. Razina statističke značajnosti postavit će se na

0.05. Kvantitativni podaci obradit će se metodama deskriptivne statistike. Normalnost raspodjele podataka procijenit će se pomoću Shapiro-Wilk testa. Za usporedbu pojedinačnih markera između vegetarijanaca i svejeda koristit će se nezavisni *t*-test ili Mann-Whitney U test, ovisno o raspodjeli podataka. Korelacije između svih parova markera analizirat će se Pearsonovom ili Spearmanovom korelacijom te će se izraditi matrica korelacije. Potencijalne ometajuće varijable (engl. *confounders*) identificirat će se višestrukim regresijskim modelima. Multivarijatnom analizom kovarijance (MANCOVA) utvrdit će se razlike u skupinama ispitivanih markera (pokazatelji upale, pokazatelji oksidacijskog stresa, pokazatelj oštećenja DNA, slobodne aminokiseline i njihovi derivati, anorganski makro- i mikroelementi, toksični metali, NMF) između vegetarijanaca i svejeda uz kontrolu utjecaja kovarijata.

Očekivani znanstveni ili umjetnički doprinos predloženoga istraživanja (preporučeno 500 znakova s praznim mjestima)

Predloženo istraživanje pružit će interdisciplinarni uvid u opisanu problematiku te ponuditi statistički utemeljene modele analize razlika u razinama markera kronične upale niskog intenziteta, oksidacijskog stresa i oštećenja DNA između vegetarijanaca i svejeda, unutar istog uzorka ispitanika iz hrvatske populacije. Riječ je o prvom istraživanju koje će usporediti razine markera upale u rožnatom sloju kože između vegetarijanaca i svejeda te analizirati povezanost prehrambenih obrazaca s komponentama koje pridonose normalnoj funkciji kožne barijere.

Popis citirane literature / umjetničkih radova (maksimalno 30 referenci)

Bassin, S. R., Ferreira De Carvalho, J., Gulati, M. (2024) A Review of Plant-Based Diets for Obesity Management. *Endocr. Pract.* **30**, 779–789.

Carvalho, A. M., Miranda, A. M., Santos, F. A., Loureiro, A. P. M., Fisberg, R. M., Marchioni, D. M. (2015) High intake of heterocyclic amines from meat is associated with oxidative stress. *Br. J. Nutr.* **113**, 1301–1307.

Chai, W., Morimoto, Y., Cooney, R. V., Franke, A. A., Shvetsov, Y. B., Le Marchand, L. i sur. (2017) Dietary Red and Processed Meat Intake and Markers of Adiposity and Inflammation: The Multiethnic Cohort Study. *J. Am. Coll. Nutr.* **36**, 378–385.

Chatterjee, S. (2016) Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. U: *Oxidative Stress and Biomaterials* [online], (Dziubla, T., Butterfield, D. A., ured.), Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 35–58. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4

Derouiche, F., Djemil, R., Sebihi, F. Z., Douaouya, L., Maamar, H., Benjemana, K. (2024, 6. ožujka) High methionine diet mediated oxidative stress and proteasome impairment causes toxicity in liver. *Sci. Rep.* **14**:5555. https://doi.org/10.1038/s41598-024-55857-1

EVU (2019) EVU position paper: Definitions of “vegan” and “vegetarian” in accordance with the EU Food Information Regulation. EVU – European Vegetarian Union, Bruxelles, <https://www.euroveg.eu/vegan-and-vegetarian-definitions/>. Pristupljeno 5. veljače 2025.

Fenech, M. (2019) The role of nutrition in DNA replication, DNA damage prevention and DNA repair. U: *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics: Fundamentals of Individualized Nutrition* [online], (De Caterina, R., Martinez, J. A., Kohlmeier, M., ured.), Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 27–32. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804572-5.00004-5

Forman, H. J., Zhang, H. (2021) Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov*. **20**, 689–709.

Foster, M., Samman, S. (2012) Zinc and Regulation of inflammatory cytokines: Implications for cardiometabolic disease. *Nutrients* **4**, 676–694.

Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C. i sur. (2019) Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **25**, 1822–1832.

Gajski, G., Gerić, M., Jakaša, I., Peremin, I., Domijan, A. M., Vučić Lovrenčić, M. i sur. (2023) Inflammatory, oxidative and DNA damage status in vegetarians: is the future of human diet green? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **63**, 3189–3221.

Gajski, G., Gerić, M., Vučić Lovrenčić, M., Božičević, S., Rubelj, I., Nanić, L. i sur. (2018) Analysis of health-related biomarkers between vegetarians and non-vegetarians: A multi-biomarker approach. *J. Funct. Food.* **48**, 643–653.

Guttman-Yassky, E., Zhou, L., Krueger, J. G. (2019) The skin as an immune organ: Tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **144**, 362–373.

Haidar, Z., Fatema, K., Shoily, S. S., Sajib, A. A. (2023) Disease-associated metabolic pathways affected by heavy metals and metalloid. *Toxicol. Rep.* **10**, 554–570.

Jenko Pražnikar, Z., Šik Novak, K., Bogataj Jontez, N., Petelin, A., Mohorko, N., Kenig, S. (2023, 12. listopada) Inflammatory and intestinal permeability biomarkers in healthy participants on long term vegan, vegetarian, omnivore and low-carbohydrate high-fat diet. *Sci. Rep.* **13**:17286. https://doi.org/10.1038/s41598-023-44233-0

Key, T. J., Davey, G. K., Appleby, P. N. (1999) Health benefits of a vegetarian diet. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 271–275.

McAleer, M. A., Jakasa, I., Hurault, G., Sarvari, P., McLean, W. H. I., Tanaka, R. J. i sur. (2019) Systemic and stratum corneum biomarkers of severity in infant atopic dermatitis include markers of innate and T helper cell-related immunity and angiogenesis. *Brit. J. Dermatol.* **180**, 586–596.

Menzel, J., Biemann, R., Longree, A., Isermann, B., Mai, K., Schulze, M. B. i sur. (2020, 6. veljače) Associations of a vegan diet with inflammatory biomarkers. *Sci. Rep.* **10**:1933. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58875-x

Montalcini, T., De Bonis, D., Ferro, Y., Carè, I., Mazza, E., Accattato, F. i sur. (2015, 17. srpnja) High vegetable fats intake is associated with high resting energy expenditure in vegetarians. *Nutrients* **7**, 5933–5947.

Myung, S. K., Ju, W., Cho, B., Oh, S. W., Park, S. M., Koo, B. K. i sur. (2013, 18. siječnja) Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ – Brit. Med. J.* **346**:f10. https://doi.org/10.1136/bmj.f10

Newby, P. K., Tucker, K. L., Wolk, A. (2005) Risk of overweight and obesity among semivegetarian, lactovegetarian, and vegan women. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 1267–1274.

Olfert, M. D., Wattick, R. A. (2018, 18. rujna) Vegetarian Diets and the Risk of Diabetes. *Curr. Diabetes Rep.* **18**, 101. https://doi.org/10.1007/s11892-018-1070-9

Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A. i sur. (1996) Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *J. Natl. Cancer I.* **88**, 1550–1559.

Ridker, P. M. (2003, 28. siječnja) Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* **107**, 363–369. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000053730.47739.3C

Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R. i sur. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11, 973–981.

Satija, A., Hu, F. B. (2018) Plant-based diets and cardiovascular health. *Trends Cardiovas. Med.* **28**, 437–441.

Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Hogstrand i sur. (2023, 28. ožujka) Risk assessment of N-nitrosamines in food. *EFSA J.* **21**, 7884. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7884

Tsuchida, K., Kobayashi, M. (2020, 15. lipnja) Oxidative stress in human facial skin observed by ultraweak photon emission imaging and its correlation with biophysical properties of skin. *Sci. Rep.* **10**:9626. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66723-1

Van Remmen, H., Hamilton, M. L., Richardson, A. (2003) Oxidative damage to DNA and aging. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **31**, 149–153.

Procjena ukupnih troškova predloženoga istraživanja (u eurima)		
230 000		
Predloženi izvori financiranja istraživanja		
Nacionalno financiranje	**Naziv projekta**	
	Voditelj projekta	
	Potpis	
Međunarodno financiranje	**Naziv projekta**	
	Voditelj projekta	
	Potpis	
Ostale vrste projekata	**Naziv projekta**	**Procjena učinkovitosti i toksičnosti biološki aktivnih tvari – BioMolTox**
	Voditelj projekta	**dr. sc. Nikolina Maček Hrvat, viši znanstveni suradnik**
	Potpis	
Samostalno financiranje	Suradnja s nacionalnim i inozemnim znanstveno-istraživačkim institucijama	
Sjednica Etičkog povjerenstva na kojoj je odobren prijedlog istraživanja (navesti samo ako je potrebno)	17. travnja 2025.	

Suglasnost predloženog mentora i doktoranda s prijavom nacrta doktorskoga rada

Izjavljujem da sam suglasan s nacrtom koji se prijavljuje.

Potpis _____
prof. dr. sc. Ivone Jakaša

Potpis _____
dr. sc. Goran Gajski

Potpis _____
Ines Peremin, mag. ing. bioproc.

IZJAVA

Izjavljujem da nisam prijavio / prijavila doktorski rad s istovjetnom temom na drugome studiju Sveučilišta, odnosno na drugome sveučilištu. *(Zanemariti u slučaju dvojnog doktorata - Cotutelle de thèse)*

U Zagrebu, 08.04.2025.

Potpis _____
Ines Peremin, mag. ing. bioproc.