



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

**Евалуација ефеката различитих режима исхране на
морфофункционалне карактеристике, маркере оксидативног стреса и инфламаторни
одговор код пацијената са реуматоидним артритисом**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

др Драган Васиљевић

Крагујевац, 2016. године

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Реуматоидни артритис	2
1.1.1. Дефиниција и преваленца	2
1.1.2. Клиничка слика	2
1.1.3. Дијагноза	3
1.1.4. Прогноза	4
1.1.5. Лечење	6
1.1.6. Лекови који се користе	7
1.1.6.1. Аналгетици	7
1.1.6.2. Лекови који мењају ток болести	8
1.1.6.3. Биолошки лекови	8
1.1.6.4. Кортикостероиди	9
1.1.7. Физијатријско лечење реуматоидног артритиса	9
1.1.8. Други облици лечења	10
1.1.9. Важност режима исхране	10
1.2. Полинезасићене масне киселине	11
1.2.1. Природни извори полинезасићених масних киселина	12
1.2.2. Однос n-6 : n-3 полинезасићених масних киселина	13
1.2.3. Инкорпорирање масних киселина у ћелијске структуре	15
1.2.4. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на модулацију функције ћелија имунског система	17
1.2.5. Биолошки ефекти еиконасоида	19
1.2.6. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на цитокине, хемокине, факторе раста и ћелије имуног система	21
1.2.7. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на телесну композицију	22
1.3. Слободни радикали и антиоксидациона заштита	24
1.3.1. Слободни радикали	24

1.3.2. Реактивне врсте кисеоника (ROS)	27
1.3.2.1. Особине појединих ROS	28
1.3.2.1.1. Порекло	28
1.3.2.1.2. Супероксид ањон радикал	29
1.3.2.1.3. Водоник пероксид	30
1.3.2.1.4. Хидроксил радикал	31
1.3.2.1.5. Синглет кисеоник	31
1.3.3. Липидна пероксидација	32
1.3.4. Реактивне врсте азота (RNS)	33
1.3.4.1. Азот моноксид	34
1.3.5. Антиоксидациони заштитни систем	35
1.3.5.1. Ензимске компоненте антиоксидационе одбране	36
1.3.5.2. Неензимске компоненте антиоксидационе одбране	37
1.3.6. Маркери оксидативног стреса и њихово одређивање	38
1.3.7. Протективно дејство n-3 полинезасићених масних киселина	38
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	41
2.1. Циљеви студије	42
2.2. Хипотезе студије	44
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	46
3.1. Врста студије	47
3.2. Испитаници	47
3.3. Биохемијске анализе	49
3.3.1. Одређивање антигена за Фон Вилебрандов фактора (vWFAg)	49
3.3.2. Одређивање активности фон Вилебрандовога фактора (vWFAct)	50
3.3.3. Одређивање индекса агрегације тромбоцита (TRAP)	51
3.3.4. Одређивање параметара оксидационог стреса	52
3.3.4.1. Одређивање концентрације супероксид ањон радикала ($O_2^{\cdot -}$)	52
3.3.4.2. Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)	53
3.3.4.3. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	54

3.3.4.4. Одређивање концентрације азот монооксида (NO·)	55
3.3.4.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)	57
3.3.4.6. Одређивање активности каталазе (CAT)	58
3.3.4.7. Одређивање активности глутатиона (GSH)	59
3.3.5. Одређивање проинфламаторних цитокина	60
3.3.6. Одређивање масних киселина	60
3.3.7. Одређивање антропометријских карактеристика	61
3.4. Статистичка обрада података	61
4. РЕЗУЛТАТИ	63
4.1. Телесне, клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	64
4.2. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	67
4.2.1. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре суплементације	67
4.2.2. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом после суплементације	70
4.2.3. Поређење клиничких и лабораторијских карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом у оквиру сваке групе после периода суплементације	73
4.3. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	76
4.3.1. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом пре периода суплементације	76
4.3.2. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације	78
4.3.3. Поређење карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом у оквиру сваке групе после периода суплементације	80
4.4. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	83
4.4.1. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним	

артритисом пре периода суплементације	83
4.4.2. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације	84
4.4.3. Поређење степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације у оквру сваке групе	85
4.5. Поређење нивоа параметара оксидативног стреса пре и после периода суплементације у оквру сваке групе	85
4.6. Одређивање антигена за фон вилебрандов фактор (vwfag), активности фон вилебрандов-ог фактора (vwfact) и хомоцистеина код пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	88
4.7. Клиничко-антропометријске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	90
4.8. Одређивање вредности цитокина код пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	92
4.9. Одређивање вредности липидних параметара код пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	96
5. ДИСКУСИЈА	102
5.1. Ефекти различитих режима исхране на телесне, клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	104
5.2. Ефекти различитих режима исхране на клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	105
5.3. Ефекти различитих режима исхране на карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом	106
5.4. Ефекти различитих режима исхране на одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом	107
5.5. Ефекти различитих режима исхране на параметаре оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом	108
5.6. Ефекти различитих режима исхране на вредности антигена за фон вилебрандов фактор (vWFAg), активност фон вилебрандов-ог фактора (vWFAct) и хомоцистеина код пацијената са реуматоидним артритисом	112

5.7. Ефекти различитих режима исхране на телесне карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	113
5.8. Ефекти различитих режима исхране на вредности цитокина код пацијената са реуматоидним артритисом	117
5.9. Ефекти различитих режима исхране на вредности липидних параметара код пацијената са реуматоидним артритисом	118
6. ЗАКЉУЧЦИ	121
7. ЛИТЕРАТУРА	124

I

УВОД

1.1. РЕУМАТОИДНИ АРТРИТИС

1.1.1. Дефиниција и преваленца

Реуматоидни артритис је хронична, мултисистемска, аутоимунска болест непознате етиологије, променљивог тока и трајања, чија је главна манифестација синовитис периферних зглобова. Процењује се да 1% светске популације болује од ове болести која утиче на квалитет живота болесника, с тим да је преваленца реуматоидног артритиса 1,16% код жена и 0,44% код мушкараца. Женска превласт се налази у свакој старосној групи и преваленца се повећава са годинама и код мушкараца и код жена (1).

Инциденција болести расте са старењем и највиша је код особа узраста 35 до 50 година. Међутим, није ретко да се јави и код још старијих особа. Утврђено је да преваленца реуматоидног артритиса варира између различитих земаља и различитих националности. Међутим, женски превага и повећање учесталости са годинама су остали исти. Најнижа преваленца реуматоидног артритиса у свету документована је у Африци, у Нигерији, где практично нису пронађени оболели од ове болести (2). Највиша преваленца реуматоидног артритиса у свету пронађена је код домородачких Американаца, где износи од 5,3% до 6% (3). Преваленца реуматоидног артритиса највише се разликује у афричким земљама, где износи од горе поменутих 0,0% у Нигерији (2) до 1,8% у Јужноафричкој републици (4). У до сада објављеним истраживањима у Европи преваленца реуматоидног артритиса износи од 0,18% у Србији (5) до 0,8%-1,1% у Уједињеном краљевству (6).

1.1.2. Клиничка слика

Почетак болести је постепен и неспецифичан. Спонтане ремисије су ретке (само код 5-10 % болесника), а нарочито су ретке после 3-6 месеци од почетка болести. Тамо где је дошло до деструкције кости или лигамената, болест остаје трајна.

Критеријуми који се користе за класификацију реуматоидног артритиса предложени су 1987. године од стране Америчког удружења реуматолога-*American Rheumatism Association* (ARA) (7).

Клинички стални знаци артритиса су исти они који се срећу код сваког запаљења: оток зглоба, бол, укоченост, осетљивост и ограничена функција зглоба. Карактеристична је јутарња укоченост захваћених зглобова која траје дуже од сат времена. У почетку су обично симетрично захваћени мали зглобови шака и стопала. Ширење болести на друге зглобове догађа се у току неколико месеци или година. Прогресијом болести зглобови су обично захваћени следећим редом : метакарпофалангеални зглобови, зглобови ручја, проксимални интерфалангеални зглобови, колено, метатарзофалангеални зглоб, раме, скочни зглоб, вратна кичма, кук, лакат и темпоромандибуларни зглоб.

Екстра-артикуларне манифестације обухватају поткожне чвориће, васкулитис, перикардитис, пулмоналне нодулусе, или плућну интерстицијалну фиброзу, мононеуритис мултиплекс, еписклеритис и склеритис (1).

1.1.3. Дијагноза

Реуматоидни артритис је неопходно дијагностиковати и зауставити активност болести пре развоја ерозија. Ерозије се код 50% болесника откриву већ после 4 месеца трајања болести, знак су значајног оштећења зглоба и указују на могућност брзог и непоправљивог губитка функције зглоба.

Дијагноза раног реуматоидног артритиса се поставља на основу анамнезе и клиничког прегледа. Сумњу на реуматоидни артритис побуђују следећи клинички налази:

- дуготрајан ноћни и јутарњи бол у зглобовима и јутарња укоченост зглобова која траје дуже од пола сата;
- осетљивост зглоба на додир, клинички знаци упале зглобова (оток, повишена температура и ограничена покретљивост зглоба);
- симетрично хватање метакарпофалангеалних, проксималних интерфалангеалних зглобова и ручја;
- смањење тегоба у току примене нестероидних антиинфламаторних лекова.

Клиничка дијагноза упале зглобова (синовитиса) је најважнији појединачни дијагностички тест. Лабораторијски тестови (пре свега налаз реуматоидног фактора у крви) и методе сликања (пре свега налаз ерозија) не помажу значајно, јер њихов налаз

само потврђује дијагнозу, а ако их нема то не искључује постојање болести. Типичан налаз је благо до умерено убрзана седиментација еритроцита и повишен ниво реактивног протеина Ц. Тромбоцитоза и повремено леукоцитоза се срећу код болесника са активном инфламацијом. Такође је често снижени хемоглобин. Серумско гвожђе може бити снижено, док концентрација феритина може бити повишена као одраз реакције акутне фазе запаљења (8).

1.1.4. Прогноза

Инфламацијски процес у зглобу временом доводи до губитка хрскавице и деструкције кости како у унутрашњости коштаног ткива (цисте) тако и на ивицама кости (ерозије), што се на радиографијама види као сужење зглобног простора, цисте у коштаном ткиву и ерозије на ивицама кости. Ове промене су класификоване у четири анатомска стадијума према Штајнброкеровој скали (*Steinbrocker*) (9):

I стадијум: јукстаартикуларна остеопороза

II стадијум: сужење зглобног простора, појава субкортикалних циста на кости и мањих ерозија

III стадијум: веће ерозије и деструкције хрскавице кости

IV стадијум: сублуксација или анкилоза захваћених зглобова

Поред разарања зглобне хрскавице, у одмаклом стадијуму реуматоидног артритиса долази и до карактеристичних тешких оштећења зглобних костију и нарочито тетива, које стабилизују зглоб. Теносиновитис и последична руптура тетива најчешће се јављају на мишићима екстензорима прстију шака. Због разарања зглобне хрскавице, растезања зглобне чауре и лигамената долази најпре до нестабилности зглобова, а затим и до сублуксација и деформација. При томе важну улогу у настанку деформација имају и контрактуре флексионих мишића, као и могуће атрофије мишића. Такође, као последица локализованог инфламаторног процеса, може настати периартикуларна остеопороза, а због хроничне инфламације, имобилизације и терапије кортикостероидима, генерализована остеопороза. Код 50% болесника се на магнетној резонанцији виде ерозије

већ након 4 месеца болести, а код 70-90% болесника су видљиве ерозије на радиографијама малих зглобова две године од почетка болести.

Показатељи лошег исход реуматоидног артритиса:

- ванзглобне појаве (реуматоидни чворићи, упала делова ока, васкулитис, оштећење плућа, бубрега, срца, нервног система),
- женски пол,
- лош положај у друштву, сиромаштво и ниско образовање,
- старија животна доб у почетку болести,
- брзо оштећење функције зглобова (HAQ >1 годину дана од почетка болести),
- упала више зглобова истовремено (малих и великих, а посебно > од 12),
- рана појава ерозија на радиографијама зглобова (унутар 1-2 године)
- висока концентрација реуматоидног фактора и антитела према цикличном цитрулинисаном полипептиду
- стално повишени показатељи акутне фазе запаљења (СЕ, ЦРП) (10).

Основне дневне активности су код већине болесника поремећене. После 5 година трајања болести око 33% болесника неће бити способно за рад, а после 10 година 50% ће имати значајне функционалне дефиците. Код 15-20% болесника се уграде тоталне ендопротезе великих зглобова. Током 10 година болести, 50% болесника потпуно изгуби способност за рад, а просечна радна способност свих болесника је сведена на половину уобичајене (11). Очекивано трајање живота се код болесника са реуматоидним артритисом смањује за око 5-10 година, мада болесници који имају добар одговор на терапију могу имати и мањи степен морталитета (12).

Код већине болесника, реуматоидни артритис је тешка болест, током које напредује оштећење зглобова, слаби или се губи способност за рад и самозбрињавање. То води ка социјалној и финансијској зависности болесника од других особа и скраћењу животног века. Реуматоидни артритис је значајно оптерећење за заједницу због великих непосредних трошкова лечења хроничне болести и још већих посредних трошкова због губитка способности болесника за рад и самозбрињавање (13, 14).

Око 50% болесника је депресивно и чешће се разводе у односу на здраве особе. Код болесника са реуматоидним артритисом је повећана смртност просечно 1,3 пута, а код оболелих жена 1,4 пута. Током 10 година болести релативни ризик за појаву кардиоваскуларних болести је 2-3 пута већи код оболелих од реуматоидног артритиса у односу на здраве истог пола и животног доба. Болесници са реуматоидним артритисом просечно краће живе за 3-7 година у односу на здраве (15).

1.1.5. Лечење

Циљ лечења је уклањање симптома и знакова болести (увођење болести у трајну ремисију), очување нормалне и поправљање оштећене функције, спречавање и поправљање оштећења и деформација, обука болесника, очување и поправљање квалитета живота.

За успешно лечење болесника са реуматоидним артритисом најчешће је неопходна сарадња лекара опште праксе, реуматолога, медицинског техничара, физијатра, физиотерапеута и радног терапеута, фармацеута, дијететичара и социјалног радника. Све болеснике са упалом зглобова треба упутити реуматологу ради постављања дијагнозе и лечења. Лечење реуматоидног артритиса треба започети одмах по постављању дијагнозе, а треба га спроводити док је то неопходно (најчешће доживотно).

Реуматоидни артритис се лечи лековима и другим средствима и поступцима (обука болесника, социјални рад, физијатријско и хируршко лечење). Лекови који се најчешће користе су: аналгетици, нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ), лекови који могу да мењају ток болести (ЛМТБ) и биолошки лекови. Ако се дијагностикује реуматоидни артритис, неопходно је што пре применити лекове који могу да мењају ток болести. Међутим, због хроничне природе болест и њених ефеката на квалитет живота, пацијената и њихови лекари имају тенденцију да користе алтернативне методе лечења реуматоидног артритиса.

Обука омогућује болеснику да разуме природу сопствене болести и да научи како да се бори са њеним последицама.

Физијатријско лечење има за циљ повећање и одржавање обима покрета, мишићне снаге, умањење бола и спречавање и лечење деформација.

Радна терапија помаже пацијенту да научи да употребљава зглобове и тетиве без непотребног оптерећења, да смањи оптерећење истих применом одговарајућих ортоза и да омогући болеснику нормалне дневне активности прилагођавајући околину болесника коришћењем различитих помагала.

Хируршко лечење обухвата низ оперативних поступака, укључујући и уградњу ендопротеза (16).

1.1.6. Лекови који се користе за лечење реуматоидног артритиса

1.1.6.1. Аналгетици

Класични аналгетици (парацетамол) су ефикасни у отклањању болова у реуматоидном артритису. Аналгетици се могу користити као додатак НСАИЛ и ЛМТБ, ради додатног смањивања болова, али они не утичу на ток болести и треба их користити опрезно јер могу да оштете бубреге и јетру. Гастрична подношљивост парацетамола је значајно боља, те се препоручује као замена у случају неподношљивости НСАИЛ.

Нестероидни антиинфламаторни лекови су ефикасни у смањењу бола и запаљења. Нестероидни антиинфламаторни лекови су лекови различите хемијске грађе и фармакокинетице, који смањују активност ензима циклооксигеназа (СОХ), чиме смањују стварање простагландина, који учествују у настајању и одржавању запаљења. Велике су разлике у подношљивости различитих НСАИЛ између појединих болесника.

Позната су два облика СОХ (СОХ1-ензим активан у већини органа и ткива у току физиолошких процеса; и СОХ2-ензим који се у већини органа и ткива активира само у току запаљења, али је у неким органима и ткивима он активан и у физиолошким процесима). НСАИЛ који више смањују активност СОХ2, а не ремете битно активност СОХ, ређе изазивају нежељене појаве на гастроинтестиналном систему, посебно код старијих болесника. Скорашња испитивања су показала да је при употреби високо селективних СОХ2 инхибитора (коксиби) чешћа појава инфаркта срца и можданих удара, понекад и тешких осипа по кожи, због чега се препоручују НСАИЛ са умереном СОХ2 селективношћу (мелоксикам, нимесулид) (17, 18).

1.1.6.2. Лекови који мењају ток болести

Лекови који мењају ток болести (ЛМТБ) могу да успоре напредовање оштећења (радиолошки видљивих) зглобова, сачувају функцију зглоба, одрже радну способност болесника, поправе квалитет живота и смање укупне трошкове лечења (19). Лекови који модификују болест су метотрексат, сулфасалазин, хидроксихлорохин, хлорохин, D-пенициламин, соли злата, азатиоприн, циклоспорин, лефлуномид. Делују као имуномодулаторни лекови, различите хемијске структуре, фармакодинамских и фармакокинетских особина. Ефикасност им је слична, а с обзиром на мању токсичност избор прве линије су метотрексат, сулфасалазин, хлорохин и хидроксихлорохин (20).

1.1.6.3. Биолошки лекови

Најзначајнији биолошки лекови који се употребљавају за лечење реуматоидног артритиса су хуманизовани протеински молекули намењени неутрализацији проинфламаторних цитокина, у првом реду фактора туморске некрозе- α (TNF- α) и у мањој мери интерлеукина-1 (IL-1). У свакодневној пракси за сада се употребљавају 2 лека са анти-TNF активношћу:

1. Инфликсимаб - представља химеризовано моноклонско антитело које везује хумани TNF и на тај начин га неутралише.

2. Етанерцепт - представља рекомбинантни хуманизовани протеин намењен компетитивном везивању за TNF рецептор, који се може давати истовремено са метотрексатом или као монотерапија.

Једини регистровани IL-1 антагонист је анакинра, рекомбинантни хумани антагонист рецептора за IL-1 (IL-1-RA).

1.1.6.4. Кортикостероиди

Терапија системским кортикостероидима може помоћи да се премости време потребно да ЛМТБ почну да делују. На тај начин долази до побољшања симптома и смањења активности реуматоидног артритиса, али након прекида терапије код неких болесника може се очекивати нагло погоршање, односно разбуктавање болести (21).

Мале дозе кортикостероида нису показале дејство на смањење брзине седиментације еритроцита и смањење концентрације протеина акутне фазе (22). Средње и високе дозе кортикостероида изазивају брз пад седиментације еритроцита и концентрације протеина акутне фазе (23).

1.1.7. Физијатријско лечење реуматоидног артритиса

Физикална терапија заузима значајно место у комплексном лечењу болесника са реуматоидним артритисом. Пошто се ради о хроничној болести, физикално лечење и рехабилитација трају целог живота. Посебно је значајна мотивисаност болесника да редовно обављају терапијски програм. Обука болесника са реуматоидним артритисом може имати умерене краткотрајне ефекте на општу способност и мале краткотрајне ефекте на неспособност и психолошки статус. Одмор у току дана посебно је потребан болесницима са акутним артритисом у циљу смањења бола и смирења запаљења. Дуготрајно потпуно мировање нема оправдање код болесника са хроничним артритисом јер неповољно делује на мускулоскелетни, кардиоваскуларни, и нервни систем. Мишићи при потпуном мировању могу изгубити у снази 3% дневно. Један сат лежања у току дана смањује замор мишића изазван инфламацијом зглобова. Захваћени зглобови се често држе у положају флексије због смањења притиска у зглобу, али је овај положај функцијски некоректан. Као резултат држања зглоба у неповољном положају могу се јавити контрактуре отпорне на било какво лечење. Локални одмор појединих зглобова постиже се одржавањем правилног положаја зглобова адекватним позиционирањем зглобова у функцијском положају, често уз помоћ лонгета. Најважније је одржати добру позицију ручја – у дорзифлексији од 15° до 20°, пуну екстензију кукова и колена, као и управан положај стопала у односу на потколеницу.

1.1.8. Други облици лечења

У лечењу болесника са реуматоидним артритисом, користе се многи физички агенси: климатски фактори, хелиотерапија (лечење сунцем), пелоид (лековито минерално блато), термоминералне воде, разни видови топлоте, звук, електрицитет, магнетизам и механичка енергија која се примењује у виду кинезитерапије, масаже и терапије радом (24, 25, 26, 27).

1.1.9. Важност режима исхране

Савети дијететичара и нутрициониста су важни у лечењу болесника са артритисом. Смањење телесне тежине код гојазних особа је битно када су захваћени зглобови који носе терет (кукови, колена). Лечење је препоручено у водичу за гојазност. Код неких болесника је потребно повећати телесну масу, јер кахексија може да се јави код болесника са високо еволутивним артритисом. Неколико студија су показале да особе са малим индексом телесне масе имају лошији функцијски статус (28).

Дијететски суплементи рибњег уља су привукли много интереса међу пацијентима и реуматолозима као комплементарна терапија за реуматоидни артритис. Ова уља су екстрахована из ткивима масних риба као што су спрат, скуша, сардина и лосос. Рибље уље је богат извор омега-3 есенцијалних масних киселина за које се верује да имају јака антиинфламаторна својства. Делују углавном на два начина за ублажавање симптома пацијената са реуматоидни артритисом. Иако здравствене користи од рибњег уља могу настати кроз више различитих механизма, изгледа да смањена инфламација да један заједнички пут. Прво, делују смањењем ослобађања про-инфламаторних супстанци из белих крвних зрнаца. Друго, они пружају неопходне састојке за синтезу простагландина. Простагландини могу да регулишу имуни систем и да се боре против инфламације зглобова.

Проинфламаторни цитокинима попут интерлеукина-6 и фактора туморске некрозе- α играју улогу у коронарној болести срца, реуматоидном артритису, депресији, дијабетесу тип 2, остеопорозу, Алцхајмеровој болести, пародонтопатији и другим.

Један број епидемиолошких и опсервационих студија је показао да нижи нивои

омега-3 полинезасићених масних киселина дугог ланца су повезани са вишим нивоима интерлеукина-6 и фактора туморске некрозе- α и Ц-реактивног протеина.

Унос храном и омега-3 и омега-6 полинезасићених масних киселина утиче на инфламацију. Арахидонска киселина је $n-6$ полинезасићена масна киселина изведени из линолеинске киселине. Еиконасоиди произведени ензимском хидроксилацијом арахидонске киселине повећавају производњу проинфламаторних цитокина. Насупрот томе, еиконасоиди изведени из $n-3$ полинезасићених масних киселина сузбија производњу еикосаноида добијених из арахидонске киселине. Тако, виши нивои $n-3$ полинезасићених масних киселина у плазми, као и нижи плазма $n-6 : n-3$ однос треба да обузда производњу проинфламацијских цитокина.

Метаанализе испитивања исхране са додатком рибљег уља болесницима са реуматоидним артритисом, закључују да постоји значајно смањење броја осетљивих зглобова и трајање јутарње укочености после 3 месеца лечења. Нису запажени ефекти на активност болести или прогресију реуматоидног артритиса (29).

1.2. ПОЛИНЕЗАСИЋЕНЕ МАСНЕ КИСЕЛИНЕ

Масне киселине су монокарбоксилне киселине, које се на основу типа везе класификују на засићене и незасићене. Незасићене могу бити мононезасићене, са једном двогубом везом, и полинезасићене киселине, са две или више двогубих веза у алифатичном низу (Табела 1). Код незасићених могући су *cis* и *trans* изомери, а најзаступљеније масне киселине у природи су равног низа са парним бројем угљеникових атома и *cis* конформације. Полинезасићене масне киселине се такође деле на $n-3$, односно $\omega-3$ масне киселине које садрже двоструку $C=C$ везу на трећем угљениковом атому од метил краја и $n-6$, односно $\omega-6$ масне киселине са терминалном двоструком везом на шестом C атому од метил краја. Полинезасићене масне киселине су есенцијалне масне киселине, које организам не може синтетисати, већ их мора унети храном.

Табела 1. Најзаступљеније незасићене масне киселине

Тривијални назив	Хемијски назив	Скраћена ознака
Палмитолеинска	<i>cis</i> -9-хексадекаенска	16:1n-7
Олеинска	<i>cis</i> -9-октадекаенска	18:1n-9
Вакценска	<i>cis</i> -11-октадекаенска	18:1n-7
Гадолеинска	<i>cis</i> -9-еикозаенска	20:1n-7
Еручна	<i>cis</i> -13-докозаенска	22:1n-9
Нервонска	<i>cis</i> -15-тетракозаенска	24:1n-9
Линолна	<i>cis</i> -9,12-октадекадиенска	18:2n-6
γ-Линоленска	<i>cis</i> -6,9,12-октадекатриенска	18:3n-6
α-Линоленска	<i>cis</i> -9,12,15-октадекатриенска	18:3n-3
Дихомо-γ-линоленска	<i>cis</i> -8,11,14-еикозатриенска	20:3n-6
Арахидонска	<i>cis</i> -5,8,11,14-еикозатетраенска	20:4n-6
Тимнодонска	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-еикозапентаенска	20:5n-3
Клупанодонска	<i>cis</i> -7,10,13,16,19-докозапентаенска	22:5n-3
Цервонска	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-докозахексаенска	22:6n-3

Постоје три главна типа ω-3 масних киселина добијених из хране, а које тело користи: α-линоленска киселина, еикозапентаенска киселина и докозахексаенска киселина. Тело конвертује линоленску киселину у еикозапентаенску киселину, а затим у докозахексаенску киселина. Еикозапентаенска киселина и докозахексаенска киселина су две врсте ω-3 (n-3) масних киселина које служе као важни прекурсори за модулаторе ћелијске сигнализације коју су добијени из липида, за експресију гена и у запаљенским процесима.

1.2.1. Природни извори полинезасићених масних киселина

Највећи део α-линоленске киселине конзумиран у исхрани долази из биљних извора (нпр. ланеног семена и ораха), са малим процентом се могу добити и из пилетине и

говедине. Највећа концентрација еикозапентаенске и докозахексаенске киселине се могу наћи у хладноводним рибама, као што су лосос, туна и харинга. Биолошки најважније полинезасићене масне киселине су еикозапентаенска и докозахексаенска киселина. Иако α -линоленска киселина може послужити као прекурсор за синтезу еикозапентаенске и докозахексаенске киселине код људи, овај пут синтезе варира у општој популацији. Према томе, директан дијететски унос $n-3$ масти богатих еикозапентаенском и докозахексаенском киселином су од највеће клиничке користи. Међутим, већина западне исхране је обогаћена $n-6$ полинезасићеним масним киселинама добијеним из уља поврћа као што је сојино уље, кукурузно уље, уље ноћурка и уље боражине и садрже линолну киселину која је преведена у арахидонску киселину (30).

1.2.2. Однос $n-6$: $n-3$ полинезасићених масних киселина

Повећан мембрански садржај еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине, избалансиран са смањеним садржајем арахидонске киселине, резултује у измењеном обрасцу производње низа липидних медијатора инфламације. Промена састава масних киселина инфламаторних ћелија такође има утицаја и на производњу протеинских медијатора инфламације (тј. цитокина, хемокина и адхезивних молекула), тиме утичући на њихову функцију.

Арахидонска киселина присутана у фосфолипидним мембранама телесних ћелија је претеча проинфламаторних еикосаноида, и суплементација арахидонском киселином резултује стимулисаном производњом простагландина. Еикосаноиди су подељени у две групе, такозване “добре” и “лоше”. Али и “лоши” су корисни и потребни организму ако делују у међусобној равнотежи и балансу с “добрима”. Они међу собом имају супротно деловање, па “добри” еикосаноиди делују антиинфламаторно и уопште одржавају добро здравље и јак имунитет, док “лоши” еикосаноиди изазивају инфламацију ради заштите од озледа и потребни су код великих телесних и менталних напора у кратким и интензивним периодима.

Еикозапентаенска киселина је масна киселина из породице омега-3 и управља групом “добрих” еикосаноида, па тако делује антиинфламаторно, штити срце и крвне судове и генерално добро здравље, али само док се арахидонска киселина из породице

омега-6 масних киселина, која управља “лошим” еикосаноидима и изазива инфламацију, налази присутна у мањој мери (31, 32).

Као резултат њиховог анти-инфламаторног капацитета, n-3 полинезасићене масне киселине су пријављене да имају терапеутску ефикасност код реуматоидног артритиса, инфламаторне болести црева и других инфламаторних обољења као и пародонтопатије (33).

Омега-3 масне киселине из рибљег уља инхибирају формирање цитокина и еикосаноида, конкуренцијом са n-6 масним киселинама за уградњу у ћелијске фосфолипиде и за везивно место циклооксигеназе и липоксигенезе. Како омега-3 масне киселине и омега-6 масне киселине конкуришу истим метаболичким путевима, то јест користе исти ензим $\Delta 6$ -дехидрогеназу, тако претерани унос омега-6 у организам доводи до недостатка омега-3 и “добрих” еикосаноида, па се тако нормални инфламаторни процеси којима управљају “лоши” еикосаноиди претварају у хроничне инфламаторне процесе. (34, 35, 36)

Правилан однос између омега-3 масне киселине и омега-6 масних киселина није важан само за здраво срце и крвоток, него и за опште телесно и психичко здравље и имунитет. Чак је важан и за постизање и одржавање нормалне телесне тежине, јер смањује сигнале у телу који стварају масне залихе, а побољшава и осетљивост према инсулину чиме се смањује ризик од настанка дијабетеса (37). Корелација између метаболичког синдрома и инфламације документована је многим истраживањима (38). Повећање проинфламаторних цитокина, укључујући интерлеукин-6, резистин, фактор туморске некрозе- α , као и Ц-реактивни протеин (39) удружено је са хиперпродукцијом масног ткива (40). Доказано је да се макрофаги који потичу од моноцита налазе у масном ткиву и да могу бити, барем делимично, извор стварања проинфламаторних цитокина, како на локалном нивоу, тако и у системској циркулацији (41, 42). Поједини подаци показују да резистин снижава инсулином стимулисано преузимиње глукозе у скелетним мишићима (43). Постоји све више доказа да инсулинска резистенција у јетри, мишићима и масном ткиву није само повезана са великим бројем проинфламаторних цитокина (и релативним недостатком антиинфламаторног цитокина адипонектина), већ да је директан резултат овог стања (44).

1.2.3. Инкорпорирање масних киселина у ћелијске структуре

Масне киселине дугог ланца утичу на запаљење кроз различите механизме, од којих су многи посредовани, или у вези са, променом у саставу масних киселина ћелијских мембрана. Такве промене могу модификовати флуидност мембране, ћелијску сигнализацију (што доводи до измењене експресије гена) и образац производње липидних медијатор. Ћелије које су укључене у инфламаторни одговор су обично богате n-6 масном киселином арахидонском киселином, али садржај арахидонске киселине и однос n-3 (еикозапентаенска киселина/докозахексаенска киселина) у n-6 масне киселине може бити измењен ингестијом еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине.

Полинезасићене масне киселине су важни састојци фосфолипида свих ћелијских мембрана. Повећан дијететски унос n-3 полинезасићених масних киселина повећава концентрацију у сложеним липидима (триглицеридима, фосфолипидима и естрима холестерола) унутар крвотока и у фосфолипидима у мембрани ћелија и ткива. Тако, након повећаног уноса еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине, ћелије укључене у инфламацију и њихово екстрацелуларно окружење (нпр. крвна плазма) су обogaћени тим масним киселинама. Лабораторијске животиње које се хране стандардном храном имају висок садржај арахидонске киселине (20:4n-6) и низак садржај еикозапентаенске киселине (20:5n-3) и докозахексаенске киселине (22:6n-3) у фосфолипидима лимфоцита и макрофага (нпр. перитонеалне, алвеоларне и Купферове ћелије). Међутим, животиње на дијети чија храна садржи рибље уље, које садржи еикозапентаенску и докозахексаенску киселину резултира већим садржајем ових масних киселина у свим ови типовима ћелија са пратећим смањењем у садржају арахидонске киселине (45). Слично томе, већина фосфолипида крвних ћелија укључених у инфламаторни одговор људи који конзумирају типичну западну дијету садржи око 10-20% масних киселина као арахидонске киселине, са око 0,5-1% еикозапентаенске киселине и око 2-4% докозахексаенске киселине (46, 47, 48). Ова дистрибуција одражава чињеницу да је садашњи унос n-3 незасићених масних киселина низак код већине појединаца који живе у западним земљама. Састав масних киселина ових ћелија може бити модификован повећањем уноса n-3 масних киселина (49, 50) и долази до дозно зависног одговора у року од неколико дана до неколико недеља. У оквиру око 8 недеља је добијено ново

равнотежно стање састава ћелија, док промене серума су забележене 4 недеље пре. Повећање садржаја n-3 полинезасићених масних киселина ћелијске мембране јавља се на рачун n-6 полинезасићених масних киселина, посебно арахидонске киселине. Као што је раније поменуто, природни извор еикозапентаенске и докозахексаенске киселине је морска храна, посебно хладноводна плава риба. Недавна студија је показала да уље добијено кроз исхрану из лосога доводи до већег пораста еикозапентаенске киселине/ докозахексенске киселине у поређењу са уљем бакалара (51). Додатно, ове масне киселине се лако доствљају из капсула рибљег уља у транспортни систем (липиди крви), функционалне јединице (ћелија и ткива) и складишта (масно ткиво) у телу. Међутим, док додатак исхрани са различитим врстама незасићених масних киселина доводи до промена у ћелијским мембранама, ефекати ових промена на формирање еикосаноида и других анти-инфламаторних функција ћелија не корелира рутински са променом у укупним масним киселинама мембране. Недавни извештај сугерише да овај резултат може бити повезан са поделом полинезасићених масних киселина у органелама и унутар ћелијских мембрана.

Асиметрична дистрибуција фосфолипида у двослојну мембрана већине ћелија сисара је позната (52). Аминофосфолипиди су асиметрично дистрибуирани широм спољних и унутрашњих делова двослоја мембране већине људских ћелија. Физичке особине мембране се делимично одређују степеном незасићења масних киселине. Ови фосфолипиди су врло обогаћени полинезасићеним масним киселинама и имају специфичне интеракције са бројним протеинима мембране, транспортним системима на мембрани за измену катјона (53) и активностима рецептора хормона (54). Ове студије указују на то да се селективна инкорпорација n-3 масних киселина дешава у унутрашњој мембрани фосфолипида и да су n-3 фосфатидил-серини заменили n-6 и n-9 врсте у еритроцитима.

Ово сугерише да промене у исхрани у уносу масних киселина, могу да промене степен асиметрију фосфолипида у ћелијским мембранама и да обогаћивање n-3 масним киселинама може довести до диференцијалних ефеката на физичке особине и функције мембрана и до варијација у ћелијском одговору. Слично томе, n-3 масне киселине значајно штите еритроците од хемолизе и иако ове масне киселине показују високу подложност оксидацији, n-3 масне киселине могу очувати интегритет мембране (55).

Коначно, студија коју су спровели *Witte et al.* (56) утврдила је да фракција n-3 полинезасићених масних киселина повећана и у црвеним крвним зрнцима и у леукоцитима следећи потрошњу дијететских суплемента који садрже еикозапентаенску киселину/ докозахексаенску киселину. Црвена крвна зрнца су показала линеаран однос према дози дијететског додатка, али то није виђено код белих крвних зрнца и величина повећања n-3 полинезасићених масних киселина се разликује међу типовима ћелија. Кроз ове механизме, еикозапентаенска киселина и докозахексаенска киселина утичу на физиологију ћелија и ткива и начин на који ћелије и ткива реагују на спољне сигнале. У већини случајева ефекти су компатибилни са побољшањима у болести и исходима везаним за здравље. Као резултат тога, n-3 полинезасићене масне киселине веома-дугих ланаца могу да играју улогу у постизања оптималног здравља и заштити од болести (56).

1.2.4. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на модулацију функције ћелија имунског система

Биолошки, n-3 полинезасићене масне киселине рибег уља су показале да ублажавају инфламаторне процесе код људи и у различитим животињским моделима. Ови ефекти су приписани заштитним променама у обрасцима плазма липопротеина, затим формирање ћелијских еикосаноида смањује агрегацију тромбоцита, долази до смањења леукоцит-ендотел интеракције, измене производње проинфламаторних и анти-инфламаторних медијатора и бољег опсега функција ћелија имуног система (57, 58, 59, 60). Као што је раније поменуто, основни механизам којим омега-3 незасићене масне киселине мењају деструктивне инфламаторне одговоре односе се на обogaћење фосфолипидне мембране са еикозапентаенском и докозахексаенском киселином.

Полинезасићене масне киселине могу да утичу на концентрације сложених липида, липопротеина, метаболита и хормона који заузврат утичу на упалу. Оксидоване полинезасићене масне киселине (ензимски или неензимски) могу да делују директно на инфламаторне ћелије преко површине или интрацелуларног рецептора. Мононуклеарне инфламаторне ћелије могу такође приступити масним киселинама из липопротеина хидролизујући их екстрацелуларно (61, 62). Тако, ћелије укључене у инфламаторни процес су изложене масним киселинама, укључујући и полинезасићене масне киселине, у

различитим облицима, а могу приступити масним киселинама из њиховог окружења помоћу различитих механизма.

Основни ефекти полинезасићених масних киселина на ћелијске мембране ћелија:

- утичу на својства ћелијске мембране, мењајући микроокружење трансмембранских рецептора и мењајући интеракције са својим лигандима (63);
- утичу на способност мембрански везаних протеина да се повежу са мембраном и на формирање мултипротеинских комплекса који су укључени у систем ћелијске сигнализације (64, 65);
- различити инфламаторни медијатори интерагују са мембранским рецепторима и покрећу Г-протеин везани одговора (нпр. активирање фосфолипазе А2) који су укључени у ослобађању фосфолипида за конверзију у различите еикосаноиде (66)
- мембрански фосфолипиди су супстрати за производњу других гласника, као што је диацилглицерол, са саставом масних киселина тих гласника одређених прекурсором фосфолипида (67); и
- мембрански фосфолипиди су супстрати за ослобађање полинезасићених масних киселина унутар ћелије као сигнални лиганди за транскрипционе факторе и различите нуклеарне рецепторе (68, 69).

Тако на пример, дијететско рибље уље, богато n-3 полинезасићеним масним киселинама, може да мења функцију ћелија имунолошког система и да помогне у решавању хроничних запаљење, укључујући реуматоидни артритис, Кронову болест, дерматитис, псоријазу и улцерозни колитис (60, 70, 71, 72). Показано је да исхрана богата рибљим уљем, као и пречишћена докозахексенска киселина, мењају састав масних киселина на плазма мембрани CD4⁺ T- ћелија и изгледа да модулирају функцију T-ћелија путем мењања липидни структуре и транслокације сигналних молекула (73).

Мноштво и сложеност потенцијалних механизма учинила је то да је тешко употпуности разумети деловање полинезасићених масних киселина у појединим аспектима инфламаторних процеса. Проблем је такође и у вези са различитим *in vitro* и *in vivo* експерименталним приступима за презентацију полинезасићених масних киселина од

интереса за инфламаторне ћелије у циљу документовања њихових ефеката. Стога су показани ефекти незасићених масних киселина на одговор лимфоцита (74), моноцита/макрофага (75, 76), неутрофила (77, 78) и ендотелијалних ћелија (79). Сходно томе, величина података јасно показује да n-3 полинезасићене масне киселине могу умањити активност инфламаторних ћелија и смањити нивое инфламаторних медијатора потенцијално доприносећи унапређењу здравља (71). Доказано је да се макрофаги који потичу од моноцита налазе у масном ткиву и да могу бити, барем делимично, извор стварања проинфламаторних цитокина, како на локалном нивоу, тако и у системској циркулацији (80, 81).

Што се тиче инфламаторних цитокина интерлеукина-1 и фактора туморске некрозе- α , у студијама код здравих добровољаца и код оболелих од реуматоидног артритиса је доказано да се након суплементације омега-3 масним киселинама концентрација смањивала до 90% (82, 83).

Антиинфламаторни ефекат омега-3 масних киселина је повезан са инхибицијом активности Т лимфоцита и инхибицијом катаболичких ензима (84). Бројна истраживања су показала да омега-3 масне киселине утичу на активност и симптоме реуматоидног артритиса укључујући болове и отоке зглобова и јутарњу укоченост (85- 91). Студија која је пратила употребу нестероидних антиинфламаторних лекова код болесника са реуматоидним артритисом, који су 3 месеца били на суплементацији омега-3 масним киселинама је показала потпуну или делимичну редукацију узимања нестероидних антиинфламаторних лекова након 3 месеца (92). Суплементација рибљим уљем код болесника са реуматоидним артритисом је у студијама показала и значајно смањење обољевања од кардиоваскуларних болести (93).

1.2.5. Биолошки ефекти еиконасоида

Еиконасоиди су кључни медијатори и регулатори инфламације и имунитета и произведени су из 20-угљеничних полинезасићених масних киселина. Еиконасоиди, који обухватају простагландине, тромбоксане, леукотриене и друге оксидоване деривате, су произведени из арахидонске киселине специфичним метаболичким процесима. Ови еиконасоиди су укључени у модулисање интензитета и трајање инфламаторних одговора

(59, 71, 94).

Недавна студија је показала да уље које потиче из исхране богате лососом више повећава еикозапентаенску/ докозахексаенску киселину у поређењу са уљем бакалара. Штавише, нивои еикозапентаенске киселине и докозахексенске киселине су у негативној корелацији са липополисахаридом индукованим фактором туморске некрозе- α , интерлеукином-8, леукотриеном В4, тромбоксаном В2 и ткивним фактором у крви (51).

Докази подржавају директну везу између садржаја арахидонске киселине фосфолипида инфламаторних ћелија и способност тих ћелија да смање производњу простагландина Е2 у присуству еикозапентенске киселина или докозахексаенске киселине (95). Осим тога, добро је документовано да је количине простагландина Е2 и проинфламаторних леукотриена које производе хумане ћелије запаљења могу бити значајно смањени суплементацијом рибљим уљем за период од пар недеља до пар месеци (96, 97). Еикосапентенска киселина је такође супстрат за циклооксигеназу и липоксигеназу, ензиме који производе еикосаноиде, али произведени медијатори имају другачију структуру од медијатора изведених из арахидонске киселине и често су много мање биолошки активна. Осим тога, еиконасоиди изведени из еикосапентенске киселине могу да антагонизују дејство оних произведених из арахидонске киселине (78). Додатно, липоксин фамилија молекула изведених из арахидонске киселине очигледно има противупално дејство.

Биолошки ефекат еикосаноида зависи у великој мери од релативне масе у ткивима, од еикосаноида изведених из $n-6$ масних киселина, диомогама-линоленске киселине и арахидонске киселине, и $n-3$ масне киселине, еикосапентенске киселине. Стварање ове ткивне равнотеже се односи на релативну ћелијску масу ових прекурсора масних киселина, конкуренцију између њих за улазак и изласка из ћелијских фосфолипида и њихово такмичење за ензиме који катализују њихову конверзију у еикосаноиде. Ова запажања пружају објашњење за ефикасну употребу ових масних киселина у дијететској терапији усмереној ка модулацији производње еикосаноида. Како је наведено, ови еиконасоиди критично утичу на широк спектар физиолошких и патолошких процеса, укључујући инфламацију имунитет (57, 59, 60, 71).

1.2.6. Утицај $n-3$ полинезасићених масних киселина на цитокине, хемокине,

факторе раста и ћелије имуног система

Поред утицаја на инфламацију посредовану променама у обрасцу еиконасоида и других липидних медијатора, n-3 полинезасићене масне киселине су показале да мењају производњу инфламаторних протеина, укључујући хемокине, цитокине, факторе раста и матрикс металопротеиназе. Овај ефекат може бити посредован измењеним активирањем кључних фактора транскрипције укључених у регулацији експресије гена који кодирају инфламаторне протеине, укључујући нуклеарни фактор капа-лаког ланца-појачивач активираних Б ћелија и пероксизомни пролифератором активирани рецептор гама. Нуклеарни фактор капа-лаког ланца-појачивач активираних Б ћелија је главни транскрипциони фактор укључен у усходну регулацију инфламаторних цитокина, адхезионих молекула и циклооксигеназе-2 гена, док пероксизомни пролифератором активирани рецептор-гама може имати анти-инфламаторно деловање ометајући активацију нуклеарног фактора капа-лаког ланца-појачивача активираних Б ћелија (98-104).

Еикозапентаенска киселина и докозахексаенска киселина инхибирају липополисахаридну индукцију нуклеарног фактора капа-лаког ланца-појачивача активираних Б ћелија, мењају митогеном активирани протеин киназе и производњу интерлеукина-6, интерлеукина-8 и фактор туморске некрозе- α у ендотелијалним ћелијама (105, 106) и моноцитима (107). Суплементација риблим уљем мења активацију нуклеарног фактора капа-лаког ланца-појачивач активираних Б ћелија у лимфоцитима (74, 108), као и производњу различитих цитокина (нпр. фактор туморске некрозе- α , интерлеукина-1 и интерлеукина-6) изазваних макрофагима (109, 110). Слични дијететски ефекти су пријављени и у студијама на људима (99, 111-114).

Еикозапентаенска и докозахексаенска киселина се метаболишу до ресолвина и протектина кроз путеве који укључују циклооксигеназу и липокигеназу (115-118). Ови липидни медијатори имају антиинфламаторно дејство. Ресолвин E1, ресолвин D1 и протектин D1 инхибирају миграцију неутрофила из капилара и ограничавају инфилтрацију неутрофила на местима инфламације (119). И ресолвин и протектин инхибирају продукцију интерлеукина-1b и фактора туморске некрозе- α (120, 121). Улога и значај ресолвина и сличних једињења се повећава, јер је резолуција упале од кључног

значаја у затварању активних инфламаторних процеса и у ограничавању оштећења ткива (122-124).

Недавно су испитивани медијатори изведени из масних киселина, као што су n-3 полинезасићене масне киселине, због њиховог утицаја на решавање инфламације. Ови изведени липидни медијатори укључују ресолвине, липоксине, протектине и маресине и модификују запаљенски одговор променом хемотаксије полиморфних нуклеотида, повећањем макрофагних преузимања и стимулацијом антимикуробног одговора (116, 117, 125, 126). Ови медијатори дају активан приступ решавању инфламације и потенцијал за обезбеђење додатних средстава који побољшавају одговор домаћина на инфламаторне болести (127-129). Локално топикално примењен ресолвин (RvE1) на моделу зеца обезбеђује моменталну резолуцију акутне инфламације (130). Када се уз то конзумира аспирин, дијететске n-3 полинезасићене масне киселине могу се метаболисати у Е и Д серије ресолвина преко липоксигеназног пут и као други исход, могу индуковати макрофаге на побољшану фагоцитозу бактерија и апоптозу неутрофила (131). Стога, конзумирање n-3 полинезасићених масних киселина и аспирина може изменити одговор домаћина на хронично запаљење.

1.2.7. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на телесну композицију

Више студија је показало да n-3 полинезасићене масне киселине имају јачи ефекат на губитак тежине и смањење обима струка код мушкараца него код жена (132), док су друге студије нашле јаче ефекте код жена (133). Разлика међу половима у физиолошком одговору на n-3 полинезасићене масне киселине је прихватљива, јер мушкарци и жене имају другачију анатомију масног ткива и физиологију. На пример, жене могу претворити више α -линолеинске киселине у докозахексаенску киселину него мушкарци (134, 135). Будуће студије о деловању n-3 полинезасићених масних киселина на телесну композицију треба испитати родне разлике у циљу појашњавања евентуалне разлике у здравственим предностима.

Неколико механизма је предложено да би се објаснио ефекат мршављења n-3 полинезасићених масних киселина, на пример, повећана липолизу и смањена липогенеза. Омега-3 полинезасићене масне киселине подстичу β -оксидацију и инхибирају синтезу

масних киселина и секрецију липопротеина врло ниске густине, делимично регулишу генску експресију. Код пацова, постоји индикација да n-3 полинезасићене масне киселне могу смањити липогенеза у масним ћелијама смањењем активности липопротеин липазе. (136).

Правилан однос између омега-3 масне киселине и омега-6 масних киселина је важан за постизање и одржавање нормалне телесне тежине, јер смањује сигнале у телу који стварају масне залихе, а побољшава и осетљивост према инсулину чиме се смањује ризик од настанка дијабетеса (137).

Поједини подаци показују да резистин снижава инсулином стимулисано преузимиње глукозе у скелетним мишићима (138). Постоји све више доказа да инсулинска резистенција у јетри, мишићима и масном ткиву није само повезана са великим бројем проинфламаторних цитокина (и релативним недостатком антиинфламаторног цитокина адипонектина), већ да је директан резултат овог стања (139).

Дијететска суплементација рибљим уљима, богат је извор n-3 масних киселина дугог ланца, првенствено еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине и добро је познато да смањује плазма концентрацију триглицерида (140, 141.). Капсуле рибљег уља разликују се у саставу и формулацији, садрже различите концентрације еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине. Етил естер облици n-3 масних киселина се сматрају највише биолошки ефикасним због хемијске чистоће, више биорасположивости и заштите против оксидативног стреса (142, 143). Клинички докази такође указују на то да суплементација рибљим уљем поправља ендотелну функцију, крутост артерија и крвни притисак (144-148).

Дијететска суплементација рибљим уљима 4 грама / дан значајно смањује телесну масу, обима струка, систолни и дијастолни крвни притисак, брзину откуцаја срца, плазма концентрацију триглицерида и повећа плазма концентрацију ХДЛ холестерола, концентрацију адипонектина и еластичност артерија.

1.3. СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

Слободни радикали су производи сталних биолошких редокс процеса који се одвијају у ћелији током њеног метаболизма. Њихова реактивност доводи до оксидативних промена биогених молекула с врло штетним учинцима, који могу реверзибилно и/или летално деловати на живе ћелије. Аеробни организми су током еволуције развили сложени систем заштите, као одговор на евентуално штетно деловање оксидационих процеса.

Оксидативни стрес се дефинише као стање поремећене равнотеже између прооксидативних фактора са једне и антиоксидативних са друге стране, односно између стварања реактивних врста кисеоника и азота (енг. *reactive oxygen species* - ROS; *reactive nitrogen species* - RNS) и њиховог уклањања антиоксидансима. Стање оксидативног стреса праћено је повећаним нивоом производа оксидације, као што су липидни хидропероксиди, оксидациони производи протеина и фрагменти ДНК (149). ROS и RNS су, као производи нормалног ћелијског метаболизма, у ниским и умереним концентрацијама корисни за живе организме. Њихови повољни ефекти се огледају у учешћу у бројним ћелијским сигналним путевима, индуковању митогеног одговора, као и у одбрани од инфективних чиниоца (150). У стањима повећаног стварања, ROS и RNS које не могу у потпуности бити елиминисане или неутралисане ензимским и неензимским антиоксидансима, доводе до оксидативног оштећења протеина, липида, ДНК и ћелијских компоненти. Ово ремети уобичајену структуру ћелије и њене функције доприносећи патогенези различитих болести (151).

1.3.1. Слободни радикали

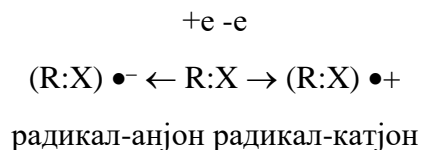
Реактивне врсте које доводе до стања оксидативног стреса у биолошким системима, могу бити радикалске и нерадикалске, које се често лако преводе у слободне радикале. Слободним радикалима се сматрају молекули или молекуларни фрагменти са једним или више неспарених електрона у спољашњој орбитали, који их чине веома реактивним и подложним интеракцијама са биомолекулима. Радикали настали од кисеоника су најважније радикалске врсте у живим системима (150). У молекуларном облику кисеоник је релативно нереактиван, али са додатком једног електрона настаје

супероксид-анјон радикал који се сматра примарним ROS и учествује у стварању секундарних кисеоничних врста (152).

Слободни радикали настају у низу биолошких реакција, те су у организму присутни у ниским концентрацијама ($10^{-5} - 10^{-9}$ mol). Настају у:

1. оксидативној фосфорилацији у митохондријама,
2. фагоцитози,
3. биотрансформацијама егзогенних и ендогенних супстанци на мембранама ендоплазмског ретикулума – у процесима аутооксидације и у редокс циклусима,
4. метаболизму етанола,
5. ензимским реакцијама у којима учествују оксигеназе,
6. синтези еикозаноида – биосинтези простагландина, леукотриена,
7. оксидо – редукцијама метала са променљивом валенцом,
8. липидној пероксидацији.

Слободни радикали могу бити неутрални, али и позитивно (радикал-катјон) или негативно наелектрисани (радикал-анјон):

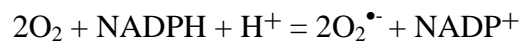


Током свог функционисања слободни радикали пролазе кроз три фазе: фаза иницијације, фаза пропације и фаза терминације.

1. У фази иницијације, нерадикали губе или примају један електрон, чиме им се мењају физичке и хемијске особине.
2. У фази пропације, новонастали слободни радикал активира циљни молекул, одузимајући му један електрон. На тај начин се он стабилизује, а циљни молекул постаје слободног радикала. С обзиром на то да су веома реактивни, настали слободни радикали делују даље и за кратко време вишеструко се умножи број слободних радикала. На тај начин, добија се низ ланчаних реакција, чиме је омогућена брза и интензивна пропација ових хемијских облика.

3. Фаза терминације, је период заустављања-неутрализације слободних радикала и њихове пропагације. За ове реакције заслужни су: неензимски оксиданси, ензимски оксиданси и судар два слободна радикала.

Слободни радикали су у организму присутни у ниским концентрацијама ($10^{-5} - 10^{-9}$ mol). У физиолошким процесима, слободни радикали учествују у производњи енергије, важни су за антимикуробну активност фагоцитних ћелија, учествују у процесима преношења сигнала и регулацији ћелијског циклуса, неопходни су за механизам деловања неких ензима. Поред тога, слободни радикали су и мутагени, убрзавају старење и стимулишу раст ћелија (153). Кисеонични слободни радикали настају у процесу фагоцитне активности неутрофила, моноцита, макрофага и еозинофила и део су каскадних догађаја у антимикуробној активности фагоцитних ћелија. Фагоцитоване честице у овим ћелијама изложене су великој количини створеног супероксид анјон радикала у процесу тзв. респираторне експлозије која настаје након активације мембранске NADPH оксидазе:



Слободни радикали могу бити и регулаторни молекули у биохемијским процесима. Лимфоцити и фибробласти непрестано стварају мале количине $\text{O}_2^{\bullet-}$, који је регулатор раста. Ендотелне и глатке мишићне ћелије могу бити стимулисане да ослобађају супероксид анјон радикал (154). Стварање ROS је значајно за ћелију и зато што они могу бити и унутарћелијски секундарни гласници (155).

Слободни радикали су такође у физиолошким условима укључени у механизам деловања неких ензима, на пример, хем ензима цитохрома P450 и простагландин синтазе, затим FeS-рибонуклеозид дифосфат редуктазе која редукује рибонуклеозид дифосфат у деоксирибонуклеозид, прекурсор ДНК (156). Ензимски каталисан оксидација арахидонске киселине у току биосинтезе еикосаноида праћена је стварањем хидропероксида и кисеоникових слободних радикала као интермедијерних једињења.

Према теорији слободних радикала о развоју организма, метаболички оксиданси (ROS и слободни радикали) утичу на развој тако што мењају антиоксидациони капацитет

ћелије мењањем продукције глутатиона (GSH). Наиме, GSH и кисеоник утичу на активност ензима одговорних за иницирање и одржавање епигенетске контроле у експресији гена (157).

Слободни радикали су, као део нормалне метаболичке активности ћелије, укључени у многе функције ћелије *in vivo*, али уколико измакну контроли они постају веома реактивни и штетни за ћелију јер могу оштетити бројне функционалне путеве у њој. Оштећењем ДНК могу довести до малигне трансформације ћелије (158).

1.3.2. Реактивне врсте кисеоника (ROS)

Реактивне врсте кисеоника, слободни радикали кисеоника, (*Reactive oxygen species*) (ROS), су слободне радикалске честице кисеоника. Састоје се од атома, молекула или јона и ове честице имају један или више неспарених електрона у својој структури. Настају као међупроизвод у току метаболизма кисеоника, јако су нестабилне и веома реактивне, због чега могу изазивати ланчане реакције у организму (159).

У нормалном молекулу, језгро је окружено паром негативно наелектрисаних електрона. Уклањањем једног електрон из пара, процесом који се зове оксидација, молекул постаје нестабилан. Име овако насталог новог молекула је „радикал“ молекул.

Реактивне кисеоничне врсте се у великом броју случајева поистовећују са слободним радикалима. Не представљају само реактивне кисеоничне врсте слободне радикал. Исто тако ни све реактивне кисеоничне врсте не представљају слободне радикалине. ROS се деле у 2 групе (160) (Табела 2):

- 1) слободни радикали кисеоника
- 2) нерадикалски облици кисеоника

Табела 2. Реактивне врсте кисеоника

Слободни радикали кисеоника		Нерадикалски облици кисеоника	
Ознака	Назив	Ознака	Назив
O_2^{\bullet}	Супероксид анјон радикал	H_2O_2	Водоник пероксид
$\bullet OH$	Хидроксил радикал	$HOCl$	Хипохлорна киселина
HO_2^{\bullet}	Хидропероксил радикал	O_3	Озон
RO^{\bullet}	Алкоксил радикал	1O_2	Синглет кисеоник
RO_2^{\bullet}	Пероксил радикал	$ROOH$	Органски хидропероксид

1.3.2.1. Особине појединих ROS

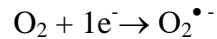
1.3.2.1.1. Порекло

Порекло реактивних врста кисеоника у организму, може бити *ендогено* (у току физиолошких процеса, нпр. ћелијског дисања) и *егзогено* (када је њихова продукција изазвана уносом ксенобиотика и других материја у организам).

ROS се у организму непрекидно стварају у току ћелијске респирације у телу, углавном током процеса преноса електрона у процесу дисања у митохондријама, и најчешће настају као непожељни производи непотпуног ћелијског дисања. У активним митохондријама се око 0,1% до 4% удахнутог кисеоника претвара у реактивна једињења кисеоника (161). Многбројни радикали могу настати у организму и након уноса различитих супстанци или страних материја (ксенобиотика). Неки од најчешћих ксенобиотика су; пестициди, катрани, вештачке боје, дувански дим, конзерванси, лекови или радикали настају као последица изложености микроталасном, јонизујућем и другим врстама зрачења, па чак и јачег физичког напрезања (160).

1.3.2.1.2. Супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$)

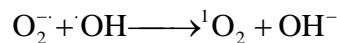
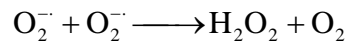
Супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$), настаје једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника у електронском транспортном ланцу (162):



Супероксид анјон радикал, мада сам релативно нетоксичан, може реаговати са разним биолошким молекулима и учествовати у регулацији раста и преношењу интрацелуларних сигнала (163, 164). Као слободни радикал, $O_2^{\bullet-}$ лако ступа у интеракцију са другим слободним радикалима, на пример, азот моноксид радикалом (NO^{\bullet}), а настали пероксинитрит ($OONO^{\bullet}$) је такође реактивна кисеонична честица (165).

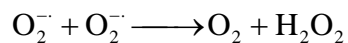
Штетно дејство супероксид анјон радикала може се увидети у следећим реакцијама:

- Формирање других врста ROS (166)



- Може изазвати деполимеризацију полисахарида; оштећење ћелијских мембрана индукцијом липидне пероксидације; оштећење ДНК и РНК приликом процеса репликације и транскрипције (167);

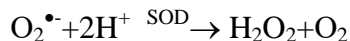
Реакцијом два супероксид анјон радикала долази до разградње $O_2^{\bullet-}$ и настанка водоник пероксида (H_2O_2). У киселој средини ово је спонтана реакција, а на физиолошком рН реакција дисмутације је вођена ензимом супероксид дизмутаза (SOD).



$O_2^{\bullet -}$ који избегне дисмутацију или реагује са $\bullet NO$ формирајући пероксинитрит, или реагује на различите начине са транзиционим металима, учествује у Fenton-овој реакцији са водоник пероксидом при чему настаје хидроксил радикал, или бива протонизован у хидропероксил радикал. Иако је количина протонизованог $O_2^{\bullet -}$ *in vivo* мала, HO_2^{\bullet} може да се инкорпорира у фосфолипидни двослој и иницира липидну пероксидацију (168).

1.3.2.1.3. Водоник пероксид (H_2O_2)

Водоник пероксид нема неспарених електрона и није слободни радикал. Најстабилнији је облик ROS. Огроман део продукованог водоник пероксида настаје путем дисмутације супероксид анјон радикала, створеног од стране митохондрија или NADPH оксидаза (169).



Штетни ефекти H_2O_2 су дозно зависни. Низак ниво водоник пероксида делује пре пролиферативно него антипролиферативно (170).

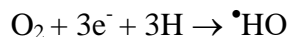
Дозно зависни штетни ефекти H_2O_2 су (171):

- У ниским концентрацијама оштећује протеине ћелијских мембрана и ремети њихову функцију
- У већим концентрацијама оштећује ДНК у многим типовима ћелија
- Високе концентрације су леталне за скоро све живе организме (због тога се користи и као дезинфекционо средство)

Водоник пероксид је опаснији када делује индиректно у реакцији са супероксид анјон радикалом или јонима метала (Fe^{2+}) када доводи до стварања изузетно реактивног хидроксил радикала ($\bullet HO$) који је најснажнији активатор пероксидације мембранских липида (172):

1.3.2.1.4. Хидроксил радикал ($\bullet\text{HO}$)

Хидроксил радикал ($\bullet\text{HO}$) представља најтоксичнију врсту ROS-а (172).



Реагује са скоро свим биомолекулима: алкохолима, органским киселинама, шећерима, аминокиселинама, фосфолипидима и нуклеотидима при чему настају одговарајући органски радикали.

Висока реактивност $\bullet\text{OH}$ и мала селективност чине га веома опасним по интегритет и функционалност ћелије. Он је најреактивнији интермедијарни продукт делимичне редукције кисеоника. Као резултат серије реакција може настати и пероксил радикал који даље пропагира слободне радикалске процесе посебно оне на мембранама.

Ако каталаза не уклони водоник пероксид, онда он може да реагује са феро јонима и да формира хидроксил радикал (173).

Хидроксил радикал изазива следеће реакције које су довољне за настанак иреверзибилног оштећења ћелије (174).

- Оштећење мембране митохондрија.
- Оштећење молекула ДНК.
- Оштећење мембране ћелије.
- Поремећај липидне пероксидације (160).

1.3.2.1.5. Синглет кисеоник ($^1\text{O}_2$)

Молекуларни кисеоник је слободни радикал са два неспарена електрона паралелних спинова. Спада у нерадикалске форме ROS али представља врло јак оксидациони агенс. Синглетни кисеоник настаје довођењем енергије у молекул кисеоника, са циљем да се мења спин једног од електрона, што значајно увећава његову реактивност. Такође овај радикал може да испољи и значајну токсичност у различитим биолошким

системима. (160).

$^1\text{O}_2$ може реаговати са низом биомолекула као што су ДНК, протеини и липиди (160). Ове реакције укључују оксидацију, хидроксилацију и O_2^- адитивне реакције (169).

Штетно дејство синглет кисеоника представља се као стварање сулфооксида, фенола, ендопероксида, хидропероксида и хинона. Због способности да реагује са незасићеним масним киселинама липидних мембрана, може да иницира процес липидне пероксидације, а може лако да се трансформише и у друге облике ROS (166).

1.3.3. Липидна пероксидација

Липидна пероксидација је термин који описује уградњу молекуларног кисеоника у структуру полинезасићених масних киселина у биолошким мембранама (160).

Услед пероксидације липида плазна мембрана су:

- Поремећај флуидности ћелијске мембране-могуће цурење садржаја цитосола у ванћелијску средину.
- Појачана пропустљивост за једновалентне и двовалентне јоне. Услед овакве пропустљивости може да дође и до промене осмотског притиска у ћелији, а и ван ње.
- Оштећење система преноса информација са рецептора на мембрани на унутарћелијске системе, с обзиром на то да су неки липиди категоризовани као секундарни гласници.
- Инактивација ензима.

На пероксидацију липида осетљивост су показали и неурони ЦНС-а и ћелије глије због високог садржаја полинезасићених масних киселина у липидима мозга—сфингомијелина, цереброзида и ганглиозида (175).

Овај процес може тећи на два начина:

1. Ензимским путем – дејством липоксигеназе и циклооксигеназе. Ови ензими катализују оксидацију арахидоната, до простагландина и леукотриена, док оксидацију холестерола до хидроксихолестерола катализује цитохром P-450 (176).
2. Неензимским путем – Посредовањем ROS – а на полинезасићене масне киселине из липидног двослоја мембране доводи до појаве изопростана (177). Радикали који учествују у одузимању водониковог атома полинезасићеним масним киселинама су алкоксил радикали (RO^\bullet), пероксил радикали (RO_2^\bullet), хидропероксил радикали (HO_2^\bullet), неколико гвожђе-кисеоник комплекса и хидроксил радикал ($^\bullet\text{HO}$) (178),

Реактивне кисеоничке врсте одузимају H-атом из метил-групе у α -у положају у односу на двогубу везу у молекулу полинезасићене масне киселине. Одузимањем ових атома, који носе по 1 електрон, на C-атому метил-групе полинезасићене масне киселине, остаје 1 неспарени електрон–заправо настаје липидни радикал (L). Да би се стабилизовао новонастали хемијски облик, дешава се премештање електрона дуж угљоводоничног низа полинезасићене масне киселине, што има за последицу премештање двогубих веза и стварање коњугованих диена. Адицијом молекулског кисеоника на овакав радикал, на месту C-атом радикала, настаје пероксил радикал (LOO^\bullet).

Као финални продукт липидне пероксидације полинезасићене масне киселине настаје малонилдиалдеhid (MDA). У киселој средини он кондензује са 2 молекула тиобарбитурна киселина, дајући производ који апсорбује у видљивом делу спектра, са апсорпционим максимумом на 532 nm. Ово представља и доказну реакцију за липидну пероксидацију у неком биолошком систему и квантитативна мера присуства липидних пероксида у систему (169).

1.3.4. Реактивне врсте азота (RNS)

Поред ROS, висок оксидациони потенцијал поседују и реактивне врсте азота (RNS). Главни представник RNS је азот моноксид ($^\bullet\text{NO}$). Метаболизам $^\bullet\text{NO}$ и његова реактивност, доводе до постанка много других RNS, пре свега пероксинитрита (ONOO^-), а онда и азот диоксида (NO_2), диазот триоксида (N_2O_3) и диазот тетоксида (N_2O_4).

Све ове врсте, а међу њима и реактивне врсте кисеоника, имају велики број функција које нису увек лоше по живу ћелију, али поседују велику биореактивност и потенцијал за нарушавање физиолошке функције протеина, липида, угљених хидрата и нуклеинских киселина (179).

1.3.4.1. Азот моноксид ($\bullet\text{NO}$)

Азот моноксид има многобројне улоге у редокс сигнализацији као слободни радикал. Његов настанак је везан за ћелије под дејством ензима који се називају азот моноксид синтазе (енгл. *Nitric Oxide Synthases* – NOSs) (180).

Азот моноксид реагује са многим биомолекулима. $\bullet\text{NO}$ може да изазове инхибицију активности многих ензима, да изазове липидну пероксидацију, може и да измени структуру ДНК, али може да делује и као антиоксиданс у смислу заштите ћелије од оксидационог стреса (179), што је директно пропорционално продукцији $\bullet\text{NO}$.

Азот моноксид на овај начин утиче на регулацију многих биолошких одговора, као што су индукција и активација гена, инхибицију агрегације тромбоцита, цитостаза, апоптоза, неуротрансмисија, стимулација имуног одговора, релаксација васкуларне глатке мускулатуре (181).

Оксидациони стрес представља један од битних фактора са утицајем на ендотелну функцију и биорасположивост $\bullet\text{NO}$ -а. $\text{O}_2^{\bullet-}$ умањује функцију eNOS на тај начин што скраћује полуживот азот монооксида и умањујући његову расположивост. При том долази до настајања високотоксичног ONOO^- (167). Ова реакција је повезана са мноштвом патофизиолошких стања, док у нормалним условима $\text{O}_2^{\bullet-}$ бива елиминисана од стране SOD. Реактивне кисеоничне врсте такође регулишу васкуларну функцију модулишући ћелијски раст, апоптозу, миграцију, инфламацију, секрецију и продукцију екстрацелуларног протеинског матрикса (182). Оксидациони стрес и оштећења изазвана њиме представљају медијаторе васкуларних оштећења и инфламације у многим кардиоваскуларним болестима, поготову уколико постоје компликације у виду хипертензије, хиперлипидемије, дијабетеса (153, 160).

1.3.5. Антиоксидациони заштитни систем

Антиоксидациони заштитни систем (енг. *Antioxidant defence system*- AOS), настао је током еволуције код свих аеробних организама, како би се спречила, ограничила или "поправила" оштећења настала деловањем реактивних врста кисеоника ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ и 1O_2) (183).

Антиоксиданс је супстанца која својим присуством у малим концентрацијама, у односу на оксидабилни супстрат, утиче на смањење, или на спречавање оксидације тог супстрата (160). "Оксидабилни супстрат" је супстанца која може да се нађе у храни, ткивима, код животиња и људи. Ту спадају и протеини, липиди, угљени хидрати и ДНК.

Антиоксиданси су молекули, који могу деловати пре или током реакције слободних радикала, у фазама иницијације, пропагације, терминације и декомпозиције слободних радикала или током следствених реакција оксидованих продуката са осетљивим циљним молекулима (184). Деловање антиоксиданаса представља способност хватања (енг. *scavengers*) слободних радикала, давања електрона, разграђивања хидропероксида липида, који су настали у фази пропагације, затим неутрализацију деловања синглетних облика кисеоника као и способност инхибиције неких ензима (185).

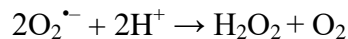
Антиоксидациони заштитни систем чине ензими и једињења мале молекулске масе. Овај систем омогућава заштиту од токсичног дејства ROS. Оштећења, која настају деловањем ROS, тумаче се као последица оксидационог стреса. Оксидациони стрес настаје када дође до поремећаја равнотеже између ROS и RNS-а, с једне стране, и заштитног система с друге стране. У том случају вишак одбеглих ROS регује с липидима, протеинима, нуклеинским киселинама и полисахаридима изазивајући значајна оштећења. Сматра се да оксидациони стрес представља важан фактор у патогенези старења, у дегенеративним обољењима као што су: атеросклероза, кардиоваскуларна обољења, реуматоидни артритис, дијабетеса тип 2 и у развоју тумора (160, 186).

Како би се спречила, оштећења која настају услед деловања слободних радикала кисеоника ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2), развио се антиоксидациони заштитни систем, који представља заштиту биолошких система.

1.3.5.1. Ензимске компоненте антиоксидационе одбране

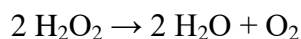
Излагање слободним радикалима насталим у нормалним метаболичким процесима или под дејством егзогених чиниоца, довело је до развоја серије одбрамбених механизма који укључују превентивне механизме, механизме поправке оксидативних оштећења, физичку одбрану и антиоксидативну заштиту (187). Антиоксидансима се сматрају молекули који, у малој концентрацији у односу на биомолекуле које штите, могу да спрече или редукују ниво оксидативних оштећења биомолекула и тиме смање штетне ефекте континуираног стварања ROS (188). У антиоксидансе се убрајају ензимске и неензимске компоненте које могу бити лоциране у цитоплазми, ћелијској мембрани и екстрацелуларном простору. Ензимска антиоксидативна заштита укључује ензиме супероксиддисмутазу (SOD), каталазу (CAT) и глутатион-пероксидазу (GPx). Наведени антиоксиданси делују тако што блокирају започињање ланчане реакције слободних радикала и, самим тим, онемогућавају пратећу пероксидацију липида (189), јер сваки од њих детоксикује неког припадника ROS.

Супероксиддисмутаза (SOD) има кључну улогу у заштити ћелије од оксидативних оштећења јер представља прву линије одбране од ROS. То је металопротеин који убрзава превођење $O_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 према следећој једначини:

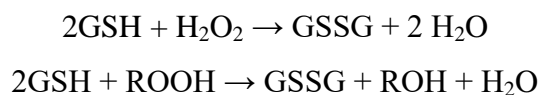


У људском организму постоје два основна молекуларна типа овог ензима. То су цитосолна форма (CuZnSOD) која садржи бакар и цинк и митохондријална форма (MnSOD) која садржи манган као редокс активни метал (190). Протективно деловање SOD је повезано са деловањем каталазе и пероксидазе да би се спречило нагомилавање H_2O_2 и његово претварање у OH^{\cdot} .

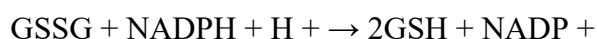
Каталаза (CAT) се налази у пероксизомима и митохондријама и по структури је тетрамер који у свом активном центру има Fe^{3+} везано за порфирин хем групу (191). Делује тако што преводи H_2O_2 до H_2O и један је од најефикаснијих ензима у живом свету. Показано је да високе концентрације H_2O_2 стимулишу његову неутрализацију каталазом у реакцији у којој је H_2O_2 истовремено и дозор и акцептор водоника (191):



Са друге стране, ниске концентрације H_2O_2 су неутралисане пре свега пероксидазом. Глутатион-пероксидаза је лоцирана у цитосолу и митохондријама и катализује редукцију H_2O_2 у H_2O , као и редукцију и органских хидропероксида (ROOH) у алкоhole (ROH) при чему се као кофактор користи глутатион (GSH):



При овоме настаје оксидовани глутатион, глутатион-дисулфид (GSSG), који се активношћу глутатион-редуктазе (GR) преводи у редуковану форму (GSH) уз учешће NADPH као редукујућег еквивалента (192) према једначини:



1.3.5.2. Неензимске компоненте антиоксидационе одбране

У неензимске компоненте система заштите од оксидативних оштећења убрајају се различита липосолубилна и хидросолубилна једињења. Највише проучавани хидросолубилни неензимски антиоксиданси су глутатион, витамин Ц (Л-аскорбинска киселина), мокраћна киселина, албумин, трансферин, билирубин, а липосолубини су витамин А (ретинол), провитамин А (β -каротен), витамин Е (α -токоферол) и коензим Q (убихинон) (150). Неензимски антиоксиданси могу учествовати у заштити од оксидативних оштећења различитим механизмима деловања. Под овим се подразумева “хватање” слободних радикала (витамин Ц и Е) и заустављање ланчаних радикалских реакција, хелирање прелазних метала који катализују радикалске реакције (флавоноиди), инхибиција оксидативних ензима (аспирин) или деловање као кофактора антиоксидативних ензима (селен, коензим Q) (193).

1.3.6. Маркери оксидативног стреса и њихово одређивање

Оксидативни стрес је уобичајено дефинисан као стање поремећене равнотеже између концентрације ROS и RNS с једне стране и антиоксидативних одбрамбених механизма организма са друге. Ипак, оксидативни стрес није јединствено дефинисан у погледу метода и маркера који се користе за одређивање његовог нивоа. Најчешће коришћен критеријум за процену оксидативног статуса заснива се на одређивању концентрације производа оксидације липида у телесним течностима или на мерењу подложности липида оксидацији *ex vivo* (194).

Иако појединачни антиоксиданси имају јединствену улогу у борби против оксидативних оштећења, мерење њихових индивидуалних концентрација није добар показатељ заједничког деловања свих у заштити од оксидативних оштећења у систему. Стога се често приступа мерењу укупног антиоксидативног потенцијала биолошких система, који представља важан индекс при мерењу нивоа оксидативног стреса (195).

1.3.7. Протективно дејство n-3 полинезасићених масних киселина

Ефекти n-3 полинезасићених масних киселина на радикале кисеоника и антиоксидансе су пријављени као главни ефектори ових дијететских суплемената (71, 98, 99). Масне киселине у мембранским липидима су подложне оксидацији слободним радикалима који могу бити генерисани било ксенобиотицима било нормалним аеробним ћелијским метаболизмом, што доводи до формирања липидних пероксида (100). Липидни пероксиди у биолошким мембранама су веома деструктивни и токсични биомолекули. Липидни пероксиди нуспроизводи су уплетени у етиологију низа болести, укључујући кардиоваскуларне болести и атеросклерозе (101). Недавне студије су испитивале дејство n-9 (маслиново уље), n-6 и n-3 полинезасићених масних киселина етил естара на оновну (неиндуковану) и Fe^{2+} / аскорбат (индуковану) пероксидацију липида у пљувачним жлездама мишева. Резултати су показали да се осетљивост ткива на липидне пероксиде повећава у следећем редоследу: маслиново уље < кукурузно уље < сунцокретово уље < n-3 етил естри. n-3 полинезасићене масне киселине повећавају супероксид дисмутазу и активност каталазе у ткиву пљувачних жлезда. Аутори су закључили да конзумирање

маслиновог уља повећава отпорност пљувачних жлезда, а вероватно и других ткива на индуковане и неиндуковане липидне пероксиде (102).

Сматра се да неконтролисано формирање липидних пероксида представља један од водећих механизма ћелијског оштећења, као и да води до настајања патолошких стања попут инфламације и кардиоваскуларних болести (196). Додатно, слободни радикали интеракцијом са липидима мењају њихову структуру, паковање и дистрибуцију у ћелијској мембрани, што доводи до смањења мембранске флуидности, која се доводи у везу са развојем хипертензије и кардиоваскуларних болести (197). С обзиром да представља место првог контакта екстраћелијских чиниоца и саме ћелије, ћелијска мембрана је ћелијска структура која је примарно изложена оштећењу деловањем прооксиданаса присутних у плазми, насталих као резултат поремећаја прооксидативно-антиоксидативне равнотеже. Основно место деловања слободних радикала и других реактивних врста су молекули полинезасићених масних киселина у фосфолипидима ћелијских мембрана (198).

Појава липидне пероксидације у биолошким мембранама доводи до поремећаја њихових функција, промена у флуидности, инактивације мембрански везаних рецептора и ензима и повећања неспецифичне пропустљивости за јоне. Тако на пример, излагање еритроцита пероксидима и њихова последична деформација, чини њихову мембрану високо пермеабилном за калијумове јоне (199). У студијама које се баве евалуацијом оксидативног стреса у различитим стањима, као и ефикасности потенцијалних антиоксиданаса, као модел биолошке мембране најчешће се користе еритроцити. Еритроцити су такође, као најбројније крвне ћелије, главни извор антиоксидативних ензима који представљају део одбрамбеног механизма организма против оксидативних оштећења. Ове крвне ћелије сматрају се потенцијалним метама прооксиданаса, због чињенице да је њихова мембрана богата полинезасићеним масним киселинама, као и да реактивне врсте кроз њу лако пролазе. Додатно, услед недостатка ДНК, еритроцити имају ограничене могућности за регенерацију биомолекула оштећених оксидансима (200).

Стога у стањима праћеним изразитим оксидативним стресом, еритроцити често мењају своју структуру и функције, а њихове компоненте, па и мембрана бивају оксидативно угрожене. Пероксидација еритроцитне мембране, односно липида, може довести до губитка способности промене облика еритроцита и проласка кроз најмање

капиларе, што угрожава транспорт кисеоника до периферних ткива. Промене у липидном двослоју мембране еритроцита мењају њену флуидност, што се одражава променама у структури, динамичкој деформабилности мембране као и активности мембрански везаних ензима, а доводи се у везу са бројним патолошким стањима, као и патогенезом кардиоваскуларних болести и реуматоидног артритиса (201, 202). Одређивање садржаја полинезасићених масних киселина, па и целокупног профила масних киселина у мембрани еритроцита од значаја је у предвиђању ризика за настанак кардиоваскуларних болести и реуматоидног артритиса. Установљено је да већи садржај n-3 полинезасићених масних киселина у мембранама негативно корелише са ризиком за настанак кардиоваскуларних болести, али и појавом реуматоидног артритиса и метаболичког синдрома (203-205).

Неки аутори предлажу и увођење „омега-3-индекса“, који представља суму садржаја две најзначајније n-3 масне киселине, еикозапентаенске и докозахексаенске у мембрани еритроцита, као потенцијалног фактора ризика за смрт од коронарне болести срца (206). Докозахексаенска киселина је полинезасићена масна киселина са највећим бројем незасићених веза, које су циљно место интеракције са слободним радикалима, те је од значаја одређивање њеног садржаја. Студије су показале њен антиаритмички ефекат као и хипотензивно дејство, посредовано ослобађањем NO у ендотелијуму (207). Утврђено је и да висок однос n-6 и n-3 масних киселина у мембрани еритроцита промовише инфламацију и развој хроничних болести, као и да његово смањење делује супресивно на патогенезу кардиоваскуларних и других болести (208).

II

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ:

- 1) Утврдити како утиче суплементација концентрованим рибљим уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани на активност болести код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 2) Утврдити како утиче суплементација концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани на активност болести код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 3) Утврдити како утиче суплементација концентрованим рибљим уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани на параметре оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 4) Утврдити како утиче суплементација концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани на параметре оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 5) Утврдити како утиче суплементација концентрованим рибљим уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани на нивое проинфламаторних цитокина код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 6) Утврдити како утиче суплементација концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани на нивое проинфламаторних цитокина код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 7) Утврдити како утиче суплементација концентрованим рибљим уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани на ендотелну функцију код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 8) Утврдити како утиче суплементација концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани на ендотелну функцију код пацијената са реуматоидним артритисом.
- 9) Утврдити како утиче суплементација концентрованим рибљим уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани на телесни састав, тежину и обим струка код пацијената

са реуматоидним артритисом.

10) Утврдити како утиче суплементација концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани на телесни састав, тежину и обим струка код пацијената са реуматоидним артритисом.

2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ:

- 1) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог рибљег уља са омега-3 масним киселинама ће имати значајно смањење активности болести (смањење броја отечених и болних зглобова, краћа јутарња укоченост).
- 2) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог уља ноћурка са омега-6 масним киселинама ће имати значајно смањење активности болести (смањење броја отечених и болних зглобова, краћа јутарња укоченост).
- 3) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог рибљег уља са омега-3 масним киселинама ће имати значајно ниже параметре оксидативног стреса.
- 4) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог уља ноћурка са омега-6 масним киселинама ће имати значајно ниже параметре оксидативног стреса.
- 5) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог рибљег уља са омега-3 масним киселинама ће имати значајно ниже нивое проинфламаторних цитокина.
- 6) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог уља ноћурка са омега-6 масним киселинама ће имати значајно ниже нивое проинфламаторних цитокина.
- 7) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог рибљег уља са омега-3 масним киселинама ће имати значајно бољу ендотелну функцију.
- 8) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог уља ноћурка са омега-6 масним киселинама ће имати значајно бољу ендотелну функцију.
- 9) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог рибљег уља са омега-3 масним киселинама ће имати

мању телесну тежину, мањи проценат масти и мањи обим струка.

10) Пацијенти са реуматоидним артритисом који су узимали у периоду од 3 месеца суплементацију концентрованог уља ноћурка са омега-6 масним киселинама ће имати мању телесну тежину, мањи проценат масти и мањи обим струка.

Резултати студије би требало да укажу на значај исхране богате високим дозама омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом као додатак фармаколошком лечењу.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ВРСТА СТУДИЈЕ

Ово истраживање је мултидисциплинарно и обухвата опште прихваћене методе физиологије и реуматологије. Реч је о интервентној, клиничкој, проспективној студији у трајању од 3 месеца, спроведеној у периоду од априла до јуна 2014. године у Одељењу Реуматологије Клиничког Центра Крагујевац и на Катедри за физиологију, Факултета Медицинских Наука у Крагујевцу. Студија је одобрена од стране Етичког одбора Клиничког Центра Крагујевац. Све особе су добровољно пристале да учествују у студију и сви испитаници информисани су о природи, сврси, трајању, очекиваним ефектима и ризицима истраживања, и од њих је добијена писмена сагласност за учешће у студији. Студија је спроведена у складу са принципима Хелсиншке декларације и добре клиничке праксе.

3.2. ИСПИТАНИЦИ

У студији је учествовало 60 пацијентата женског пол са реуматоидним артритисом који испуњавају важеће дијагностичке критеријуме Америчке реуматолошке асоцијације из 1988. године (7). Пацијенти су одабирани у Одељењу Реуматологије и Реуматолошкој амбуланти у Клиничком Центру Крагујевац. Просечна старост пацијентата је била 56 године (средња вредност 56,75 године, $SD \pm 7.39$, min 32 - max 69 године). Дужина трајања болести просечно је износила 7,31 година $\pm SD 3,09$ (min. 2 – max. 20 година). У време студије, сви пацијенти су употребљавали један или два болест модификујућа лека. Пацијенти који су примали високе дозе кортикостероида (> 10 mg/дневно, укључујући парентералну администрацију) и они који су употребљавали биолошке лекове нису укључени у студију. Нестероидне антиинфламаторни лекове пацијенти су употребљавали повремено.

Реуматолошки преглед је укључивао процену активности болести преко скорa за активност болести 28 (*Disease Activity Score* - DAS 28). DAS 28 обухвата преглед и

процену броја отечених и осетљивих зглобова од укупно 28 зглобова који укључују: проксималне интерфалангеалне зглобове, метакарпалне фалангеалне зглобове, ручје, лактове, рамена и колена; заједно са нивоом седиментације еритроцита (ESR) и визуелном аналогном скалом (VAS). VAS је скала која користи хоризонталну линију од 100 mm где пацијент означи место које означава његов степен бола на линији која лево означава “без бола” (леви крај, 0mm) и “ најјачи бол” (десни крај 100mm). DAS 28 се израчунава аутоматски користећи аутоматски DAS 28 калкулатор (V1.1-beta *Alfons and Michel*), који је доступан на интернет адреси www.umcn.nl. DAS 28.

Пацијенти су подељени у три групе. Прву групу чини 20 пацијената са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула Омега 3 Кардио која у саставу једне гел капсуле садржи 1000mg концентрованог рибљег уља са 300mg докозахексаенске киселине (DHA), 200mg еикозапентаенске киселине (EPA), 100mg осталих омега-3 масних киселина у току 3 месеца уз своју редовну реуматолошку терапију. Другу групу чини 20 пацијената са реуматоидним артритисом који су узимали по 3 гел капсуле Омега 3 Кардио и две гел капсуле уља ноћурка уз оброк (која садржи 1300mg уља ноћурка са 949mg линолне киселине и 117mg γ -линоленске киселине). У трећој, контролној групи је било 20 пацијената са реуматоидним артритисом који су били само на својој реуматолошкој терапији.

Фактори искључења за студију су били исти и за експерименталну групу и за контролну групу:

- кардиоваскуларно обољење,
- дијабетес,
- активни пушач (задњих 5 година),
- хиперлипидемија
- хемофилија,
- поремећај коагулације
- и друге форме артритиса, изузев реуматоидног артритиса,
- преосетљивост на неки од састојка сумплемената или било какав ранији податак о алергијама.

Клинички преглед је обухватао и антропометријска мерења (телесну висину,

телесну масу), мерење вредности крвног притиска. Индекс телесне масе (*Body mass index* - BMI) је израчунат преко формуле телесна маса/(телесна висина)².

3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Пункција вене је обављена код испитаника који седе. Сви узорци су послати у Централну лабораторију Клиничког Центра Крагујевац и процесуирани су у оквиру 4 сата од венепункције. Испитаници су замољени да гладују 12 сати пре вађења крви. Свим испитаницима је узимана крв непосредно пре ултразвучног мерења. Ниво седиментације еритроцита (*Erythrocyte sedimentation rate* - ESR) је одређивана методом по *Westergreen*-у а С-реактивни протеин је одређиван нефелометријски. Реуматоидни фактор у серуму је одређиван техником латекс аглутинације. Присуство антитела на циклични цитрулисани пептид у серуму детектовали смо помоћу EIA (*Immunoscan, Roche, COBAS, The Switzerland*) у складу са препорукама произвођача. Титар испод 17 јединица се сматра негативним. Укупни холестерол, фракције холестерола липопротеини ниске и високе густине су одређивани (HDL, LDL) лабораторијским ензимским китом (*Roche Pharmaceuticals*). Све анализе су рађене на почетку и након три месеца.

Узорак крви за мерење хомоцистеина узет је наташте, са K3-EDTA антикоагуланси (*Vacutainer* епрувете, са 0,04ml 7.5% K3E и волуменом од 2,0ml), и одмах стављен на лед те у року од 30 минута центрифугиран (5мин на 3000 окр / мин). Одвојене плазме чуване на -20 °C до извођења анализе. Хомоцистеин је мерен методом гасне хроматографије-масене спектрометрије (GC-MS, *Hawlett-Packard* серије 6890) уз деутерисани интерни стандард хомоцистеина (DL-3,3,3',3',4,4,4',4'-2H8, *Cambridge Isotope Laboratories*), а назива се стабилна изотопна дилуцијска масена спектрометрија (SID). Коришћен је контролни материјал компаније *Chromosystem* (*Chromosystem (Serum Control Homocysteine Level 1)*) и стандардни раствори припремљени одговарајућим мерењем хомоцистеина (*Sigma Chemical Co*) (209).

3.3.1. Одређивање антигена за Фон Вилебрандов фактора (vWFAg)

За одређивање антигена за *von Willebrandov faktor* (vWFAg) је коришћен латекс имуноесеј за квантитативно одређивање vWFAg у хуманој плазми, на апарату ACL Elite Pro апарату (*Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, 01730-2443, USA*). Кит за одређивање vWFAg се састоји из: 1) латекс реагенса (Nr.Cat.0020002310):2 бочице x 3ml суспензије поликлонских антитела зеца (на vWFAg) обложених полистиренским латекс честицама, са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. 2) реакционог пуфера (Nr.Cat.0020002320) : и 2 бочице x 4ml HEPES пуфера са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. Метода се заснива на аглутинацији латекс честица у присуству vWFAg. Степен аглутинације је директно пропорционалан концентрацији vWFAg-а у узорку плазме и одређује се мерењем смањења количине светлости које ослобађају створени агрегати.

3.3.2.Одређивање активности фон Вилебрандовог фактора (vWFAct)

За одређивање активности *von Willebrand-ovog faktora* (vWFAct) је коришћен латекс имуноесеј за квантитативно одређивање vWFAct у хуманој плазми, на апарату ACL Elite Pro апарату (*Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, 01730-2443, USA*). Кит за одређивање vWFAct се састоји из 1) латекс реагенса (Nr.Cat.0020004710):2 бочице x 4,5ml суспензије лиофилизованих пречишћених моноклонских антитела миша (на функционални епитоп vWF-а) обложених полистиренским латекс честицама са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора 2)пуфера (Nr.Cat.0020004720): 2 бочице x 4,5ml Tris пуфера са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. Метода се заснива на мерењу пораста замућености која настаје као последица аглутинације латекс реагенса. Специфична моноклонска анти-vWF антитела , адсорбована за латекс реагенс реагују са vWF плазме. Степен аглутинације је директно пропорционалан активности vWF-а у узорку плазме, и одређује се мерењем снижења количине светлости које ослобађају створени агрегати. vWfAct и vWfAg резултати су формулисани као одређен процента од нормалних референтних вредности и урађени су у Лабораторији за хематологију Интерне клинике КЦ Крагујевац.

3.3.3. Одређивање индекса агрегације тромбоцита (TRAP)

Поступак за детерминацију индекса агрегације тромбоцита (TRAP) се састоји у следећем:

300 μ l раствора CaCl_2 (MP0530) загрејаног на 37 °C се помеша са 300 μ l пуне крви, затим следи инкубација 3 мин, након чега се дода 20 μ l TRAP тест реагенса и започиње мерење на апарату MULTIPLATE (*Dynabyte Informationssysteme GmbH, Munich, Germany*) у трајању од 6 минута.

Кит за одређивање TRAP-а се састоји из:

1. TRAP тест (MP0150): TRAP-6; 1 x 1 ml лиофилизата (1 mM) са 5 епрувета за разблажење
2. TRAP тест (MP0195): TRAP-6; 1 x 1 ml лиофилизата (1 mM) без 5 епрувета за разблажење
3. TRAP тест (MP0250): TRAP-6; 1 x 1 ml лиофилизата (1 mM) без 5 епрувета за разблажење

ASPI тест - активатор је арахидонска киселина као супстрат за деловање циклооксигеназе (мониторинг ASA), ADP тест HS – активатор је ADP који делује на P2Y12 рецептор на површини тромбоцита (мониторинг тиенопиридина), TRAP тест – је активатор рецептора тромбина на површини тромбоцита (мониторинг инхибитора П_b/П_a рецептора). Инхибиција агрегације тромбоцита у ASPI тесту: адекватан ефекат аспирина је када су вредности теста између 790-1410 AU*мин (Агрегационе јединице у минути). Инхибиција агрегације тромбоцита у ADP тесту: адекватан ефекат клопидогрела су вредности теста између 406-992 AU*мин. Физиолошка агрегација тромбоцита у TRAP тесту је између 923-1509 AU*мин (Агрегационе јединице у минути).

3.3.4. Одређивање параметара оксидационог стреса

Да би се избегли утицаји исхране на нализе крви саветовано је испитаницима да се пре узимања узорака крви придржавају дијете без сухомеснатих производа, сирева, рибе, биљних или црних чајева, пива, вина и других алкохолних пића (Choi, 2003). Узорци венске крви (4,5 ml) испитаницима су узети у време студије. Крв је узимана у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорака се састојала се од одвајања еритроцита од плазмецентрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4 °C). Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 5000 rpm, а затим замрзнути на -20 °C до анализе.

Анализа биохемијских параметара ендотелне функције и параметара повезаних са акутним и хроничним ефектима оксидационог стреса: ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO^{\cdot} , TBARS, SOD, CAT, GSH) одрађена је у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију на Медицинском факултету у Крагујевцу. Мерење је вршено на спектрофотометру *Analytic Jena Specord S 600*.

3.3.4.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$)

Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) у плазми заснива се на реакцији $O_2^{\cdot-}$ са нитро тетразолијум плавим (*Nitro Blue Tetrazolium* - NBT) до нитроформаза плавог (210). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{max}=550$ nm. Есејна смеша (“*assay mixture*”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH = 8,6), 0,1 mM EDTA, 0,1 mg/ml желатина и 0,1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12 x 100) пипетира се 50 μ l плазме и 950 μ l есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо плазме користи се адекватна количина дестиловане воде. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две

узастопне приближно исте екстинкције. Последња екстинкција се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног $O_2^{\cdot -}$ добија се на основу следећих једначина:

$$\Delta E_u = E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)}$$

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)}$$

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\text{nmol } O_2^{\cdot -} / \text{ml плазме} = \Delta E / 0,015 \times 1/0,05$$

3.3.4.2. Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)

Детерминација количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол-црвеног помоћу водоник пероксида, реакцијом која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horse Radish Peroxidase* –HRPO) (211). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције на $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$. Линеарна зависност апсорбанце на 610 nm од концентрације H_2O_2 је постојана за 1 - 60 mM опсег концентрација (1 – 60 nmol/ml).

Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања H_2O_2 за временски интервал од 5 - 60 минута. У епрувете (12 x 100) се пипетира 200 ml плазме и 800 ml свеже направљеног раствора фенол црвеног (*Phenol Red Solution* – PRS) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH = 7), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол-црвеног. Узорцима се затим дода 10 ml (1 : 20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10 минута, а затим се подеси pH > 12, помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба плазме користи се адекватна количина дестиловане воде.

Концентрација ослобођеног H_2O_2 у венској крви израчунава се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни (*Stock*) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). У три епрувете пипетира се, уместо плазме, 5, 10 и 20 ml 1 mM раствора H_2O_2 , 200 ml дестиловане воде, 800 ml раствора фенол-црвеног и 10 ml (1 : 20) HRPO. Након

инкубације од 10 минута на собној температури, подеси се ј рН>12 , помоћу 1М NaOH (10ml).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H₂O₂ у венском ефлуенту израчунава се на основу фактора апсорбанце (F)/nmol H₂O₂:

$$F = \Delta A / \text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{cuv}$$

На основу апсорбанце узорка (Au) на $\lambda_{\text{max}} = 610\text{nm}$ и њеног упоређивања са слепом пробом (Asp) израчунава се финална апсорбанца (DA) ($A = Au - Asp$). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине венског ефлуента употребљеног у есеју (200 ml) израчунава се концентрација и количина H₂O₂ у плазми по формули:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{ml плазме} = \Delta A / F$$

3.3.4.3. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидативног стреса, одређује се индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances* – TBARS). За одређивање концентрације TBARS у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у Ерпендорф епрувете пиретира се 0,4 ml 28 % TCA и 0,8 ml плазме. Тако добијени узорци се инкубирају у леденом куратилу (-4° C) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугурају 4 минута на 15000 грм, а у добијеном супернатанту одређује се концентрација TBARS спектрофотометријски (212). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете (12 x 100) пиретира се 800 μl екстракта плазме и 200 μl 1% TBA у 0,05 М NaOH. Као слепа проба уместо екстракта плазме користи се еквивалентна количина дестиловане воде. Након пиретирања, узорци се инкубирају у воденом

куратилу 15 минута на 100° C. Након инкубације, узорци се прилагоде собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$.

Концентрација ослобођених TBARS добија се на основу следеће једначине

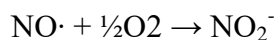
$$\text{nmol TBARS/ml плазме} = \Delta A (\text{Au-Asp}) / 1,56 \times 1,25$$

при чему је Au асорбанца узорка, док је Asp асорбанца слепе пробе, док су 1,56 и 1,25 корекциони фактори за овај есеј.

3.3.4.4. Одређивање концентрације азот монооксида (NO•)

За одређивање концентрације нитрита (NO_2^-) у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у Eppendorf епрувете пипетира се 0,1 ml 3 M PCA, 0,4 ml 20 mM EDTA и 0,2 ml плазме. Тако добијени узорци инкубирају се уледеном куратилу (-4 °C) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугурају 4 минута на 15000 rpm, супернатант се одлива, а преципитат ресуспендује у 2 M K_2CO_3 до pH = 7,4.

У тако добијеним узорцима екстракта плазме одређује се концентрација ослобођених нитрита спектрофотометријском реакцијом уз употребу Griess-овог реагенса (2013). С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита представља количину ослобођеног NO•. Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0,1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етиленамина

дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4° C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 x 100) пипетира се 0,1 ml екстракта плазме, 250 μ l свеже направљеног *Griess*-ов реагенса и 125 μ l амонијачног пуфера (pH = 9,0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH₄Cl) и натријум тетраборат (Na₂B₄O₇). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба екстракта плазме користи се дестилована вода. Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређује се на основу калибрационе криве. Калибрациона крива конструише се на основу екстинкција узорака, који у себи садрже познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са *Griess*-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO₂ у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24 μ l, чиме се добија одређена концентрација нитрита. Након стабилизације боје на собној температури 5 - 10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda_{\max} = 550\text{nm}$.

Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита, добија се на основу одређивања стандардног фактора (F):

$F = \text{Екстинкција стандарда-екстинкција слепе пробе} / \text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}$

за сваки појединачни стандард (F1 - F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине. Затим се разлика екстинкција узорка и слепе пробе подели са стандардом (F):

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml екстракта} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

3.3.4.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Одређивање активности SOD врши се адреналинском методом. Ова метода припада групи метода "негативног" типа, јер се прати смањење брзине аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од $O_2^{\cdot-}$. (214). Присутна SOD уклања $O_2^{\cdot-}$ и при томе инхибира реакцију аутооксидације адреналина. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на 480 nm. Пораст апсорбанце на 480 nm потиче од акумулације адренохрома. Брзина аутооксидације адреналина једнака је нагибу линеарног дела пораста апсорпције. Процент инхибиције користи се као мера каталитичке активности ензима. Брзина аутооксидације адреналина у одсуству ензима узима се као референтна (контролна), а брзина аутооксидације у присуству SOD, односно протеина у цитосолу представља део референтне вредности. У 3,2 ml реакционе смеше коју чине: 3 ml карбонатног буфера, pH = 10,2 и 0,1 ml раствора адреналина, додаје се 0,01 ml раније припремљеног супернатанта. Аутооксидација адреналина прати се у току 4 минута на 480 nm. Реакција је стабилна у температурном опсегу од 26 - 30° C. Упоредо се ради и контролна реакција. Процент инхибиције аутооксидације адреналина у присуству SOD из узорка, у односу на контролну реакцију аутооксидације адреналина користи се за израчунавање SOD активности. Количина SOD изражена је у јединицама SOD активности по граму Hb (јед/gHb). Јединица SOD активности дефинисана је као запремина, односно количина протеина која узрокује 50 % инхибиције брзине аутооксидације адреналина у линеарном делу пораста апсорпције.

Израчунавање се врши по следећој једначини:

$$SOD-I = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times Hb \times \Delta K}$$

ΔK - промена апсорпције контролне реакције у минути

ΔA - промена апсорпције реакције са узорком у минути

V - запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml)

Hb - количина хемоглобина (g/100ml лизата)

R – разблажење

3.3.4.6. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а (215). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. На тој таласној дужини водоник-пероксид апсорбује светлост. Тачна концентрација водоник-пероксида одређује се на следећи начин: у односу на апсорпцију разблаженог раствора руфера (1 : 10), као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0,9 ml разблаженог пуфера и 0,1 ml разблаженог 30 % раствора H₂O₂ (1 : 100). Концентрација водоник-пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H₂O₂, на 230 nm, 0,071, по формули:

$$C = A \Delta / 0,071$$

Добијена концентрација затим се разблажује до 10 mM.

Реакциона смеша: У кварцну кивету у којој се налази 50 μ l пуфера додаје се између 5 и 50 μ l узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник-пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm у току 3 минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H₂O₂, изражена у μ M, у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \cdot R}{0,071 \cdot \text{Low} \cdot V}$$

ΔA – промена апсорбанце у минути

R – разблажење

V – запремина узорка (ml)

Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

3.3.4.7. Одређивање активности глутатиона (GSH)

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми одређује се спектрофотометријски по методи *Beutler*-а (215), а заснива се на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензевом киселином (DTNB). GSH се екстрахује тако што се у 0,1 ml 0,1% EDTA дода 0,4 ml плазме и 0,75 ml раствора за преципитацију (1,67 g метафосфорне киселине, 0,2 g EDTA, 30 g NaCl, допунити до 100 ml дестилованом водом; раствор је стабилан 3 недеље на +4⁰C). После мешања на Vortex-мешалици, смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. Мерење се врши у кварцним киветама запремине 1 ml. У епрувете (12 x 100) пипетира се 300 µl венског ефлуента, 750 µl Na₂HPO₄ и 100 µl DTNB (1 mg DTNB/ml 1 % натријум цитрата). Као слепа проба користи се дестилована вода. Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у венском ефлуенту одређује се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни Stock-раствор редукованог глутатиона концентрације 1,5 mmol/l. У 4 епрувете се пипетира (уместо венског ефлуента) 10, 20, 30 и 40 µl 1 mM раствора GSH, 300 µl хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Тако се одреди концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту по формули:

$$\text{nmol GSH/ml ефлуента} = \Delta A/F$$

$$F = \Delta A/\text{nmol GSH/cuv}$$

3.3.5. Одређивање проинфламаторних цитокина

Користили смо комерцијални ELISA сет (R&D Systems, Minneapolis, MN) за мерење концентрације одабраних цитокина (IFN, IL-1 β , IL-17, IL-27, IL-6, TNF.) према инструкцијама произвођача (216).

Цитокини су анализирани са мултиплекс сендвич имуноесејом са електрохемилуминисценцијом. Укратко, плоче се прекривају са хватајућим антителима за специфичне цитокина, затим се инкубирју са узорцима плазме. Потом се антитела за детекцију додатају и плоче се поново инкубирају. После испирања, одреди се ниво детекције.

3.3.6. Одређивање масних киселина

За екстракцију и дериватизацију масних киселина из фосфолипида еритроцита, еритроцити су испрани три пута са 0, 9% NaCl и одвојени центрифугирањем (1,3009g, 10 мин). После хомогенизације у три смеше метанола и хлороформ [1:2 v/v са 50 ml / 1 2,6-ди-терц-бутил-4-метилфенола (ВНТ)], (2:1 v/v са 5% H₂O), и (1:1 v/v) сукцесивно, укупни екстракти липида су припремљени према поступку *Harth*-а (217).

Плазма липиди су екстраховани са хлороформ-метанол (2:1 v/v) методом *Folch*-а (218), са 10 mg / 100 ml ВНТ додаток као антиоксиданс. Фракција фосфолипида је изолована из екстрахованих липида једнодимензионом танкослојном хроматографијом у неутралном систему растварача (петрол етар-диетил етар-сирћетне киселине; 87:12:1 v/v) на силика гелу GF плочама (Merck, Darmstadt, Germany). Метил естри масних киселина су припремљене по методи *Christopherson*-а (219), а затим анализирани гасном хроматографијом Varian 3400 опремљен капиларном колоном (Rtx 2330, RESTEC, USA). Поједини метил естри масних киселина су идентификовани ретенционом временом аутентичане стандардне мешавине (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) и / или стандардне мешавине полинезасићених масних киселина (Supelco, Inc. Belleforte, PA).

3.3.7. Одређивање антропометријских карактеристика

Висина у стојећем положају је мерена са тачношћу од 0,1 cm на стадиометеру монтираном на зид, пацијенти су скинули своје ципеле и чарапе (Perspective Enterprises, Kalamazoo, Mich., USA).

Телесна тежина и процента масти у организму су мерени Tanita биоелектричном импеданцом (TBF-300, Tanita Corp., Japan). Пацијенти су скинули своје ципеле и чарапе пошто се биоелектрична импеданца одређује електричну импеданцу, или отпор протоку електричне струје кроз ткива и на тај начин одређује проценат заступљености воде и масти у организму.

За провену абдоминалне масе масног ткива мерени су обим струка и сагитални абдоминални дијаметар. Обим струка је одређиван у предели пупка нееластичном траком за мерење, а сагитални абдоминални дијаметар је одређиван тако што се измери размак између кичме и предњег трбушног зида у лежећем положају на равnoj подлози.

3.4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада података рађена је у статистичком пакету SPSS 18.0 *for Windows*.

За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћене су методе дескриптивне статистике: мере централне тенденције (средња вредност, медијана), мере варијабилитета (стандардна девијација, минимум и максимум), као и графичко и табеларно приказивање.

За испитивање нормалности расподеле параметара коришћен је *Kolmogorov-Smirnov* тест и *Shapiro-Wilk* тест.

У зависности од расподеле, за анализу података коришћени су одговарајући параметријски или непараметријски тестови. Тестирање значајности статистичке разлике између група вршено је Т-тестом за два независна узорка, односно *Mann Whitney* тестом. За тестирање разлике између два мерења коришћен је Упарени т-тест, односно *Willcoxon*-ов тест. За упоређивање аритметичке средине неког обележја

више од две порулације коришћен је *ANOVA* или *Kruskal Wallis* тест. За тестирање зависности два обележја користишћен је χ^2 -тест. За анализу међусобне корелације параметара коришћене су методе линеарне регресије и корелације. За мерење јачине линеарне везе између обележја коришћен је *Pearson*-ов или *Spearman*-ов коефицијент корелације.

IV

РЕЗУЛТАТИ

4.1. ТЕЛЕСНЕ, КЛИНИЧКЕ И ЛАБОРАТОРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом су приказане у Табели 3.

Просечан број година старости је био веома сличан између експерименталних група: испитаници који су узимали омега-3 масне киселине - (54 ± 8) и испитаници који су узимали омега-3 масне киселине и уље ноћурка - ($57,3 \pm 8$) и контролне групе, која је била само на редовној медикаментозној реуматолошкој терапији ($59 \pm 7,5$).

Табела 3 показује да није било статистички значајне разлике у телесној висини, телесној тежини и ВМІ испитаника између експерименталних група и контролне групе.

Није било статистички значајне разлике у вредностима реуматоидног фактора, дужине болести и недељне дозе метотрексата између експерименталних група и контролне групе.

Једина разлика између ове три групе, постојала је за вредност анти ЦЦП антитела (антитела на цикличне цитрулинисане пептиде). И то статистички значајна разлика постојала је само између прве (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине) и треће (контролне) групе (График 1).

Табела 3. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом по групама

Карактеристике пацијента	I група n=20	II група n=20	III група n=20	p вредност
Године старости	54±8	57,3±8	59±7,5	NS
Телесна висина [cm]	163,25±6,43	164,55±7,29	166,25±9,72	NS
Телесна тежина [kg]	70,63±11,73	71,78±12,97	70,93±13,12	NS
BMI [kg/m ²]	26,48±4,15	26,52±4,37	24,65±6,29	NS
Реуматоидни фактор	133,82±80,32	113,46±94,21	173,77±188,2	NS
Анти ЦЦП антитело	186,55±123,61	263,04±160,96	348,65±239,31	p=0,042
Дужина болести	6,6±4	8,1±2,75	7,25±2,6	NS
Метотрексат, недељна доза [mg]	12±3	13,5±3,8	13,37±2,6	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; BMI: индекс телесне масе; NS: није статистички значајно.

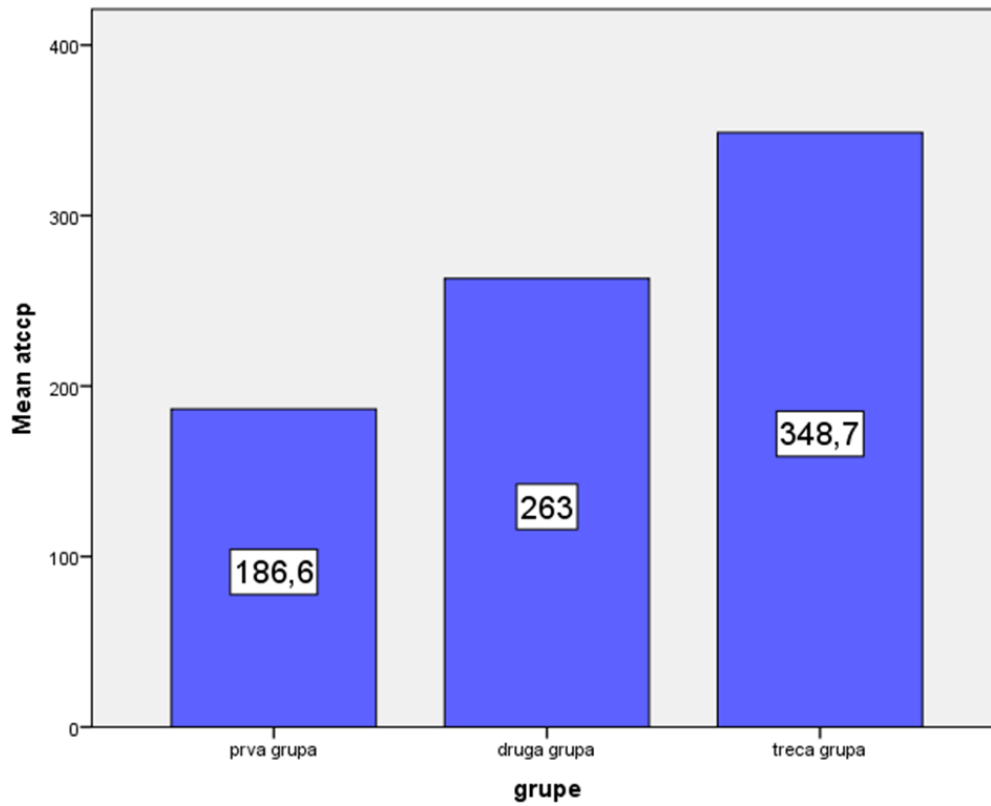


График 1. Разлике у висини средњих вредности анти ЦЦП антитела између експерименталних група и контролне групе

4.2. КЛИНИЧКЕ И ЛАБОРАТОРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

4.2.1. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре суплементације

Табела 4 приказују разлике између група у клиничким и лабораторијским карактеристикама пацијената са реуматоидним артритисом пре суплементације

Према добијеним резултатима, праћени параметри пацијената са реуматоидним артритисом пре суплементације се нису много разликовали. Тачније, није било статистички значајне разлике у вредностима CRP и ESR, као ни у броју осетљивих зглобова између експерименталних група и контролне групе.

Такође, није било статистички значајне разлике у скоровима VAS, DAS 28 и HAQ између експерименталних група и контролне групе.

Једина разлика између ове три групе, постојала је за број отечених зглобова, при чему је статистички значајна разлика постојала између прве и друге и прве и треће групе (График 2).

Табела 4. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре суплементације по групама

Карактеристике пацијента	I група n=20	II група n=20	III група n=20	p вредност
CRP [mg/l]	12,4±8,2	16,0±18,3	12,7±7,2	NS
Број осетљивих зглобова	6,25±2	5,45±1,9	5,0±2	NS
Број отечених зглобова	2,85±1	1,5±1,6	1,0±1,3	p<0,05
VAS (бол)	55,7±10,1	58,95±9,1	61,5±8,9	NS
ESR [mm/h]	35±24	36,7±19,2	33,25±17,14	NS
DAS 28	4,99±0,88	4,76±0,85	4,66±0,80	NS
HAQ	1,4±0,38	1,36±0,19	1,36±0,23	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; ESR: брзина седиментације еритроцита; CRP: Ц-реактивни протеин; VAS: визуелна аналогна скала; DAS 28 (*Disease Activity Score*): скор активности болести 28; HAQ (*Health Assessment Questionnaire*): упитник процене здравственог стања.

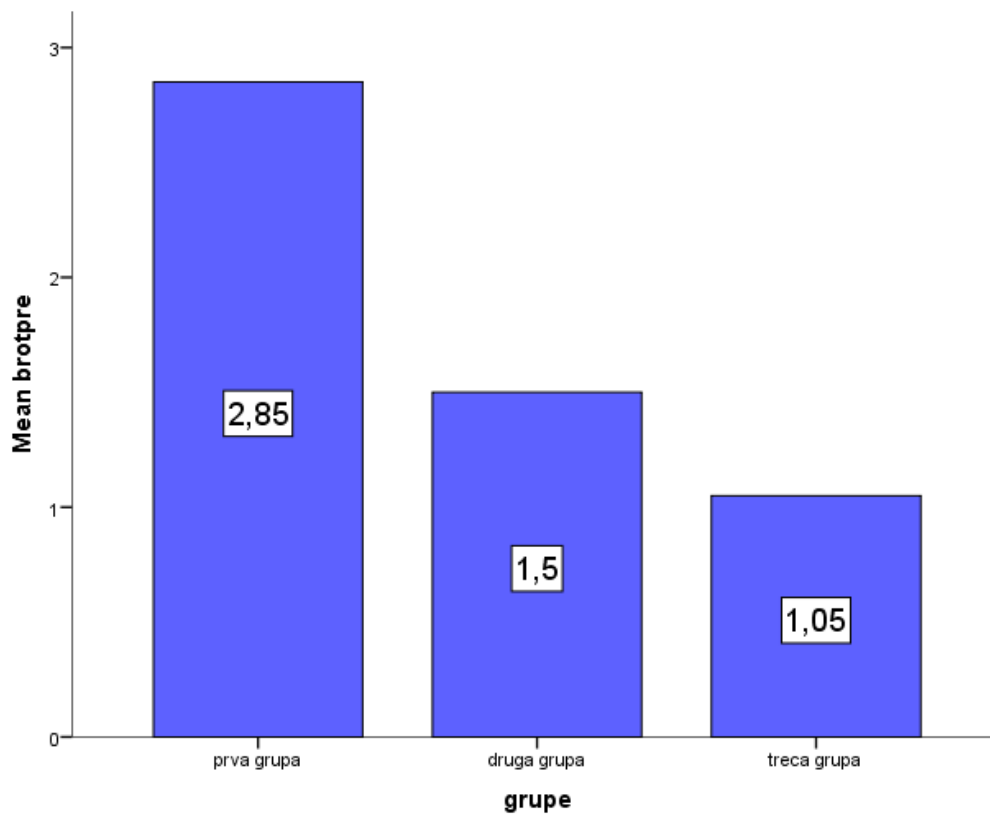


График 2. Разлике у висини средњих вредности броја отечених зглобова између експерименталних група и контролне групе пре суплементације

4.2.2. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом после суплементације

Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом после суплементације су приказане у Табели 5.

Вредности CRP и ESR су биле ниже у све три групе испитаника, али без статистичке значајности.

DAS 28 и HAQ скорови су били нижи у експерименталним група после суплементације, али без статистичке значајности.

Док је VAS скор статистички значајно пао након тро-месечне суплементације. График 3 приказује статистички значајне разлике у висини VAS скорa између прве и треће и друге (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине и уље ноћурка) и треће групе после суплементације.

Број отечених зглобова се смањио у све три групе испитаника, али без статистичке значајности, међутим број осетљивих зглобова се статистички значајно смањио, када поредимо прву (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине) и трећу групу (контролна група).

Табела 5. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом после 3 месеца суплементације по групама

Карактеристике пацијента	I група n=20	II група n=20	III група n=20	p вредност
CRP [mg/l]	7,34±2,96	7,15±5,57	6,98±3,50	NS
Број осетљивих зглобова	3,35±1,53	4,0±1,4	4,6±1,6	p=0,013
Број отечених зглобова	0,80±1,28	0,35±0,8	0,4±0,2	NS
VAS (бол)	46,75±7,06 ^a	50,50±6,98 ^b	59,3±6,92 ^{a b}	p<0,01
ESR [mm/h]	23,25±16,59	19,95±10,77	24,15±13,86	NS
DAS 28	3,91±0,80	3,786±0,72	4,23±0,66	NS
HAQ	1,26±0,24	1,28±0,19	1,39±0,24	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; ESR: брзина седиментације еритроцита; CRP: Ц-реактивни протеин; VAS: визуелна аналогна скала; DAS 28 скор активности болести 28; HAQ: упитник процене здравственог стања.

a p<0,01, b p<0,01

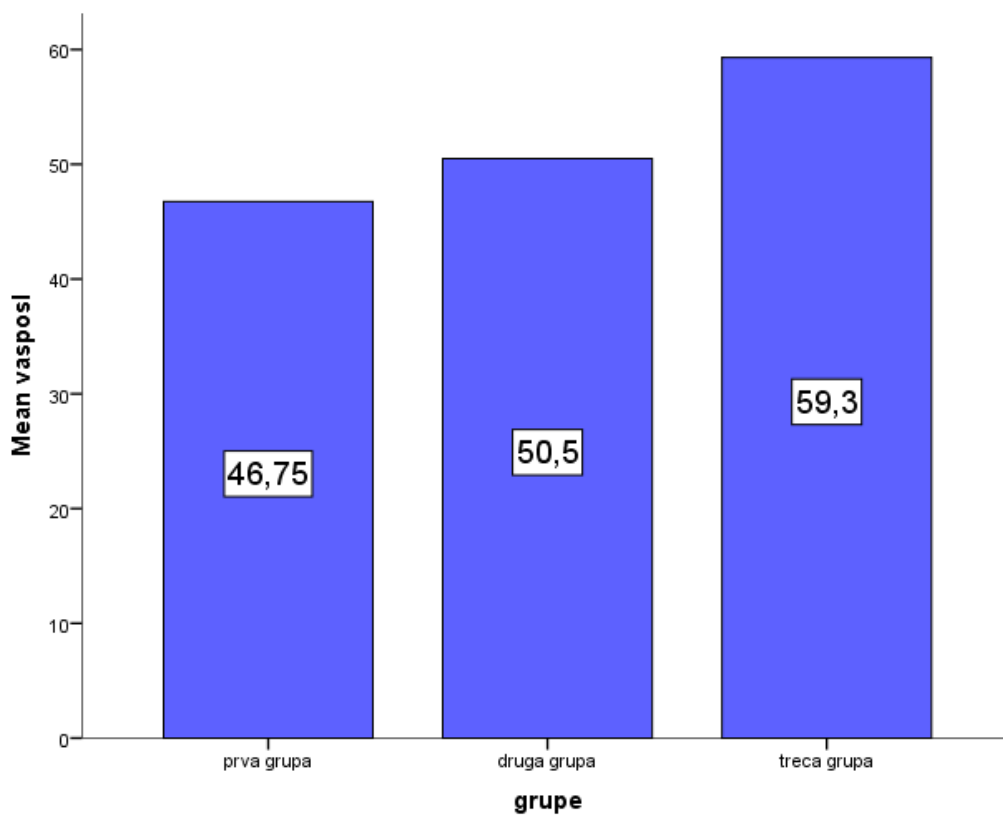


График 3. Разлике у висини VAS скорa између експерименталних група и контролне групе после суплементације

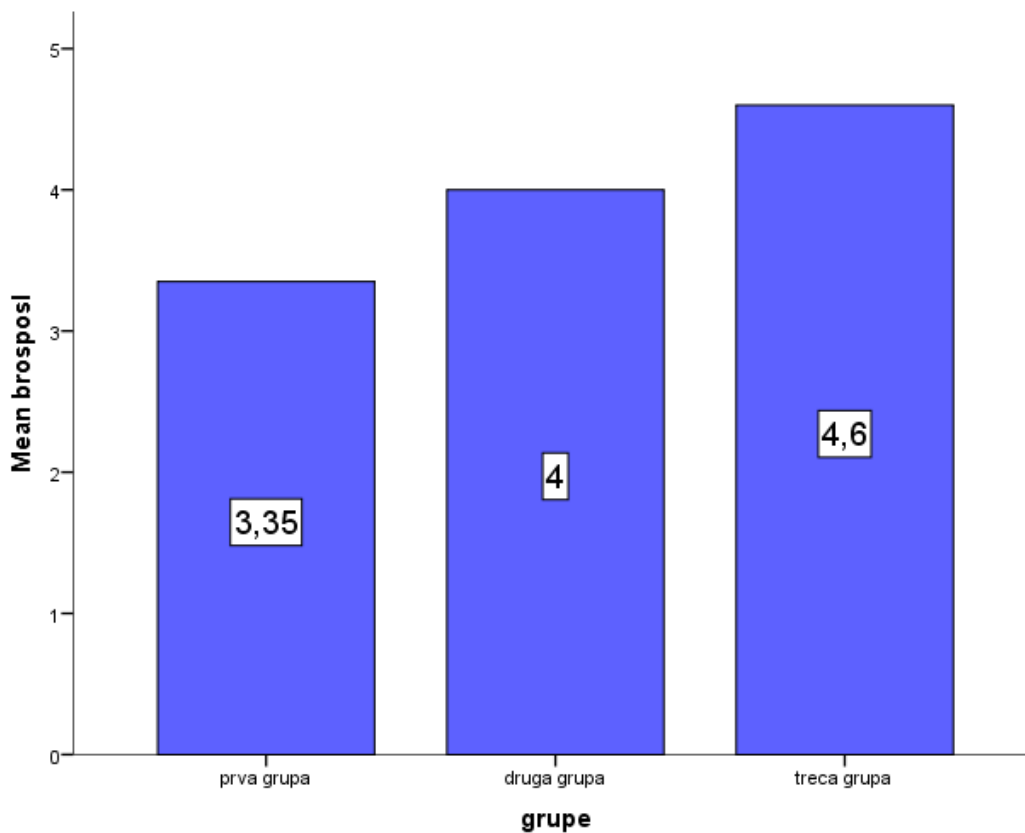


График 4. Разлике у висини средњих вредности броја осетљивих зглобова између експерименталних група и контролне групе после суплементације

4.2.3. Поређење клиничких и лабораторијских карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом у оквиру сваке групе после периода суплементације

Вредности CRP и ESR су биле статистички значајно ниже у све три групе испитаника после периода суплементације (Табеле 6, 7 и 8).

DAS 28 скор је био статистички значајно нижи у све три групе испитаника после суплементације (Табеле 6, 7 и 8).

Такође, вредности VAS и HAQ скорова статистички значајно су пале након тромесечне суплементације у обе експерименталне групе (Табеле 6 и 7).

Број отечених зглобова се статистички значајно смањено у све три групе испитаника, док се број осетљивих зглобова се статистички значајно смањено у првој (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине) и другој групи (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине и уље ноћурка) (Табеле 6, 7 и 8).

Табела 6. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после obroка

Прва група n=20			
Карактеристике пацијента	Пре суплементације	После суплементације	p вредност
CRP [mg/l]	12,4±8,2	7,34±2,96	p=0,001
Број осетљивих зглобова	6,25±2	3,35±1,53	p<0,001
Број отечених зглобова	2,85±1	0,80±1,28	p<0,001
VAS (бол)	55,7±10,1	46,75±7,06	p<0,001
ESR [mm/h]	35±24	23,25±16,59	p<0,001
DAS 28	4,99±0,88	3,91±0,80	p<0,001
HAQ	1,4±0,38	1,26±0,24	p=0,001

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; ESR: брзина седиментације еритроцита; CRP: Ц-реактивни протеин; VAS: визуелна аналогна скала; DAS 28 скор активности болести 28; HAQ: упитник процене здравственог стања.

Табела 7. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *Evening Primrose Oil* дневно после оброка.

Друга група n=20			
Карактеристике пацијента	Пре суплементације	После суплементације	p вредност
CRP [mg/l]	16,0±18,3	7,15±5,57	p=0,003
Број осетљивих зглобова	5,45±1,9	4,0±1,4	p=0,002
Број отечених зглобова	1,5±1,6	0,35±0,8	p=0,001
VAS (бол)	58,95±9,1	50,50±6,98	p<0,001
ESR [mm/h]	36,7±19,2	19,95±10,77	p<0,001
DAS 28	4,76±0,85	3,786±0,72	p=0,003
HAQ	1,36±0,19	1,28±0,19	p=0,007

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; ESR: брзина седиментације еритроцита; CRP: Ц-реактивни протеин; VAS: визуелна аналогна скала; DAS 28 скор активности болести 28; HAQ: упитник процене здравственог стања.

Табела 8. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом на редовној реуматолошкој терапији

Трећа група n=20			
Карактеристике пацијента	Пре суплементације	После суплементације	p вредност
CRP [mg/l]	12,7±7,2	6,98±3,50	p<0,001
Број осетљивих зглобова	5,0±2	4,6±1,6	NS
Број отечених зглобова	1,0±1,3	0,4±0,2	p=0,004
VAS (бол)	61,5±8,9	59,3±6,92	NS
ESR [mm/h]	33,25±17,14	24,15±13,86	p=0,004
DAS 28	4,66±0,80	4,23±0,66	p=0,013
HAQ	1,36±0,23	1,39±0,24	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; ESR: брзина седиментације еритроцита; CRP: Ц-реактивни протеин; VAS: визуелна аналогна скала; DAS 28 скор активности болести 28; HAQ: упитник процене здравственог стања.

4.3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ЛАБОРАТОРИЈСКИХ И ПАРАМЕТАРА ХЕМОСТАЗЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

4.3.1. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостаза пацијената са реуматоидним артритисом пре периода суплементације

Карактеристике лабораторијских и параметара хемостаза пацијената са реуматоидним артритисом по групама пре суплементације су приказане у Табели 9.

Већина лабораторијских параметри као што су еритроцити, леукоцити, холестерол, триглицериди, HDL и глукоза, нису показали статистички значајну разлику између

експерименталних група и контролне групе пре суплементације.

Једино су се вредности LDL статистички значајно разликовале између прве у треће групе пре периода суплементације (График 5).

Одређивани параметри хемостазе, фибриноген и тромбоцити, нису показали статистички значајну разлику у вредностима између експерименталних група и контролне групе пре суплементације.

Табела 9. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом по групама пре суплементације

Параметри	I група n=20	II група n=20	III група n=20	p вредност
RBC [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	4,5 \pm 0,54	4,44 \pm 0,54	4,38 \pm 0,40	NS
WBC [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	7,6 \pm 2,4	7,6 \pm 1,7	7,49 \pm 1,97	NS
PTL [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	173 \pm 52	186 \pm 52	219 \pm 53	NS
Фибриноген [g/L]	5,38 \pm 1,97	4,74 \pm 0,91	4,52 \pm 0,56	NS
Холестерол [mmol/L]	4,89 \pm 0,33	4,77 \pm 0,43	4,95 \pm 0,14	NS
Триглицериди [mmol/L]	1,29 \pm 0,22	1,20 \pm 0,14	1,18 \pm 0,92	NS
LDL [mmol/L]	3,29 \pm 0,44	3,34 \pm 0,44	3,61 \pm 0,18	p<0,05
HDL [mmol/L]	1,11 \pm 0,28	0,98 \pm 0,20	0,99 \pm 0,14	NS
Глукоза [mmol/L]	4,42 \pm 0,27	4,39 \pm 0,32	4,37 \pm 0,28	NS

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD; NS: није статистички значајно; RBC (енгл. *red blood cells*): еритроцити; WBC (енгл. *white blood cells*): леукоцити; PTL (енгл. *platelets*): тромбоцити ; HDL (енгл. *high-density lipoprotein*): липопротеин високе густине; LDL (енгл. *low-density lipoprotein*): липопротеин ниске густине.

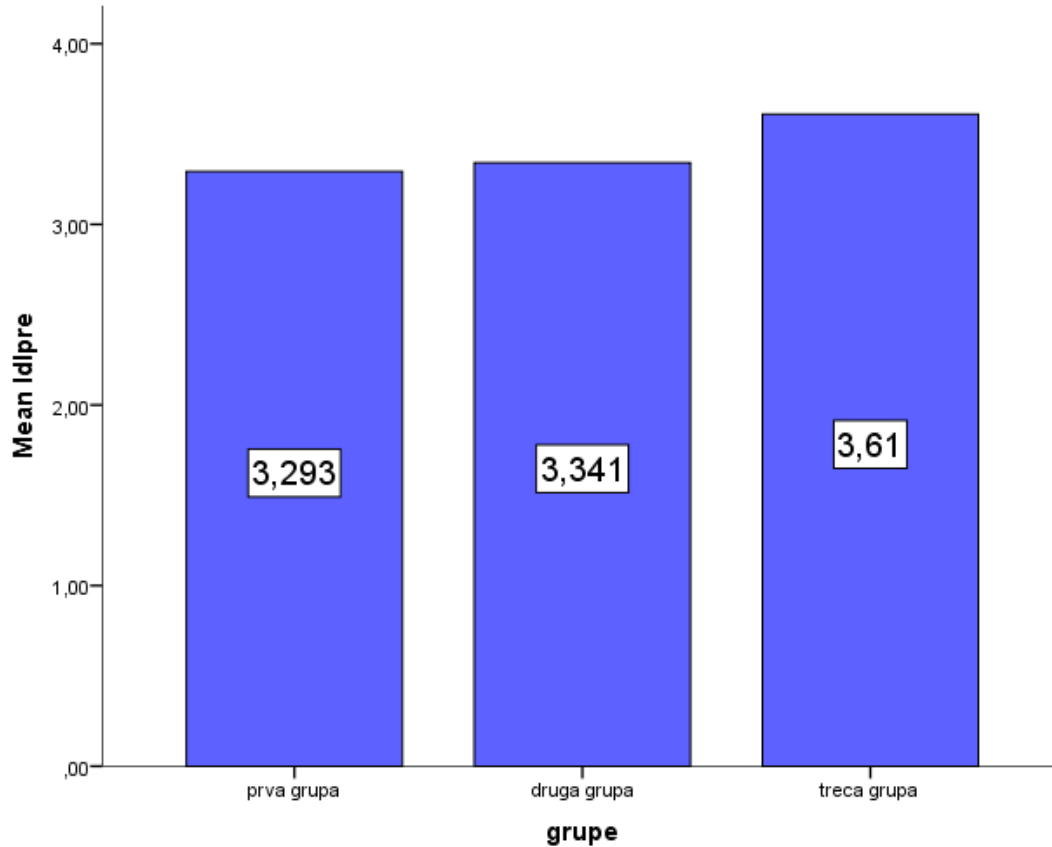


График 5. Разлике у висини средњих вредности LDL између експерименталних група и контролне групе пре суплементације

4.3.2. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације

Након три месеца суплементације концентрованим рибљим уљем, односно комбинацијом концентрованог рибљег уља и уља ноћурка, вредности глукозе, холестерола, триглицерида и фибрина се нису статистички значајно разликовале између група.

Вредности HDL су се статистички значајно разликовале између прве и друге и прве у треће групе, након периода суплементације (График 6).

Такође вредности LDL су се статистички значајно разликовале после суплементације између прве у треће и друге и треће групе (График 7).

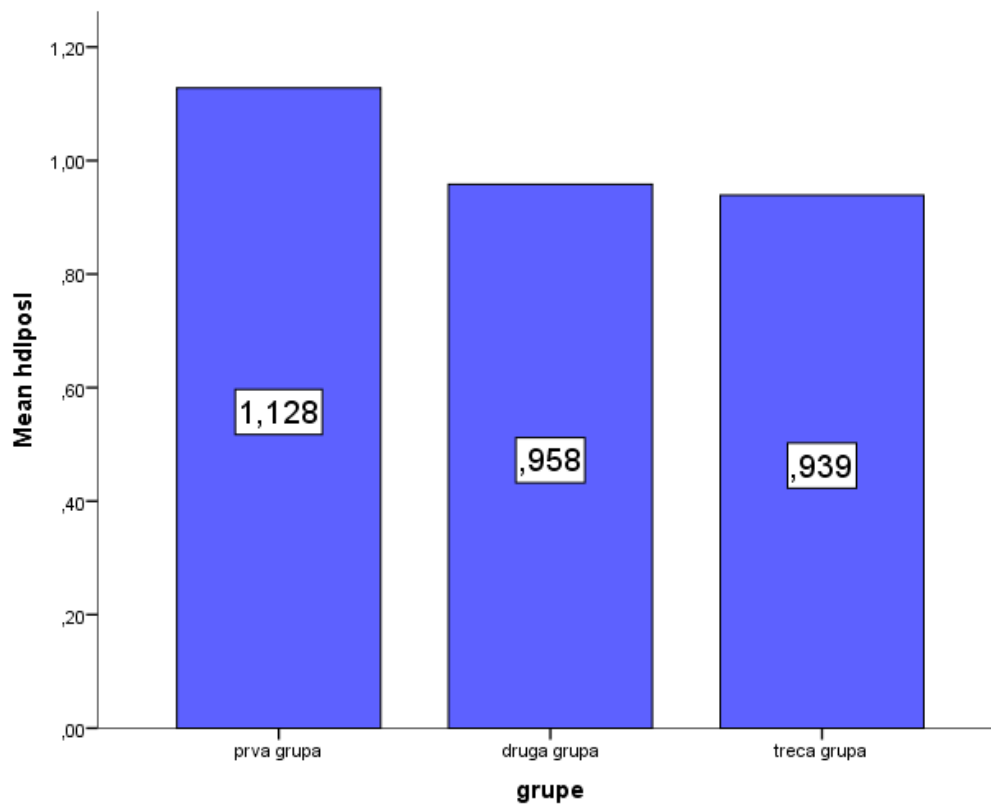


График 6. Разлике у висини средњих вредности HDL између експерименталних група и контролне групе после суплементације

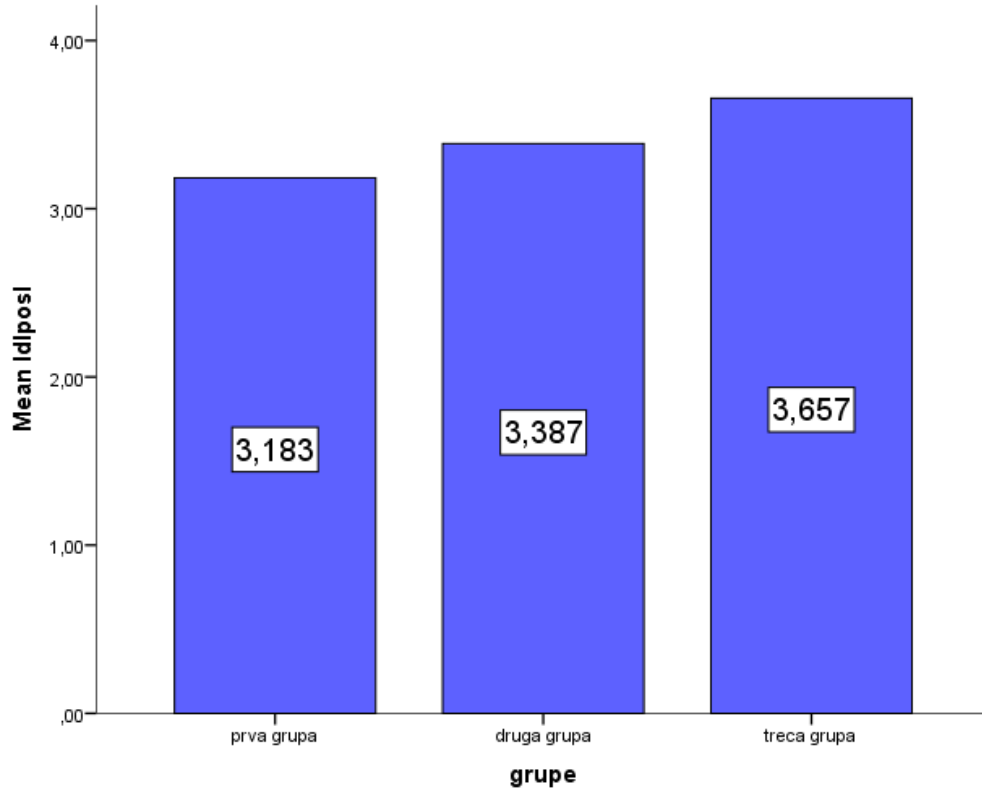


График 7. Разлике у висини средњих вредности LDL између експерименталних група и контролне групе после суплементације

4.3.3. Поређење карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом у оквиру сваке групе после периода суплементације

Нако три месеца суплементације претходно поменутих суплементима у оквиру сваке групе је дошло до статистички значајног снижења вредности фибрина (Табеле 10, 11 и 12).

Вредности глукозе су статистички значајно биле ниже после периода суплементације у оквиру прве групе, тј. групе која је користила концентровано риблије уље (Табела 10).

Вредности HDL су статистички значајно биле ниже у трећој групи, након 3 месеца суплементације (Табела 12).

Као и вредности LDL, које су статистички значајно биле ниже у трећој групи, док

су у првој групи вредности LDL биле статистички значајно више, након 3 месеца суплементације (Табеле 10 и 12).

Док се вредности триглицерида и холестерола нису статистички значајно разликовале у оквиру група након периода суплементације (Табеле 10, 11 и 12).

Табела 10. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после оброка

Прва група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	p вредност
Фибриноген [g/L]	5,38±1,97	4,59±1,02	p=0,002
Холестерол [mmol/L]	4,89±0,33	4,80±0,31	NS
Триглицериди [mmol/L]	1,29±0,22	1,25±0,22	NS
LDL [mmol/L]	3,29±0,44	3,18±0,40	p=0,013
HDL [mmol/L]	1,11±0,28	1,13±0,26	NS
Глукоза [mmol/L]	4,42±0,27	4,30±0,26	p=0,001

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; HDL (енгл. *high-density lipoprotein*): липопротеин високе густине; LDL (енгл. *low-density lipoprotein*): липопротеин ниске густине.

Табела 11. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *Evening Primrose Oil* дневно после оброка.

Друга група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	р вредност
Фибриноген [g/L]	4,74±0,91	4,19±0,43	p=0,004
Холестерол [mmol/L]	4,77±0,43	4,77±0,39	NS
Триглицериди [mmol/L]	1,20±0,14	1,54±1,70	NS
LDL [mmol/L]	3,34±0,44	3,39±0,32	NS
HDL [mmol/L]	0,98±0,20	0,96±0,14	NS
Глукоза [mmol/L]	4,39±0,32	4,37±0,26	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; HDL (енгл. *high-density lipoprotein*): липопротеин високе густине; LDL (енгл. *low-density lipoprotein*): липопротеин ниске густине.

Табела 12. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом на редовној реуматолошкој терапији

Трећа група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	р вредност
Фибриноген [g/L]	4,52±0,56	4,42±0,29	NS
Холестерол [mmol/L]	4,95±0,14	4,96±0,25	NS
Триглицериди [mmol/L]	1,18±0,92	1,19±0,09	NS
LDL [mmol/L]	3,61±0,18	3,65±0,18	p=0,008
HDL [mmol/L]	0,99±0,14	0,94±0,11	p=0,006
Глукоза [mmol/L]	4,37±0,28	4,37±0,21	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; HDL (енгл. *high-density lipoprotein*): липопротеин високе густине; LDL (енгл. *low-density lipoprotein*): липопротеин ниске густине.

4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ СТЕПЕНА АГРЕГАЦИЈЕ ТРОМБОЦИТА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

4.4.1. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом пре периода суплементације

Вредности примењених тестова за одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом пре периода суплементације по групама су приказане у Табели 13.

Ни једна вредност коришћених тестова за одређивање степена агрегације тромбоцита, као што су ADP, ASPI, TRAP, ADP/TRAP, ASPI/TRAP се није није статистички значајно разликовала између експерименталних група и контролне групе, пре суплементације.

Табела 13. Разлике у вредностима тестова за одређивање агрегабилности тромбоцита између група пре суплементације

ТЕСТ	I група n=20	II група n=20	III група n=20	p вредност
ADP X ± SD Медијана	600,00±285,0 520,00	671,90±255,20 698,50	676,20±193,18 708,00	NS
ASPI X ± SD Медијана	641,70±311,59 641,00	667,65±339,76 801,00	820,40±278,42 828,00	NS
TRAP X ± SD Медијана	838,15±314,56 860,50	960,60±199,73 1007,50	864,70±196,82 874,00	NS
ADP/TRAP X ± SD Медијана Процент редуције	0,99±0,34 0,77 99	0,70±0,19 0,79 70	0,78±0,15 0,75 78	NS
ASPI/TRAP X ± SD Медијана Процент редуције	0,89±0,31 0,95 89	0,70±0,35 0,85 70	0,93±0,22 0,96 93	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно.

4.4.2. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са

реуматоидним артритисом после периода суплементације

Вредности примењених тестова за одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације по групама су приказане у Табели 14.

Вредности ADP и ASPI тестова су биле ниже у све три групе испитаника после суплементације, али без статистичке значајности.

Вредности TRAP теста су биле ниже у све другој и трећој групе испитаника после суплементације, али без статистичке значајности.

Вредности ADP/TRAP теста су биле статистички значајно ниже у првој и трећој групи испитаника после периода суплементације.

Док су вредности ASPI/TRAP теста су биле ниже у првој групи испитаника после суплементације, али без статистичке значајности.

Табела 14. Разлике у вредностима тестова за одређивање агрегабилности тромбоцита између група после суплементације

ТЕСТ	I група n=20	II група n=20	III група n=20	p вредност
ADP X ± SD Медијана	560,55±251,32 489,50	651,50±204,35 704,50	667,50±189,49 738,00	NS
ASPI X ± SD Медијана	609,80±332,24 611,00	662,40±314,08 728,00	783,95±309,47 835,00	NS
TRAP X ± SD Медијана	836,20±242,17 818,00	893,00±253,05 893,00	804,25±209,83 827,50	NS
ADP/TRAP X ± SD Медијана Процент редукције	0,68±0,20 ^a 0,65 68	0,79±0,14 0,78 79	0,83±0,12 ^a 0,89 83	p=0,08
ASPI/TRAP X ± SD Медијана Процент редукције	0,76±0,39 0,91 76	0,80±0,30 0,87 80	0,96±0,23 0,95 96	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно;

^ap < 0,05.

4.4.3. Поређење степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације у оквру сваке групе

Када се посматрају промене вредности тестова у оквру сваке групе након периода суплементације у оквиру друге групе, дошло је до статистички значајног снижења вредности TRAP теста и повишења вредности ASPI/TRAP тестова.

Док су вредности ADP/TRAP теста статистички значајно биле више у првој групи након периода суплементације.

4.5. ПОРЕЂЕЊЕ НИВОА ПАРАМЕТАРА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ У ОКВРУ СВАКЕ ГРУПЕ

У првој групи, после 3 месеца примене концентрованог рибљег уља, нивои TBARS и NO_2^- у плазми су се статистички значајно повећали. Такође је дошло до статистички значајног повећања нивоа GSH у еритроцитима и статистички значајног смањења H_2O_2 нивоа у плазми (Табле 15).

Исти ефекти статистички значајног пораста нивоа TBARS и NO_2^- у плазми су постигнути и у другој групи, која је користила концентровано рибље уље у комбинацији са уљем ноћурка у периоду од 3 месеца. Поред тога, забележена је статистички значајно повећана активност SOD (Табела 16).

Смањење нивоа H_2O_2 у плазми и повећан ниво GSH у еритроцита су такође примећени али без статистичке значајности (због великих стандардне девијације).

У трећој групи, која није узимала суплементе, није било статистички значајне промене за серумске маркере оксидативног стрес (TBARS, NO_2^- , H_2O_2 , O_2^-) и антиоксидансе (CAT, SOD, GSH) (Табела 17).

Активност каталазе и ослобађање O_2^- нису показали статистички значајне промене између три групе (Табеле 15, 16 и 17).

Табела 15. Нивои прооксиданата и антиоксиданата код пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после оброка

Група I			
Параметри	Пре суплементације	После 3 месеца	p вредност
TBARS [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$2,15 \pm 0,97$	$2,84 \pm 0,28$	$p < 0,05$
NO_2^- [$\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$2,92 \pm 0,42$	$3,78 \pm 0,42$	$p < 0,001$
H_2O_2 [$\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$2,55 \pm 0,71$	$1,90 \pm 0,18$	$p < 0,001$
O_2^- [$\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$1,29 \pm 0,87$	$1,14 \pm 0,69$	NS
CAT [$\text{U}/\text{g Hb} \times 10^3$]	$0,01 \pm 0,01$	$0,00 \pm 0,00$	NS
SOD [$\text{U}/\text{g Hb} \times 10^3$]	$16,82 \pm 4,83$	$17,37 \pm 7,45$	NS
GSH [nmol of RBC's]	$128263,80 \pm 44627,04$	$195062,58 \pm 52780,36$	$p < 0,001$

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD; NS: није статистички значајно; TBARS (енгл. *thiobarbituric acidreactive substances*): индекс липидне пероксидације, H_2O_2 – водоник пероксид; O_2^- - супероксид ањон радикал; NO – азот монооксид; SOD – супероксид дисмутаза; CAT – каталаза и GSH - глутатион.

Табела 16. Нивои прооксиданата и антиоксиданата код пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *Evening Primrose Oil* дневно после оброка

Група II			
Параметри	Пре суплементације	После 3 месеца	p вредност
TBARS [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$2,03 \pm 0,44$	$2,82 \pm 0,23$	$p < 0,001$
NO_2^- [$\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$2,87 \pm 0,56$	$3,96 \pm 0,49$	$p < 0,001$
H_2O_2 [$\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$2,15 \pm 0,49$	$1,86 \pm 0,28$	NS
O_2^- [$\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$]	$1,01 \pm 0,52$	$1,78 \pm 2,17$	NS
CAT [$\text{U}/\text{g Hb} \times 10^3$]	$0,01 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	NS
SOD [$\text{U}/\text{g Hb} \times 10^3$]	$14,92 \pm 7,52$	$26,34 \pm 14,25$	$p < 0,05$
GSH [nmol of RBC's]	$159479,21 \pm 36999,78$	$198874,05 \pm 54448,32$	NS

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD; NS: није статистички значајно; TBARS (енгл. *thiobarbituric acidreactive substances*): индекс липидне пероксидације, H₂O₂ – водоник пероксид; O₂⁻ - супероксид ањон радикал; NO – азот монооксид; SOD – супероксид дисмутаза; CAT – каталаза и GSH - глутатион.

Табела 17. Нивои прооксиданата и антиоксиданата код пацијента са реуматоидним артритисом на редовној реуматолошкој терапији

Група III			
Параметри	Пре суплементације	После 3 месеца	р вредност
TBARS [μ mol/min/g wt]	2,45 \pm 0,55	2,48 \pm 0,21	NS
NO ₂ ⁻ [nmol/min/g wt]	3,41 \pm 0,36	3,81 \pm 0,14	NS
H ₂ O ₂ [nmol/min/g wt]	1,91 \pm 0,32	2,06 \pm 0,40	NS
O ₂ ⁻ [nmol/min/g wt]	0,99 \pm 0,52	1,29 \pm 1,03	NS
CAT [U/g Hb x 10 ³]	0,00 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	NS
SOD [U/g Hb x 10 ³]	11,01 \pm 7,01	14,60 \pm 8,27	NS
GSH [nmol of RBC's]	168661,13 \pm 61268,59	168146,63 \pm 68706,08	NS

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD; NS: није статистички значајно; TBARS (енгл. *thiobarbituric acidreactive substances*): индекс липидне пероксидације, H₂O₂ – водоник пероксид; O₂⁻ - супероксид ањон радикал; NO – азот монооксид; SOD – супероксид дисмутаза; CAT – каталаза и GSH - глутатион.

4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИГЕНА ЗА ФОН ВИЛЕБРАНДОВ ФАКТОР (vWfAg), АКТИВНОСТИ ФОН ВИЛЕБРАНДОВ-ОГ ФАКТОРА (vWFAct) И ХОМОЦИСТЕИНА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

Плазматски фон Вилебрандов фактор (vWf) је водећи плазматски маркер ендотелне дисфункције, његовог генерализованог оштећења и степена активности атеросклеротског процес (220-222).

Анализом вредности vWfAg, код све три групе испитаника како пре и тако и после периода суплементације, није уочена статистички значајна разлика у вредностима овог параметра. Такође није уочена статистички значајна разлика у вредностима овог параметра ни у оквиру самих група након периода суплементације.

Није уочена статистички значајна разлика у вредностима vWFAct ни пре ни после тро-месечне суплементације између група. Али је дошло до статистички значајног повишења вредности vWFAct у оквиру друге групе након периода суплементације.

Вредности хомоцистеина се нису статистички значајно разлике између група пре периода суплементације. Након узимања суплемената дошло је до статистички значајно разлике у вредностима хомоцистеина између прве и треће групе (График 8). Док унутар група није било промена након суплементације.

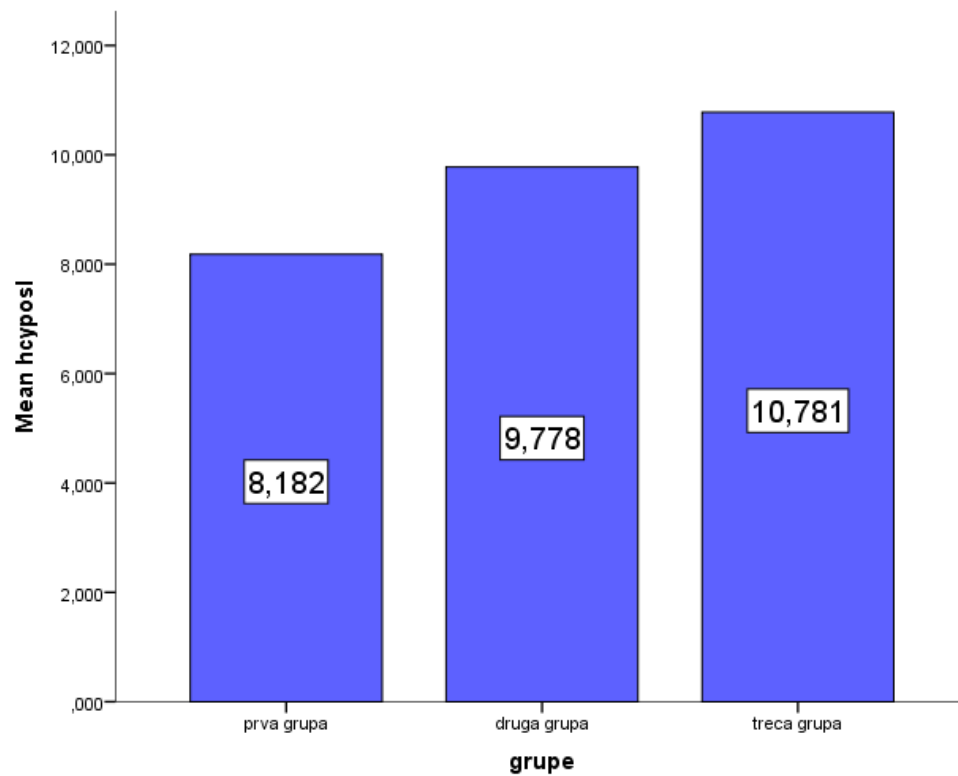


График 7. Разлике у висини средњих вредности хомоцистеина између прве експерименталне групе и контролне групе после суплементације

4.7. КЛИНИЧКО - АНТРОПОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

Антропометријске карактеристике пацијената као што су BMI, обим струка, проценат воде, проценат мишићне масе, сагитални абдоминални дијаметар, однос обима струка и телесне висине, однос сагиталног абдоминалног дијаметра и телесне висине се нису статистички значајно разликовале између група ни пре, а ни после узимања суплемената.

Међутим дошло је до промена у вредностима поменутих параметара у оквиру самих група. Вредности обима струка, сагиталног абдоминалног дијаметра и односа обима струка и телесне висине су статистички значајно пале у обе експерименталне групе, након суплементације (Табеле 18 и 19).

А у првој групи је дошло и до статистички значајног снижења вредности односа сагиталног абдоминалног дијаметра и телесне висине и повећања процента воде у организму (Табела 18).

Табела 18. Телесне карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после оброка

Прва група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	p вредност
BMI [kg/m ²]	26,47 ± 4,15	26,49 ± 4,63	NS
OS [cm]	92,10 ± 14,10	88,19 ± 14,05	p=0,01
SAD [cm]	12,73 ± 3,47	11,77 ± 3,35	p=0,007
FAT	35,76 ± 7,24	35,67 ± 7,68	NS
OS/TV	0,56 ± 0,09	0,54 ± 0,09	p=0,013
SAD/TV	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02	p=0,002
VODA	32,71 ± 3,10	32,72 ± 3,58	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно;

BMI: индекс телесне масе изражен у kg/m^2 ; **OS**: обим струка изражен у сантиметрима; **SAD**: сагитални абдоминални дијаметар; **FAT**: проценат масти у организму; **OS/TV**: ; **SAD/TV**: ; **VODA**: садржај воде у организму

Табела 19. Телесне карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *Evening Primrose Oil* дневно после оброка

Друга група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	р вредност
BMI [kg/m^2]	26,52 ± 4,37	25,78 ± 4,75	NS
OS [cm]	93,10 ± 17,62	86,15 ± 13,88	p=0,004
SAD [cm]	13,06 ± 3,47	11,48 ± 2,91	p=0,006
FAT	36,39 ± 7,44	35,96 ± 7,84	NS
OS/TV	0,57 ± 0,10	0,52 ± 0,80	p=0,006
SAD/TV	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	NS
VODA	32,95 ± 4,13	32,35 ± 4,55	p=0,020

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно;

BMI: индекс телесне масе изражен у kg/m^2 ; **OS**: обим струка изражен у сантиметрима; **SAD**: сагитални абдоминални дијаметар; **FAT**: проценат масти у организму; **OS/TV**: ; **SAD/TV**: ; **VODA**: садржај воде у организму

4.8. ОДРЕЂИВАЊЕ ВРЕДНОСТИ ЦИТОКИНА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

Ради процена степена инфламаторног одговора одређиване су вредности следећих цитокина: IFN, IL-1 β , IL-17, IL-27, IL-6, TNF.

Пре суплементације вредности IL-1 β су се статистички значајно разликовале између друге и треће групе (График 8).

Статистички значајна разлика уочена је у вредностима IL-27 између прве и друге групе, пре суплементације (График 9).

Док се вредности осталих одређиваних цитокина нису статистички значајно разликовале између експерименталних група и контролне групе, пре суплементације.

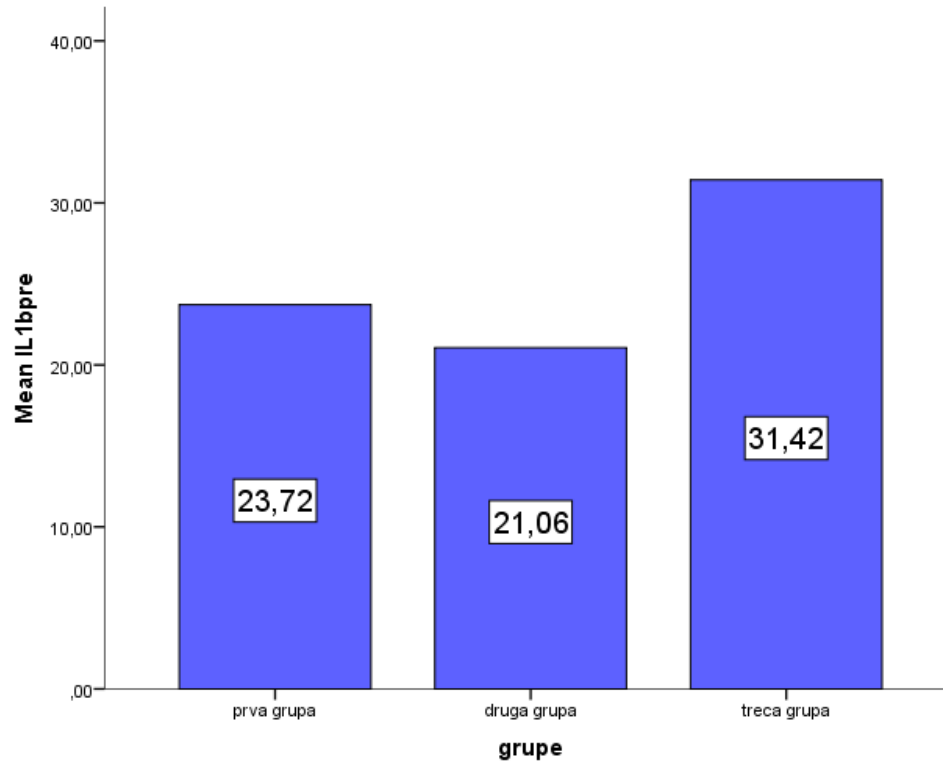


График 8. Разлике у висини средњих вредности IL-1 β између друге експерименталне групе и контролне групе пре суплементације

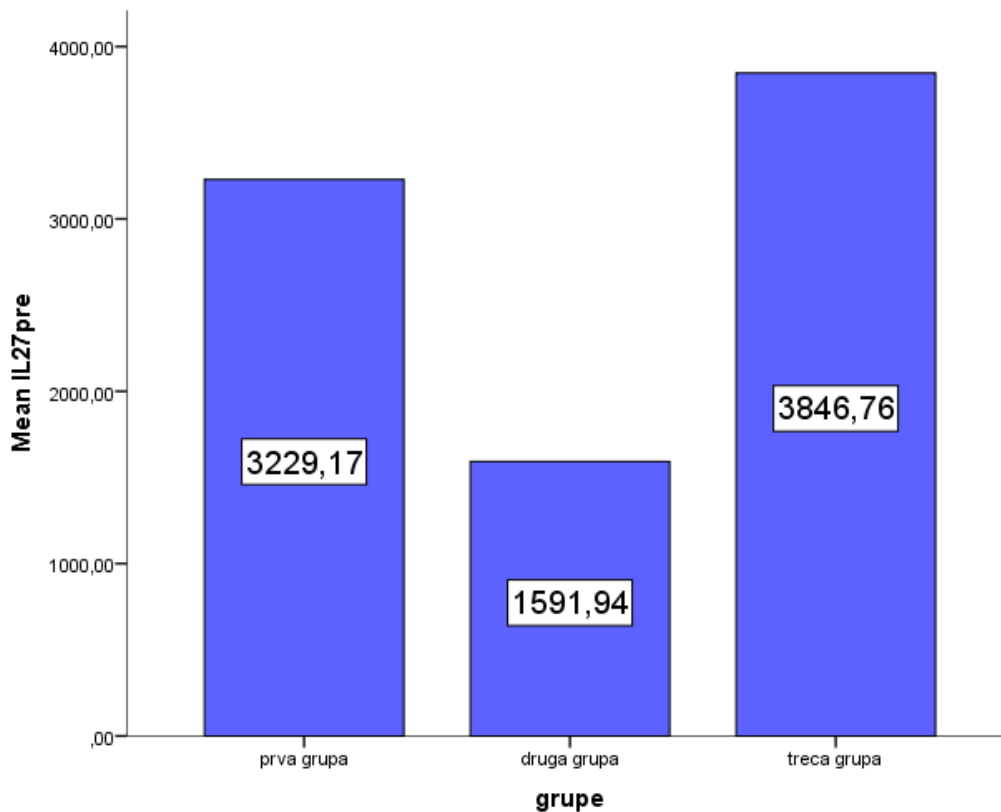


График 9. Разлике у висини средњих вредности IL-1 β између прве експерименталне групе и друге експерименталне групе пре суплементације

Анализом вредности горе наведених цитокина после периода суплементације, код све три групе испитаника, није уочена статистички значајна разлика у њиховим вредностима између група.

Међутим, у оквиру експерименталних група након три месеца суплементације дошло је до повишења вредности цитокина. Тачније вредности IFN су статистички значајно порасле у првој и другој експерименталној групи (Табела 20 и 21).

Такође у првој и другој експерименталној групи је дошло и до статистички значајног пораста вредности IL-1 β и IL-17 (Табела 20 и 21).

Док су вредности IL-27, IL-6 и TNF статистички значајно биле више после периода суплементације у другој експерименталној групи (Табела 21).

Табела 20. Вредности проинфламаторних цитокина пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после оброка

Прва група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	р вредност
IFN	578,78 ± 602,86	844,61 ± 564,27	p=0,044
IL-1β	23,71 ± 5,77	58,12 ± 69,63	p=0,007
IL-17	23,93 ± 7,45	42,18 ± 29,44	p=0,037
IL-27	3229,17 ± 3474,49	2711,85 ± 2321,77	NS
IL-6	7,50 ± 7,67	30,08 ± 53,48	NS
TNF	44,67 ± 39,56	116,47 ± 218,63	NS

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; IFN – интерферон; IL – интерлеукин; TNF – фактор некрозе тумора

Табела 21. Вредности проинфламаторних цитокина пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *Evening Primrose Oil* дневно после оброка

Друга група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	р вредност
IFN	384,14 ± 74,40	1015,56 ± 479,66	p<0,001
IL-1β	21,06 ± 4,54	48,83 ± 35,07	p=0,001
IL-17	19,88 ± 2,20	62,13 ± 39,81	p<0,001
IL-27	1591,94 ± 957,57	3129,62 ± 2649,81	p=0,011
IL-6	8,26 ± 20,16	30,94 ± 32,78	p=0,002
TNF	47,60 ± 64,05	110,43 ± 106,82	p=0,005

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно; IFN – интерферон; IL – интерлеукин; TNF – фактор некрозе тумора

4.9. ОДРЕЂИВАЊЕ ВРЕДНОСТИ ЛИПИДНИХ ПАРМЕТАРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

Вредности липидних парметара пацијената са реуматоидним артритисом пре и после суплементације су приказане у Табелама 22, 23 и 24.

Табела 22. Вредности липидних парметара пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после оброка

Група I			
Масне киселине	Пре суплементације	После 3 месеца	р вредност
16:0	30,07 ± 5,22	29,47 ± 2,31	NS
16:1 n-7	0,57 ± 0,15	0,53 ± 0,23	NS
18:0	18,59 ± 2,82	16,77 ± 2,53	p=0,037
18:1 n-9	9,32 ± 1,24	8,05 ± 1,05	p=0,027
18:1 n-7	1,99 ± 0,33	1,58 ± 0,25	p=0,001
18:2 n-6	23,73 ± 2,43	26,03 ± 2,91	NS
18:3 n-3	0,23 ± 0,24	0,21 ± 0,13	NS
18:3 n-6	0,00 ± 0,00	0,005 ± 0,02	NS
20:3 n-6	2,84 ± 0,80	2,46 ± 0,94	NS
20:4 n-6	11,05 ± 3,31	10,22 ± 1,81	NS
20:5 n-3	0,32 ± 0,22	1,01 ± 1,02	p=0,026
22:4 n-6	0,45 ± 0,38	0,32 ± 0,13	NS
22:5 n-3	0,38 ± 0,17	0,58 ± 0,30	NS
22:6 n-3	1,92 ± 0,91	2,74 ± 1,08	NS
n-3	2,85 ± 1,14	4,55 ± 2,26	NS
n-6	38,08 ± 3,80	39,05 ± 3,22	NS
n-6/n-3	15,47 ± 5,51	10,62 ± 5,07	p=0,005
SFA	47,17 ± 3,59	46,24 ± 3,97	NS
MUFA	11,89 ± 1,33	10,16 ± 1,34	p=0,012
PUFA	40,49 ± 4,45	43,60 ± 4,22	NS

Вредности су изражене као средња вредност \pm SD; NS: није статистички значајно,

16:0 – палмитинска масна киселина, **16:1 n-7** – палмитолеинска масна киселина,
18:0 - стеаринска масна киселина, **18:1 n-9** - олеинска масна киселина,
18:1 n-7 - вакценска масна киселина, **18:2 n-6** - линолна масна киселина,
18:3 n-3 - α -линоленска масна киселина, **18:3 n-6** - γ -линолна масна киселина,
20:3 n-6 - γ -линоленска масна киселина, **20:4 n-6** - арахидонска масна киселина,
20:5 n-3 - еикозапентаенска масна киселина, **22:4 n-6** - докозатетраенска масна киселина,
22:5 n-3 докозапентаентска масна киселина, **22:6 n-3** - докозахексаенска масна киселина,
n-3 - збир свих n-3 масних киселина, **n-6** - збир свих n-6 масних киселина,
n-6/n-3 – однос n-6 и n-3 масних киселина, **SFA** - збир свих засићених масних киселина,
MUFA - збир свих масних киселина са 1 двогубом везом (16:1 и 18:1),
PUFA - збир свих осталих масних киселина од 18:2 до 22:6.

Табела 23. Вредности липидних параметара пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *Evening Primrose Oil* дневно после оброка

Група II			
Масне киселине	Пре суплементације	После 3 месеца	р вредност
16:0	30,08 ± 5,06	28,85 ± 2,62	NS
16:1 n-7	0,56 ± 0,13	0,58 ± 0,26	NS
18:0	16,93 ± 1,83	16,34 ± 1,41	p=0,025
18:1 n-9	8,64 ± 1,03	8,44 ± 0,93	NS
18:1 n-7	1,75 ± 0,24	1,63 ± 0,23	NS
18:2 n-6	26,20 ± 1,90	26,30 ± 2,41	NS
18:3 n-3	0,22 ± 0,18	0,18 ± 0,15	p<0,001
18:3 n-6	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,11	NS
20:3 n-6	2,59 ± 0,63	2,67 ± 0,63	NS
20:4 n-6	10,52 ± 1,81	11,29 ± 2,14	p=0,048
20:5 n-3	0,20 ± 0,10	0,49 ± 0,23	p<0,001
22:4 n-6	0,37 ± 0,18	0,34 ± 0,13	NS
22:5 n-3	0,31 ± 0,08	0,45 ± 0,16	p<0,001
22:6 n-3	1,61 ± 0,55	2,22 ± 0,74	p=0,006
n-3	2,34 ± 0,65	3,33 ± 1,00	p=0,001
n-6	39,69 ± 3,08	40,75 ± 2,86	NS
n-6/n-3	18,15 ± 50,4	13,50 ± 4,81	p=0,005
SFA	47,01 ± 3,62	45,19 ± 2,80	p=0,039
MUFA	10,56 ± 1,46	10,67 ± 1,12	NS
PUFA	42,04 ± 3,38	44,07 ± 2,96	p=0,020

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно,

16:0 – палмитинска масна киселина, **16:1 n-7** – палмитолеинска масна киселина,

18:0 - стеаринска масна киселина, **18:1 n-9** - олеинска масна киселина,

18:1 n-7 - вакценска масна киселина, **18:2 n-6** - линолна масна киселина,

18:3 n-3 - α-линоленска масна киселина, **18:3 n-6** - γ-линолна масна киселина,

20:3 n-6 - γ-линоленска масна киселина, **20:4 n-6** - арахидонска масна киселина,
20:5 n-3 - ейкозапентаенска масна киселина, **22:4 n-6** - докозатетраенска масна киселина,
22:5 n-3 докозапентаентска масна киселина, **22:6 n-3** - докозахексаенска масна киселина,
n-3 - збир свих n-3 масних киселина, **n-6** - збир свих n-6 масних киселина,
n-6/n-3 – однос n-6 и n-3 масних киселина, **SFA** - збир свих засићених масних киселина,
MUFA - збир свих масних киселина са 1 двогубом везом (16:1 и 18:1),
PUFA - збир свих осталих масних киселина од 18:2 до 22:6.

Табела 24. Вредности липидних парметара пацијената са реуматоидним артритисом на редовној реуматолошкој терапији

Група III			
Масне киселине	Пре суплементације	После 3 месеца	р вредност
16:0	32,21 ± 3,69	29,67 ± 3,88	p = 0,007
16:1 n-7	0,72 ± 0,61	0,57 ± 0,12	NS
18:0	16,19 ± 2,40	16,55 ± 1,82	NS
18:1 n-9	8,51 ± 1,45	8,35 ± 1,39	NS
18:1 n-7	1,69 ± 0,25	1,68 ± 0,30	NS
18:2 n-6	26,40 ± 3,47	27,49 ± 3,96	NS
18:3 n-3	0,21 ± 0,14	0,19 ± 0,23	NS
18:3 n-6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	NS
20:3 n-6	2,44 ± 0,78	2,82 ± 0,97	NS
20:4 n-6	8,98 ± 1,84	9,60 ± 2,90	NS
20:5 n-3	0,28 ± 0,18	0,40 ± 0,25	p=0,017
22:4 n-6	0,32 ± 0,14	0,29 ± 0,13	NS
22:5 n-3	0,32 ± 0,14	0,56 ± 0,69	NS
22:6 n-3	1,66 ± 0,69	1,83 ± 0,72	NS
n-3	2,46 ± 0,90	3,09 ± 1,15	p=0,019
n-6	38,14 ± 3,09	40,03 ± 2,71	p=0,011
n-6/n-3	17,25 ± 5,51	14,27 ± 4,44	p=0,020
SFA	48,41 ± 3,02	46,26 ± 3,67	p<0,001
MUFA	9,72 ± 2,41	10,61 ± 1,74	NS
PUFA	40,61 ± 3,52	43,13 ± 3,17	p=0,013

Вредности су изражене као средња вредност ± SD; NS: није статистички значајно,

16:0 – палмитинска масна киселина, **16:1 n-7** – палмитолеинска масна киселина,

18:0 - стеаринска масна киселина, **18:1 n-9** - олеинска масна киселина,

18:1 n-7 - вакценска масна киселина, **18:2 n-6** - линолна масна киселина,

18:3 n-3 - α-линоленска масна киселина, **18:3 n-6** - γ-линолна масна киселина,

20:3 n-6 - γ-линоленска масна киселина, **20:4 n-6** - арахидонска масна киселина,

20:5 n-3 - еикозапентаенска масна киселина, **22:4 n-6** - докозатетраенска масна киселина,
22:5 n-3 докозапентаентска масна киселина, **22:6 n-3** - докозахексаенска масна киселина,
n-3 - збир свих n-3 масних киселина, **n-6** - збир свих n-6 масних киселина,
n-6/n-3 – однос n-6 и n-3 масних киселина, **SFA** - збир свих засићених масних киселина,
MUFA - збир свих масних киселина са 1 двогубом везом (16:1 и 18:1),
PUFA - збир свих осталих масних киселина од 18:2 до 22:6.

V

ДИСКУСИЈА

Реуматоидни артритис карактерише запаљење и хиперплазија синовије, продукција аутоантитела (реуматоидни фактор и антитела на циклични цитрулисани пептид), разарање хрскавице и кости и системске манифестације, укључујући кардиоваскуларна, пулмолошка, психијатријска и скелетна обољења (223).

Главни циљ ове студије је био да испита ефекте различитих додатака исхрани на морфофункционалне карактеристике, маркере оксидативног стреса и инфламаторни одговор код пацијената са реуматоидним артритисом. Опште је познато да су рибље уље и уље ноћурка богати извори омега-3 и омега-6 есенцијалних масних киселина за које се верује да имају јака антиинфламаторна својства. Делују углавном на два начина за ублажавање симптома пацијената са реуматоидни артритисом. Иако здравствене користи од рибљег уља могу настати кроз више различитих механизма, изгледа да смањена инфламација да један заједнички пут (29).

Уље ноћурка је природни извор линолене киселине и γ -линоленске киселине у релативно високој концентрацији. Други богати природни извори γ -линоленске киселине су биљна уља попут уља семена боражине, уље семена црне рибизле, уље семена конопље и спинулина. Ноћурак (лат. *Oenothera biennis*) је мала биљка са прилично жутим цветовима које цвета увече. Данас се гаји као исплатива биљка, а њене ситне семенке се беру да би се добило драгоцено уље. До сада, многа клиничка испитивања су пријавила благотворне ефекте уља ноћурка код атопичног дерматитиса, мада се нека истраживања разликују.

γ -линоленске киселине је први пут изолован из семена уља жутог ноћурка. Ову биљку су узгајали Индијанци за лечење отеклина у телу. У 17. веку, је уведена у Европу и постала популаран народни лек, када је добио име краљев лек за све. 1919, *Heiduschka* и *Lüft* екстрахују уље од семенки ноћурка и описују необичну линоленску киселину, коју су назвали γ -линоленска киселина (224).

5.1. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА ТЕЛЕСНЕ, КЛИНИЧКЕ И ЛАБОРАТОРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

У нашем истраживању испитаници све три групе су поприлично били уједначени по броју година и погледу телесних карактеристика као што су телесна висина, телесна тежина и ВМІ. Такође дужина болести и недељна доза метотрексата су за све три групе биле сличне, као и висина вредности реуматоидног фактора. Пацијената са реуматоидним артритисом све три групе на почетку истраживања, тј пре узимања суплемената су се једино разликовали по висина вредности анти ЦЦП антитела (Табела 3, График 1).

Антитело на циклични цитрулисани пептид, који је настао посттранслационом модификацијом аргинина, представља најспецифичнији маркер за реуматоидни артритис. Анти ЦЦП антитела су повезана са високом активношћу болести, као и са високим степеном радиографских оштећења (225). У студијама пресека доказана је повезаност са субклиничком атеросклерозом (226) и са развојем исхемијске болести срца (227). Слично као и са реуматоидним фактором, механизам ових повезаности је неразјашњен. Друге студије су доказале да је присуство антитела на циклични цитрулисани пептид и присуство реуматоидног фактора класе имуноглобулина М повезано са нарушеном ендотелном функцијом, код пацијената са реуматоидним артритисом (228).

Реуматоидни фактор је антитело карактеристично за пацијената са реуматоидним артритисом и усмерено је на Fc фрагмент IgG. Реуматоидни фактор је детектован код 60–80% пацијента са реуматоидним артритисом и убраја се у показатеље тежине и прогресије болести. Механизми којима реуматоидни фактор предиспонира васкуларну болест је још увек непознат. Могуће објашњење би било да имунокомплекси активирају систем комплемента и оштећују ендотел и тако га чине фактором ризика за развој кардиоваскуларних болести (229). Мада, одређен број аутора није доказало корелацију између присуства реуматоидног фактора и атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом (230, 231).

У нашем истраживању вредности реуматоидног фактора се нису статистички

значајно разликовале између група.

5.2. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА КЛИНИЧКЕ И ЛАБОРАТОРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Бројна истраживања су показала да омега-3 масне киселине утичу на активност и симптоме реуматоидног артритиса укључујући болове и отоке зглобова и јутарњу укоченост (85-91). Студија која је пратила употребу нестероидних антиинфламаторних лекова код болесника са реуматоидним артритисом, који су 3 месеца били на суплементацији омега-3 масним киселинама је показала потпуну или делимичну редукцију узимања нестероидних антиинфламаторних лекова након 3 месеца (92).

Ови резултати су у складу са нашим истраживањем, у групи испитанка који су узимали концентровано рибље уље VAS скор је био знатно нижи, што указује да је бол био мање присутан (График 3). Такође, у истој групи дошло је смањења броја осетљивих зглобова (Табели 5).

С обзиром да су високе вредности Ц-реактивног протеина и седиментације еритроцита биомаркери системског запаљења, ефекат примене суплемената је и више него знајачајан када погледамо Табеле 6, 7 и 8 и видимо да су вредности CRP и ESR су биле статистички значајно ниже у све три групе испитаника после периода суплементације.

Маркери активности болести као што су број осетљивих и отечених зглобова и вредности визуелне аналогне скале бола VAS, скор DAS 28 и HAQ, јасно указују да су опште здравствено стање болесника са реуматоидним артритисом који су узимали концентровано уље ноћурка уз оброк три месеца, знатно боље (Табела 6). Ништа мање побољшање је забележено и код пацијената који су узимали уље ноћурка (Табела 7).

5.3. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ЛАБОРАТОРИЈСКИХ И ПАРАМЕТАРА ХЕМОСТАЗЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Многе студије су показале да инфламација утиче на хиперкоагулабилност крви. Повећање TNF- α узрокује повећану експресију ткивног фактора на моноцитима и ендотелу што почиње коагулациону каскаду, депонујући тромбин и фибрин (232). Фибрин се депонује у вишку у реуматоидним зглобовима и фибринолитички процеси су инхибирани код пацијената са реуматоидним артритисом. Чак и код пацијената са реуматоидним артритисом са ниском активношћу болести повећан је ниво фибриногена, фибрин Д-димера, ткивног плазминоген антиген активатора и Фон Вилебрандовог фактора (vWF) (233). Пацијенти са реуматоидним артритисом често испољавају патолошку тромбоцитопезу (234). На основу тога може се рећи да пацијенти са реуматоидним артритисом имају хронично хиперкоагулабилно стање што је предиспозиција за артеријске тромбозе и инфаркт миокарда.

Вредности фибрина су биле значајно ниже после периода суплементације у све три групе испитанка. Потенцијални механизам којим γ -линоленска киселина и дихомо- γ -линолна киселина посредују њихове позитивне ефекте је кроз фибринолитичке процес.

Вредности глукозе наше су биле значајно ниже после периода суплементације у оквиру прве групе, тј. групе која је користила концентровано рибље уље (Табела 10).

Познато је да инфламација мења липопротеине и те прве промене се не могу детектовати рутинским лабораторијским анализама (235). Инфламација мења величину и густину липопротеине мале густине (LDL) (236). Инфламација такође мења липопротеине високе густине (HDL) смањујући њихову способност да уклањају холестерол из атеросклеротских лезија и смањује њихову антиоксидативну активност (237). Многе студије су доказале да се ове промене липопротеина догађају код пацијената са реуматоидним артритисом.

Повећање нивоа LDL у код пацијената са реуматоидним артритисом 3 пута повећава ризик за кардиоваскуларне болести. Смањење нивоа HDL које је доказано код пацијената са реуматоидним артритисом вероватно је последица повећаног лучења

фосфолипазе 2-ПА која је у корелације са CRP, а који одражава инфламацију у реуматоидном артритису (238). Хронична инфламација, као у реуматоидном артритису, води ка повећању LDL и смањењу HDL што се описује као атерогени индекс A1 (239). Повишени нивои серумског тоталног холестерола или LDL су везане за повећани ризик од кардиоваскуларних обољења (240). Промене у плазма липопротеинима који утичу на функција тромбоцита су пронађене код хиперлипидемије (241). Висок ниво LDL може да изазове спонтани агрегацију тромбоцита (242) преко мобилизације калцијума унутар тромбоцита (243) и повећања функције и осетљивост тромбоцита (244).

У нашем истраживању све три групе пацијената су имале благо повишене вредности LDL, док су има вредности HDL биле благо снижене или на граници (Табеле 6 и 7), што су је у складу са предходних истраживањима. Група пацијента која није узимала никакве суплементе поред своје редовне реуматолошке терапије је имала и додатоно значајно снижење вредности HDL, али и LDL (Табела 12).

Група која је узимала само рибље уље (богато n-3 масним киселинама) је постигла боље резултате од групе која је конзумирала уље ноћурка (богато n-6 масним киселинама) и што се тиче LDL, тако и HDL. Док се вредности триглицерида и холестерола нису статистички значајно разликовале у оквиру група након периода суплементације (Табеле 10, 11 и 12).

5.4. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА ОДРЕЂИВАЊЕ СТЕПЕНА АГРЕГАЦИЈЕ ТРОМБОЦИТА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Показано је да је код пацијента који су узимали високе дозе омега-3 масних киселина у трајању од три месеца смањена тромбогеност. Главно објашњење за ово смањење тромбогености је то да омега-3 масна киселина (или еикозапентаенска киселина) замењује арахидонску киселину, која је снажан агонист агрегације тромбоцита. На овај начин, повећање уноса еикозапентаенске киселине обично је праћени смањењем арахидонске киселине у телу, теоретски смањује функцију тромбоцита. Неколико студија је показало антитромбоцитне ефекте након третмана еикозапентаенском киселином.

Terano и његови сарадници су изучавали антитромбоцитни утицај еикозапентаенске киселине на здравим субјектима. У њиховој студији, након суплементације еикозапентаенском киселином 3,6 g / дан током 4 недеље, агрегација тромбоцита и задржавање тромбоцита су значајно потиснути. Исти аутори су показали да је садржај еикозапентаенске киселине у фосфолипидима тромбоцита знатно повећан, док се садржај арахидонске киселине не мења (245). У нашој студији забележене су промене у оквиру друге групе, дошло је до статистички значајног снижења вредности TRAP теста и повишења вредности ASPI/TRAP тестова. Док су вредности ADP/TRAP теста статистички значајно биле више у првој групи након периода суплементације.

5.5. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Оксидативни стрес ремети уобичајену структуру ћелије и њене функције доприносећи патогенези различитих болести (151), а до дога долази кад настане дисбаланс између прооксидативних фактора са једне и антиоксидативних са друге стране. Због тога долази до оштећења ткива дејством ROS што може имати важну улогу у патогенези запаљенских и дегенеративних болести, укључујући атеросклерозу и реуматоидни артритис (246, 247). С обзиром да је патофизиологија реуматоидног артритиса још увек непотпуно разјашњена, реактивни кисеонични и азотни радикали (*reactive oxygen and nitrogen species* -RONS) могу имати улогу у његовој патогенези (248). Повећано стварање ROS нарушава аниоксидативни статус и може да мења експресију инфламаторних цитокина појачавајући запаљење и узрокујући ткивна оштећења у аутоимуним болестима, и показујући повезаност са степеном активности болести (249). Осим тога, запаљење и релативна хипоксија у зглобовима додатно појачавају оксидативни стрес (247). Синовијална течност у запаљеном реуматоидном зглобу обилује активираним неутрофилима који преко *Fenton* реакције продукују велике количине супероксид радикала (*superoxide radical* - O_2^-), водоник пероксида (H_2O_2) и високо реактивног хидроксил радикала (OH^\cdot) (250). Објављено је више студија које су испитивале директну улогу оксидативног стреса у реуматоидном

артритису (251-253). Такође је доказано да антиоксиданти борбом против оксидативног стреса могу успорити развој реуматских болести (254). Иако је доказан инверзни однос између ситемског запаљења и антиоксидативног статуса у серуму, релативно се мало зна о утицају антиоксиданаса на почетак ових болести код људи (254, 255).

У ранијим студијама су истраживачи код пацијената са реуматоидним артритисом пронашли корелацију са параметријма оксидативног стреса и активности болести (256, 257). Друге студије нису пронашле значајну корелацију између параметара оксидативног стреса и активности реуматоидног артритиса (252).

Erdogan и сарадници (258) су сугерисали да додаток исхрани са рибљим уљем може да побољша отпорност на напад слободних радикала и смањити липидану пероксидацију на основу његове способности да значајно подигну активност SOD и ниво NO, као и да се смањи ниво TBARS, што је у складу са нашим резултатима, што се тиче SOD активности и NO нивоа у групи пацијената која је узимала концентрована рибље уље и уље ноћурка. Липидна пероксидација је важна у патогенези тумора, атеросклерозе, дегенеративних болести и артритиса. Током липидне пероксидације полинезасићене масне киселине подлежу оксидацији и стварају липидне пероксил радикале који поново изазивају оксидацију полинезасићених масних киселина и тако у ланчаној реакцији оштећују мембрану ћелије. Пацијенти са реуматоидним артритисом у нашој студији су имали значајно виши ниво липидне пероксидације у првој и другој групи у односу на контролну групу и то је у складу са многим студијама (Табеле 9, 10 и 11) (259, 260).

Значајно повећање индекса липидне пероксидације и позитивна корелација са високом активношћу болести је нађена код пацијенти са реуматоидним артритисом (249). Резултати студија указују да комбинација хроничног запаљења и повећаног индекса липидне пероксидације код пацијенти са реуматоидним артритисом може објаснити повећан кардиоваскуларни ризик код тих пацијената (261).

Показано је да рибље уље смањује васкуларни оксидативни стрес негативном регулацијом експресије и активност NADPH оксидазе и повећањем активности SOD у крвним судовима. Истакнути васкуларни антиоксидантни потенцијал рибљег уља може додатно побољшати функцију васкуларног ендотела унапређујући биодоступност NO. Аутори су подржали идеју да омега-3 полинезасићене масне киселине могу бити ефикасне

за управљање поремећајима који су повезани са смањењем оксидантног/антиоксидантног механизма одбране (258, 262).

Супероксид анјон радикал у плазми може да се конвертује у водник пероксид помоћу супероксид дисмутазе, али водоник пероксид се највероватније није конвертовао под утицајем каталазе или глутатиона. Могуће је да се водоник пероксид конвертује у хидроксил радикал помоћу гвожђа помоћу ниског нивоа трансферина и може повећати серумску липидну пероксидацију код пацијената са реуматоидним артритисом. Азот моноксид (*Nitric oxide* - NO) је молекул са кратким полуживотом који има важну улогу у физиолошким функцијама, укључујући регулацију тонуса крвних судова, запаљења, функција митохондрија и апоптозе (263). С обзиром да је NO врло нестабилан, у лабораторији се користи мерење његових стабилних метаболита, нитрата и нитрита као мера за индекс стварања NO и маркер за активност ензима азот-моноксид синтетазе (*nitric oxide synthetase* - NOS). Одређен број студија је објавило резултате који показују повећање ендogene синтезе NO код реуматоидног артритиса, што се може објаснити дисфункцијом Т лимфоцита (264-266). У прилог томе говоре резултати студије која је објавила смањивање нивоа нитрата, нитрита и нитрата + нитрита након терапије анти TNF- α лековима код реуматоидног артритиса (267). Постоје студије и са контрадикторним резултатима (268), што се објашњава тиме да потрошња NO у серуму настаје због реакције са активним супстанцама као што је супероксид и долази до стварања перокси нитрата и нитрозованих протеина.

Ћелије имају различите аниоксидативне системе за одбрану од слободних радикала. Цируклишући хумани еритроцити способни су да хватају O_2^- и H_2O_2 који су екстрацелуларно, а створени од активираних неутрофила, механизмима помоћу супероксид дисмутазе (*superoxide dismutase* -SOD) и каталазе (*catalase* - CAT). O_2^- се конвертује у H_2O_2 некада спонтано или чешће реакцијом катализованом SOD, ензимом којима две изоформе, једну коју индукују инфламаторни цитокини као што је тумор некротис фактор-алфа (*tumor necrosis factor- α* - TNF- α). Релација између еритроцитне SOD и реуматоидног артритиса још није јасна. Досадашњи резултати студија о антиоксидативном статусу код пацијена са реуматоидним артритисом су контрадикторна, неке студије су обајавиле пад у антиоксидативном систему (249, 256, 265), док су друге пронашле неизмењен антиоксидативни систем (248).

Студије у којима је вршена суплементација пружају предпоставку да 3,1-8,4 g еикозапентаенске кислене + докозахексаенске киселине / дан смањује за 30-55% производњу реактивних врста кисеоника (супероксида или водоник пероксида) стимулишући хумане неутрофиле (269-271). Иако смо користили ниже дозе еикозапентаенске кислене + докозахексаенске киселине / дан (2,5 g), H₂O₂ нивои у плазми такође су смањени (Табеле 9 и 10).

Суплементација са 6 g еикозапентаенске кислене + докозахексаенске киселине / дан је показала да смањује производњу водоник пероксида од стране хуманих моноцита (272). Студије које користе ниже дозе омега-3 полинезасићених масних киселина (0,55-2,3 g / дан) нису показале ефекте на продукцију реактивних врста кисеоника ни преко неутрофила нити моноцита (273-276).

Студија *Halvorsen-a* и сарадника (277) је показала да 3,8 g било еикозапентаенске киселине или докозахексаенске киселине дневно није утицала на производњу водоник пероксида у хуманим моноцитима. Овај недостатак ефекта може се односити или на различит стимулус коришћен у овој студији (*Escherichia coli*) у поређењу са другим високо-дозним студијама са моноцитима (латекс куглице) или на чињеницу да 3,8 g омега-3 полинезасићених масних киселина / дан је испод и 6 g / дан је изнад прага који утиче на моноцитну производњу водоник пероксид (272)

Антиоксидативни ензими су одговорни за заштиту од слободних радикала. Постоје неки извештаји о еритроцитној активности SOD, CAT и GSH-Px код болесника са реуматоидним артритисом, али резултати су контроверзни. *Sarban* (259) није приметио никакве промене, а *Akyol* (260) није приметио никакву промену у еритроцитној SOD и инхибицији плазма SOD. *Cimen* (248) је приметио пораст еритроцитне SOD активности. Ми смо такође показали повећање антиоксидативне активности у првој групи (GSH вредности) (Табела 9) и другој групи (GSH и SOD вредности) (Табела 10) у односу на трећу групу, што потврђује позитивне ефекте ових суплемената у побољшању антиоксидативног капацитета. С друге стране, значајне разлике у активности CAT нису примећене и то је у складу са већином студија, али такође постоје неке разлике и између истраживача - *Sarban* је посматрао инхибицију активности CAT. Његови резултати потврђују пораст оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом (259).

Могуће објашњење за наше делимичне резултате у вези оксидативног стреса је да

се код пацијената са реуматоидним артритисом, други ред одбрана од оксидативног стреса повећава, индукован оксидативном модификацијом ћелијских мембрана, док прва линија, као што су SOD и CAT, не испољава никакве значајне промене под повећаним оксидативним стресом. Осим тога, повећање нивоа SOD сугерише на повећан антиоксидативни капацитет одбране који је веома важан налаз о суплементима које смо ми користили (278). Додатно, витамина Е има значајна антиоксидантна својства. Капсуле рибљег уља садрже витамин Е, али само 1,6 mg природне мешавине токоферол (углавном токоферол- α) (279). Ова концентрација је довољна да изазове антиоксидантно деловање, јер неки антиоксидативни ефекат су пронађени код пацијената који су узимали 300-600 mg витамина Е дневно (280, 281).

5.6. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА ВРЕДНОСТИ АНТИГЕНА ЗА ФОН ВИЛЕБРАНДОВ ФАКТОР (vWFAg), АКТИВНОСТ ФОН ВИЛЕБРАНДОВ-ОГ ФАКТОРА (vWFAct) И ХОМОЦИСТЕИНА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

У физиолошким условима, васкуларни ендотел производи многе супстанце које имају важну улогу у хемостази, фибринолизи и очувању васкуларног тонуса (282). Једна од тих супстанци је фон Вилебрандов фактор (vWf) који се искључиво производи у ендотелу, и представља маркер ендотелне активације или дисфункције (283, 284). *Paczuski* и његови сарадници у испитивали ниво антигена за вон Вилебрандов фактор у плазми (vWFAg) код пацијената са реуматоидним артритисом и болесника са еритемским лупусом. У обе групе нивои vWFAg су биле 243% и 240% више него код здравих добровољаца. Добијени резултати указују да мерења концентрације vWFAg могу бити корисни као потенцијални маркер повреде ендотела (285).

Повећан ниво vWF може бити предиктивни маркер за рану атеросклерозу (286). Група аутора је пратила пацијенте са реуматоидним артритисом 8 година, просечне старости 63 године, и просечне дужине трајања болести 21 годину. Праћена је појава нових кардиоваскуларних догађаја и уочено је да је код тих пацијената била повећана серумска вредност vWF (287). Повећан ниво фибриногена и фон Вилебрандовог фактора у серуму могли би да предвиде кардиоваскуларни ризик код пацијената са

реуматоидним артритисом (288).

У нашем истраживању није дошло до значајних промена вредности vWFAg, vWFAct и хомоцистеина ни у једној од група након узимања суплемената.

5.7. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА КЛИНИЧКО - АНТРОПОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Више студија је показало да n-3 полинезасићене масне киселине утичу на губитак тежине и смањење обима струка (132, 133). За постизање и одржавање нормалне телесне тежине потребан је правилан однос између омега-3 масне киселине и омега-6 масних киселина, јер смањује сигнале у телу који стварају масне залихе, а побољшава и осетљивост према инсулину чиме се смањује ризик од настанка дијабетеса (137). Дијететска суплементација рибљим уљима 4 грама / дан значајно смањује телесну масу, сагиталани абдоминални дијаметар и обима струка (144-148), што је у складу са нашим резултатима и за групу пацијената која је узимала 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после оброка, као и групу која је узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *Evening Primrose Oil* дневно после оброка.

Недавно је показано да је сагиталани абдоминални дијаметар јаче повезан са метаболичким синдромом (289, 290) и инсулинском резистенцијом (291, 292) у односу на остале антропометријске мере које се обично користе, укључујући ВМІ и обим струка. Сагиталани абдоминални дијаметар може бити најбољи антропометријски маркер за одређивање кардиоваскуларног ризика (293, 294) и морталитет, барем код мушкараца (295, 296).

Сагиталани абдоминални дијаметар је у снажној корелацији са запремином висцералне масти мерене компјутеризованом томографијом (297, 298, 299) који може бити једно од објашњења за супериорну улогу сагиталаног абдоминалног дијаметра у предвиђању инсулинске резистанције код мушкараца (300).

Многе студије су показале да n-3 полинезасићене масне киселине, нарочито

еикозапентаенска и докозахексаенска киселина, којима обилује рибље уље, су мање ефикасне у промовисању акумулације масног ткива него засићене масти (301-305). Дијета богата n-3 полинезасићеним масним киселинама уз храну богату мастима не утичу на потрошњу масти (302, 306-308), али модулира потрошњу залиха нисходном регулацијом липогенезе и стимулицијом липидне оксидације. Оваква модулација метаболизма је повезана са променом експресије гена у многим ткивима, укључујући јетру, мишиће и масно ткиво (304, 309, 310). Примећено је да исхрана обogaћена рибљим уљем преференцијално смањује епидидимално у поређењу са поткожним белим масним ткивом (302, 307, 310, 311).

Исхрана богата докозахексаенском киселином доводи до смањења складиштења масних наслага, које се објашњава ограниченом акумулацијом липида у адипоцитима, а не смањењем броја масних ћелија (302, 311). Студије на мишевима који су били на дијети богатој мастима су документовале смањење гојазности услед уноса n-3 полинезасићених масних киселина (306, 307, 312, 313) и указују да је еикозапентаенска и докозахексаенска киселина могу бити ефикасније од n-3 полинезасићених масних киселина биљног порекла, односно α -линоленске киселине. α -линоленска киселина је прекурсор еикозапентаенске и докозахексаенске киселине код сисара, али се врло брзо оксидише у организму и њена конверзија у еикозапентаенску и докозахексаенску киселину је прилично неефикасна (304, 314, 315). У другој клиничкој студији, суплементација рибљим уљем у трајању од 3 недеље (1,8g n-3 еикозапентаенска киселина/докозахексаенска киселина) је резултирало значајним смањењем телесних масних наслага (316).

Развој гојазности и акумулација масти у телу може бити смањена модулацијом генске експресије у адипоцитима. На пример, еикозапентаенска киселина /докозахексаенска киселина нисходно регулишу липогене гене (301, 302, 304, 309, 317) и стимулишу експресију митохондријалних протеина 2 и 3 за одвајања (307, 318) у масном ткиву.

α -линоленска киселина, је прекурсор еикозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине, али је ефикасност конверзије ниска (Схема 1). Стога, дијететски суплементи рибљег уља су ефикаснији извор докозахексаенске киселине од суплемената који садрже α -линоленску киселину као што је уље ноћурка (304, 314, 319).

Схема 1. Настајање масних киселина

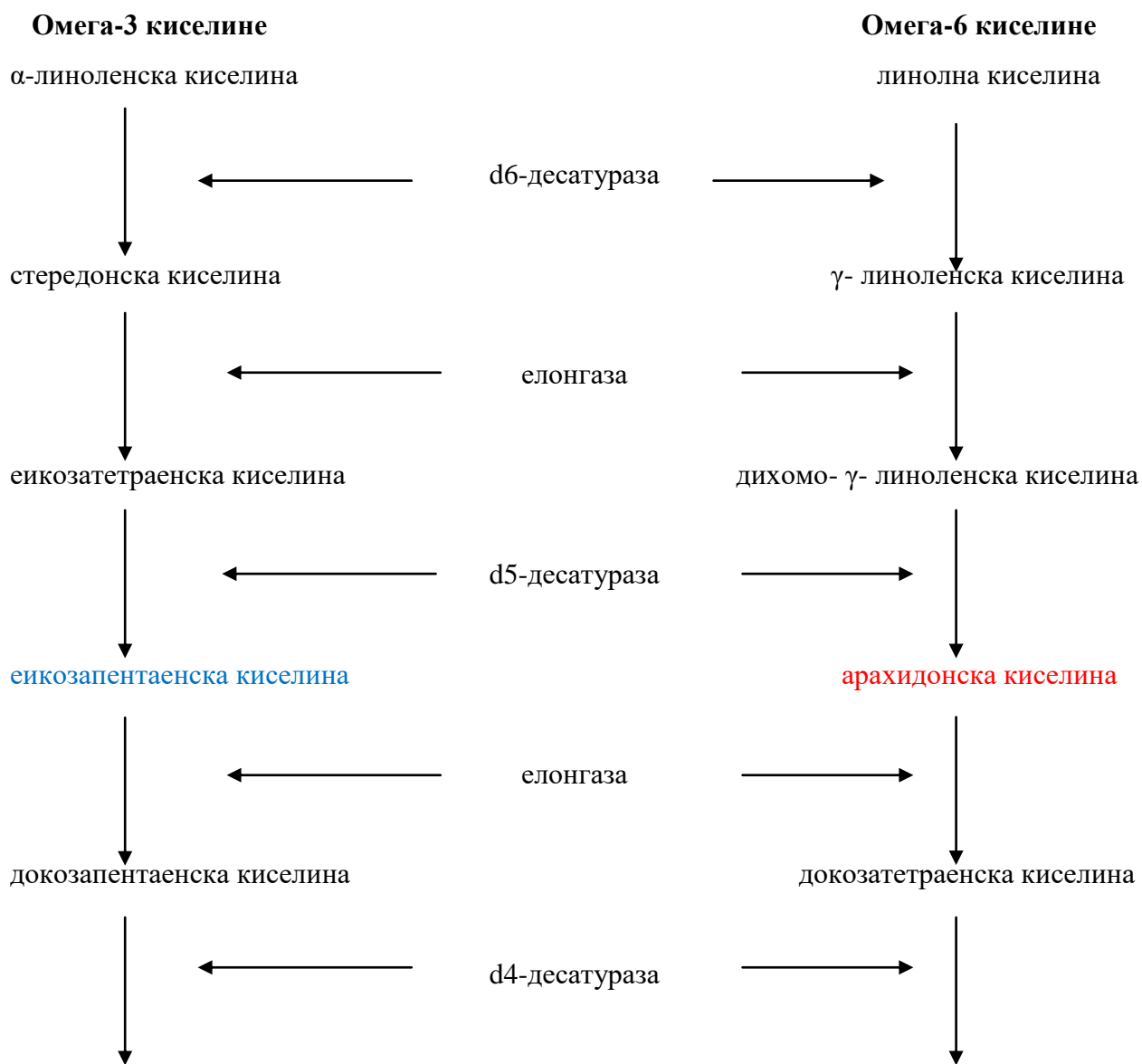


Схема приказује да из две праве есенцијалне масне киселине, ензимским процесима настају друге масне киселине. У организму је потребан баланс између инфламаторне арахидонске киселине која настаје из линолне киселине и еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине које настају из α -линоленске киселине. Критични ензим којег недостаје је d6-десатураза. С обзиром да се кроз савремени начин исхране уноси вишак омега-6 киселина, тај ензим се “троши” на линолну киселину и настајање

вишка арахидонске киселине на штету антиинфламаторних ейкозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине. Ситуацију погоршава и вишак омега-9 киселина које такођер “троше” $\delta 6$ -десатуразу.

Омега-3 полинезасићене масне киселине се даље метаболише у 3 серије еиконасоида, који би могли бити укључени у антиадипогени ефекат ейкозапентаенске киселине/докозахексаенске на адипоците (309, 310).

Линолна киселина служи као прекурсор арахидонске киселине и еикосаноида 1 и 2 серије, који промовишу адипогенезу (304, 320, 321). Обиље линолне киселине у исхрани богатој мастима ограничава формирање арахидонске киселине из линолеинске киселине и потом инхибира синтезу адипогенине серија еикосаноида (319, 320). Штавише, докозахексаенска киселина инхибира циклооксигеназу, која је кључни ензим укључен у синтези ових једињења (322). Сви ови механизми могу да допринесу смањењу складиштења масних наслага када се ейкозапентаенска киселина и докозахексаенска киселина додају исхрани која је обогаћена линолном киселином.

Исхрана обогаћена ейкозапентаенском киселином и докозахексаенском киселином у ниским дозама доводи до смањења укупне количине ДНК у епидидималним мастима. Свака ћелија садржи константану количину ДНК, ткивна концентрација ДНК и њена количина се могу користити као маркери средње величине ћелија и целуларности ткива. Смањење тежине масног ткива услед овакве исхране је због смањења броја ћелија у ткиву, а не смањења величине ћелија. Само већа доза ейкозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине повећава концентрацију ДНК у масном ткиву, што указује на смањење средње величине ћелија. Антиадипогени ефекат ейкозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине током развоја гојазности указују на то да ейкозапентаенска киселина/докозахексаенска киселина могу смањити акумулацију телесних масних наслага ограничавањем хипертрофије и хиперплазије масних ћелија. Низак однос ейкозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине потенцира антиадипогени ефекат. Повећан дијететски унос ейкозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине може бити користан за превенцију и лечење гојазности и сродних болести без обзира на уноса линолне киселине.

5.8. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА ВРЕДНОСТИ ЦИТОКИНА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Раније студије су показале да еикозапентаенска киселина и докозахексаенска киселина инхибирају ендотоксином стимулисану производњу IL-6 и IL-8 из култивисаних хуманих ендотелијалних ћелија (323), док еикозапентаенска киселина или риблије уље инхибира ендотоксином индуковану продукцију TNF- α из култивисаних моноцити (324). Мишеви који су храњени риблијим уљем имају смањену производњу TNF- α , IL-1 β и IL-6 од стране макрофага који су стимулирани ендотоксином (325) и смањену концентрацију циркулишућих TNF- α , IL-1 β и IL-6 код мишева којима је убризган ендотоксин (326). Неколико студија које пружају риблијег уља допуне здравим добровољцима су известили смањено стварање TNF- α , IL-1 β и IL-6 ендотоксином-стимулисане моноцита или моноклеарних ћелија (327, 328) иако све студије не потврђују овај ефекат (329). Неке од студија не показују ефекат омега-3 масних киселина на производњу цитокина у дози мањој од 2 грама еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине на дан, што може бити недовољна доза. Код пацијената са реуматоидним артритисом, суплементација риблијим уљем је имала за резултат смањену моноцитну производњу IL-1 (330), смањену плазма концентрацију IL-1 β (331) и смањену серумску концентрацију TNF- α (332).

Познато је да од γ -линоленске киселине (главни састојак уља ноћурка), тело формира дихомо- γ -линолна киселина. Ово је један од три извора еикосаноида у телу (уз арахидонску киселину и еикозапентаенску киселину). Дихомо- γ -линолна киселина је претеча простагландина PGH₁, што заузврат формира PGE₁ и тромбоксан A₁. PGE₁ има улогу у регулацији функције имунолошког система. Тромбоксан A₁ модулира про-инфламаторне особине тромбоксана A₂. За разлику од других еикосаноида, дихомо- γ -линолна киселина не може дати леукотриене. Међутим, могу да инхибирају формирање про-инфламаторних леукотриена из арахидонске киселине (333). Ова анти-инфламаторна имуномодулаторна улога γ -линоленске киселине је коришћена у третман различитих болести које укључују различите системе, па тако и реуматоидни артритис (334).

Прелиминарне студије показују да γ -линоленска киселина може имати неку терапеутску ефикасност у разноврсни стања попут атопијског дерматитиса, реуматоидног артритиса, Сјогреновог синдрома, остеопорозе, алкохолизма, гојазности, недостатка

пажње и хиперкинетичких поремећаја, пременопаузног синдрома и дијабетеса. Прва болест за коју је коришћено уље ноћурка (због садржаја γ -линоленске киселине) је мултипла склероза (335).

Суплементација рибљим уљем мења активацију нуклеарног фактора капа-лаког ланца-појачивач активираних Б ћелија у лимфоцитима (74, 108), као и производњу различитих цитокина (нпр. фактор туморске некрозе- α , интерлеукина-1 и интерлеукина-6) изазваним макрофагима (109, 110). Слични дијететски ефекти су пријављени и у студијама на људима (99, 111-114). Што се тиче инфламаторних цитокина интерлеукина-1 и фактора туморске некрозе- α , у студијама код здравих добровољаца и код оболелих од реуматоидног артритиса је доказано да се након сумплементације омега-3 масним киселинама концентрација смањивала до 90% (82, 83). Међутим резултати нашег истраживања нису у складу са претходно наведеним истраживањима. У нашој студији услед суплементације омега-3 и омега-6 масним киселинама дошло до потпуног супротног ефекта. Од очекиваног смањења вредности проинфламаторних цитокина, добили смо значајно више вредности проинфламаторних цитокина (Табеле 20 и 21).

5.9. ЕФЕКТИ РАЗЛИЧИТИХ РЕЖИМА ИСХРАНЕ НА ВРЕДНОСТИ ЛИПИДНИХ ПАРАМЕТАРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Масне киселине су саставни делови различитих липопротеини, и мали део масних киселина у ткивима су присутан у слободној, тј, неестерификованој форми, која представља важно гориво за скелетне мишиће (336).

Ниво засићених масних киселина у плазма фосфолипидма и ниво палмитинске киселине у холестерол естарима су директно повезан са кардиоваскуларним ризиком. (337, 338). Штавише, пронађени су повећани нивои палмитинске киселине и засићених масних киселина у плазма фосфолипидма код пацијената са не-Хочкиновим лимфомаима (339). Експерименти су показали да палмитинска киселина индукује апоптозу кардиомиоцита одраслих пацова и има драматичано деструктивно дејство на миофибриле (340). Иако је стеаринска киселина засићена масна киселина (18:0), показано је да има

кардиопротективан ефекат (341) и протективно деловање на рак (342).

Полинезасићене масне киселине имају многе биолошке функције у организму, укључујући модулацију имуног одговор, али улоге n-3 и n-6 полинезасићених масних киселина су различите. Три масне киселина са 20-угљеника: арахидонска киселина (20:4 n-6), еикозапентенска киселина (20:5 n-3) и дихомо- γ -линоленска (20:3 n-6) су прекурсор еикосаноида (343). Све три се такмиче за исте ензимске путева, али арахидонска киселина доводи до производње про-инфламаторних еикосаноида (на пример, 2-серија простагландина, тромбоксана и 4-серије леукотриена), док дихомо- γ -линоленска, еикозапентенска киселина и њихов прекурсор α -линолеинска киселина смањују инфламацију смањењем синтезе инфламаторних цитокина и подстицањем синтезе антиинфламаторних еикосаноида (344).

Суплементација омега-3 масним киселинама (концентровано рибље уље) у периоду од 12 недеља, резултирала је снижењем вредности стеаринске масне киселине (18:0), олеинске масне киселина (18:1 n-9), вакценске масне киселине (18:1 n-7), односа n-6/n-3 масних киселина и збира свих масних киселина са 1 двогубом везом (16:1 и 18:1) и довела до повећања вредности еикозапентаенске масне киселине (20:5 n-3). С обзиром на важност односа n-6/n-3 масних киселина, јер је управо однос n-6/n-3 важан фактор у модулисању инфламације и аутоимунитета (345) прва група је била најближа пожељном односу n-6/n-3 према препорукама Светске Здравствене организације, која гласи да је размера од 5-10:1 за n-6/n-3 однос најпожељнија (346).

Док је суплементација комбинацијом омега-3 и омега-6 масних киселина у периоду од 12 недеља довела до већих промена у липидном профилу код пацијената са реуматоидним артритисом. Суплементација комбинацијом концентрованог рибљег уља и уља ноћурка је довела до снижења вредности стеаринске масне киселине (18:0), α -линоленске масне киселине (18:3 n-3), збира засићених масних киселина и односа n-6/n-3 масних киселина. У другој групи је дошли и до повећања вредности арахидонске масне киселине (20:4 n-6), еикозапентаенске масне киселине (20:5 n-3), докозапентаентске масне киселине (22:5 n-3), докозахексаенске масне киселине (22:6 n-3), збира свих n-3 масних киселина и збир свих осталих масних киселина од 18:2 до 22:6. Повишени ниво арахидонске киселине након суплементације комбинацијом концентрованог рибљег уља и уља ноћурка може бити узрокован управо већим ослобађањем арахидонске киселине из

масног ткива.

Уље ноћурка је богато γ -линоленском киселином, прекурсора простагландина E1 (PGE1) и 15-хидрокси-дихомо- γ -линоленске киселине. PGE1 је познат антиинфламаторни агенс док дихомо- γ -линоленска киселина инхибира и 5-липоксигеназу и 12-липоксигеназу, који стварају проинфламаторне еикосаноиде.

Постоји синергијска интеракција између γ -линоленска киселина и еикозапентаенске киселине; друго инхибира конверзију дихомо- γ -линоленске киселине у арахидонску киселину и као резултат, γ -линоленска киселина има већи ефекат у подизању концентрације дихомо- γ -линоленске киселине.

Комбиновано давање, дакле, повећава нивое две есенцијалне антиинфламаторне масне киселине, дихомо- γ -линоленске киселине и еикозапентаенске киселине, уз истовремено смањење нивоа проинфламаторне арахидонске киселине. γ -линоленска киселина је такође пријављена да инхибира формирање леукотриена из арахидонске киселине путем метаболита дихомо- γ -линоленске киселине (347), што је делимично у складу са нашим резултатима.

Али запажене су и промене у групи пацијената која није узимала суплементе, тачније дошло је до снижења вредности палмитинске масне киселине (**16:0**), збира свих засићених масних киселина и односа n-6/n-3 масних киселина и до повишења вредности еикозапентаенске масне киселине (20:5 n-3), збира свих n-3 масних киселина, али и збира свих n-6 масних киселина и збир свих осталих масних киселина од 18:2 до 22:6.

VI

ЗАКЉУЧАК

На основу наведеног истраживања може се закључити следеће:

- 1) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани је дошло до смањења активности болести.
- 2) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани је дошло до смањења активности болести.
- 3) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до повећања нивоа параметара антиоксидативне заштите и смањења нивоа прооксиданата.
- 4) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до повећања нивоа параметара антиоксидативне заштите и смањења нивоа прооксиданата.
- 5) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани није дошло до смањења нивоа проинфламаторних цитокина.
- 6) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани није дошло до смањења нивоа проинфламаторних цитокина.
- 7) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани није дошло до побољшања ендотелне функције.
- 8) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани није дошло до побољшања ендотелне функције.

9) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до смањења тежине и обима струка.

10) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до смањења тежине и обима струка.

VII

ЛИТЕРАТУРА

1. Silman A, Hochberg and M. *Epidemiology of the Rheumatic Diseases*, Oxford University Press, 2nd Edition; 2001:31-71.
2. Silman AJ, Ollier W, Holligan S, Birrell F, Adebajo A, Asuzu MC. Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population. *J Rheumatol*. 1993; 20: 618–622.
3. Hochberg M, Silman A, Smolen J, Weinblat M, Weisman M (2003). *Rheumatology*, 3rd edn, pp 811–2. Mosby, Toronto.
4. Moolenburgh JD, Valkenburg HA, Fourie PB. A population study on rheumatoid arthritis in Lesotho, southern Africa. *Ann Rheum Dis*. 1986;45(8):691-695.
5. Stojanovic R, Vlajinac H, Palic-Obradovic D, Janosevic S, Adanja B. Prevalence of rheumatoid arthritis in Belgrade, Yugoslavia. *Br J Rheumatol*. 1998;37:729–732.
6. Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology* 2002;41:793–800.
7. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31: 315-324.
8. O'Del JR. *Arthritis Rheum* 2002; 40: 203-205.
9. Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc*. 1949;140:659–662.
10. Graudal NA, Jurik AG, de Carvalho A, Graudal HK. Radiographic progression in rheumatoid arthritis: a long-term prospective study of 109 patients. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1470-1480.
11. Sokka T, Kautiainen H, Mottonen T, Hannonen P: Work disability in rheumatoid arthritis 10 years after the diagnosis. *J Rheumatol*. 1999; 26: 1681-1685.
12. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, et al: The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994; 37: 481-494.
13. Pincus T. Early arthritis. Introduction. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21(Suppl 31).
14. Cooper NJ. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology* 2000; 39: 28-33.
15. Landewe RBM. *Arthritis Rheum* 2002; 40: 347-350.
16. St Clair EW et al. *Arthritis Rheum* 2004; 50:3432-3443.

17. Chan FKL, Hung LCT, Suen BY, et al. Celecoxib versus diclofenac and omeprazole in reducing the risk of recurrent ulcer bleeding in patients with arthritis. *N Engl J Med* 2002; 347: 2104–2110.
18. van Tulder MW, Scholten RJPM, Koes BW, Deyo RA Non-steroidal antiinflammatory drugs for low back pain (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 1, 2003. Oxford: Update Software.
19. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines, Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis 2002 Update, *Arthritis and Rheumatism*, 2002, 46:2, 328-346.
20. Scottish Intercollegiate Guidelines Network, Management of Early Rheumatoid Arthritis, A National Clinical Guideline, December 2000, www.sign.ac.uk
21. Boers M, Verhoeven AC, Markusse HM, van de Laar MA, Westhovens R, van Dendren JC et al. Randomized comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet* 1997; 350: 309-318.
22. Wolfe F, Zwiilich SH. The long-term outcomes of rheumatoid arthritis: a 23-year prospective, longitudinal study of total joint replacement and its predictors in 1,600 opatients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1072-1082.
23. Laan RF, Jansen TL, van Riel PL. Glucocorticosteroids in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; 38: 6-12.
24. Chan KF. and Lim PAC. Rehabilitation in rheumatic diseases. In: Howe HS, Feng PH. *Textbook of clinical Rheumatology*. 1997: National Arthritis Foundation, Singapore: 443-455.
25. Swezey RL. Rehabilitation in arthritis and alied conditions. In: Kruzen. *Handbook of physical medicine and rehabilitation*. 1990: Saunders, Philadelphia: 673-706.
26. Walker JM, Helewa A. *Physical therapy in Arthritis*. 1996: W.B.Saunders company, Philadelphia.
27. Bell MJ et al. A randomized controlled trial to evaluate the efficacy of community based physical therapy in the treatment of people with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998; 25: 231-237.
28. Munro R, Cappel CH, Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: association

with the acute phase response. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 326-329.

29. Fortin P, Lew RA et al. Validation of a meta-analysis: The effects of fish oil in Rheumatoid arthritis. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 1379-1390.
30. Calder PC, Yaqoob P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med.* 2009 Nov;121(6):148-157.
31. Whelan J, Surette ME, Hardardottir I, Lu D, Golemboski KA, Larsen E, Kinsella JE (1993) Dietary arachidonate enhances tissue arachidonate levels and eicosanoid production in Syrian hamsters. *J Nutr* 23:2174–2185.
32. Adam O (1992) Immediate and long range effects of the uptake of increased amounts of arachidonic acid. *Clin Invest* 70:721–727.
33. Dolphus R. Dawson III, Grishondra Branch-Mays, Octavio A. Gonzalez & Jeffrey L. Ebersole. Dietary modulation of the inflammatory cascade. *Periodontology* 2000, Vol. 64, 2014, 161–197.
34. Cleland LG, James MJ, Neumann MA, D'Angelo M, Gibson RA (1992) Linoleate inhibits EPA incorporation from dietary fish-oil supplements in human subjects. *Am J Clin Nutr* 55:395–399.
35. Grønn M, Gørbitz C, Christensen E, Leverson A, Ose I, Hagve TA, Christophersen BO (1991) Dietary n-6 fatty acids inhibit the incorporation of dietary n-3 fatty acids in thrombocyte and serum phospholipids in humans: a controlled dietetic study. *Scand J Clin Lab Invest* 51:255–263.
36. Whelan J (1996) Antagonistic effects of dietary arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr* 126 [Suppl 4]:1086S–1091S.
37. Michelle Micallef, Irene Munro, Melinda Phang and Manohar Garg. Plasman-3 polyunsaturated fatty acids are negatively associated with obesity. *British Journal of Nutrition* (2009), 102, 1370–1374.
38. Sutherland J, McKinnley B, Eckel RH. The Metabolic Syndrome and Inflammation. *Metabolic Syndr Rel Disord* 2004; 2: 82-104.
39. Fernandez-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24: 278-301.
40. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347-55.

41. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1796-808.
42. Stefan N, Kantartzis K, Haring HU. Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocrine Reviews*. 2008; 29(7): 939-960.
43. Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Bejum N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285: 106-115.
44. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The Metabolic Syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428.
45. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. *Adv Enzyme Regul* 1997;37: 197–237.
46. Gibney MJ, Hunter B. The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1993;47: 255–259.
47. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholme P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 2000; 35: 763–768.
48. Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in alphatocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest* 2000;30: 260–274.
49. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79: 101–108.
50. Simopoulos AP. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev Nutr Diet* 2009;99: 1–16.
51. Elvevoll EO, Barstad H, Breimo ES, Brox J, Eilertsen KE, Lund T, Olsen JO, Osterud B. Enhanced incorporation of n-3 fatty acids from fish compared with fish oils. *Lipids* 2006;41: 1109–1114.
52. Knapp HR, Hullin F, Salem N Jr. Asymmetric incorporation of dietary n-3 fatty acids into membrane aminophospholipids of human erythrocytes. *J Lipid Res* 1994; 35: 1283–1291.

53. Swanson JE, Lokesh BR, Kinsella JE. Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase of mouse cardiac sarcoplasmic reticulum is affected by membrane n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid content. *J Nutr* 1989;119: 364–372.
54. Swann PG, Parent CA, Croset M, Fonlupt P, Lagarde M, Venton DL, Le Breton GC. Enrichment of platelet phospholipids with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibits thromboxane A₂/ prostaglandin H₂ receptor binding and function. *J Biol Chem* 1990;265: 21692–21697.
55. Mabile L, Piolot A, Boulet L, Fortin LJ, Doyle N, Rodriguez C, Davignon J, Blache D, Lussier-Cacan S. Moderate intake of n-3 fatty acids is associated with stable erythrocyte resistance to oxidative stress in hypertriglyceridemic subjects. *Am J Clin Nutr* 2001;74: 449–456.
56. Witte TR, Salazar AJ, Ballester OF, Hardman WE. RBC and WBC fatty acid composition following consumption of an omega 3 supplement: lessons for future clinical trials. *Lipids Health Dis* 2010;9:31.
57. Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;77: 327–335.
58. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79: 101–108.
59. Kinsella JE, Lokesh B, Broughton S, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* 1990;6: 24–44.
60. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002;21: 495–505.
61. Calder PC, Yaqoob P, Newsholme EA. Triacylglycerol metabolism by lymphocytes and the effect of triacylglycerols on lymphocyte proliferation. *Biochem J* 1994; 298(Pt 3): 605–611.
62. Mahoney EM, Khoo JC, Steinberg D. Lipoprotein lipase secretion by human monocytes and rabbit alveolar macrophages in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79: 1639–1642.
63. Lee JY, Zhao L, Hwang DH. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr Rev* 2009;68:38–61.

64. Huang ZH, Bates EJ, Ferrante JV, Hii CS, Poulos A, Robinson BS, Ferrante A. Inhibition of stimulus-induced endothelial cell intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cellular adhesion molecule-1 expression by arachidonic acid and its hydroxy and hydroperoxy derivatives. *Circ Res*1997;80: 149–158.
65. Kim W, Fan YY, Barhoumi R, Smith R, McMurray DN, Chapkin RS. n-3 polyunsaturated fatty acids suppress the localization and activation of signaling proteins at the immunological synapse in murine CD4+ T cells by affecting lipid raft formation. *J Immunol*2008;181: 6236–6243.
66. Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest*1993;91: 651–660.
67. Ferrante A, Goh D, Harvey DP, Robinson BS, Hii CS, Bates EJ, Hardy SJ, Johnson DW, Poulos A. Neutrophil migration inhibitory properties of polyunsaturated fatty acids. The role of fatty acid structure, metabolism, and possible second messenger systems. *J Clin Invest*1994;93: 1063–1070.
68. De Caterina R, Spiecker M, Solaini G, Basta G, Bosetti F, Libby P, Liao J. The inhibition of endothelial activation by unsaturated fatty acids. *Lipids*1999; 34(Suppl.): S191–S194.
69. Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Chu A, Helton S. Fish oil modulates macrophage P44/ P42 mitogen-activated protein kinase activity induced by lipopolysaccharide. *J Parenter Enteral Nutr*2000;24: 159–163.
70. Adam O. Dietary fatty acids and immune reactions in synovial tissue. *Eur J Med Res*2003;8: 381–387.
71. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, Folkerts G, Friedmann PS, Frost GS, Guarner F, Løvik M, Macfarlane S, Meyer PD, M Rabet L, Serafini M, van Eden W, van Loo J, Vas Dias W, Vidry S, Winklhofer-Roob BM, Zhao J. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*2009;101(Suppl.1): S1–S45.
72. Simopoulos AP. The importance of the omega-6 / omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*2008; 233:674–688.
73. Arrington JL, Chapkin RS, Switzer KC, Morris JS, McMurray DN. Dietary n-3

polyunsaturated fatty acids modulate purified murine T-cell subset activation. *Clin Exp Immunol* 2001;125: 499–507.

74. Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr* 2002;87(Suppl.1): S31–S48.
75. Calder PC, Bond JA, Newsholme EA. Fatty acid inhibition of lipopolysaccharide-stimulated B lymphocyte proliferation. *Biochem Soc Trans* 1990;18: 904–905.
76. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NFkappa B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284: L84–L89.
77. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 2000;35: 763–768.
78. Tull SP, Yates CM, Maskrey BH, O Donnell VB, Madden J, Grimble RF, Calder PC, Nash GB, Rainger GE. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. *PLoS Biol* 2009;7:e1000177.
79. De Caterina R, Spiecker M, Solaini G, Basta G, Bosetti F, Libby P, Liao J. The inhibition of endothelial activation by unsaturated fatty acids. *Lipids* 1999; 34(Suppl.): S191–S194.
80. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112:1796-808.
81. Stefan N, Kantartzis K, Haring HU. Causes and metabolic consequences of fatty liver. *Endocrine Reviews*. 2008; 29(7): 939-960.
82. [Caughey GE](#), [Mantzioris E](#), [Gibson RA](#), [Cleland LG](#), [James MJ](#). The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. [Am J Clin Nutr](#). 1996 Jan;63(1):116-122.
83. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:810-820.
84. Sales C, Oliviero F, Spinella P. Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the diet of patients with rheumatic disease. *Reumatismo* 2008;60:95-101.
85. Kremer JM, Lawrence DA, Gayle FP et al. Effects of high dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Clinical and Immuno*

Correlates 1995;38(8):1107-1114.

86. Volker D, Fitzgerald P, major J. Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000;27:2343-2346.
87. Adam O, Beringer C, Kless T, Lemmen C, Adam A, Wiseman M, Adam P, Klimmek R, Forth W. [Anti-inflammatory effects of a low arachidonic acid diet and fish oil in patients with rheumatoid arthritis](#). *Rheumatol Int.* 2003 Jan;23(1):27-36.
88. [Sundrarjun T](#), [Komindr S](#), [Archararit N](#), [Dahlan W](#), [Puchaiwatananon O](#), [Angthararak S](#), [Udomsuppayakul U](#), [Chuncharunee S](#). Effects of n-3 fatty acids on serum interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and soluble tumour necrosis factor receptor p55 in active rheumatoid arthritis. *J Int Med Res.* 2004 Sep-Oct;32(5):443-454.
89. Yamanaka H, Tanaka Y, Inoue E, Hoshi D, Momohara S, Hanami K, Yunoue N, Saito K, Amano K, Kameda H, Takeuchi T. [Efficacy and tolerability of tocilizumab in rheumatoid arthritis patients seen in daily clinical practice in Japan: results from a retrospective study \(REACTION study\)](#). *Mod Rheumatol.* 2011 Apr;21(2):122-133.
90. Efthimiou P, Kukar M. [Complementary and alternative medicine use in rheumatoid arthritis: proposed mechanism of action and efficacy of commonly used modalities](#). *Rheumatol Int.* 2010 Mar;30(5):571-586.
91. [Proudman SM](#), [James MJ](#), [Spargo LD](#), [Metcalf RG](#), [Sullivan TR](#), [Rischmueller M](#), [Flabouris K](#), [Wechalekar MD](#), [Lee AT](#), [Cleland LG](#). Fish oil in recent onset rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind controlled trial within algorithm-based drug use. *Ann Rheum Dis.* 2013 Sep 30. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204145.
92. Kremer JM, Lawrence DA, Petrillo GF, Litts LL, Mullaly PM, Rynes RI, Stocker RP, Parhami N, Greenstein NS, Fuchs BR, et al. [Effects of high-dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping nonsteroidal antiinflammatory drugs. Clinical and immune correlates](#). *Arthritis Rheum.* 1995 Aug;38(8):1107-1114.
93. Cleland LG, Caughey GE, James MJ, Proudman SM. [Reduction of cardiovascular risk factors with longterm fish oil treatment in early rheumatoid arthritis](#). *J Rheumatol.* 2006 Oct;33(10):1973-1999.
94. German JB, Lokesh B, Kinsella JE. The effect of dietary fish oils on eicosanoid biosynthesis in peritoneal macrophages is influenced by both dietary n-6 polyunsaturated fats and total dietary fat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1988;34: 37-45.

95. Mayatepek E, Paul K, Leichsenring M, Pfisterer M, Wagner D, Domann M, Sonntag HG, Bremer HJ. Influence of dietary (n-3)-polyunsaturated fatty acids on leukotriene B4 and prostaglandin E2 synthesis and course of experimental tuberculosis in guinea pigs. *Infection* 1994;22:106–112.
96. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Effect of oral n-3 fatty acid supplementation on the immune response of young and older women. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991;21A: 245–248.
97. Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest* 1993;91: 651–660.
98. Grimble RF. Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. *New Horiz* 1994;2:175–185.
99. Trebble T, Arden NK, Stroud MA, Wootton SA, Burdge GC, Miles EA, Ballinger AB, Thompson RL, Calder PC. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fishoil supplementation in healthy men and response to 195 Dietary modulation of the inflammatory cascade antioxidant co-supplementation. *Br J Nutr* 2003;90: 405–412.
100. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222: 1–15.
101. Cazzola R, Russo-Volpe S, Miles EA, Rees D, Banerjee T, Roynette CE, Wells SJ, Goua M, Wahle KW, Calder PC, Cestaro B. Age- and dose-dependent effects of an eicosapentaenoic acid-rich oil on cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Atherosclerosis* 2007;193: 159–167.
102. Avula CP, Fernandes G. Modulation of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in murine salivary gland by dietary fatty acid ethyl esters. *Life Sci* 1999;65: 2373–2383.
103. Aggarwal BB, Takada Y, Shishodia S, Gutierrez AM, Oommen OV, Ichikawa H, Baba Y, Kumar A. Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. *Indian J Exp Biol* 2004;42: 341–353.
104. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004;82: 434–448.

105. Kaarniranta K, Salminen A. NF-kappaB signaling as a putative target for omega-3 metabolites in the prevention of age-related macular degeneration (AMD). *Exp Gerontol* 2009;44: 685–688.
106. Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U, Weber PC. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15: 622–628.
107. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NFkappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284: L84–L89.
108. Fan YY, Ly LH, Barhoumi R, McMurray DN, Chapkin RS. Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol* 2004;173: 6151–6160.
109. Calder PC. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Biol Res* 1998;31: 467–490.
110. Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Activation state alters the effect of dietary fatty acids on pro-inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cytokine* 2000;12: 1374–1379.
111. Abbate R, Gori AM, Martini F, Brunelli T, Filippini M, Francalanci I, Paniccia R, Prisco D, Gensini GF, Neri Serneri GG. n-3 PUFA supplementation, monocyte PCA expression and interleukin-6 production. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;54: 439–444.
112. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996: 63: 116–122.
113. Endres S, Meydani SN, Dinarello CA. Effects of omega 3 fatty acid supplements on ex vivo synthesis of cytokines in human volunteers. Comparison with oral aspirin and ibuprofen. *World Rev Nutr Diet* 1991;66: 401–406.
114. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J*

Nutr1991:121: 547–555.

115. Levy BD. Resolvins and protectins: natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*2010:82: 327–332.
116. Serhan CN. Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators. *J Periodontol* 2008: 79: 1520–1526.
117. Serhan CN. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008:79: 157–163.
118. Serhan CN, Arita M, Hong S, Gotlinger K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids*2004:39: 1125–1132.
119. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol*2007:28: 176–183.
120. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol*2005:174: 4345–4355.
121. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*2007:447: 869–874.
122. Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, Colgan SP. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J*2007:21: 3162–3170.
123. Ho KJ, Spite M, Owens CD, Lancero H, Kroemer AH, Pande R, Creager MA, Serhan CN, Conte MS. Aspirin-triggered lipoxin and resolvin E1 modulate vascular smooth muscle phenotype and correlate with peripheral atherosclerosis. *Am J Pathol*2010:177: 2116–2123.
124. Uddin M, Levy BD. Resolvins: natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. *Prog Lipid Res*2010:50: 75–88.
125. Nowak JZ. Anti-inflammatory pro-resolving derivatives of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2010:64: 115–132.
126. Serhan CN. Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. *Anesthesiol Clin* 2006:24: 341–364.

127. Herrera BS, Ohira T, Gao L, Omori K, Yang R, Zhu M, Muscara MN, Serhan CN, Van Dyke TE, Gyrko R. An endogenous regulator of inflammation, resolvin E1, modulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Br J Pharmacol*2008;155: 1214–1223.
128. Kantarci A, Van Dyke TE. Resolution of inflammation in periodontitis.*J Periodontol*2005;76: 2168–2174.
129. Seki H, Sasaki T, Ueda T, Arita M. Resolvins as regulators of the immune system.*ScientificWorldJournal*2010;10: 818–831.
130. Hasturk H, Kantarci A, Ohira T, Arita M, Ebrahimi N, Chiang N, Petasis NA, Levy BD, Serhan CN, Van Dyke TE. RvE1 protects from local inflammation and osteoclastmediated bone destruction in periodontitis.*FASEB J*2006: 20: 401–403.
131. Smith MR, O Malley AJ, Keating NL. Gonadotrophinreleasing hormone agonists, diabetes and cardiovascular disease in men with prostate cancer: which metabolic syndrome? *BJU Int*2008;101: 1335–1336.
132. Thorsdottir I, Tomasson H, Gunnarsdottir I et al. Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content.*Int J Obes (Lond)* 2007;31: 1560–1566.
133. Munro IA, Garg ML. Prior supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids promotes weight loss in obese adults: a double-blinded randomised controlled trial. *Food Funct* 2013;4: 650–658.
134. Burdge GC, Wootton SA. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr*2002;88: 411–420.
135. Burdge GC, Jones AE, Wootton SA. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alphaslinolenic acid metabolism in young men*. *Br J Nutr*2002;88: 355–363.
136. Baltzell JK, Wooten JT, Otto DA. Lipoprotein lipase in rats fed fish oil: apparent relationship to plasma insulin levels. *Lipids* 1991;26: 289–294.
137. Michelle Micallef, Irene Munro, Melinda Phang and Manohar Garg. Plasman-3 polyunsaturated fatty acids are negatively associated with obesity. *British Journal of Nutrition* (2009), 102, 1370–1374.

138. Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Bejum N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: 106-115.
139. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The Metabolic Syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428.
140. Mori TA, Beilin LJ. Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12:11–17.
141. Mozaffarian D, Wu JHY. (n-3) Fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J Nutr.* 2012;142:S614–25.
142. Rupp H. Omacor (Prescription omega-3 acid ethyl esters 90): from severe rhythm disorders to hypertriglyceridemia. *Adv Ther.* 2009;26: 675–690.
143. von Schacky C. A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2:251–262.
144. Wang S, Ma AQ, Song SW, Quan QH, Zhao XF, Zheng XH. Fish oil supplementation improves large arterial elasticity in overweight hypertensive patients. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62:1426–1431.
145. Sjoberg NJ, Milte CM, Buckley JD, Howe PR, Coates AM, Saint DA. Dose-dependent increases in heart rate variability and arterial compliance in overweight and obese adults with DHA-rich fish oil supplementation. *Br J Nutr.* 2010;103:243–248.
146. Hill AM, Buckley JD, Murphy KJ, Howe PRC. Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:1267–1274.
147. Siasos G, Tousoulis D, Oikonomou E, Zaromitidou M, Verveniotis A, Plastiras A, Kioufis S, Maniatis K, Miliou A, Siasou Z. Effects of omega-3 fatty acids on endothelial function, arterial wall properties, inflammatory and fibrinolytic status in smokers: a cross over study. *Int J Cardiol.* Epub 2011 Nov 17.
148. Pase MP, Grima NA, Sarris J. Do long-chain n-3 fatty acids reduce arterial stiffness? A meta-analysis of randomized controlled trials. *Br J Nutr.* 2011;106:974–980.
149. Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids.* 2012;165(6):638-647.

150. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
151. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:287–306.
152. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-1208.
153. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 936486.
154. Finkel T. Oxidative signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell.Biol.* 2003., 15: 247-254.
155. Finkel T. Redox dependent signal transduction. *FEBS letters* 2000., 476,52-54.
156. Mohr A, Buneker C, Gough RP, Zwacka RM. MnSOD protects colorectal cancer cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibition of Smac/DIABLO release. *Oncogene* 2008;27: 763-774.
157. Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Rad Biol Med* 2007; 43 (7):1023-1036.
158. Dale-Donna I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52(4):1-23.
159. Ferreira AR, Bonatto F, Pasquali MA, Poludor M, et al. Oxidative stress effects on the central nervous system of rats after acute exposure to ultra-high frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2006; 27: 487-493.
160. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York 1999.
161. Nelson DL and Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*, NY: W.H. Freeman and Company 2008; 5: 720-721.
162. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(10):502-508.
163. Santos NAG, Catao Beyera CS, Martins NM, Curti C. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetics metabolism and apoptosis in rat kidney

- mitochondria. *Cancer Chemoter Pharmacol* 2008;61:145-155.
164. Ten Kate M, van der Wal JBC, Cluiter W. The role of superoxide anions in the development of tumor recurrence. *Br J Cancer* 2006;95:1497-1503.
165. Novo E, Marra F et al. Dose dependent and divergent effects of superoxide anions on cell death proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut* 2006;55:90-97.
166. Singh A: Introduction: Interconversion of singlet oxygen and related species. *Photochem. Photobiol.* 1978;28:429-433.
167. Đorđević, V. B., Pavlović, D. D. and Kocić, G. M. (2000). Karakteristike slobodnih radikala. In: *Biohemija slobodnih radikala* (Đorđević, V. B., Pavlović, D. D. and Kocić, G. M., ec.). Tehnofarm d.o.o., Beograd, pp. 7-69.
168. Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(7):917-943.
169. Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE. Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. I. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(7):917-943.
170. Lo YY, Wong JM, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem.* 1996 28;271(26):15703-15707.
171. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
172. Jacob C, Winyard PG. Redox signaling and regulation in biology and medicine. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH&Co; 2009; p. 13-40.
173. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
174. [Cheng FC](#), [Jen JF](#), [Tsai TH](#). Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 Dec 5;781(1-2):481-496.
175. Scott G. Antioxidants the modern elixir. *Chem Britain* 1995; 31: 879-882.

176. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338 (1): 668–676.
177. Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ 2nd. The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 1992; 44 (2): 155-163.
178. Sevanian A, Davies KJA, Hochstein P. Serum pyruvate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1129S-34S.
179. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998;19(4-5):221-357.
180. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9265-9269.
181. Mayer B, Hemmens B. [Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells.](#) *Trends Biochem Sci.* 1997;22(12):477-481.
182. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 2006;46:235–276.
183. Cotgreave IA, Moldéus P, Orrenius S. [Host biochemical defense mechanisms against prooxidants.](#) *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1988;28:189-212.
184. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Letters* 2003; 540 (1-3): 3-6.
185. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidants compounds in biological systems. Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 577-586.
186. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266 (1-2): 37-56.
187. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors.* 1997;6(4):391-397.
188. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res*

- Commun. 1990;9(1):1-32.
189. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures, *Physiol Rev*, 1998; 78: 547-581.
 190. Pinazo-Durán MD, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, Zanón-Moreno V, Nucci C, Dolz-Marco R, et al. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging*. 2014;9:637-652.
 191. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(7):995-1014.
 192. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):1019-1026.
 193. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841-1856.
 194. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res*. 2004;43(3):200-227.
 195. Atsumi T, Tonosaki K, Fujisawa S. Salivary free radical-scavenging activity is affected by physical and mental activities. *Oral Dis*. 2008;14(6):490-496.
 196. Suárez A, Ramírez-Tortosa M, Gil A, Faus MJ. Addition of vitamin E to long-chain polyunsaturated fatty acid-enriched diets protects neonatal tissue lipids against peroxidation in rats. *Eur J Nutr*. 1999;38(4):169-176.
 197. Solans R, Motta C, Solá R, La Ville AE, Lima J, Simeón P, Montellà N, Armadans Gil L, Fonollosa V, Vilardell M. Abnormalities of erythrocyte membrane fluidity, lipid composition, and lipid peroxidation in systemic sclerosis: evidence of free radical-mediated injury. *Arthritis Rheum*. 2000;43(4):894-900.
 198. Rice-Evans C, Miller M, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci*. 1997;2(4):152-159.
 199. Halliwell B, Chirco S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(Suppl 5):715S-725S.
 200. Magalhães J, Ascensão A, Marques F, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Duarte JA. Effect of a high-altitude expedition to a Himalayan peak (Pumori, 7,161 m) on plasma and erythrocyte antioxidant profile. *Eur J Appl Physiol*. 2005;93(5-6):726-732.
 201. Watanabe H, Kobayashi A, Yamamoto T, Suzuki S, Hayashi H, Yamazaki N.

Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. *Free Radic Biol Med.* 1990;8(6):507-514.

202. Cooper RA. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med.* 1977;297(7):371-377.
203. Piñeiro-Corrales G, Lago Rivero N, Culebras-Fernández J.M. Role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease prevention. *Nutrición hospitalaria.* 2013;28:1-5.
204. Simopoulos AP. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients.* 2013;5(8):2901-2923.
205. Lee AL, Park Y. The association between n-3 polyunsaturated fatty acid levels in erythrocytes and the risk of rheumatoid arthritis in Korean women. *Ann Nutr Metab.* 2013;63(1-2):88-95.
206. Harris WS, Von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med.* 2004;39(1):212-220.
207. Hashimoto M, Shinozuka K, Gamoh S, Tanabe Y, Hossain MS, Kwon YM, et al. The hypotensive effect of docosahexaenoic acid is associated with the enhanced release of ATP from the caudal artery of aged rats. *J Nutr.* 1999;129(1):70-76.
208. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother.* 2006;60(9):502-507.
209. Probst R, Brandl R, Blumke M, Neumier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood. *Clin Chem* 1998; 44:1567-69.
210. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research.* In: Boca Raton, CRC Press; p. 123-132.
211. Pick E, Keisari Y (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161-70.
212. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
213. Green LC, Wagner, DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal*

Biochem 126:131-138.

214. Misra HP, Fridovich I (1972). The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175.
215. Beutler E (1982). *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. New York: Grune and Stratton.
216. Shi S, Gao Y, Wang L, Liu J, Yuan Z, Yu M. Elevated free fatty acid level is a risk factor for early postoperative hypoxemia after on-pump coronary artery bypass grafting: association with endothelial activation. *J Cardiothorac Surg*. 2015 Sep 17;10:122.
217. Harth S, Dreyfus H, Urban PF et al (1978) Direct thin-layer chromatography of gangliosides of total lipid extracts. *Anal Biochem* 86:543–551.
218. Folch J, Lees M, Stanley-Sloane GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226:497–523.
219. Christopherson SW, Glass RL (1969) Preparation of milk methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J Dairy Sci* 52:1289–1290.
220. Ray KK, Morrow DA, Gibson CM, Murphy S, Antman EM, Braunwald E. Predictors of the rise in vWF after ST elevation myocardial infarction: implications for treatment strategies and clinical outcome. An ENTIRE-TIMI 23 substudy. *Eur Heart J* 2005; 26:440-6.
221. Blann AD. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost* 2006; 95:49-55.
222. Balen S, Ružić A, Mirat J, Peršić V. Exercise induced von Willebrand Factor release-New model for routine endothelial testing. *Med Hypotheses* 2007; 69:1320-2.
223. McInnes I, Schett G (2011). The Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365:2205-19.
224. Senapati S, Banerjee S, Gangopadhyay DN. Evening primrose oil is effective in atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008; 74: 447-452.
225. del Val del Amo N, Ibanez Bosch R, Fito Manteca C, Gutierrez Polo R, Loza Cortina E (2006). Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: relation with disease aggressiveness. *Clin. Exp. Rheumatol* 24: 281–286.

226. Gerli R, Bartoloni Bocci E, Sherer Y, Vaudo G, Moscatelli S, Shoenfeld Y (2008). Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies with subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67(5):724-5.
227. Lopez-Longo FJ et al (2009). Association between anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and ischemic heart disease in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 61: 419–424.
228. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, et al (2003). Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 107:1303–1307.
229. Burut DF., Karim Y, Ferns GA (2010). The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology* 61 :679–689.
230. Jonsson SW, Backman C, Johnson O, et al (2001). Increased prevalence of atherosclerosis in patients with medium term rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 2597-602.
231. Grover S, Sinha RP, Singh U, Tewari S, Aggarwal A, Misra R (2006). Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis in India. *J Rheumatol* 33: 244–7.
232. Macías I, García-Pérez S, Ruiz-Tudela M, Medina F, Chozas N, Girón-González JA (2005). Modification of pro- and antiinflammatory cytokines and vascularrelated molecules by tumor necrosis factor- α blockade in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32(11):2102-8.
233. McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD (2001). Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 40(6):640-4.
234. Ertenli I, Kiraz S, Oztürk MA, Haznedaroğlu I, Celik I, Calgüneri M (2003). Pathologic thrombopoiesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 23(2):49-60.
235. Libby P (2008). Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 121(Suppl 1):S21-S31.
236. Khovidhunkit W (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: Mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45: 1169-1196.
237. Van Lenten BJ, Reddy ST, Navab M, Fogelman AM (2006). Understanding

changes in high density lipoproteins during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1687-1688.

238. Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B, et al (2001). Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: Possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis Rheum* 44: 2761-2767.
239. Sherer Y, Shoenfeld Y (2006). Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(2):99-106.
240. Suminori K; The Fukuoka Heart Study Group. Medication for Hypercholesterolemia and the Risk of Nonfatal Acute Myocardial Infarction A Case-Control Study in Japan. *Circ J* 2002; 66: 463-468.
241. Surya I, Mommersteeg M, Gorter G, Erkelens DW, Akkerman JWN. Abnormal platelet functions in a patient with abetalipoproteinemia. *Thromb Haemost* 1991; 65: 306-11.
242. Block LH, Knorr M, Vogt E. Low density lipoprotein cause general cellular activation with increased phosphatidylinositol turnover and lipoprotein catabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 85: 885-9.
243. Knorr M, Locker R, Vogt E. Rapid activation of human platelets by low concentration of LDL via phosphatidylinositol cycle. *Eur J Biochem* 1998; 172: 753-9.
244. Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW, Malle E. Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 961-70.
245. Takada K, Ishikawa S, Yokoyama N, Hosogoe N, Isshiki T. Effects of eicosapentaenoic acid on platelet function in patients taking long-term aspirin following coronary stent implantation. *Int Heart J.* 2014;55(3):228-33.
246. Stocker R, Keaney JF Jr (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84(4):1381-478.
247. Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6(6):265-78.
248. Cimen MYB, Cimen OB, Kacmaz M et al (2000) Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 19:275-277.

249. Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A (2011). Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis *Immunobiology* 216(9):1010-7.
250. Grabowski PS, Wright PK, van't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH(1997). Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 36: 651–5.
251. Ozkan Y, Yardym-Akaydyn S, Sepici A, Keskin E, Sepici V, Simsek B (2007). Oxidative status in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26(1):64–8.
252. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N (2007). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 40(3-4):167–71.
253. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, et al (2006). Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 24(4):307–11.
254. Costenbader H, Kang JH, Karlson EW (2010). Antioxidant intake and risks of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in women. *American Journal of Epidemiology* 172(2): 205–216.
255. Profumo E, Buttari B, Tosti ME, et al (2008). Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis in Autoimmunity: Role, Regulation and Disorders, F.L. Vogel and L. F. Zimmermann, Eds., Nova Science.
256. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS (2011). Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity *Int J Rheum Dis* 14(4):325-31.
257. Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshihara M et al (2002). Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 38:765–72.
258. Erdogan H, Fadillioglu E, Ozgocmen S et al (2004) Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 71:149–152.
259. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M et al (2005) Plasma total antioxidant capacity,

- lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 38:981–986.
260. Akyol O, Nuran I, Temel I et al (2001) The relationships between plasma and erythrocyte antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 68:311–317.
261. Paredes S, Girona J, Hurt-Camejo E, Vallve JC, Olive S, Heras M, Benito P, Masana L (2002). Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: association with inflammatory markers. *J Rheumatol* 29:2271-2277.
262. Balakumar P, Taneja G (2012) Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free Radic Biol Med* 53:271–279, Review.
263. Vanhoutte PM (2000). Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 81:271–7.
264. Karppi J, Nurmi T, Kurl S, Rissanen TH, Nyyssönen K (2010). Lycopene, lutein and beta-carotene as determinants of LDL conjugated dienes in serum Atherosclerosis 209(2):565-72.
265. Vipartene D, Iasiulevichute L, Butkene B, Valiukene K, Keturkene A, Redaitene E (2006). Pro- and antioxidant blood system in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ter Arkh.* 78(6):10-4.
266. Choi JW (2003). Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity. *Clinica Chimica Acta* 336:83-87.
267. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Fillooy JA, Gonzalez-Juanatey C, de Matias JM, Martin J, Dessein PH, Llorca J (2009). Short-term effect of anti-TNF-alpha therapy on nitric oxide production in patients with severe rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 27(3):452-8.
268. Profumo E, Di Franco M, Buttari B, Masella R, Filesi C, Tosti ME, Scrivo R, Scarno A, Spadaro A, Saso L, Riganò R. Biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Mediators Inflamm.* 2012.
269. Varming K, Schmidt EB, Svaneborg N et al (1995) The effect of n 3 fatty acids on neutrophil chemiluminescence. *Scand J Clin Lab Invest* 55:47–52.
270. Luostarinen R, Saldeen T (1996) Dietary fish oil decreases superoxide generation

- by human neutrophils: relation to cyclooxygenase pathway and lysosomal enzyme release. *Prost Leuk Essent Fatty Acids* 55:167–172.
271. Calder PC (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83:1505–1519, Review.
272. Fisher M, Levine PH, Weiner BH et al (1990) Dietary n3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in monocyte enriched preparation of leukocytes. *Am J Clin Nutr* 51:804–808.
273. Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G et al (2001) Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 36:1183–1193.
274. Healy DA, Wallace FA, Miles EA et al (2000) The effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 35:763–768.
275. Kew S, Banerjee T, Minihane AM et al (2003) Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* 77:1287–1295.
276. Miles EA, Banerjee T, Dooper MWBW et al (2004) The influence of different combinations of γ -linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr* 91:893–903.
277. Halvorsen DA, Hansen J-B, Grimsgaard S et al (1997) The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. *Lipids* 32:935–942.
278. Veselinovic M, Barudzic N, Vuletic M et al (2014) Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem* 391:225–232.
279. Popovic T, Borozan S, Arsic A et al (2012) Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male Wistar rats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 96:1020–1029.
280. Mahmoodi MR, Kimiagar M, Mehrabi Y (2014) The effects of omega-3 plus vitamin E and zinc plus vitamin C supplementation on cardiovascular risk markers in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Ther Advanc Endocrin Metab* 5(4):67–76.

281. Gupta S, Sharma TK, Kaushik GG et al (2011) Vitamin E supplementation may ameliorate oxidative stress in type 1 diabetes mellitus patients. *Clin Lab* 57:379–8.
282. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B (2008). von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 117(11):1449-1459.
283. Derhaschnig U, Jilma B (2009). Assessment of platelets and the endothelium in patients presenting with acute coronary syndromes—is there a future? *Thrombosis and Haemostasis* 102(6):1144–1148.
284. Dessein PH, Joffe BI, Singh S (2005). Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7(3):R634-43.
285. Paczuski R, Iwan-Zietek I, Kotschy M, Bielawska J, Sadkiewicz S. Von Willebrand factor in plasma of patients with rheumatoid arthritis and lupus erythematosus. *Pol Merkur Lekarski*. 1998 May;4(23):254-6.
286. Tousolis D, Antoniades C, Bosinakou E, Kotsopoulou M, Tsoufis C, Marinou K, Charakida M, Stefanadi E, Vavuranakis M, Latsios G, Stefanadis C (2007). Differences in inflammatory and thrombotic markers between unstable angina and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 115:203-207.
287. Wallberg-Jonsson S, Ohman M, Rantapaa-Dahlqvist S (2004). Which factors are related to the presence of atherosclerosis in rheumatoid arthritis? *Scand J Rheumatol* 33:373–379.
288. McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD (2001). Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 40(6):640-4.
-
289. Ohrvall M, Berglund L, Vessby B: Sagittal abdominal diameter compared with other anthropometric measurements in relation to cardiovascular risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000, 24(4):497-501.
290. Valsamakis G, Chetty R, Anwar A, Banerjee AK, Barnett A, Kumar S: Association of simple anthropometric measures of obesity with visceral fat and the

- metabolic syndrome in male Caucasian and Indo-Asian subjects. *Diabet Med*2004, 21(12):1339-1345.
291. Gustat J, Elkasabany A, Srinivasan S, Berenson GS: Relation of abdominal height to cardiovascular risk factors in young adults: the Bogalusa heart study. *American journal of epidemiology* 2000, 151(9):885-891.
 292. Riserus U, Arnlov J, Brismar K, Zethelius B, Berglund L, Vessby B: Sagittal abdominal diameter is a strong anthropometric marker of insulin resistance and hyperproinsulinemia in obese men. *Diabetes Care*2004, 27(8):2041-2046.
 293. Turcato E, Bosello O, Di Francesco V, Harris TB, Zoico E, Bissoli L, Fracassi E, Zamboni M: Waist circumference and abdominal sagittal diameter as surrogates of body fat distribution in the elderly: their relation with cardiovascular risk factors. *Int J Obes Relat Metab Disord*2000, 24(8):1005-1010.
 294. Richelsen B, Pedersen SB: Associations between different anthropometric measurements of fatness and metabolic risk parameters in non-obese, healthy, middle-aged men. *Int J Obes Relat Metab Disord*1995, 19(3):169-174.
 295. Empana JP, Ducimetiere P, Charles MA, Jouven X: Sagittal abdominal diameter and risk of sudden death in asymptomatic middle-aged men: the Paris Prospective Study I. *Circulation*2004, 110(18):2781-2785.
 296. Seidell JC, Andres R, Sorkin JD, Muller DC: The sagittal waist diameter and mortality in men: the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Int J Obes Relat Metab Disord*1994, 18(1):61-67.
 297. Zamboni M, Turcato E, Armellini F, Kahn HS, Zivelonghi A, Santana H, Bergamo-Andreis IA, Bosello O: Sagittal abdominal diameter as a practical predictor of visceral fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998, 22(7):655-660.
 298. Sjöström L, Lönn L, Chowdhury B: The sagittal diameter is a valid marker of the visceral adipose tissue volume. In *Progress in Obesity Research* Edited by: Angel A, Andersson H, Bouchard C, Lau L, Leiter L, Medelson R. London , John Libbey; 1996:309-319.
 299. Keller C, Chintapalli K, Lancaster J: Correlation of anthropometry with CT in Mexican-American women. *Research in nursing & health* 1999, 22(2):145-153.
 300. Riserus U, Arnlov J, Brismar K, Zethelius B, Berglund L, Vessby B: Sagittal

abdominal diameter is a strong anthropometric marker of insulin resistance and hyperproinsulinemia in obese men. *Diabetes Care* 2004, 27(8):2041-2046.

301. Takahashi, Y., and Ide, T. (1999) Effect of Dietary Fats Differing in Degree of Unsaturation on Gene Expression in Rat Adipose Tissue, *Ann. Nutr. Metab.* 43, 86–97.
302. Raclot, T., Groscolas, R., Langin, D., and Ferre, P. (1997) Site Specific Regulation of Gene Expression by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Rat White Adipose Tissues, *J. Lipid Res.* 38, 1963–1972.
303. Shillabeer, G., and Lau, D.C. (1994) Regulation of New Fat Cell Formation in Rats: The Role of Dietary Fats, *J. Lipid Res.* 35, 592–600.
304. Azain, M.J. (2004) Role of Fatty Acids in Adipocyte Growth and Development, *J. Anim. Sci.* 82, 916–924.
305. Hill, J.O., Peters, J.C., Lin, D., Yakubu, F., Greene, H., and Swift, L. (1993) Lipid Accumulation and Body Fat Distribution Is Influenced by Type of Dietary Fat Fed to Rats, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 17, 223–236.
306. Ikemoto, S., Takahashi, M., Tsunoda, N., Maruyama, K., Itakura, H., and Ezaki, O. (1996) High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia and Obesity in Mice: Differential Effects of Dietary Oils, *Metabolism* 45, 1539–1546.
307. Hun, C.S., Hasegawa, K., Kawabata, T., Kato, M., Shimokawa, T., and Kagawa, Y. (1999) Increased Uncoupling Protein2 mRNA in White Adipose Tissue, and Decrease in Leptin, Visceral Fat, Blood Glucose, and Cholesterol in KK-Ay Mice Fed with Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Addition to Linolenic Acid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 85–90.
308. Oudart, H., Groscolas, R., Calgari, C., Nibbelink, M., Leray, C., Le Maho, Y., and Malan, A. (1997) Brown Fat Thermogenesis in Rats Fed High-Fat Diets Enriched with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 955–962.
309. Lapillonne, A., Clarke, S.D., and Heird, W.C. (2004) Polyunsaturated Fatty Acids and Gene Expression, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7, 151–156.
310. Raclot, T., and Oudart, H. (1999) Selectivity of Fatty Acids on Lipid Metabolism and Gene Expression, *Proc. Nutr. Soc.* 58, 633–646.
311. Belzung, F., Raclot, T., and Groscolas, R. (1993) Fish Oil n-3 Fatty Acids Selectively Limit the Hypertrophy of Abdominal Fat Depots in Growing Rats Fed High-

Fat Diets, *Am. J. Physiol.* 264, R1111–R1118.

312. Cha, S.H., Fukushima, A., Sakuma, K., and Kagawa, Y. (2001) Chronic Docosahexaenoic Acid Intake Enhances Expression of the Gene for Uncoupling Protein 3 and Affects Pleiotropic mRNA Levels in Skeletal Muscle of Aged C57BL/6njl Mice, *J. Nutr.* 131, 2636–2642.
313. Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Kim, H., and Ezaki, O. (1999) Up-Regulation of Liver Uncoupling Protein-2 mRNA by Either Fish Oil Feeding or Fibrate Administration in Mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 879–885.
314. Sinclair, A.J., Attar-Bashi, N.M., and Li, D. (2002) What Is the Role of α -Linolenic Acid for Mammals? *Lipids* 37, 1113–1123.
315. Ruxton, C.H., Reed, S.C., Simpson, M.J., and Millington, K.J. (2004) The Health Benefits of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Review of the Evidence, *J. Hum. Nutr. Diet.* 17, 449–459.
316. Couet, C., Delarue, J., Ritz, P., Antoine, J.-M., and Lamisse, F. (1997) Effect of Dietary Fish Oil on Body Fat Mass and Basal Fat Oxidation in Healthy Adults, *Int. J. Obes.* 21, 637–643.
317. Mori, T.A., Bao, D.Q., Burke, V., Puddey, I.B., Watts, G.F., and Beilin, L.J. (1999) Dietary Fish as a Major Component of a Weight-Loss Diet: Effect on Serum Lipids, Glucose, and Insulin Metabolism in Overweight Hypertensive Subjects, *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 817–825.
318. Oudart, H., Trayhurn, P., and Rayner, D.V. (2000) Effect of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Uncoupling Protein 1-3 Gene Expression, *Int. J. Obes. Metab. Disord.* 24 (Suppl. 1), S130 (Abstract No. 424).
319. Amusquivar, E., and Herrera, E. (2003) Influence of Changes in Dietary Fatty Acids During Pregnancy in Placental and Fetal Fatty Acid Profile in the Rat, *Biol. Neonate* 83, 136–145.
320. Massiera, F., Saint-Marc, P., Seydoux, J., Murata, T., Kobayashi, T., Narumiya, S., Guesnet, P., Amri, E.Z., Negrel, R., and Ailhaud, G. (2003) Arachidonic Acid and Prostacyclin Signaling Promote Adipose Tissue Development: A Human Health Concern? *J. Lipid Res.* 44, 271–279.
321. Sessler, A.M., and Ntambi, J.M. (1998) Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of

Gene Expression, *J. Nutr.* 128,923–926.

322. Ringbom, T., Huss, U., Stenholm, A., Flock, S., Skattebol, L., Perera, P., and Bohlin, L. (2001) COX-2 Inhibitory Effects of Naturally Occurring and Modified Fatty Acids, *J. Nat. Prod.* 64, 745–749.
323. Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Biol Med* 1997; 400: 589–97.
324. Babcock TA, Novak T, Ong E, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. Modulation of lipopolysaccharide-stimulated macrophage tumor necrosis factor- α production by ω -3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10. *J Surg Res* 2002; 107: 135–9.
325. Renier G, Skamene E, de Sanctis J, Radzioch D. Dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice: modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1515–24.
326. Sadeghi S, Wallace FA, Calder PC. Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice. *Immunology* 1999; 96: 404–10.
327. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA, Gorbach SL. Oral (ω -3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr* 1991; 121: 547–55
328. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor and interleukin 1 β production of diets enriched in ω -3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 116–22.
329. Calder PC. ω -3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1505S–19S.
330. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, Sherman M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 810–20.
331. Esperson GT, Grunnet N, Lervang HH, Nielsen GL, Thomsen BS, Faarvang KL, Dyerberg J, Ernst E. Decreased interleukin-1 β levels in plasma from rheumatoid arthritis patients after dietary supplementation with ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Clin*

- Rheumatol 1992; 11: 393–5.
332. Kolahi S, Ghorbanihaghjo A, Alizadeh S, Rashtchizadeh N, Argani H, Khabazzi AR, Hajjalilo M, Bahreini E. Fish oil supplementation decreases serum soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in female patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2010; 43: 576–80.
333. Belch JJ, Hill A. Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. *Am J Clin Nutr* 2000;71:S352–6.
334. Senapati S, Banerjee S, Gangopadhyay DN. Evening primrose oil is effective in atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008; 74: 447-452.
335. Millar JH, Zilkha KJ, Longman MJ, Wright HP, Smith AD, Belin J, et al. Double blind trial of linoleate supplementation of the diet in multiple sclerosis. *BMJ* 1973;31:765-8.
336. Nikolaidis MG, Mougios V (2004) Effects of exercise on the fatty acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med* 34:1015–1076.
337. Clarke, R., Shipley, M., Armitage, J., Collins, R., & Harris, W. (2009). Plasma phospholipid fatty acids and CHD in older men: Whitehall study of London civil servants. *British Journal of Nutrition*, 102, 279-284.
338. Simon, J.A., Hodgkins, M.L., Browner, W.S., Neuhaus, J.M., Bernert, J.T. Jr, & Hulley, S.B. (1995). Serum fatty acids and the risk of coronary heart disease. *American Journal of Epidemiology*, 142, 469-476.
339. Cvetkovic, Z., Vucic, V., Cvetkovic, B., Petrovic, M., Ristic Medic, D., Tepsic, J., et al. (2010). Abnormal fatty acid distribution of the serum phospholipids of patients with nonHodgkin lymphoma. *Annals of Hematology*, 89, 775-782.
340. Dyntar, D., Eppenberger-Eberhardt, M., Maedler, K., Pruschy, M., Eppenberger, H.M., Spinass, G.A., et al. (2001). Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes*, 50, 2105-2113.
341. Kelly, F.D., Sinclair, A.J., Mann, N.J., Turner, A.H., Abedin, L., & Li, D. (2001). A stearic acid-rich improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55, 88-96.
342. Evans, L.M., Cowey, S.L., Siegal, G.P., & Hardy, R.W. (2009). Stearate

preferentially induces apoptosis in human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 61, 746-753.

343. Zhou, L., & Nilsson, A. (2001). Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *Journal of Lipid Research*, 42, 1521-1542.
344. Pedersen, B., Bruunsgaard, H., Ostrowski, K., Krabbe, K., Hansen, H., Krzywkowski, K., et al. (2000). Cytokines in aging and exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 21(Suppl 1), 4S-9S.
345. Simopoulos, A. (2003). Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 92,1-22.
346. World Health Organization. (1995). Fats and oils in human nutrition: report of a joint expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. *FAO Food & Nutrition Paper*, 57,1-147.
347. Darlington LG, Stone TW (2001) Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr* 85:251–269, Review.