



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Маријана Томић-Смиљанић**

**Утицај генских варијанти ензима метаболизма масних киселина код  
пацијената оболелих од реуматоидног артритиса**

**Докторска дисертација**

**Ментор: др сци. мед. Александра Томић Лучић, редовни професор**

**Крагујевац, 2019. године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>	
Име и презиме: Маријана Томић Смиљанић	
Датум и место рођења: 02.08.1974, Београд	
Садашње запослење: Директор цивилног ваздухопловства Републике Србије, Београд	
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>	
Наслов: Утицај генетских варијанти ензима метаболизма масних киселина на њихов ефекат код пацијената са реуматоидним артритисом	
Број страница: 164	
Број слика: слика 4, табела 29, графика 15	
Број библиографских података: 378	
Установа и место где је рад израђен:	
1. Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац	
2. Одељење реуматологије, Клинички Центар Крагујевац, Крагујевац	
3. Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, Београд	
4. Институт за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, Београд	
Научна област (УДК): Медицина	
Ментор: проф др Алелсандра Томић Лучић	
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>	
Датум пријаве теме: 06.09. 2017.	
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-1209/9 од 11.01.2018.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Доц др Мирјана Веселиновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, председник Др Соња Павловић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, члан Проф др Милан Петронијевић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске Академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Интерна медицина, члан	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
Доц др Мирјана Веселиновић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, председник Др Соња Павловић, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, члан Проф др Милан Петронијевић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске Академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Интерна медицина, члан	
Датум одбране дисертације:	

## САЖЕТАК

**Увод:** Реуматоидни артритис (РА) карактерише хронично запаљење, разарање зглобова и повећан ризик за кардиоваскуларна обољевања. Унос храном омега-3 и омега-6 полинезасићених масних киселина утиче на инфламацију и кардиоваскуларни ризик. Генетске варијације утичу на начин на који тело одговара на неке нутријенте и састојке хране, и које материје се могу разградити и исправно искористити.

**Циљ:** Проценити улоге генетичких варијанти у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина у модификацији клиничког ефекта суплементација са омега-3 и омега-6 масним киселинама, и утицај суплементација са омега-3 и омега-6 масним киселинама на активност болести, оксидативни стрес, ендотелну функцију и хемостазу код пацијената са РА.

**Материјал и методе:** 60 пацијенткиња са РА је подељено у прву групу (20 пацијената) који су узимали 5 гел капсула Омега 3Кардио® у току 3 месеца, другу групу (20 пацијената) који су узимали по 3 гел капсула Омега 3Кардио® и две гел капсуле уља ноћурка у току 3 месеца и трећу, контролну групу (20 пацијената) који су нису узимали суплементацију. Рађена је анализа генетичких варијанти у генима који кодирају ензиме метаболизма пута омега-3 и омега-6 масних киселина: rs174556, rs174561, rs3834458, rs174570 и rs968567 по методологији заснованој на PCR-укао и сквенцирање по Sangerуабиохемијске и хематолошке анализе су урађене у лабораторијима Клиничког центра Крагујевац. Концентрација масних киселина у крви је урађена пре и после суплементације методом гасне хроматографије. Редокс статус је одређиван спектрофотометријски.

**Резултати:** Присуство одређених генетичких варијанти гена за ензиме десатуразе масних киселина код пацијената са РА који су узимали суплементацију омега 3 и омега 6 масним киселинама у току 3 месеца утичу на концентрацију арахидонске киселине и докозахексаеноинска киселина у фосфолипидима еритроцита, као и на смањење параметара инфламације у односу на контролну групу. Суплементација омега3 и омега 6 масним киселинама редукује агрегацију тромбоцита код пацијента са РА. Прооксидациони и антиоксидациони параметри су у групама пацијената са РА које су узимале суплементацију омега 3 и омега 6 масним киселинама показали смањење оксидационог стреса и повећање активности антиоксидационог система заштите. Суплементација омега

3 и омега 6 масним киселинама код пацијената са РА утиче на смањење активности болести.

**Закључак:** Код пацијената са РА који су узимали суплементацију омега 3 и омега 6 масним киселинама долази до смањења активности болести, параметара инфламације, хемостазе и оксидативног стреса. Геномске информације доносе боље разумевање интеракција гена и нутијената, а с крајњим циљем развоја персонализираних смерница за правилну исхрану која може допринети лечењу реуматоидног артритиса.

**Кључне речи:** реуматоидни артритис, омега 3/омега 6 масне киселине, нутригенетика, оксидациони стрес

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by chronic inflammation, joint destruction and an increased risk for cardiovascular morbidity dietary intakes of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids affects inflammation and cardiovascular risk. Genetic variations affect the way the body responds to certain nutrients and food components, and materials that can break down and properly utilized.

**Aim:** To assess the role of genetic variants in genes encoding enzymes in the metabolic pathway of omega-3 and omega-6 fatty acids in the modification of the clinical effect of supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids, and the effect of supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids on the activity of the disease, oxidative stress, endothelial function and hemostasis in patients with RA

**Material and methods:** 60 patients with RA is divided into the first group (20 patients), to which 5 of gel capsules Omega 3 Kardio® for 3 months, the second group (20 patients) who have taken after 3 of gel capsules Omega 3 Kardio® and two gel capsules oil evening primrose oil for 3 months, and the third, control group (20 patients) who were taking no supplements. Performed the analysis of genetic variants in genes encoding the metabolic enzyme times omega-3 and omega-6 fatty acids: rs174556, rs174561, rs3834458, rs174570 and rs968567 according to a methodology based on the PCR as well as skvenciranje by Sanger and the biochemical and haematological analyzes were performed in laboratories of Clinical center Kragujevac. Is the



concentration of fatty acids in blood was performed before and after the supplementation of the GC method. Redox status was determined by spectrophotometry

**Results:** The presence of specific genetic variants of the gene for the enzyme fatty acid desaturases in RA patients who received supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids for 3 months, affecting the concentration of arachidonic acid and docosahexaenoic acid in the erythrocyte phospholipids, as well as the reduction of the parameters of inflammation in relation to control group. Supplementation of omega 3 and omega 6 fatty acids reduces platelet aggregation in a patient with RA. Prooxidant and antioxidant actions are parameters in the groups of patients with RA who received supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids showed a decrease in oxidative stress and the increase in activity of the antioxidant protection system. Supplementation of omega 3 and omega 6 fatty acids in patients with RA affects the reduction in disease activity.

**Conclusions:** The presence of specific genetic variants of the gene for the enzymes desaturase in patients with RA who received supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids, a decrease in disease activity parameters of inflammation, hemostasis and oxidative stress. Genomic information yields better understanding of the interaction of genes and of nutrient, and with the ultimate goal of developing personalized guidelines for proper nutrition that can contribute to the treatment of rheumatoid arthritis. disease.

**Key words:** rheumatoid arthritis, omega-3/omega-6 fatty acids, nutrigenetic, oxidative stress

## **ЗАХВАЛНИЦА**

Менторки проф. др Александри Томић Лучић изражавам захвалност на помоћи и разумевању током целог процеса израде и писања докторске дисертације, на свим идејама и корисним саветима, предлозима и подршци.

Велику захвалност дугујем целој екипи Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, запосленима у Одељењу реуматологије, Клиничког Центра Крагујевац, екипи Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду. и екипи Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду.

Посебну захвалност дугујем свом супругу, својој породици и пријатељима, за подршку и мотивацију, на свим речима којима су ме охрабривали и подстицали.

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b>	1
1.1. Реуматоидни артритис	2
1.1.1. Дефиниција и преваленца	2
1.1.2. Клиничка слика	2
1.1.3. Дијагноза	4
1.1.4. Прогноза	7
1.1.5. Лечење	9
1.1.6. Лекови који се користе	12
1.1.6.1. Аналгетици	12
1.1.6.2. Лекови који мењају ток болести	12
1.1.6.3. Биолошки лекови	13
1.1.6.4. Кортикостероиди	14
1.1.7. Физијатријско лечење реуматоидног артритиса	14
1.1.8. Други облици лечења	14
1.1.9. Важност режима исхране	15
1.2. Полинезасићене масне киселине	16
1.2.1. Природни извори полинезасићених масних киселина	17
1.2.2. Однос n-6 : n-3 полинезасићених масних киселина	17
1.2.3. Инкорпорирање масних киселина у ћелијске структуре	18
1.2.4. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на модулацију функције ћелија имунског система	20
1.2.5. Биолошки ефекти еиконасоида	22
1.2.6. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на цитокине, хемокине, факторе раста и ћелије имуног система	23
1.2.7. Утицај n-3 полинезасићених масних киселина на телесну композицију	25
1.2.8. Протективно дејство n-3 полинезасићених масних киселина	26

1.3. Генетика	28
1.3.1. Фармакогенетика	29
1.3.2. Нутригенетика	31
1.3.3. Гени	35
1.3.3.1. FADS1 (Fatty acid desaturase 1 ) ген	35
1.3.3.2. FADS2 (Fatty acid desaturase 2 ) ген	37
<b>2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА</b>	41
2.1. Циљеви студије	41
2.2. Хипотезе студије	42
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	44
3.1. Врста студије	45
3.2. Испитаници	45
3.3. Биохемијске анализе	47
3.4. Одређивање гена	47
3.5. Одређивање параметара хемостазе и оксидативног стреса	48
3.5.1.Одређивање антигена за Фон Вилебрандов фактора (vWFAg)	48
3.5.2.Одређивање активности фон Вилебрандовог фактора (vWFAct)	48
3.5.3. Одређивање индекса агрегације тромбоцита (TRAP)	49
3.5.4.Одређивање параметара оксидационог стреса	50
3.5.4.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ )	50
3.5.4.2. Одређивање концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ )	51
3.5.4.3. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	52
3.5.4.4. Одређивање концентрације азот монооксида ( $NO^{\cdot}$ )	53
3.5.4.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)	55
3.5.4.6. Одређивање активности каталазе (CAT)	56
3.5.4.7. Одређивање активности глутатиона (GSH)	56
3.6.. Одређивање масних киселина	57
3.7. Одређивање антропометријских карактеристика	58
3.8. Статистичка обрада података	58

<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b>	60
4.1. Антропометријске, линичке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	61
4.2. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	62
4.2.1. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре суплементације	62
4.2.2. Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом после суплементације	64
4.2.3. Поређење клиничких и лабораторијских карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом у оквиру сваке групе после периода суплементације	66
4.3. Карактеристике лабораторијских параметара пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	69
4.3.1. Карактеристике лабораторијских параметара пацијената са реуматоидним артритисом пре периода суплементације	69
4.3.2. Карактеристике лабораторијских параметара пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације	71
4.3.3. Поређење карактеристике лабораторијских параметара пацијената са реуматоидним артритисом у оквиру сваке групе после периода суплементације	72
4.4. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	75
4.4.1. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом пре периода суплементације	75
4.4.2. Одређивање степена агрегације тромбоцита код пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације	76
4.5. Поређење нивоа параметара оксидативног стреса пре и после периода суплементације у оквиру сваке групе	77
4.6. Клиничко-антропометријске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	80
4.7. Одређивање концентрације масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом пре и после периода суплементације	82
4.8. Одређивање генетичких варијанти у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом	89

<b>5. ДИСКУСИЈА</b>	105
5.1. Утицај различитих суплементација омега-3 и омега-3/омега-6 масних киселина на телесне, клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	109
5.2. Утицај различитих суплементација омега-3 и омега-3/омега-6 масних киселина на клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	110
5.3. Утицај различитих суплементација омега-3 и омега-3/омега-6 масних киселина на параметаре оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом	114
5.4. Утицај различитих суплементација омега-3 и омега-3/омега-6 масних киселина на телесне карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом	117
5.5. Утицај различитих суплементација омега-3 и омега-3/омега-6 масних киселина на концентрацију масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом	118
5.6. Утицај различитих генетичких варијанти FADS на ефекат различитих суплементација омега-3 и омега-3/омега-6 масних киселина на концентрацију масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом	123
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b>	126
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b>	129

# **I**

## **УВОД**

## 1.1. РЕУМАТОИДНИ АРТРИТИС

### 1.1.1. Дефиниција и преваленца

Реуматоидни артритис (РА) је хронична, инфламацијска, системска болест која се најчешће испољава у диартротичним зглобовима. РА је једна од најчешћих системских (орган неспецифичних) аутоимунских болести. Преваленца реуматоидног артритиса 1,16% код жена и 0,44% код мушкараца. Преваленца се повећава са годинама и код мушкараца и код жена (1).

Инциденција РА расте са годинама до 7.деценије, а најчешће је појава болести (максимум инциденције) између 4. и 6. деценије. Жене оболевају просечно 2-3 пута чешће него мушкарци. Делимично је разлика у броју оболелих по половима је хормонске природе с обзиром да се умањује после 50.године живота. Преваленца у развијеним земаљама варира 0,5-1,0%. Екстремна захваћеност се креће око 5% код америчких индијанаца, док у популацији западне Нигерије ово обољење није нађено (2-4). 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).

Реуматоидни артритис је болест непознате етиологије. Неколико различитих генетских обележја предиспонирају настанак РА, али ни једно није присутно код свих болесника. Нема сигурне епидемиолошке повезаности РА са неким одређеним патогеним микроорганизмом. Највероватније је да је РА резултат истовременог утицаја генетских фактора ризика, спољашњег чиниоца и случајних,соматских промена у мускуло-скелетном и имунском систему (1).

### 1.1.2. Клиничка слика

Почетак болести је постепен и неспецифичан. Полиартикуларни синовитис малих зглобова шака и стопала са симетричном локализацијом уз поштеђеност дисталних интерфалангних зглобова је натипичнија појединачна одлика реуматоидног артритиса, мада је доминантна страна често много теже оштећена. Главна места локализације реуматоидног артритиса су ручја, метакарпофалангни и проксимални интерфалангни



зглобови шака, скочни зглобови и метатарзогалангни и зглобови колена, рамена, кукова и лактова.

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. Овај феномен зависи од дужине имобилизације а не од доба дана..

Структурна оштећења код болесника са РА настају између прве и друге године обољења. Структурална оштећења прогредирају као линеарна функција претходних синовитиса.

Системске манифестације РА су значајни и чест део реуматоидног патолошког процеса. Термин реуматоидни артритис наводи на погрешно мишљење, јер је и клинички и патолошки стање од почетка системско, тако да је термин реуматоидна болест можда адекватнија. Значај системских манифестација је условљен хроничном природом обољења, а потпуно развијене појединачне лезије могу да буду фаталне. (1).Једна од постојећих класификација системских манифестација је дата у табели 1.

Табела 1.Подела системских амнифестација у реуматоидном артритису

I	Основне системске појаве реуматоидне болести	-Серозитис -Васкулитис -Нодулуси
II	Придружени аутоимунски феномени (карактеристике зависне од хроничне имунске стимулације)	-Анемија -Лимфаденопатија -Felty-ев синдром
III	Удружени синдроми	-Sicca syndrome -Фиброзирајући алвеолитис
IV	Компликације и коморбидитети	-Амилоидоза -Остеопенија -Кардиоваскуларне болести
V	Компликације удружене са лековима	-Гастритис, Нефропатија

Од коморбидитета код оболелих од РА честа је депресија (2-3 пута чешћа него у општој популацији), кардиоваскуларне болести и малигнитети. РА преставља независтан фактор

ризика за појаву других хроничних болести, најчешће кардиоваскуларних и малигних. Ризик од лимфолиферативних болести је 4-5 чешћи него у општој популацији. Од солидних тумора запажено је да се код оболелих од РА чешће налазе тумори бубрега, вагине и вулве.

Кардиоваскуларне болести најчешћи су узрок смрти и јављају се код око 40% пацијената оболелих од РА. Оболели од РА имају двоструко већи ризик да умру од инфаркта миокарда или цереброваскуларног инсулта од опште популације, при чему се ризик повећава уколико болест траје преко 10 година. Повишен кардиоваскуларни ризик код оболелих од РА се не може објаснити традиционалним факторима ризика. Патогенетски механизми настанка повишеног кардиоваскуларног ризика код оболелих од РА укључују дислипидемију, инсулинску резистенцију, протромботско стање, хиперхомоцистеинемију, убрзану атеросклерозу посредовану Т-ћелијском активацијом коај води до ендотелне дисфункције. Хронична инфламација се налази у основи убрзаног настанка атеросклерозе код оболелих од РА. Ц-реактивни протеин је независан фактор ризика за развој атеросклерозе. Дислипидемија код оболелих од РА се углавном повезују са одговором акутне фазе запаљења. Док се резултати разних аутора разликују о утицају активности болести на висину укупног и LDL холестерола, ипак је запажено де је вредност HDL холестерола снижена, што доводи до пораста атерофгеног индекса. Код оболелих од РА запажена је и инсулинска резистенција која је у корелацији са степеном инфламације. Све ове метаболичке абнормалности чине заједно “метаболички синдром”- чије постојање је у ствари повезано порастом кардиоваскуларних компликација. Преваленција „метаболичког синдрома“ је значајно повећана код оболелих од РА у односу на општу популацију и корелира са активношћу болести. Ова повишена преваленца може се објаснити присуством хроничне инфламације код оболелих од РА.

### 1.1.3. Дијагноза

Дијагностички критеријуми за РА не постоје. Оток и осетљивост зглобова, јутарња уоченост и патолошке вредности лабораторијских анализа које типично срећемо код болесника са РА није специфично за ту болест. Диференцијално дијагностички морамо разматрати и друге артритисе, системске болести везивног ткива. У ствари код већине болесника након првих симптома и знакова не можемо поставити дијагнозу и углавном

класификујемо као недиферентовани артритис. Постављање прелиминарне дијагнозе је потребно јер лекове који мењају ток болести - (болест модификујуће лекове-БМЛ, енгл. Disease modifying antirheumatic drugs-DMARDs) треба увести што раније код било којег облика хроничног артритиса.

Ранима РА се сматра болест која траје краће од 3 месеца. У овом временском периоду било би идеално поставити дијагнозу РА и започети лечење јер се тако постиже најбољи ефекат. Овај временски период је тешко достижан и у развијеним земљама Европе, те се као оптимални период од појаве тегоба до постављања дијагнозе узима 6 месеци и одмах започиње лечење лековима који мењају ток болести тзв. лечење према циљу.

Због тога су развијени нови класификациони критеријуми за постављање дијагнозе РА од стране Америчког колеџа за реуматологију и Европске лиге за борбу против реуматизма (American College of Rheumatology- ACR, European League Against Rheumatism-EULAR), 2010. године који узимају у обзир који су зглобови захваћени и њихов број, имуносерологију (RF, antiCCP), реактантне акутне фазе (SE, CRP), трајање симптома (краће или дуже од 6 недеља) (Табела 2) (7).

Скоровањем предложених критеријума добија се скор од 0 до 10, предложена гранична вредност потребна за дијагнозу РА је 6. Класификациони критеријуми су се развили на бази великих кохорти пацијената са раним артритисом који су могли да имају и само један отечен зглоб у одсуству других болести. Нови класификациони критеријуми дозвољавају процену захваћености зглоба путем ултразвука или снимањем нуклеарном магнетном резонанцом, подједнако важећим као клинички преглед.

Табела 2. ACR/EULAR класификациони критеријуми за реуматоидни артритис

А-број и величина зглобова захваћених синовитисом	0-5 бодова
В-трајање симптома синовитиса	0-1 бод
С-реактанти акутне фазе	0-1 бод
D- серологија	0-3 бода

Збир од најмање 6/10 је потребан да би се болест класификовала као дефинитивни РА

А)Захваћеност зглобова	1 велики зглоб	0
	2-10 великих зглобова	1
	1-3 мала зглоба	2
	4-10 малих зглобова	3
	>10 малих зглобова	5
В)Трајање синовитиса	<6 недеља	0
	≥6 недеља	1
С) Реактанти акутне фазе	Нормалне вредности и CRP и ESR	0
	Повишене вредности CRP или ESR	1
Д)Серологија	Није позитиван RF и АСРА	0
	RF и/или АСРА позитиван у ниском титру: изнад горње границе нормалних вредности, до највише 3 пута преко горње границе	2
	RF и/или АСРА позитиван у високом титру: више од 3 пута изнад горње границе нормалних вредности	3

American College of Rheumatology- ACR, European League Against Rheumatism-EULAR, реуматоидни фактор-RF, антитела на циклични цитрулисани пептид/протеин - АСРА, ц реактивни протеин-CRP, брзина седиментације еритроцита-ESR.

Критеријуми Америчког колеџа за реуматологију (American College of Rheumatology-ACR) из 1987.године (Табела 3) за класификацију према дијагнози реуматоидног артритиса код пацијената са раним инфламаторним артритисом имали су слабу сензитивност и специфичност. Нису индетификовали пацијенте са раним артритисом који је вероватно почетак реуматоидног артритиса.

Табела 3. Класификациони критеријуми за реуматоидни артритис из 1987.

ACR Класификациони критеријуми за РА из 1987.
1.Јутарња укоченост (најмање 1сат)
2.Артритис три или више зглобова
3. Артритис зглобова шака (≥ 1 отечен зглоб)
4. Симетрични артритис
5.Реуматоидни чворићи

6.Позитиван RF у серуму
7.Радиографске промене (ерозије)
4 од 7 критеријума морају бити присутна. Критеријуми 1-4 морају бити присутни најмање 6 недеља.

реуматоидни артритис-РА, реуматоидни фактор-RF

Од лабораторијских тестова за РА пре свега треба урадити антитета на циклични цитрулисани пептид (анти ССР антитета) и реуматоидног фактора у крви, седиментацију еритроцита и ниво реактивног протеина Ц. Анти ССР антитета су много специфичнија за РА посебно рани РА, него реуматоидни фактор али са сличном сензитивношћу (специфичност 95%, сензитивност 67%). Када је тест позитиван високо је специфичан за РА и код здравих особа и код недиферентованог артритиса. Осим дијагностичког значаја, болесници са РА који имају позитивна анти ССР Ат имају лошију прогнозу у смислу агресивнијег тока болести, и предвиђања костних ерозија у наредних 10 година. Пронађена је корелација и са појавом кардиоваскуларних болести код болесника са РА и присуство анти ССР антитета. Код студија који су истраживали факторе ризика да се активира болест након уласка у ремисију или ниску активност болести присуство анти ССР антители се издвојио као предиктор погоршања. 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.

Основне дневне активности су код већине болесника поремећене. Функцијска способност болесника се процењује на свакој посети лекару помоћу Упитника за процену физичке функције реуматских болесника (*Health Assessment Questionnaire-NAQ*). Процена функционалне способности-*NAQ* се састоји од 20 питања о функционалном статусу при чему се оцењује 8 радњи (хватање, дохватање предмета, облачење и лична хигијена, устајање, храњење, уобичајне дневне активности, ходање, лична хигијена) а одговори пацијента се могу мењати у распону од 0 (нема неспособности) до 3 (потпуна неспособност). Смањење за > 0.22 у односу на базичну вредност указује на клинички значајно побољшање физичке функције и нивоа способности.

После 5 година трајања болести око 33% болесника неће бити способно за рад, а после 10 година 50% ће имати значајне функционалне дефиците (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).

Реуматоидни артритис има озбиљне социјално-економске утицаје на друштво у целини јер је радна способност и способност за самозбрињавање умањена (13, 14). Болесници са реуматоидним артритисом просечно краће живе за 3-7 година у односу на здраве (15).

#### 1.1.5. Лечење

Након постављања дијагнозе РА, као и током даљег праћења и процене одговора на терапију, неопходна је процена активности болести. Композитни индекси који укључују процену и број захваћених зглобовасе препоручују у свакодневној клиничкој пракси.

Индекс активности болести DAS-44 (Disease Activity Score-44) је направио van der Heijde 1993.године. Он се израчунава на основу сложене формуле:  $DAS = 0.54 * TJC44 + 0.06 * SJC66 + 0.33 * \ln ESR + 0.007 * VAS$  (Global Health on VAS), и омогућава процену активности болести на скали од 0-9 (DAS > 3,6 висока активност болести, DAS 2,4-3,6 умерена активност болести, DAS 1,6-2,4 ниска активност болести). У процени активности болести чешће се користи DAS28 који је поједностављена формула оригиналног DAS-а.

Најзначајнији су индекс активности болести 28 са седиментацијом (Disease Activity Score 28 Sedimentation-DAS28 SE) и Индекс активности болести 28 са CRP (Disease Activity Score 28 C Reactive Protein-DAS28 CRP). На вредност DAS28 утичу број болних и отечених зглобова, визуелно-аналогном скалом изражена активност болести (VASактивност болести) и седиментација, док DAS28 CRP укључује број болних и отечених зглобова, VAS активност болести и вредност CRP. DAS28 SE обухвата преглед 28 зглобова који се рачунају, а то су проксимални интерфалангеални зглобови шака (PIP), метакарпофалангеални зглобови (MCP), ручни зглобови, лактови, рамена и колена. Вредност индекса се израчунава према следећој формули- $DAS28 = 0.56 \sqrt{\text{број болних зглобова}} + 0.28 \sqrt{\text{број отечених зглобова}} + 0.70 \ln(SE) + 0.014 (VAS)$ . Омогућава нам процену активности болести на скали од 0-9. Сматра се да је болесник у ремисији ако је активност болести мерена DAS28 мања од 2.6. Ниска активност болести је ако је DAS28 између 2.6 и 3.1. Умерена активност болести је ако је DAS28 између 3.1 и 5.2. Висока

активност болести је ако је DAS28 већи од 5.2.

Користе се још и Поједностављен индекс активности болести (Simplified Disease Activity Index-SDAI) и Клинички индекс активности болест (Clinical Disease Activity Index-CDAI). Они се изражавају преко континуиране нумеричке скале која показује активност болести. Класификују се вредности активности болести као висок, умерен, низак или ремисија. Постоји скоро линеарна корелација између ових индекса активности болести и поремећаја у функционалној активности пацијента или прогресији у структуралним променама на зглобовима.

ACR критеријуми омогућавају мерење одговора на примењену терапију, тако да ACR 20 одговор подразумева смањење од најмање 20% болно осетљивих и отечених зглобова, уз најмањих 20% побољшања у најмање три преостале мерене активности. ACR 50 и ACR 70 одговори значе побољшање од 50%, односно 70% у овим мерењима. Они су развијени да би се проценио одговор на различиту терапију у односу на плацебо у клиничким студијама, али не могу да се користе у свакодневној клиничкој пракси јер се не изражавају у континуираној скали. Побољшање се односи на почетне вредности одређених варијабли, које су различите између појединих пацијената или различитих терапијских модалитета.

Друга мерења која процењују активност болести а не укључују преглед зглобова (RAPID3- Routine Assessment of Patient Index Data 3) се не препоручују у редовној клиничкој пракси јер нема довољно доказа да корелирају са другим индексима. RAPID-3 представља рутинску процену пацијената, састоји се од 3 упитника из групе мултидимензионих упитника за процену здравља (MDHAQ) којим се мери: функционални статус у наведеном тренутку-13 питања (0-10), процена болности зглобова на дан попуњавања (0-10) и општа процена стања пацијената уназад 7 дана (0-10). Резултати добијени RAPID-ом 3 се могу приказати на основној скали од 0-30. Делјењем са 3 добија се модификована скала од 0-10 која омогућава поређење са другим скалама. Добијени резултати се рангирају тако да се активност болести може поделити у 4 категорије: висока активност (>4), умерена (2,01-4), ниска (1,01-2) и ремисија (<1) на скали од 0-10, и на скали од 0-30: (>12) висока активност болести, (6,1-12) умерена активност болести, (3,1-6,0) ниска активност болести и (<3,0) ремисија.



Ремисија (првенствено за рани рематоидни артритис) или ниска активност болести (посебно за болест са дугим током) је циљ терапије реуматоидног артритиса. АСР и ЕULAR су развили нове критеријуме за ремисију на основу Boolean-овог модела или на основу индекса активности SDAI и CDAI. Друге дефинисане ремисије преко индекса DAS28-SE и DAS28-CRP не корелирају увек са правом ремисијом јер долази до прогресије структуралних оштећења зглобова, коморбидитета и значајне активности болести код неких пацијената, иако је вредност индекса испод 2,6. Због свега наведеног развијен је нови критеријум за ремисију којим најбоље показује одсуство инфламаторне активности болести, док су критеријуми за ниску активност болести остали валидни за клиничку праксу (Табела 5).

Лечење треба да тежи према циљу, а тоје је ремисија или ниска активност болести. Ремисија се дефинише као одсуство симптома и знакова значајне инфламаторне активности болести. Уколико није могуће постићи ремисију пожељно је постићи бар ниску активност болести. Праћење болесника са активном болешћу ди требало да буде на 1-3 месеца. Лечење РА захтева стратегију да при свакој процени активности болести адаптирамо лечење или мењамо лекове према актуелним налазима („лечење према циљу“; engl. “treat to target”).

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 околинину 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

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 (COX), чиме смањују стварање простагландина, који учествују у настајању и одржавању запаљења.

Позната су два облика COX (COX1-ензим активан у већини органа и ткива у току физиолошких процеса; и COX2-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). Скорашња испитивања су показала да је при употреби високо селективних COX2 инхибитора (коксиби) чешћа појава инфаркта срца и можданих удара, понекад и тешких осипа по кожи, због чега се препоручују НСАИЛ са умереном COX2 селективношћу (мелоксикам, нимесулид) (17, 18).

#### 1.1.6.2. Лекови који мењају ток болести

Лекови који мењају ток болести (ЛМТБ) могу да утичу на активност болести (19). ЛМТБ се могу поделити на синтетске и биолошке. Синтетски ЛМТБ се деле на конвенционалне синтетске лекове који модификују ток болести (Меткотрексат, Лефлуноמיד, Салазопирин, Хидроксихлорохин) и циљане синтетске лекове који модификују ток болести (ЈАК-инхибиторе-Тофацитиниб, Барицитиниб). Делују као имуномодулаторни лекови, различите хемијске структуре, фармакодинамских и фармакокинетских особина (20).

Метотрексат је “златни стандард“ тј. лек избора за прву линију лечења РА. Метотрексат је високо ефикасан лек и као монотерапија и као комбинација са гликокортикоидима, другим конвенционалним и циљаним синтетским или биолошким лековима који модификују ток болести. У случају да постоје контраиндикације за лечење Метотрексатом или лоша подношљивост лека могу се користити лефлуноמיד или Салазопирин који су такође показали клиничку и функционалну ефикасност. Могу се

користити и антималарици (Хлорокин и Хидроксихлорокин) углавном у комбинованој терапији, а ређе као монотерапија и то само у ниској активности болести. ЈАК инхибитора се разматрају као друга линија лечења.

#### 1.1.6.3. Биолошки лекови

Биолошки лекови су специфични хуманизовани протеински молекули који се стварају уз помоћ технолошких поступака молекуларне биологије.

Најзначајнији биолошки лекови који се употребљавају за лечење реуматоидног артритиса су намењени неутрализацији фактора туморске некрозе- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлеукина-6 (IL-6), интерлеукина-1 (IL-1), блокаде костимулације Т лимфоцита или CD 20 молекула на Б лимфоцитима

Биолошка терапија се примењује код болесника који нису у потпуности реаговали (постигли ремисију или ниску активност болести) на хемијске лекове који утичу на ток реуматоидног артритиса, као што су антималарици, метотрексат, сулфасалазин и лефлуномид. Такође, за њих се одлучујемо и када претходно споменути лекови током лечења испоље нежељене ефекте. Сви биолошки лекови показују бољу ефикасност у комбинацији са метотрексатом или комбиновани са другим конвенционалним синтетичким ЛМБТ.

Као додатна терапија препоручује се едукација болесника о болести којом се постиже боље разумевање болести и боља сарадња са медицинским особљем, као и психотерапија (когнитивна-бихевиорална, динамска, групна). Пожељно је укључити и породицу у лечење болесника јер се смањује анксиозност болесника код куће. Ако је неопходна треба саветовати болеснику помагала за свакодневну употребу, одговарајућа нега стопала (адекватна обућа, корективне протезе).

Лечење коморбидитета је битно јер утичу на терапију и њен ефекат код болесника са РА. Најважнији коморбидитети су кардиоваскуларне болести, остеопороза и депоресија. Саветује се једном годишње контрола и одговарајућа терапија за наведене коморбидитете.

#### 1.1.6.4. Кортикостероиди

Кортикостероиди се препоручују као део иницијалне стратегије лечења (заједно са једним или више конвенционалних синтетичких лекова), не би их требало користити дуже од 6 месеци и дозу треба што пре смањити на најмању могућу или искључити. Гликокортикоиде треба дати у малим или средњим дозама орално или парентерално, као једнократна интравенска апликација или интрамускуларна ињекција. Додајући мале дозе гликокортикоида конвенционалним синтетичким БМЛ појачава се њихова ефикасност у клиничком, структуралном и функционалном аспекту. Интраартикуларно дати гликокортикоиди имају високу клиничку ефикасност (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

Физикалне процедуре су обавезна допуна лечењу пацијената са реуматоидним артритисом. 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

Физички агенсикоји се користе у лечењу пацијената са реуматоидним артритсом су: лечење Сунцем (хелиотерапија), лековито минерално блато (пелоид), звук, електрицитет, магнетизам термоминералне воде, и механичка енергија која се примењује у

виду кинезитерапије, масаже и терапије радом (24, 25, 26, 27).

#### 1.1.9. Важност режима исхране

Код пацијената са реуматоидним артритисом је од важности одржавати нормалан индекс телесне масе јер има утицаја на функционални 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 реуматоидним артритисом. Иако здравствене користи од рибљег 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- $\alpha$  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- $\alpha$  и Ц-реактивног протеина.

Унос храном и омега-3 и омега-6 полинезасићених масних киселина утиче на инфламацију. Арахидонска киселина је п-6 полинезасићена масна киселина изведени из линолеинске киселине. Еиконасоиди произведени ензимском хидроксилацијом арахидонске киселине повећавају производњу проинфламаторних цитокина. Насупрот томе, еиконасоиди изведени из п-3 полинезасићених масних киселина сузбија производњу еикосаноида добијених из арахидонске киселине. Тако, виши нивои п-3 полинезасићених масних киселина у плазми, као и нижи плазма п-6 : п-3 однос треба да обузда производњу проинфламацијских цитокина (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 4. 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
$\gamma$ -Линоленска	<i>cis</i> -6,9,12-октадекатриенска	18:3n-6
$\alpha$ -Линоленска	<i>cis</i> -9,12,15-октадекатриенска	18:3n-3
Дихомо- $\gamma$ -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  $\omega-3$  масних киселина добијених из хране, а које тело

користи:  $\alpha$ -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  $\omega$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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).

Компетицијом са n-6 масним киселинама омега-3 масне киселине инхибирају формирање цитокина и еикосаноида. Повећани унос омега-6 у организам доводи до недостатка омега-3, и развијања хроничних инфламаторних процеса. (34, 35, 36)

Ризик од настанка дијабетеса се смањује правилним уносом омега-3 и омега-6 масних киселина јер се смањује инсулинска резистенција (37). Метаболички синдром прати хронично запаљење (38). Повећање продукције масних ћелија је повезано са повећањем Ц-реактивног протеина, интерлеукин-6, резистина, фактор туморске некрозе- $\alpha$ , (39, 40). У масном ткиву се налазе макрофаги који стварају проинфламаторне цитокине (41, 42). Резистин смањује инсулинску резистенцију (43), као и проинфламаторни цитокини (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.

У фосфолипидима лимфоцита и макрофага смањена је концентрација арахидонске киселине након повећаног уноса омега-3 масних киселина код експерименталних животиња (45). Код људи је доказано да је актуелни унос Омега 3 масних киселина неадекватан (46, 47, 48). Повећањем уноса n-3 масних киселина састав масних киселина инфламаторних ћелија може бити модификован (49, 50). Као што је раније поменуто, природни извор еикозапентаенске и докозахексаенске киселине је морска храна, посебно хладноводна плава риба. Употреба лососа у исхрани доводи до већег пораста омега-3 масних киселина у односу на уље бакалара (51).

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 обogaћени 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 обogaћивање 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 хемоллизе 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 обогаћење 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<sup>+</sup> 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 макрофага који се налазе у масном ткиву и смањити нивое инфламаторних медијатора потенцијално доприносећи унапређењу здравља (71, 80, 81).

Повећан унос омега-3 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом смањује концентрацију интерлеукина-1 и фактора туморске некрозе- $\alpha$  до 90% (82, 83).

Омега-3 масне киселине утичу на активност Т лимфоцита (84). Студије показују да активност реуматоидног артритиса може бити смањена употребом омега 3 масних киселина (85- 91). Након 3 месеца суплементацији омега-3 масним киселинама код пацијената са руматоидним артритисом потребе пацијента за коришћењем нестероидних антиинфламаторних лекова су се значајно смањила (92). Ризик од кардиоваскуларног морбидитета код болесника са реуматоидним артритисом је у студијама смањен након суплементације омега-3 масним киселинама (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- $\alpha$ , 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, еикосаноиди 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, дихомогама-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 еикосаноиди 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 еикосаноида 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 активираног 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- $\alpha$  у ендотелијалним ћелијама (105, 106) и моноцитима (107). 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- $\alpha$ , интерлеукина-1 и интерлеукина-6) изазваним 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 липоксигеназу (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- $\alpha$  (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 стимулисањем 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 метаболирати у Е и D 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  $\alpha$ -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  $\beta$ -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 киселине могу смањити липогенезу у масним ћелијама смањењем активности липопротеин липазе. (136).

Оптималном исхраном која садржи балансиран унос омега-3 и омега-6 масне киселине утиче се на нормализацију телесне тежине, смањује се инсулинска резистенција, што може бити последица и смањења продукције инфламаторних цитокина (137-139).

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.

#### 1.2.8. 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).

Ћелијска оштећења због повећаног стварања липидних пероксида и слободних радикала могу довести доповишеног крвног притиска и других кардиоваскуларних



болести (149, 150). 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 (151).

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 последишна деформација, чини њихову мембрану високо пермеабилном за калијумове јоне (152). 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 (153).

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 (154, 155). 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 (156-158).

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 (159). Докозахексаенска киселина је полинезасићена масна киселина са највећим бројем незасићених веза, које су циљно место интеракције са слободним радикалима, те је од значај одређивање њеног садржаја. Студије су показале њен антиаритмички ефекат као и хипотензивно дејство, посредовано ослобађањем NO у ендотелијуму (160,161).

### 1.3. ГЕНЕТИКА

**Генетика** (грч. γεννώ — гено, значи дати род, родити) је наука која проучава наслеђивање и варијације код живих организама.

Генетичари изучавају функције гена, као што је анализа генетичких интеракција. У самом организму, генетичке информације се налазе у хромозомима, који су представљени хемијским структурама као што је ДНК молекул.

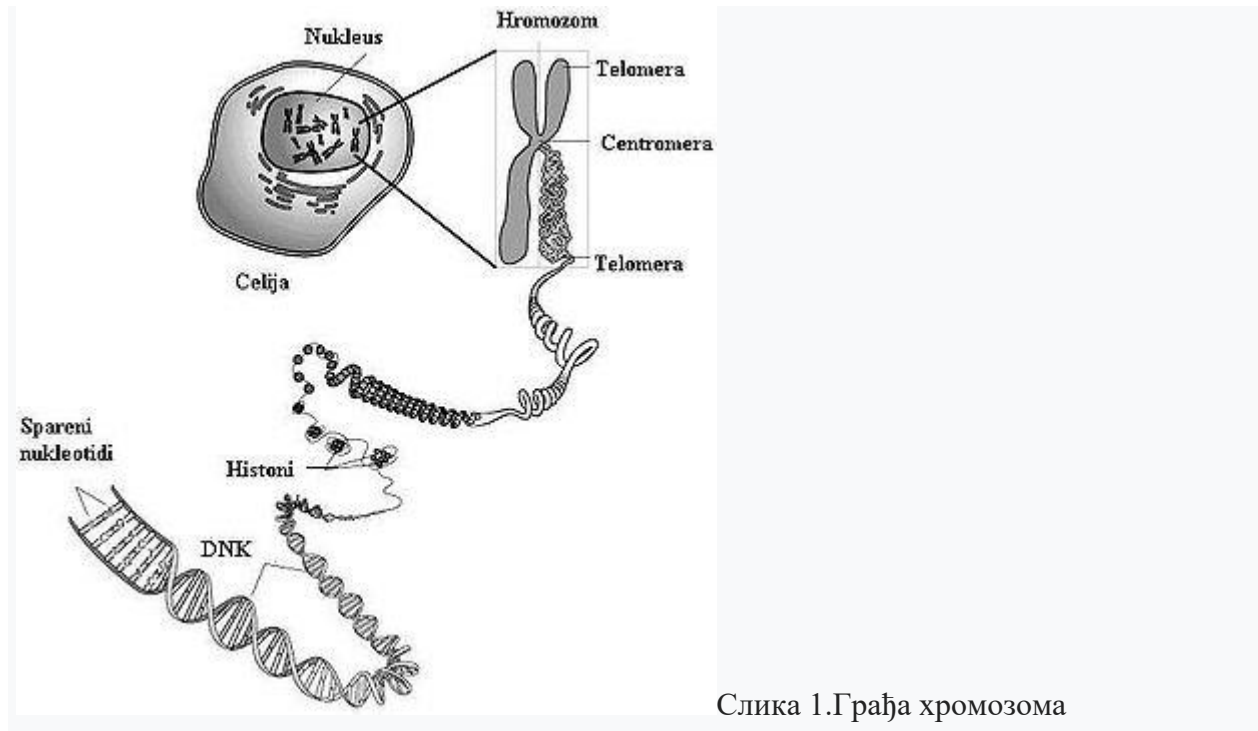
Наша тела су грађена од милиона ћелија које су програмиране да раде по генетском коду. Већина од тих ћелија садржи комплетан сет гена, којих имамо на хиљаде. Гени контролишу раст и функцију људског тела. Одговорни су и за многа физичка обележја, као што су боја очију, крвна група или висина (фенотип).

На жалост, свако од нас носи одређене генетичке дефекте или генетичке варијације које се могу негативно одразити на наше здравље.

Тако неке генетичке варијације могу повећати ризик за дијабетес, тромбозу или рак, друге могу одредити колико успешно елиминирамо токсине из нашег тијела, контролишу интолеранцију на поједине састојке хране ( као што су глутен или лактоза ), или колико смо осетљиви на пародонталну болест.

Гени се налазе на структурама које називамо хромозоми. У већини ћелија имамо по 46 хромозома. Те хромозоме наслеђујемо од родитеља, 23 од мајке и 23 од оца, тако да имамо два сета од 23 хромозома, односно 23 пара. Будући су хромозоми састављени од

гена, наслеђујемо и по две копије свакога гена (значи, једну од сваког родитеља). Због тога смо врло често слични родитељима. Хромозоми, а тиме и гени, састављени су од ДНК (деоксирибонуклеинска киселина)(Слика 1). ДНК је полимер нуклеотида који су грађени од деоксирибозе, фосфата и нуклеотида који код ДНК може бити аденин ( А ), гуанин ( Г ), цитозин ( Ц ) и тимин ( Т ).



Слика 1.Грађа хромозома

Гени носе информације неопходне за синтезу секвенци аминокиселина у протеинима. Ген носи информације које су као упутства(кодове) према којима организам гради протеин.. Ген може да буде одговоран за више продуката, у зависности како је транскрипција регулисана. Гени такође кодирају секвенцу нуклеотида у и-РНК, т-РНК и р-РНК који су неопходни за синтезу протеина.

### 1.3.1.ФАРМАКОГЕНЕТИКА

Хипократ је рекао-„Значајније је која особа има болест, него коју болест има особа...“

Фармакогенетика је савремена фармаколошка дисциплина која анализира интер-индивидуалне разлике које доводе до варијабилног, односно различитог одговора пацијената на терапију истим или сличним лековима. Наиме, неретко се дешава да одређени лек за лечење депресије, хипертензије или дијабетеса помаже једном, а готово да нема ефекта или чак негативно утиче код другог пацијента. У том смислу, циљ фармакогенетског приступа у терапији је успостављање циљаног лечења на принципима тзв. персонализоване медицине (лек по мери сваког појединачног пацијента), у којој се свакој особи, односно пацијенту, приступа као појединцу и у складу са његовим генетским карактеристикама и предиспозицијама. Најчешће је генетска варијација у генима за ензиме који метаболишу лек, рецепторе за лек или транспортере. За ген кажемо да је полиморфан ако постоји варијација гена у нормалној популацији у фреквенцији већој од 1%. Гени су функционално полиморфни када су алелне варијанте постојане у популацији, једна или више, и мењају активност кодираног протеина у односу на нормалан (дивљи) тип. У случају када фармаколошка активност лека везана за каталитичку активност одређеног ензима, фактори који утичу на активност ензима одредит ће клинички одговор.

Ензими одговорни за активацију и метаболизам лекова и других материја у организму показују широке интериндивидуалне варијације у експресији протеина или каталитичкој активност. Варијације могу настати због пролазних узрока као што су инхибиција или индукција ензима или трајних узрока као што су мутације или делеције гена. Варијације у геному су: инсерције/делеције(велике и мале) и полиморфизам једног нуклеотида.

Разлике међу људима на генетском нивоу најчешће су последица полиморфизама једног нуклеотида (single-nucleotide polymorphism – SNP). Полиморфизам једног нуклеотида је варијација у базној секвенци која се јавља једном на сваких 1000 база у молекули ДНА, а може се наћи у више од 1% популације (једина разлика између SNP -ова и тачкастих мутација је већа фреквенција појављивања SNP -ова у популацији) (162). Према резултатима Пројекта Хуманог Генома („Human genome project“) у људском геному постоји преко 1,4 милијуна полиморфизама једног нуклеотида, више од 60 000 их се налази у кодирајућим регијама гена, а како се данас секвенцира геном великог броја особа, тај број све више расте (163). Распрострањеност SNP -ова по геному није

насумична: примјећено је да их готово нема у високо конзервираним регијама генома, а чести су у другим регијама, где је генетичка разноликост биолошки пожељна (164). Сматра се да би истраживања варијабилности броја SNP -ова у геному човјека могла допринети идентификовању узрока неких комплексних болести. Уз то, таква истраживања би могла омогућити лакше разумевање делотворности лечења болести будући да људи различито реагују на терапију лековима. Управо је то предмет истраживања фармакогенетике, науке која истражује улогу наследне компоненте у делотворности лечења лековима (165).

У 20-95% случајева генетичка основа је разлог варијабилне ефикасности лекова (164). Осим генетике, постоје и бројни други фактори који могу узроковати различито реаговање на терапију лековима, нпр. пол, године старости, стил живота, напредовање болести, интеракција с другим лековима, тежина болести. Међутим, и сам генетички фактор може узроковати врло озбиљне последице на здравље појединца.

Данас су познати бројни фармакогенетички примјери како полиморфизми у генима, који кодирају ензиме за метаболизам лекова, транспортере лекова и/или који су циљ деловања лекова, узрокују индивидуалне разлике у лечењу међу појединцима.

Актуелне смернице у клиничкој пракси саветују фармакогенетско тестирање и циљану терапију посебно код пацијената на антикоагулатној терапији (лекови против згрушавања крви), дуготрајној терапији антидепресивима (лекови против депресије), антиепилептицима (лекови против епилепсије), аналгетицима (лекови против болова), антихипертензивима (лекови за повишен крвни притисак), антидијабетицима, антибиотицима, као и код примене имуносупресивне и друге комплексне терапије, односно код примене већег броја лекова (166-168)

Фармакогенетски приступ се спроводи методама молекуларне дијагностике при чему се сваком пацијенту одређује фармакогенетски статус и затим анализира могућност прописивања циљане терапије и препоручује оптимални режим лечења, са што мање нежељених ефеката. Посебна пажња се посвећује клиничкој интерпретацији резултата фармакогенетског тестирања на којима се темељи одабир и дозирање најефикаснијег и

најсигурнијег лека сваком појединачном пацијенту. Осим тога, спровођење превентивне терапије и одговарајуће суплементације још је један од циљева фармакогенетике, а самим тиме и персонализоване медицине (169).

### 1.3.2. НУТРИГЕНЕТИКА

Постоје индивидуалне разлике у односима гена и нутријената, међутим тек је завршетком Пројекта Хуманог Генома значајно проширило знање о реципрочним односима гена и нутријената те резултирало појавом нове дисциплине, нутрицијске геномике (170). Интеракције између исхране и гена треба проматрати у два смера: утицај нутрицијских материја на генску регулацију и експресију предмет је истраживања нутригеномике (171). С друге стране, нутригенетика испитује на који начин генске варијанте предодређују нутритивне потребе и преференције појединца у физиолошким, али и одређеним патофизиолошким условима (172, 173). Утицај исхране на ток генетичких информација може се дешавати на различитим регулаторним местима. Напредак у геномици, транскриптомици, протеомици, метаболомици и епигеномици омогућио је брже и свеобухватније разумевање процеса којима биоактивни састојци хране могу утјецати на људско здравље. Тако је показано да већ ин утеро, нутрицијски поремећаји могу на епигенетичкој разини моделовати импринтинг на ткивно специфичан начин. Аномалије у импринтину се повезују између осталог с развојем карцинома, дебљине, шећерне болести и поремећаја храњења (174).

Геномске информације доносе нове спознаје и боље разумевање интеракција гена и нутријената, а с крајњим циљем развоја персонализованих смерница за правилну исхрану која може допринети одржавању здравља и превенцији болести (175).

Генетичке варијанте мењају осетљивост на болест преко модулације утицаја модерног урбаног окружења на физиолошке процесе појединца. Илустративан примјер је честа генетичка варијанта гена FTO, SNP rs9939609, у првом интрону гена. Присутност генске варијанте у различитим је популацијама повезана с повећаним ризиком за развој дебљине (176, 177). Како би боље разумели механизме подложности дебљини, научници су испитивали разлике у навикама уноса хране у деце са и без те генске варијанте (178). У случају неограниченог приступа храни, ђеца носиоци варијанте FTO, која је повезана с

дебљином конзумирала су више калорија. Важно је било и запажање да је већи унос енергије био постигнут не због повећане количине конзумиране хране, већ због одабира калоричнијих намирница.

Полиморфизам у гену PLIN (кодира протеин с важном улогом у похрани масти у масном ткиву) модулира однос између уноса засићених масти и инсулинске резистенције, неовисно о дебљи (179, 180). Стога је разложно закључити да појединци могу различитим механизмима развити дебљину и инсулинску резистенцију. То надаље указује на потребу примене индивидуализираних приступа и примену различитих дијететичких препорука о врсти дијете у појединаца са дебљином. Важно је нагласити да су интеракције гена и нутријената врло сложене и зависе о низу чинилаца.

Истраживања су указала на сложеност интеракција између нутријената и биоактивних састојака хране и генома. У шпањолској популацији конзумирање мононезасићених масних киселина, MUFA (енгл. monounsaturated fatty acids,) углавном из маслиновог уља, доприноси варијабилности у вриједностима НОМА-IR. Тај налаз је даље упућивао на постојање интеракције између PPAR $\gamma$  Pro12Ala и количине MUFA из хране, при чему су дебели људи с алелом Pro12Ala имали више вредности НОМА-IR., посебно у случају ниске конзумације MUFA (181).

У студији спроведеној у италијанској дечјој популацији, у групи гојазне нормолипемичне деце Pro12Ala је био повезан с већом осетљивошћу на инсулин и већим уделом полинезасићених масних киселина, PUFA (енгл. polyunsaturated fatty acids) дугог ланца и нивоом фосфолипида у плазми (182).

Студије о гену FTO који се повезује с дебљином, јасно показују како околински чимбеници попут прехране и тјелесне активности могу модифицирати подложност појединца према развоју дебљине (183-185).

Нутригенетика и нутригенетски тестови су новост у нутриционизму где се исхрана темељи на генетском профиле сваког појединца.

Тестирање се врши из ДНА еритроцита или пљувачке, и одређује се које су индивидуалне генетске потребе и предиспозиције за одређену врсту намирница.

Одређене болести имају свој корен у дефектима гена, попут повишеног холестерола (наследна хиперхолестеролемија), целијакије, цистичне фиброзе, фенилкетонурије. Нутригенетика проучава како варијације у генетском коду неке особе (нпр. SNP

варијације гена) мењају одговор њиховог тела на одређену храну, на пример глутен или омега-3 масноће. Начин исхране тако се чита и према генима, јер одређене варијације гена имају утицаја на метаболизам, здравствено стање или ризик од болести код те особе. У зависности да ли се ради о варијацији једног или више гена, делимо генетске болести на моногене и полигене.

Бројне су корисне примене једном направљеног генетског теста, могуће је исцрпити практичне смернице о храни, врсти хране која особи одговара, чак и склоност дебљини, те сазнати чак и да ли је ниво активности и вежби оптималан.

Процењују се да свака особа у просеку носи око 2000 генетских дефеката, које могу нарушити њихово здравље, и у неким случајевима изазвати болест. Различити фактори могу узроковати промене у генима, које називамо мутацијама. У малом броју случајева ове су мутације корисне. Међутим, велика већина или нема никаквог утицаја на здравље или је тај ефект негативан.

Свако од нас носи одређене генетичке дефекте или генетичке варијације које се могу негативно одразити на наше здравље.

Тако неке генетичке варијације могу повећати ризик за дијабетес, тромбозу или рак, друге могу одредити колико успешно елиминишемо токсине из нашег тела, контролишу интолеранцију на поједине састојке хране ( као што су глутен или лактоза ), или колико смо осетљиви на пародонталну болест.

Многе мутације пролазе неопажено или узрокују смртоносне болести, као што је рак или природне абнормалности новорођенчета. УВ радијација коју емитује Сунце такође може оштетити наше гене и изазвати болест као што је рак коже.

Утицаји околине могу променити активност гена. Многе од ових промена немају ефеката на здравље, мањи део промена утиче штетно, а још мањи може имати повољне ефекте. Родитељи преносе ове промене гена на своје потомство, укључујући и гене са дефектима. Највећи дио ових генетских дефеката је наслеђен од наших родитеља. Генетичка својства могу нарушити наше здравље. Док неки генетички дефекти увек узрокују болест, већина их само повећава ризик од болести.

Генетске варијације утичу на начин на који тело одговара на неке нутријенте и састојке хране, и које материје се могу разградити и исправно искористити. Будући да исхрана игра виталну улогу у здрављу, сада се анализирањем гена прилагођава исхрана и



тако можемо утицати на метаболичке проблеме. То је подручје нутригенетике, т.ј. прилагођавање исхране генетичком профилу.

Анализом генетичких варијација добија се информације о ризику од неке болести, неадекватне детоксикације тешких метала, пестицида и сл., да ли неке супстанце тело метаболише на уобичајен начин, итд.

Антиоксидативни коензим Q10, често се узима као сакупљач слободних радикала и као средство које успорава старење. Q10 није активан након узимања, већ се претходно мора конвертирати у активну форму убиноинол и то помоћу специфичног гена. Како неки људи имају варијацију у овом гену не могу активирати Q10, и немају користи од овога додатка прехране.

Добар пример су Омега-3 масне киселине у форми капсула. Код многих људи Омега-3 масне киселине снижава ниво холестерола, док код неких људи тај ефект изостаје. Утврђено је да варијација у гену APOA1 доводи до не-ефикасности Омега 3 масних киселина у регулисању холестерола, чак га могу још додатно могу повисити. Тако многи људи који узимају Омега-3 масне киселине, не само да од тога немају користи, већ погоршавају стање.

### 1.3.3.ГЕНИ

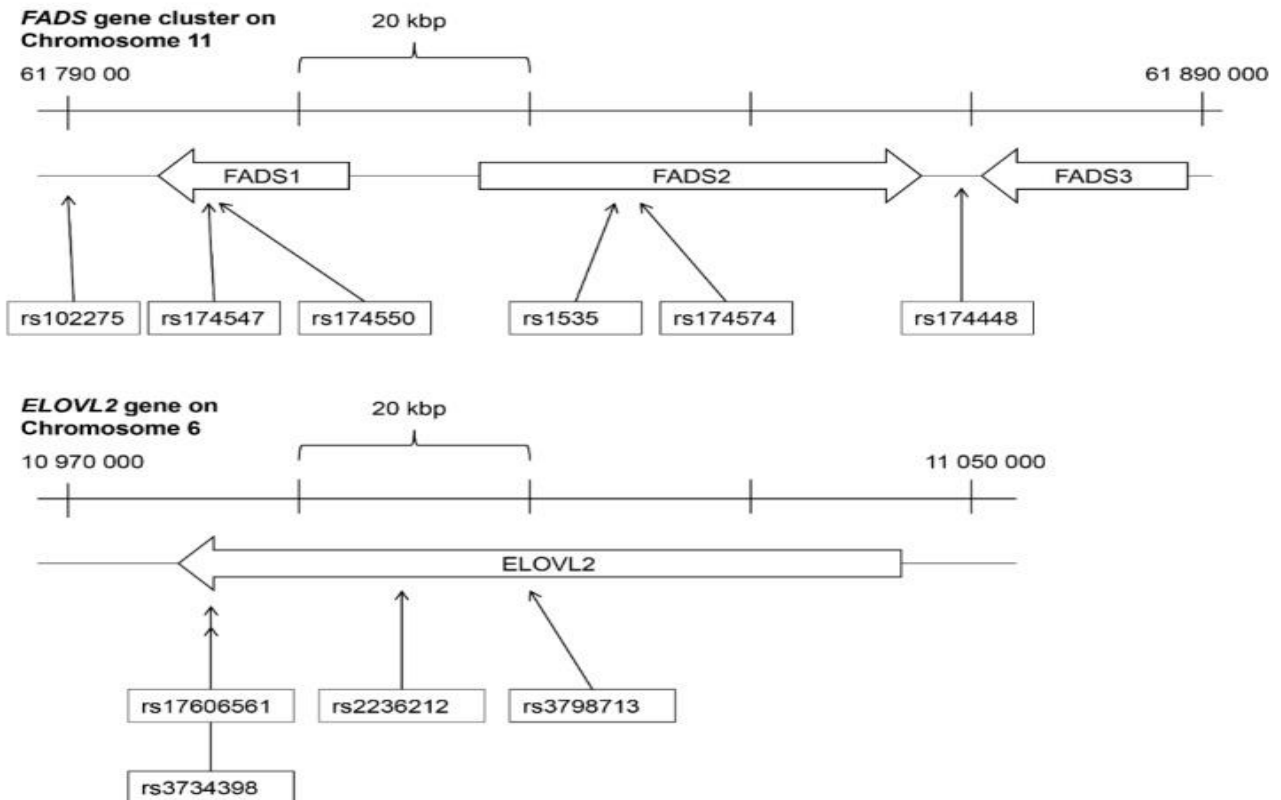
#### 1.3.3.1. FADS1 (Fatty acid desaturase 1) gen

Десатураза масних киселина 1 (FADS1) је ензим код људи који је кодиран FADS1 геном. Протеин кодиран од стране FADS1 гена је члан фамилије десатураза масних киселина (FADS) и десатурише омега-3 и омега-6 полинезасићене масне киселине у делта-5 положају, катализују завршни корак у формирању еикозапентаенске киселине (ЕПА) и арахидонске киселине (186).

Десатураза ензими (као што су они кодиран FADS1) регулише конверзију масних киселина у незасићене кроз увођење двоструких веза између одређених угљеника масних ацил ланаца. FADS1 су они емзими који су састављени од N-терминалног дела са цитохрома b-5 доменом и C-терминалног дела са вишеструком мембраном, оба дела

садрже аминокиселину хистидин. Овај ген је кластер за фамилије ензима FADS1 и FADS2 на локацији 11q12-q13.1 (Слика 2). Сматра се да је еволутивно настао из дуплирања истог гена на основу његове сличне ексон/интрон организације.

Слика 2. FADS гени на хромозому 11 и ELOVL2 гени на хромозому 6



Генетичка варијанта rs174556 је интронска варијанта FADS1 (187), са полиморфизма једног нуклеотида C>T SNP (187). Пацијенти са полиморфизмом једног нуклеотида T/T су имали нижи ниво холестерола и LDL у односу на C/C и C/T (188). Концентрације триглицерида биле су веће код T/T носилаца у односу на C/C(188). Испитивања садржаја масних киселина у мукози дебелог црева показала су ефекат исхрана-генотип. Примећене су ниже концентрације арахидонске киселине (AA) код носилаца C алела при медитеранском начину исхране у односу на “здраву исхрану”, која је приписана порасту нивоа AA у групи која се хранила “здравом исхраном”(189).

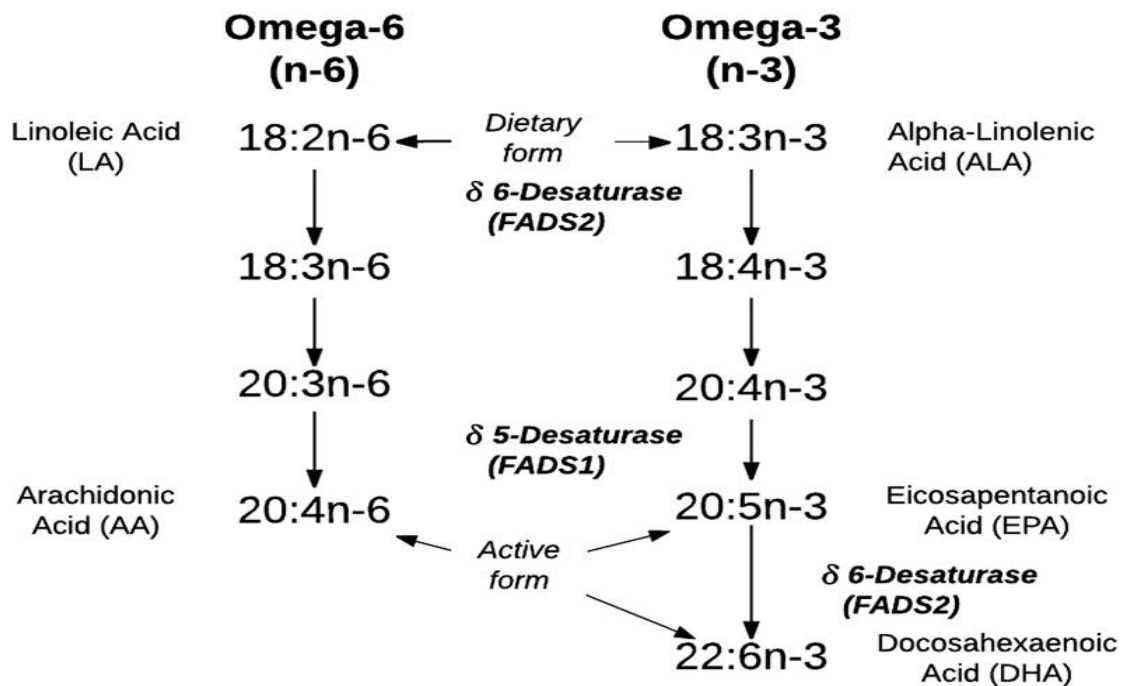
Врло вероватна повезаност са коронарном артеријском болести код Хан популације Кинеза. Учесталост (T) алела је значајно већа у испитиваној групи у односу на контролу

(190). ТТ хомозиготи повезани су са низом концентрацијом еикозапентаенске киселине (ЕРА) у млеку кинеских жена у лактацији (191). У географски изолованој популацији европског порекла, са хомогеним начином исхране, показано је да варијанте делта-5 десатуразе вероватно регулишу ефикасност конверзије полинезасићених масних киселина средњег ланца (PUFAs) у потенцијално инфламаторне PUFAs, као што је арахидонска киселина. “Т” алел повезан је са смањеним нивоима омга-6 PUFAs, са изузетком дихомо-гама-линолеинске киселине (DHGLA), чији су нивои у том случају повишени. (192). Носиоци Т алела имали су значајно смањени OR (odds ratios) за атопијски екцем (193).

### 1.3.3.2. FADS2 (Fatty acid desaturase 2 ) ген

Десатураза масних киселина 2 (FADS2) је ензим код људи који је кодиран FADS2 геном. Он је синоним за ензим Delta 6 desaturase (D6D) који може да катализује и као ензим delta-8 и delta-4 desaturase упркос свом имену.

Протеин кодиран од стране FADS2 гена је члан фамилије десатураза масних киселина (FADS) и десатурише омга-3 и омга-6 полинезасићене масне киселине (194) (Слика 3).



Слика 3. Место активности ензима десатуразе у метаболизму масних киселина

Десатураза ензими (као што су они кодиран FADS2) регулише конверзију масних киселина у незасићене кроз увођење двоструких веза између одређених угљеника масних ацил ланаца. FADS2 су ензими који су састављени од N-терминалног дела са цитохром b-5 доменом и C-терминалног дела са вишеструком мембраном, оба дела садрже аминокиселину хистидин. FADS2 ген је кластер за фамилије ензима FADS1 и FADS2 на локацији 11q12-q13.1.

Генетичка варијанта rs174561 је промотор FADS2 гена (CpG острвце између FADS1 и FADS2), 3'-UTR FADS1 гена (195) са полиморфизама једног нуклеотида T > C SNP.

Носиоци алела C/C су имали нижи ниво холестерола и LDL у односу на T/T и T/C (188). Концентрације триглицерида биле су веће код T/T носилаца у односу на C/C (188). Испитивања садржаја масних киселина у мукози дебелог црева показала су ефекат исхрана-генотип. Примећене су ниже концентрације арахидонске киселине (AA) код носилаца T алела при медитеранском начину исхране у односу на “здраву исхрану”, која је приписана порасту нивоа AA у групи која се хранила “здравом исхраном” (189).

У географски изолованој популацији европског порекла, са хомогеним начином исхране, показано је да варијанте делта-5 десатуразе вероватно регулишу ефикасност конверзије полинезасићених масних киселина средњег ланца (PUFAs) у потенцијално инфламаторне PUFAs, као што је арахидонска киселина. “C” алел повезан је са смањеним нивоима омега-6 PUFAs, са изузетком дихомо-гама-линолеинске киселине (DHGLA), чији су нивои у том случају повишени (192).

Генетичка варијанта rs174570 је интронска варијанта FADS2, са са полиморфизама једног нуклеотида C > T (FWD) SNP. Активност десатураза (представљена односом AA:LA) била је нижа код носилаца T алела (196).

Генетичка варијанта rs3834458 је промотерски регион FADS2 (197), са полиморфизама једног нуклеотида delT. Концентрације триглицерида биле су веће код -/- носилаца у односу на T/T (188.) Испитивања садржаја масних киселина у мукози дебелог црева показала су ефекат исхрана-генотип. Примећене су ниже концентрације арахидонске киселине (AA) код носилаца алела да делецијом T нуклеотида на варијабилном месту, при медитеранском начину исхране у односу на “здраву исхрану”, која је приписана порасту нивоа AA у групи која се хранила “здравом исхраном” (189). Активност десатураза (представљена односом AA:LA) била је нижа код носилаца алела са

делецијом Т нуклеотида (196).

Генетичка варијанта rs968567 је интронска варијанта FADS2, са са полиморфизама једног нуклеотида G/A (REV) SNP. Утиче на транскрипцију FADS2. Носиоци “ G алела“ имају појачану промоторску активност и олакшавају везивање ELK1 транскрипционог фактора (198).

## II

# ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

## 2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

### 2.1. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ:

#### Генерални циљ

Процењивње улоге генетичких варијанти у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина у модификацији клиничког ефекта суплементација са омега-3 и омега-6 масним киселинама код пацијената са реуматоидним артритисом.

#### Специфични циљеви

1. Анализа генетичких варијанти rs174556 (интронски регион FADS1 гена, варијанта C>T) у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом.
2. Анализа генетичких варијанти rs174561 (промоторски регион, и место везивања транскрипционих фактора FADS1 гена, CpG острвце, варијанта C>T) у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом.
3. Анализа генетичких варијанти rs3834458 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена, CpG острвце, варијанта T>del), у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом.
4. Анализа генетичких варијанти rs174570 (интронски регион FADS2 гена, место везивања транскрипционих фактора, варијанта C>T), у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом.
5. Анализа генетичких варијанти rs968567 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена и место везивања транскрипционих фактора, CpG острвце, варијанта G>A) у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом.

**2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ:****Хипотеза**

Присуство различитих генетичких варијанти гена који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина је повезана са различитим клиничким ефектима суплементације концентрованим рибљим уљем са омега-3 масним киселинама и омега -6 масним киселинама код пацијената са реуматоидним артритисом.

**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 2017. 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 сареуматоидним артритисом који испуњавају важеће дијагностичке критеријуме Америчке реуматолошке асоцијације из 2010.године (7). Пацијенти су одабирани у Одељењу Реуматологије и Реуматолошкој амбуланти у Клиничком Центру Крагујевац. Просечна старост пацијената 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 болест модификујући лек Метотрексат у дози од 15mg недељно уз фолну киселину 5mg.недељно. Пацијенти који су примали високе дозе кортикостероида ( $> 10 \text{ mg/дневно}$ , 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

висуелном 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](http://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 докозахекеаенске 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  $\gamma$ -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
- 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)<sup>2</sup>.

### 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 антропометријског 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*) (199).

### 3.4.ОДРЕЂИВАЊЕ ГЕНА

За анализу генетичких варијанти у генима који кодирају ензиме метаболизма пута омега-3 и омега-6 масних киселина коришћена је методологија заснована на PCR-у (PCR-RFLP и алел-специфични PCR) као и сквенцирање по Sangeru. Анализа ће се радити у

Лабораторији за молекуларну биомедицину у Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду. Биће анализирани следеће генетичке варијанте: rs174556 (интронски регион FADS1 гена, варијанта C>T), rs174561 (промоторски регион, и место везивања транскрипционих фактора FADS1 гена, CpG острвце, варијанта C>T), rs3834458 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена, CpG острвце, варијанта T>del), rs174570 (интронски регион FADS2 гена, место везивања транскрипционих фактора, варијанта C>T) и rs968567 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена и место везивања транскрипционих фактора, CpG острвце, варијанта G>A) (200, 201).

### **3.5.ОДРЕЂИВАЊЕ ПАРАМЕТАРА ХЕМОСТАЗЕ И ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА**

#### **3.5.1.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 (навWFAg) 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.

#### **3.5.2.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 лиофилованих пречишћених моноклонских антитела миша (на функционални епитоп vWF-a) 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-a 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.

### 3.5.3. Одређивање индекса агрегације тромбоцита (TRAP)

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

300  $\mu$ l паствора CaCl<sub>2</sub> (MP0530) загрејаног на 37 °C се помеша са 300  $\mu$ l пуне крви, затим следи инкубација 3 мин, након чега се дода 20  $\mu$ l TRAP тест реагенса и започиње мерење на апарату MULTIPATE (*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 Пв/Ша 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).

### 3.5.4. Одређивање параметара оксидационог стреса

Да би се избегли утицаји исхране на анализе крви саветовано је испитаницима да се пре узимања узорак крви придржавају дијете без сухомеснатих производа, сирева, рибе, биљних или црних чајева, пива, вина и других алкохолних пића. Узорци венске крви (4,5 ml) испитаницима су узети у време студије. Крв је узимана у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорак се састојала се од одвајања еритроцита од плазмецентрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4 °C). Исталожене 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 *AnalyticJenaSpecordS 600*.

#### 3.5.4.1. 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 нитроформазан плавог (202). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{max}=550$  nm. Есејна смеша (“*assay mixture*”) садржи: 50 mM TRIS-HCl



пуфера (рН = 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  $\mu$ l плазме и 950  $\mu$ 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:

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

$$\Delta E_{sp} = E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (заслепупробу)}$$

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

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

### 3.5.4.2. 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) (203). 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 (рН = 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 рН > 12, помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба плазме

користи се адекватна количина дестиловане воде.

Концентрација ослобођеног  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$ , уз претходну проверу концентрације (A230 за 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  износи 0,810). У три епрувете пипетира се, уместо плазме, 5, 10 и 20 ml 1 mM раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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  $\text{pH} > 12$ , помоћу 1M NaOH (10ml).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног  $\text{H}_2\text{O}_2$  у венском ефлуенту израчунава се на основу фактора апсорбанце (F)/nmol  $\text{H}_2\text{O}_2$ :

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

На основу апсорбанце узорка ( $A_u$ ) на  $\lambda_{\text{max}} = 610\text{nm}$  и њеног упоређивања са слепом пробом ( $A_{sp}$ ) израчунава се финална апсорбанца ( $\Delta A$ ) ( $A = A_u - A_{sp}$ ). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине венског ефлуента употребљеног у есеју (200 ml) израчунава се концентрација и количина  $\text{H}_2\text{O}_2$  у плазми по формули:

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

#### 3.5.4.3. 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 Eppendorf епрувете пиретира се 0,4 ml 28 % TCA и 0,8 ml плазме. Тако добијени узорци се инкубирају у леденом куратилу ( $-4^\circ \text{C}$ ) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугирају 4 минута на

15000 грм, а у добијеном супернатанту одређује се концентрација TBARS спектрофотометријски (204). 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  $\mu$ l екстракта плазме и 200  $\mu$ l 1% ТВА 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  $\lambda_{\max} = 530$  nm.

Концентрација ослобођених TBARS добија се на основу следеће једначине

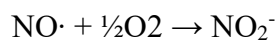
$$\text{nmol TBARS/ml плазме} = \Delta A (\text{Au-Asp}) / 1,56 \times 1,25$$

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

#### 3.5.4.4. Одређивање концентрације азот монооксида (NO•)

За одређивање концентрације нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у Eppendorf епрувете пипетира се 0,1 ml 3 М PCA, 0,4 ml 20 mM EDTA и 0,2 ml плазме. Тако добијени узорци инкубирају се у леденом куратилу (-4 °C) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугурају 4 минута на 15000 грм, супернатант се одлива, а преципитат ресуспендује у 2 М  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до pH = 7,4.

У тако добијеним узорцима екстракта плазме одређује се концентрација ослобођених нитрита спектрофотометријском реакцијом уз употребу Griess-овог реагенса (205). 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)-етилендиамин 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 µl свеженаправљеног *Griess*-ов реагенса и 125 µl амонијачног пуфера (pH = 9,0), когасачињавају амонијум хлорид (NH<sub>4</sub>Cl) и натријум тетраборат (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слаберастворљивости 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 узорка, 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 NaNO<sub>2</sub> у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24 µl, 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):

$F = \text{Екстинкција стандарда} / \text{Екстинкција слепе пробе} / \text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}$   
за сваки појединачни стандард (F1 - F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине. Затим се разлика екстинкција узорка и слепе пробе подели са стандардом (F):

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

### 3.5.4.5. 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  $O_2^{\cdot-}$ . (206). 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:

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

$\Delta K$  - промена апсорпције контролне реакције у минути

$\Delta A$  - 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

### 3.5.4.6. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а (207). 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 пуфера (1 : 10), као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0,9 ml разблаженог пуфера и 0,1 ml разблаженог 30 % раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 : 100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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  $\mu$ l пуфера додаје се између 5 и 50  $\mu$ 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, изражена у  $\mu$ M, у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

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

$\Delta A$  – промена апсорбанце у минути

R – разблажење

V – запремина узорка (ml)

Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

### 3.5.4.7. Одређивање активности глутатиона (GSH)

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми одређује се спектрофотометријски по методи *Beutler*-а (207), 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 +4°C). 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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  $\lambda_{\max} = 420$  nm. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту по формули:

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

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

### 3.6. Одређивање масних киселина

Одређивање масних киселина је урађено у Институту за медицинска истраживања, Универзитета у Београду. 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% H<sub>2</sub>O), и (1:1 v/v) сукцесивно, укупни екстракти липида су припремљени према

поступку *Harth*-а (208).

Плазма липиди су екстраховани са хлороформ-метанол (2:1 v/v) методом *Folch*-а (209), 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 (210), а затим анализирани гасном хроматографијом Varian 3400 опремљен капиларном колоном (Rtx 2330, RESTEC, USA). Поједини метилестри масних киселина су идентификовани ретенционом временом аутентичане стандардне мешавине (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) и / или стандардне мешавине полинезасићених масних киселина (Supelco, Inc. Bellefonte, PA).

### 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.

### 3.8. 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 *MannWhitney* 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 *KruskalWallis* тест. За тестирање зависности два обележја користишћен је  $\chi^2$ -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. АНТРОПОМЕТРИЈСКЕ, КЛИНИЧКЕ И ЛАБОРАТОРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

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

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±8) и контролне групе, која је била само на редовној медикаментозној реуматолошкој терапији (59±7,5).

Табела 5 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, и дужине болести између експерименталних група и контролне групе.

**Табела 5.** 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
ВМІ [kg/m <sup>2</sup> ]	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 ССР 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

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

## 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 2 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.

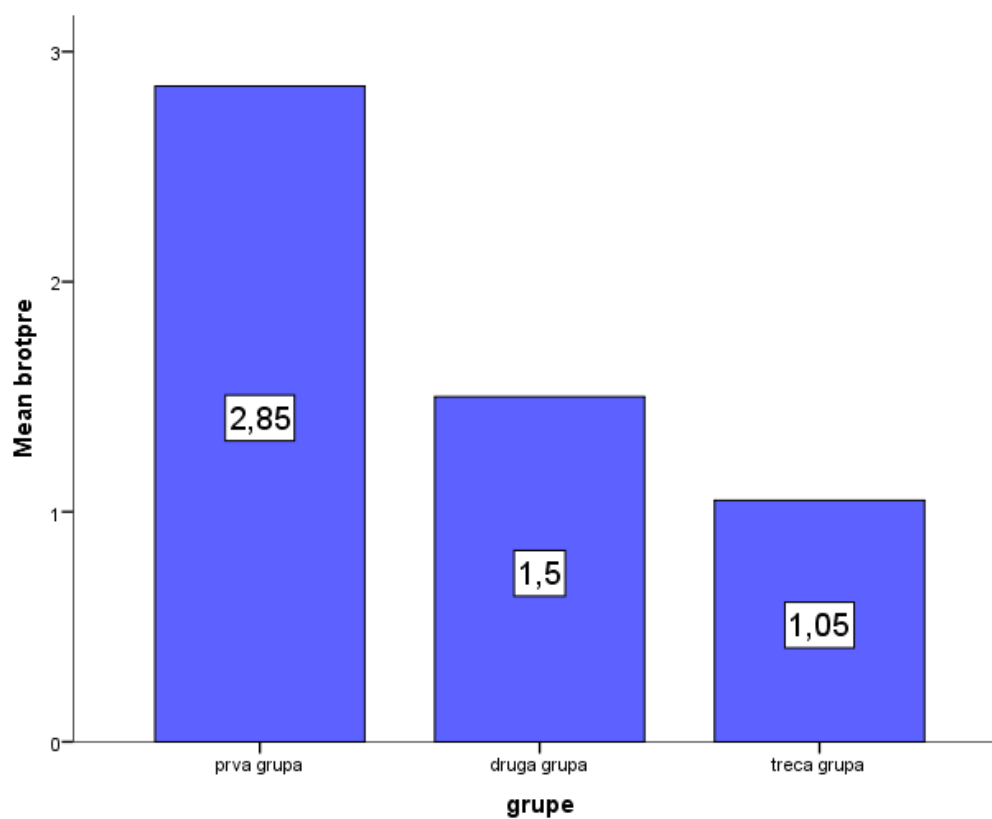
Такође, није било статистички значајне разлике у скоровима VAS, DAS 28 и HAQ између експерименталних група и контролне групе.

**Табела 6.** 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

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 1).



**График 1.** 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

Вредности CRP и ESR су биле ниже у све три групе испитаника, али без статистичке значајности (Табела 6).

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

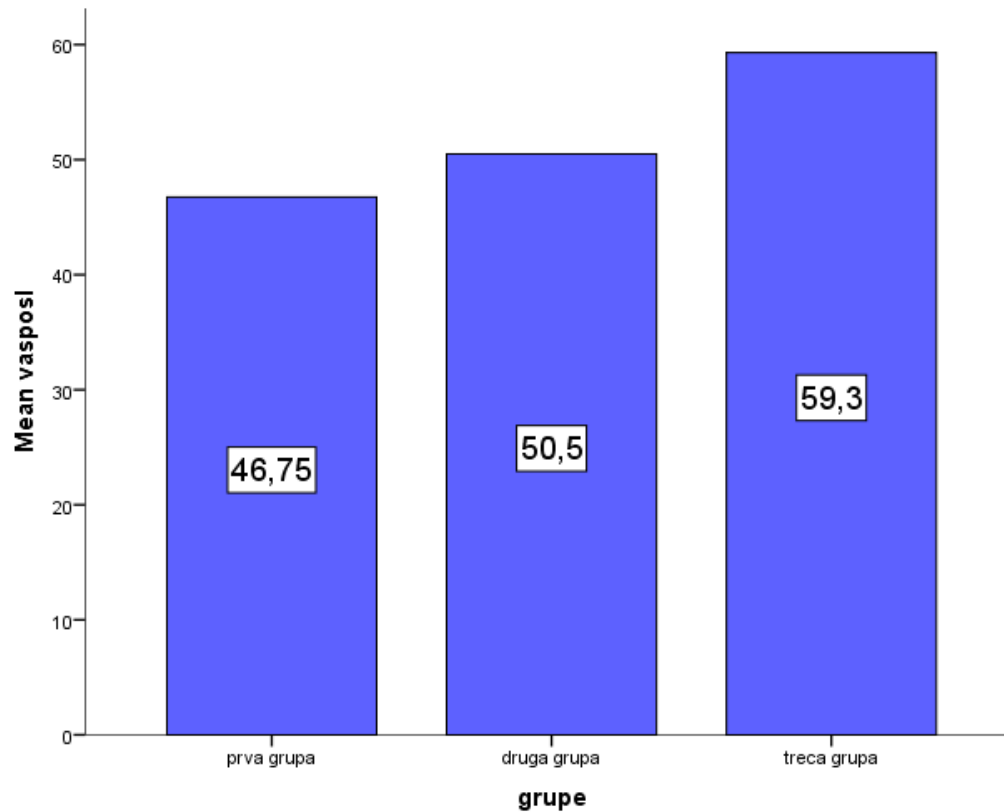
**Табела 6.** Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијената са реуматоидним артритисом после 3 месеца суплементације по групама

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 <sup>a</sup>	50,50±6,98 <sup>b</sup>	59,3±6,92 <sup>a b</sup>	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.

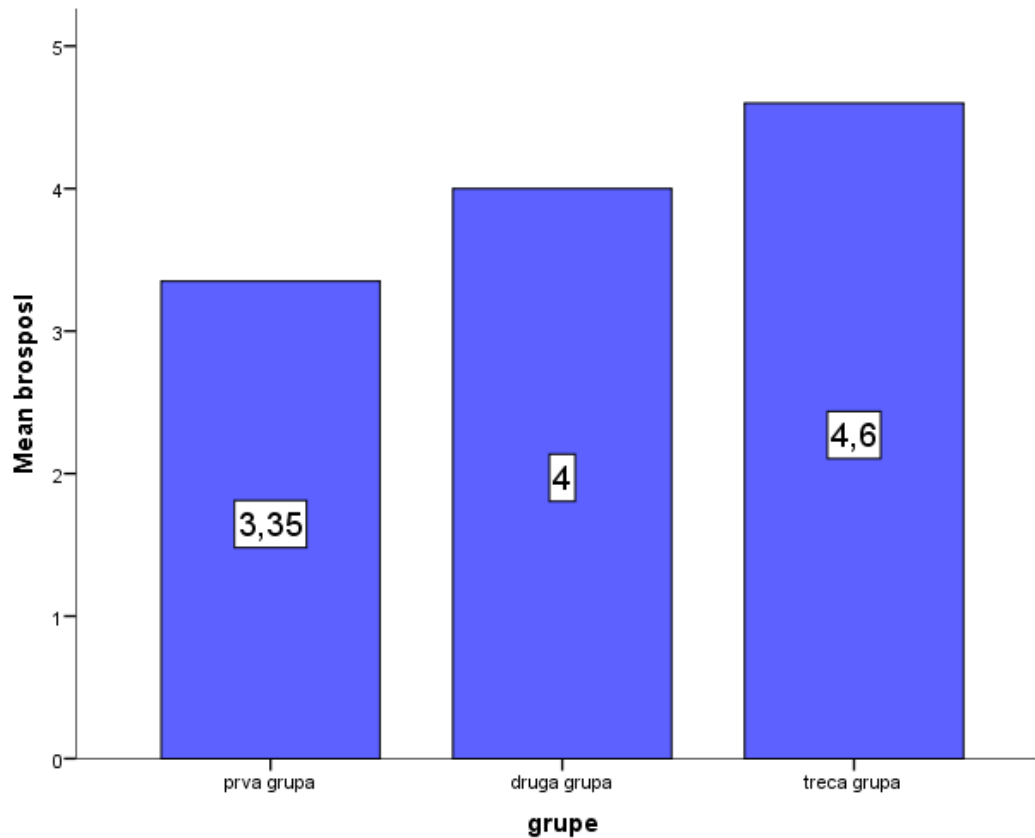
a p<0,01, b p<0,01

График 2 приказује статистички значајне разлике у висини VAS скора између прве и треће и друге (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине и уље ноћурка) и треће групе после суплементације.



**График 2.** Разлике у висини VAS скора између експерименталних група и контролне групе после суплементације

График 3 приказује статистички значајне разлике у броју осетљивих зглобова између прве и треће и прве и друге (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине и уље ноћурка) после суплементације.



**График 3.** 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 7, 8 и 9).

DAS 28 скор је био статистички значајно нижи у све три групе испитаника после суплементације (Табеле 7, 8 и 9).

Такође, вредности VAS и HAQ скорова статистички значајно су пале након тромесечне суплементације у обе експерименталне групе (Табеле 7 и 9).

Број отечених зглобова се статистички значајно смањило у све три групе испитаника, док се број осетљивих зглобова се статистички значајно смањило у првој (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине) и другој групу (испитаници који су узимали омега-3 масне киселине и уље ноћурка) (Табеле 7, 8 и 9).

**Табела 7.** 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 8.** Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *EveningPrimrose Oil* дневно после obroка.

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 9.** Клиничке и лабораторијске карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом на редовној реуматолошкој терапији

<b>Трећа група n=20</b>			
<b>Карактеристике пацијента</b>	<b>Почетак студије</b>	<b>После 3 месеца</b>	<b>p вредност</b>
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 ПАРАМЕТАРА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ**

#### **4.3.1. Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом пре периода суплементације**

Карактеристике лабораторијских и параметара хемостазе пацијената са реуматоидним артритисом по групама пре суплементације су приказане у Табели 7.

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.

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

**Табела 10.** Карактеристике лабораторијских параметара код 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

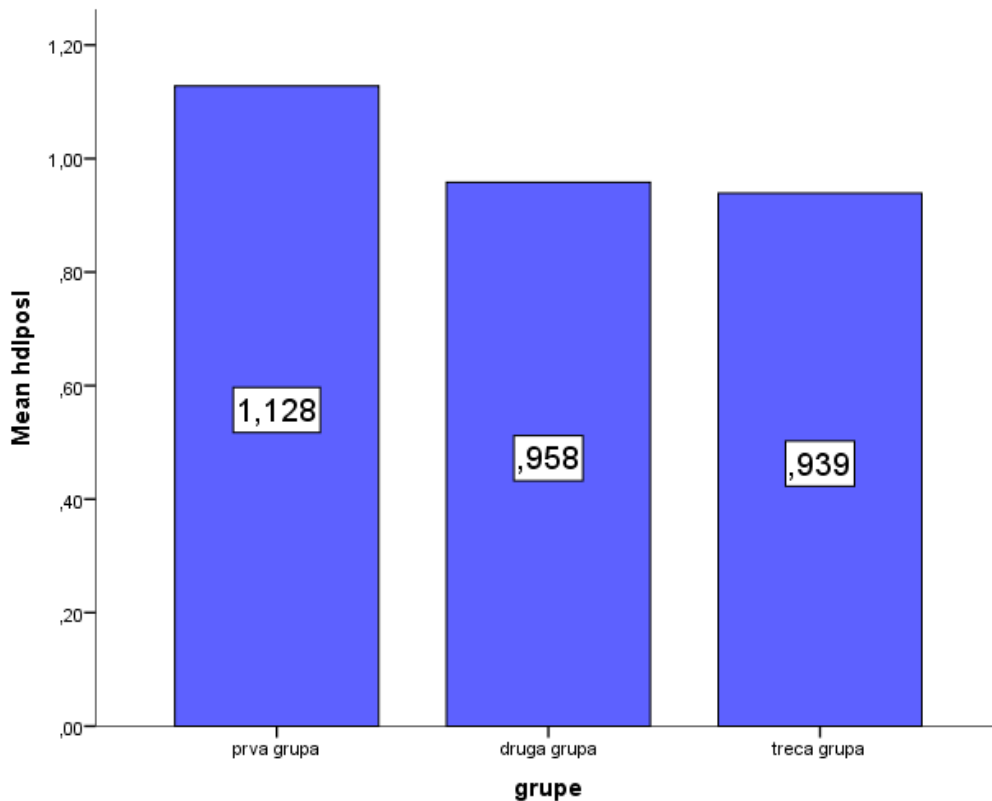
Вредности су изражене као средња вредност  $\pm$  SD; NS: није статистички значајно; RBC (енгл. *red blood cells*): еритроцити; WBC (енгл. *white blood cells*): леукоцити; PTL (енгл. *platelets*): тромбоцити ; HDL (енгл. *high-density lipoprotein*): липопротеин високе густине; LDL (енгл. *low-density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

#### 4.3.2. Карактеристике лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом после периода суплементације

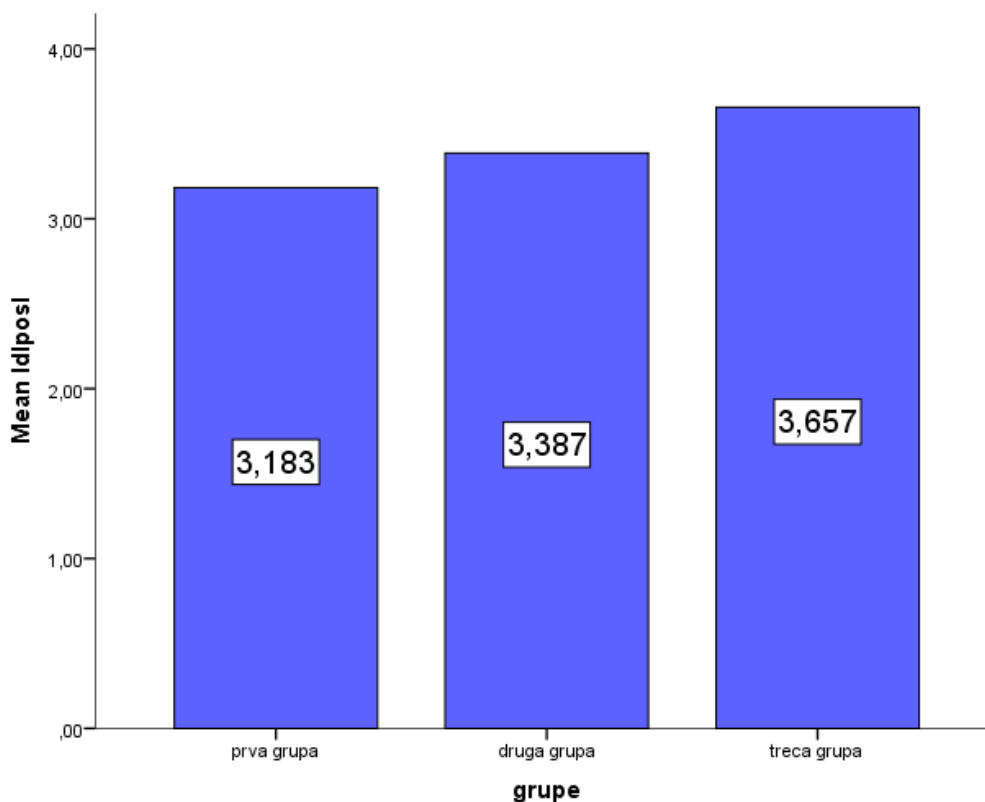
Након три месеца суплементације концентрованим рибљим уљем, односно комбинацијом концентрованог рибљег уља и уља ноћурка, вредности глукозе, холестерола, триглицерида и фибрина се нису статистички значајно разликовале између група.

Вредности HDL су се статистички значајно разликовале између прве и друге и прве у треће групе, након периода суплементације (График 4).

Такође вредности LDL су се статистички значајно разликовале после суплементације између прве у треће и друге и треће групе (График 5).



**График 4.** Разлике у висини средњих вредности HDL између експерименталних група и контролне групе после суплементације



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

#### **4.3.3.Поређење карактеристике лабораторијских параметара код 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 11, 12 и 13).

Вредности глукозе су статистички значајно биле ниже после периода суплементације у оквиру прве групе, тј.групе која је користила концентровано рибеље уље (Табела 11).

Вредности HDL су статистички значајно биле ниже у трећој групи, након 3 месеца

суплементације (Табела 13).

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 11 и 13).

Док се вредности триглицерида и холестерола нису статистички значајно разликовале у оквиру група након периода суплементације (Табеле 11, 12 и 13).

**Табела 11.** Карактеристике лабораторијских параметара 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	р 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 12.** Карактеристике лабораторијских параметара пацијената са реуматоидним артритисом који су узимали 3 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 13.** Карактеристике лабораторијских параметара 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 суплементацијепогрупама су приказане у Табели 14.

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 14.** 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 Mean ± SD Median	600,00±285.0 520,00	671,90±255,20 698,50	676,20±193,18 708,00	0.352 <sup>a</sup>
ASPI Mean±SD Median	641,70±311,59 641,00	667,65±339,76 801,00	820,40±278,42 828,00	0.733 <sup>b</sup>
TRAP Mean±SD Median	838,15±314,56 860,50	960,60±199,73 1007,50	864,70±196,82 874,00	0.320 <sup>a</sup>
ADP/TRAP Mean±SD Median Percent of reduction	0.99±0.34 0.77 99	0.70±0.19 0.79 70	0.78±0.15 0.75 78	0.176 <sup>b</sup>
ASPI/TRAP Mean±SD Median Percent of reduction	0.89±0.31 0.95 89	0.70±0.35 0.85 70	0.93±0.22 0.96 93	0.534 <sup>a</sup>

Вредности су изражене као средња вредност ± SD;

<sup>a</sup>ANOVA test.анализа варијансе

<sup>b</sup>Kruskal-Wallis test.

<sup>c</sup>Significant at P < .05.

#### 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 15.

Вредности ADP су биле статистички значајно ниже у првој него у трећој групи испитаника после периода суплементације, али без статистичке значајности.

Вредности ASP 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 него у 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 15.** 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 Mean ± SD Median	560,55±251,32 489,50	651,50±204,35 704,50	667,50±189,49 738,00	0.057 <sup>a</sup>
ASPI Mean±SD Median	609,80±332,24 611,00	662,40±314,08 728,00	783,95±309,47 835,00	0.480 <sup>b</sup>
TRAP Mean±SD Median	836,20±242,17 818,00	893,00±253,05 893,00	804,25±209,83 827,50	0.586 <sup>a</sup>
ADP/TRAP Mean±SD Median Percent of reduction	0,68±0,20 <sup>c</sup> 0,65 68	0,79±0,14 0,78 79	0,83±0,12 <sup>c</sup> 0,89 83	0.042 <sup>b</sup>
ASPI/TRAP Mean±SD Median Percent of reduction	0,76±0,39 0,91 76	0,80±0,30 0,87 80	0,96±0,23 0,95 96	0.565 <sup>a</sup>

Вредности су изражене као средња вредност ± SD;

<sup>a</sup>ANOVA test. <sup>b</sup>Kruskal-Wallis test. <sup>c</sup>p < 0,05

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

У првој групи, после 3 месеца примене концентрованог риблиег уља, нивои TBARS и  $\text{NO}_2^-$  у плазми су се статистички значајно повећали. Такође је дошло до статистички значајног повећања нивоа GSH у еритроцитима и статистички значајног смањења  $\text{H}_2\text{O}_2$  нивоа у плазми (Табле 16).

Исти ефекти статистички значајног пораста нивоа TBARS и  $\text{NO}_2^-$  у плазми су постигнути и у другој групи, која је користила концентровано риблије уље у комбинацији са уљемноћурка у периоду од 3 месеца. Поред тога, забележена је статистички значајно повећана активност SOD (Табела 17).

Смањење нивоа  $\text{H}_2\text{O}_2$  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,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ) и антиоксидансе (CAT, SOD, GSH) (Табела 18).

Активност каталазе и ослобађање  $\text{O}_2^-$  нису показали статистички значајне промене између три групе (Табеле 16, 17 и 18).

**Табела 16.** Нивои прооксиданата и антиоксиданата код пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5гел 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 <sub>2</sub> <sup>-</sup> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	2,92 $\pm$ 0,42	3,78 $\pm$ 0,42	p < 0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	2,55 $\pm$ 0,71	1,90 $\pm$ 0,18	p < 0,001
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	1,29 $\pm$ 0,87	1,14 $\pm$ 0,69	NS
CAT [U/g Hb x 10 <sup>3</sup> ]	0,01 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	NS
SOD [U/g Hb x 10 <sup>3</sup> ]	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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид; O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анјон радикал; NO – азот монооксид; SOD – супероксид дисмутаза; CAT – каталаза и GSH - глутатион.

**Табела 17.** Нивои прооксиданата и антиоксиданата код пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *EveningPrimrose Oil* дневно после obroka

Група II			
Параметри	Пре суплементације	После 3 месеца	р вредност
TBARS [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	2,03 $\pm$ 0,44	2,82 $\pm$ 0,23	p < 0,001
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	2,87 $\pm$ 0,56	3,96 $\pm$ 0,49	p < 0,001
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	2,15 $\pm$ 0,49	1,86 $\pm$ 0,28	NS
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	1,01 $\pm$ 0,52	1,78 $\pm$ 2,17	NS
CAT [U/g Hb x 10 <sup>3</sup> ]	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	NS
SOD [U/g Hb x 10 <sup>3</sup> ]	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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид; O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анион радикал; NO – азот монооксид; SOD – супероксид дисмутаза; CAT – каталаза и GSH - глутатион.

**Табела 18.** Нивои прооксиданата и антиоксиданата код пацијента са реуматоидним артритисом на редовној реуматолошкој терапији

Група III			
Параметри	Пре суплементације	После 3 месеца	р вредност
TBARS [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	2,45 $\pm$ 0,55	2,48 $\pm$ 0,21	NS
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	3,41 $\pm$ 0,36	3,81 $\pm$ 0,14	NS
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	1,91 $\pm$ 0,32	2,06 $\pm$ 0,40	NS
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> [ $\text{nmol}/\text{min}/\text{g wt}$ ]	0,99 $\pm$ 0,52	1,29 $\pm$ 1,03	NS
CAT [U/g Hb x 10 <sup>3</sup> ]	0,00 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	NS
SOD [U/g Hb x 10 <sup>3</sup> ]	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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид; O<sub>2</sub><sup>-</sup> - супероксид анион радикал; NO – азот монооксид; SOD – супероксид дисмутаза; CAT – каталаза и GSH - глутатион.

#### 4.6. АНТРОПОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

Антропометријске карактеристике пацијената као што су ВМІ, 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 пре и 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 19 и 20).

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 19).

**Табела 19.** Телесне карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после obroка

Прва група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	р вредност
ВМІ[kg/m <sup>2</sup> ]	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; ВМІ: индекс телесне масе изражен у kg/m<sup>2</sup>; 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 20.** Телесне карактеристике пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 капсула *Omega-3 Cardio* и 2 капсуле *EveningPrimrose Oil* дневно после obroка

Друга група n=20			
Параметри	Пре суплементације	После суплементације	р вредност
BMI[kg/m <sup>2</sup> ]	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<sup>2</sup>; **OS**: обим струка изражен у сантиметрима; **SAD**: сагитални абдоминални дијаметар; **FAT**: проценат масти у организму; **OS/TV**: ; **SAD/TV**: ; **VODA**: садржај воде у организму

#### 4.7. ОДРЕЂИВАЊЕ ВРЕДНОСТИ МАСНИХ КИСЕЛИНА У СЕРУМУ КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ ПРЕ И ПОСЛЕ ПЕРИОДА СУПЛЕМЕНТАЦИЈЕ

Вредности концентрације масних киселина пацијената са реуматоидним артритисом пре и после суплементацијесу приказане у Табелама 21, 22 и 23.

Вредности концентрације масних киселина између група након периода суплементације је приказан у Табели 24.

**Табела 21.** Вредности масних киселина код пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* дневно после obroка

Група I			
Масне киселине	Пре суплементације	После 3 месеца	p 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	NS
18:1 n-9	9.32 ± 1.24	8.05 ± 1.05	NS
18:1 n-7	1.99 ± 0.33	1.58 ± 0.25	0.010
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	0.00 ± 0.00	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	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	0.007
n-3	2.85 ± 1.14	4.55 ± 2.26	0.013
n-6	38.08 ± 3.80	39.05 ± 3.22	NS
n-6/n-3	15.47 ± 5.51	10.62 ± 5.07	0.005
SFA	47.17 ± 3.59	46.24 ± 3.97	NS



MUFA	11.89 ± 1.33	10.16 ± 1.34	0.012
PUFA	40.61 ± 3.52	43.13 ± 3.17	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, **18:2n-6** - линолна масна киселина,  
**18:3n-3**- α-линоленска масна киселина, **18:3 n-6** -γ-линолна масна киселина,  
**20:3n-6**- γ-линоленска масна киселина, **20:4n-6**-арахидонска масна киселина,  
**20:5 n-3** - еикозапентаенска масна киселина, **22:4n-6**- докозатетраенска масна киселина,  
**22:5 n-3** докозапентаентска масна киселина, **22:6n-3**- докозахексаенска масна киселина, **n-3**-  
збирсвих n-3 масних киселина, **n-6**- збирсвих n-6 масних киселина,  
**n-6/n-3** – однос n-6 и n-3 масних киселина, **SFA** - збирсвих засићених масних киселина,  
**MUFA** - збирсвих масних киселина са 1 двогубом везом (16:1 и 18:1),  
**PUFA**- збирсвих осталих масних киселина од 18:2 до 22:6.

**Табела 22.** Вредности масних киселина код пацијента са реуматоидним артритисом који су узимали 5 гел капсула *Omega-3 Cardio* и 2 гел капсуле *EveningPrimrose Oil* дневно после obroka

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	NS
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	NS
18:3 n-6	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.11	<0.001
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 ± 5.04	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  $\pm$  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, **18:2n-6** - линолна масна киселина,  
**18:3n-3**-  $\alpha$ -линоленска масна киселина, **18:3 n-6** - $\gamma$ -линолна масна киселина,  
**20:3n-6**-  $\gamma$ -линоленска масна киселина, **20:4n-6**-арахидонска масна киселина,  
**20:5 n-3** - еикозапентаенска масна киселина, **22:4n-6**- докозатетраенска масна киселина,  
**22:5 n-3** докозапентаентска масна киселина, **22:6n-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 масних киселина код 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	NS
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	NS
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	NS
n-6	38,14 ± 3,09	40,03 ± 2,71	NS
n-6/n-3	17,25 ± 5,51	14,27 ± 4,44	NS
SFA	48,41 ± 3,02	46,26 ± 3,67	NS
MUFA	9,72 ± 2,41	10,61 ± 1,74	NS
PUFA	40,61 ± 3,52	43,13 ± 3,17	NS

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, **18:2n-6** - линолна масна киселина,

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

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

**20:5 n-3** - еикозапентаенска масна киселина, **22:4n-6**- докозатетраенска масна киселина, **22:5 n-3** докозапентаентска масна киселина, **22:6n-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 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом између група након периода суплементације

Масне киселине	Пре суплементације	После 3 месеца	p вредност
20:4 n-6 AA	10,22 ± 1,81	11,29 ± 2,14*#	9,60 ± 2,90
20:5 n-3 EPA	1,01 ± 1,02**	0,49 ± 0,23*#	0,40 ± 0,25
22:5 n-3 DPA	0,58 ± 0,30	0,45 ± 0,16	0,56 ± 0,69
22:6 n-3 DHA	2,74 ± 1,08*	2,22 ± 0,74*	1,83 ± 0,72
n-3	4,55 ± 2,26**	3,33 ± 1,00*	3,09 ± 1,15
n-6	39,05 ± 3,22	40,75 ± 2,86	40,03 ± 2,71
n-6/n-3	10,62 ± 5,07**	13,50 ± 4,81*	14,27 ± 4,44
SFA	46,24 ± 3,97	45,19 ± 2,80	46,26 ± 3,67
MUFA	10,16 ± 1,34	10,67 ± 1,12	10,61 ± 1,74
PUFA	43,13 ± 3,17	44,07 ± 2,96	43,60 ± 4,22

\* Статистички значајна разлика између група ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); # Статистички значајна разлика од групе I # ( $p \leq 0.05$ ); ANOVA; анализа варијансе; 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, **18:2n-6** - линолна масна киселина,

**18:3n-3** -  $\alpha$ -линоленска масна киселина, **18:3 n-6** -  $\gamma$ -линолна масна киселина,

**20:3n-6**-  $\gamma$ -линоленскамасна киселина, **20:4n-6**-арахидонскамасна киселина,  
**20:5 n-3** - еикозапентаенскамасна киселина, **22:4n-6**- докозатетраенскамасна киселина,  
**22:5 n-3** докозапентаентскамасна киселина, **22:6n-3** - докозахексаенскамасна киселина, **n-3**- збир свих n-3 масних киселина, **n-6**- збир свих n-6 масних киселина,  
**n-6/n-3** – односп-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.

#### **4.8. ОДРЕЂИВАЊЕ ГЕНЕТИЧКИХ ВАРИЈАНТИ У ГЕНИМА КОЈИ КОДИРАЈУ ЕНЗИМЕ У МЕТАБОЛИЧКОМ ПУТУ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИХ КИСЕЛИНА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ**

У табели 25. су приказане генетичке варијанте у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина: rs174556 (интронски регион FADS1 гена, варијанта C>T), rs174561 (промоторски регион, и место везивања транскрипционих фактора FADS1 гена, CpG острвце, варијанта C>T), rs3834458 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена, CpG острвце, варијанта T>del), rs174570 (интронски регион FADS2 гена, место везивања транскрипционих фактора, варијанта C>T), rs968567 (интергенски регион између гена FADS1 и FADS2 гена и место везивања транскрипционих фактора, CpG острвце, варијанта G>A) код пацијената са реуматоидним артритисом у групама које су примале суплементацију омега-3 и омега-6 масним киселинама.

**Табела 25.** Генетичке варијанте у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом који су примали суплементацију (група I и група II)

Група I	rs174556	rs174561	rs174570	rs3834458	rs968567
1.	C/T	C/T	C/C	T/-	G/G
2.	T/T	C/C	C/T	-/-	G/A
3.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
4.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
5.	C/T	C/T	C/C	T/-	G/A
6.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
7.	T/T	C/C	C/T	-/-	G/A
8.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
9.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
10.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
11.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
12.	C/T	C/T	C/T	T/-	G/G
13.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
14.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
15.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
16.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
17.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
18.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
Група II					
1.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
2.	C/T	C/T	C/T	T/-	G/G
3.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
4.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
5.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
6.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
7.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
8.	C/T	C/T	C/C	T/-	G/A
9.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
10.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
11.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
12.	C/C	T/T	C/T	T/-	G/G
13.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
14.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
15.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
16.	C/T	C/T	C/C	T/-	G/G
17.	T/T	C/C	T/T	-/-	G/G



**Табела 26.** Генетичке варијанте у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом који нису примали суплементацију (група III)

Група III	rs174556	rs174561	rs174570	rs3834458	rs968567
1.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
2.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
3.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
4.	<b>C/T</b>	<b>T/C</b>	C/C	T/-	<b>G/A</b>
5.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
6.	C/T	<b>T/C</b>	C/C	T/-	<b>G/A</b>
7.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
8.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
9.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
10.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
11.	C/T	<b>T/C</b>	C/C	T/-	<b>G/A</b>
12.	<b>T/T</b>	<b>C/C</b>	C/C	<b>-/-</b>	<b>A/A</b>
13.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
14.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
15.	C/T	<b>T/C</b>	<b>T/T</b>	<b>-/-</b>	G/G
16.	C/T	<b>T/C</b>	<b>C/T</b>	T/-	G/G
17.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
18.	C/T	<b>T/C</b>	C/C	T/-	G/G
19.	C/C	T/T	C/C	T/T	G/G
20.	C/C	T/T	<b>C/T</b>	T/-	G/G

У табели 27. су приказане учесталости генских алела FADS код свих испитаника са реуматоидним артритисом који су учествовали у нашој студији. Ова пет минор алела ензима које кодирају десатурзе масних киселина су анализирани у нашој студији да би показали њихов утицај на ефекте суплементације омега-3 и омега-3/омега-6 масним киселинама код пацијената са руматоидним артритисом.

**Табела 27.** Учесталост генетичке варијанте у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3и омега-6 масних киселина код пацијената са реуматоидним артритисом

	Хомозигот минор	Хетерозигот	Хомозигот мајор	Учесталост минор алела	Р вредност
<b>FADS1</b>					
rs174556	ТТ(5.1)	СТ(41.3)	СС(53.6)	0.24	0.19
rs174561	СС(5.2)	ТС(38.2)	ТТ(56.7)	0.24	0.19
rs3834458	del/del(5.1)	T/del(36.4)	T/T(58.6)	0.22	0.50
<b>FADS2</b>					
rs174570	ТТ(7.0)	СТ(40.7)	СС(52.3)	0.27	0.47
rs968567	АА(4.0)	GA(32.9)	GG(62.8)	0.20	0.70

Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина

У табели 28. су приказане преко регресионе анализе да алели rs174556 и rs174561 код прве групе пацијената са реуматоидним артритисом који су три месеца узимали суплементацију омега-3 масним киселинама утичу статистички значајно на повећање концентрације арахидонске киселине, док алел rs174561 утиче позитивно и у моделу када је завистан од других генских алела. За концентрацију ДНА само алел rs3834458 има статистичку значајну негативну корелацију у моделу када је повезан и са другим генским алелима. Анализирану су ова 4 алела од укупно 5 јер када се укључе у регресиону анализу утичу на 24% и 11% варијабилности у концентрацијама у плазми за АА и ДНА.

**Табела 28.** Повезаност 4 селектована генетичке варијанте FADS и концентрација АА и ДНА у плазми код прве групе пацијента са реуматоидним артритисом након периода суплементације

FADS -SNPs	АА		ДНА	
	1	2	1	2
rs174556	0.67±0.12*	0.28±0.19	0.12±0.04	0.09±0.07
rs174561	0.76±0.12*	0.69±0.20*	0.10±0.02	0.11±0.05
rs3834458	0.387±0.20	-0.20±0.13	0.00±0.04	-0.12±0.05*
rs174570	-0.03±0.12	-0.12±0.11	-0.04±0.04	-0.06±0.04

Вредности су изражене у средњим вредностима;±SD; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ );  $\beta$  коефицијент је резултат линеарног регресионог модела и показује промену у повећању концентрацији (mg/dL) масних киселина у односу на број минор алела; АА, арахидонска киселина; ДНА, докозахексаеноинска киселина; FADS, десатураза масних киселина

1 - Модел је представљен за сваку појединачну генетичку варијанту FADS и концентрације АА и ДНА у плазми независно од других генетичких варијанти

2 - Модел представља линеарну асоцијацију сваке генетичке варијанте FADS и концентрације АА и ДНА у плазми зависно од осталих три генетичких варијанти

У табели 29. су приказане преко регресионе анализе да алел rs3834458 код друге групе пацијената са реуматоидним артритисом који су три месеца узимали супплементацију омега-3/омега-6 масним киселинама утиче статистички значајно на повећање концентрације арахидонске киселине. За концентрацију DHA алел rs174561 има статистичку значајну позитивну корелацију као и у моделу када је повезан и са другим генским алелима. Анализирану су ова 4 алела од укупно 5 јер када се укључе у регресиону анализу утичу на 24% и 11% варијабилности у концентрацијама у плазми за AA и DHA.

**Табела 29.** Повезаност 4 селектована генетичке варијанте FADS и концентрација AA и DHA у плазми код друге групе пацијента са реуматоидним артритисом након периода супплементације

FADS -SNPs	AA		DHA	
	1	2	1	2
rs174556	0.56±0.02	0.31±0.14	0.12±0.04	0.09±0.07
rs174561	0.66±0.19	0.59±0.12	0.12±0.04*	0.14±0.07*
rs3834458	0.28±0.12*	-0.20±0.13	0.00±0.04	-0.11±0.03
rs174570	-0.05±0.09	-0.10±0.11	-0.05±0.02	-0.07±0.02

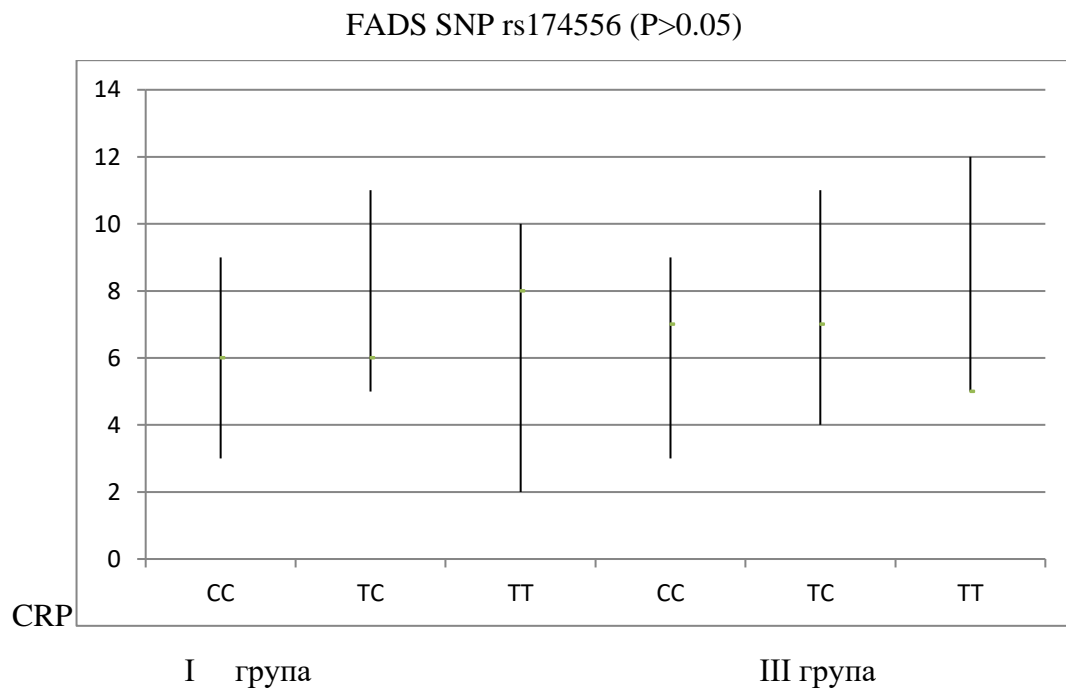
Вредности су изражене у средњим вредностима;±SD; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ );  $\beta$  коефицијент је резултат линеарног регресионог модела и показује промену у повећању концентрацији (mg/dL) масних киселина у односу на број минор алела; AA, арахидонска киселина; DHA, докозахексаеноинска киселина; FADS, десатураза масних киселина

1 - Модел је представљен за сваку појединачну генетичку варијанту FADS и концентрације AA и DHA у плазми независно од других генетичких варијанти

2 - Модел представља линеарну асоцијацију сваке генетичке варијанте FADS и концентрације AA и DHA у плазми зависно од осталих три генетичких варијанти

На графикону 6 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код прве и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензиме десатуразе масних киселина.

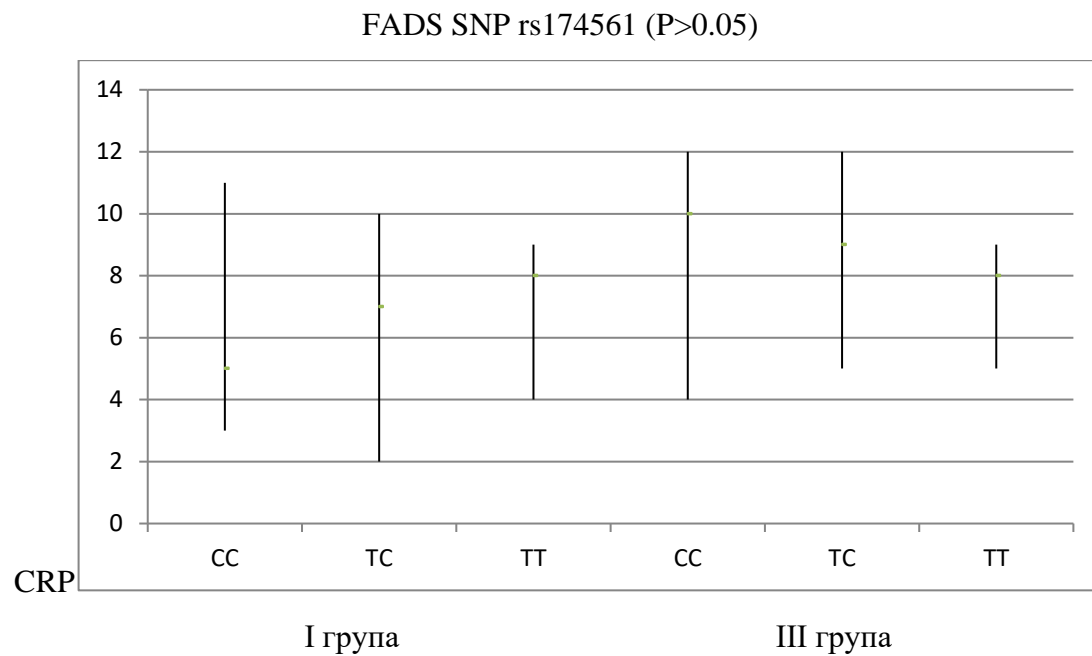
**Графикон 6.** Средња вредност CRP у првој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 7 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код прве и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина.

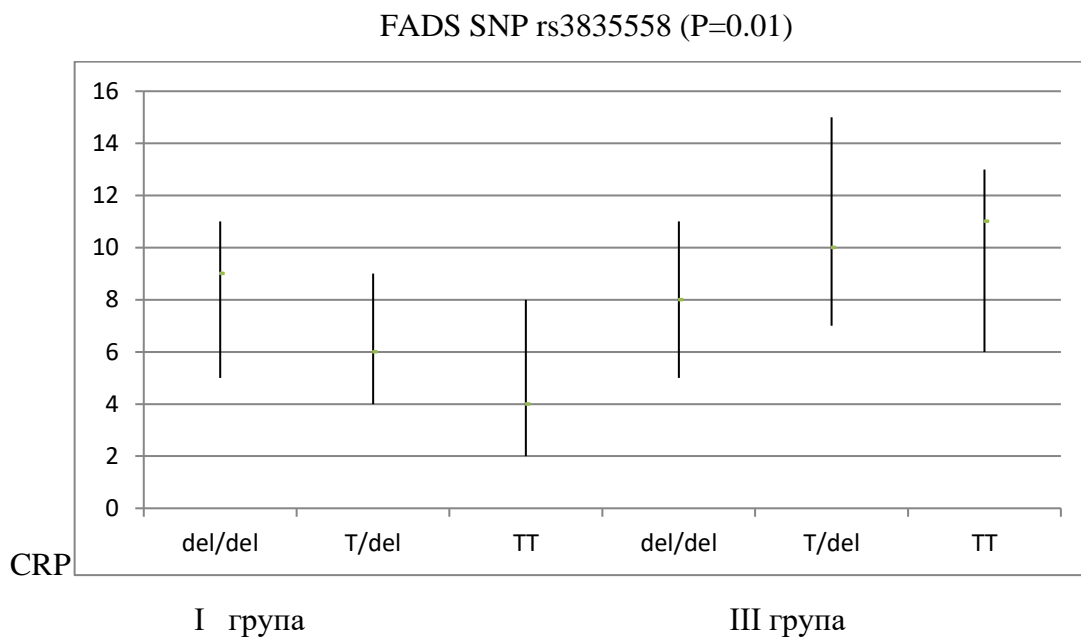
**Графикон 7.** Средња вредност CRP у првој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 8 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код прве и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина. Носиоци алела T/- и T/T су имали статистички ниже вредности CRP након периода суплементације у односу на контролну групу. Није било статистички значајне разлике код носиоца хомозигота -/-.

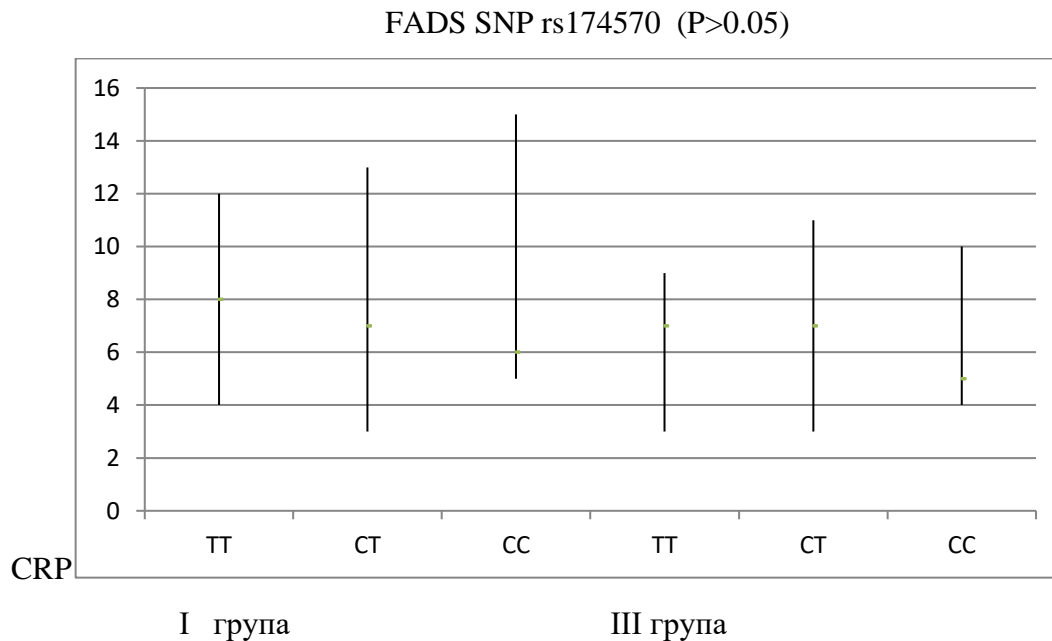
**Графикон 8.** Средња вредност CRP у првој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 9 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код прве и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина.

**Графикон 9.** Средња вредност CRP у првој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације

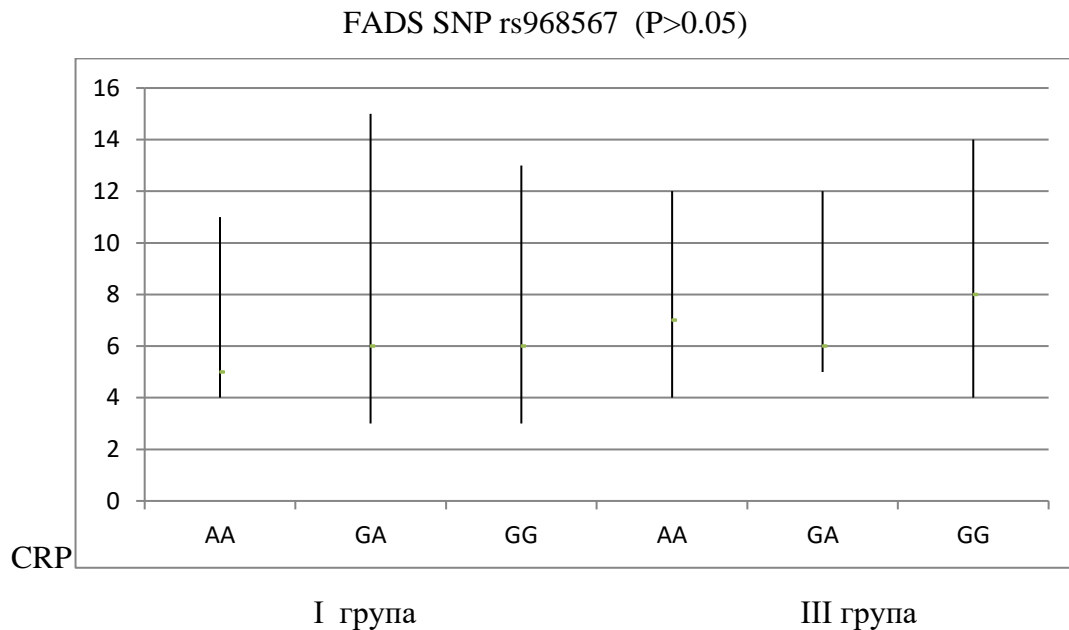


Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина



На графикону 10 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код прве и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина.

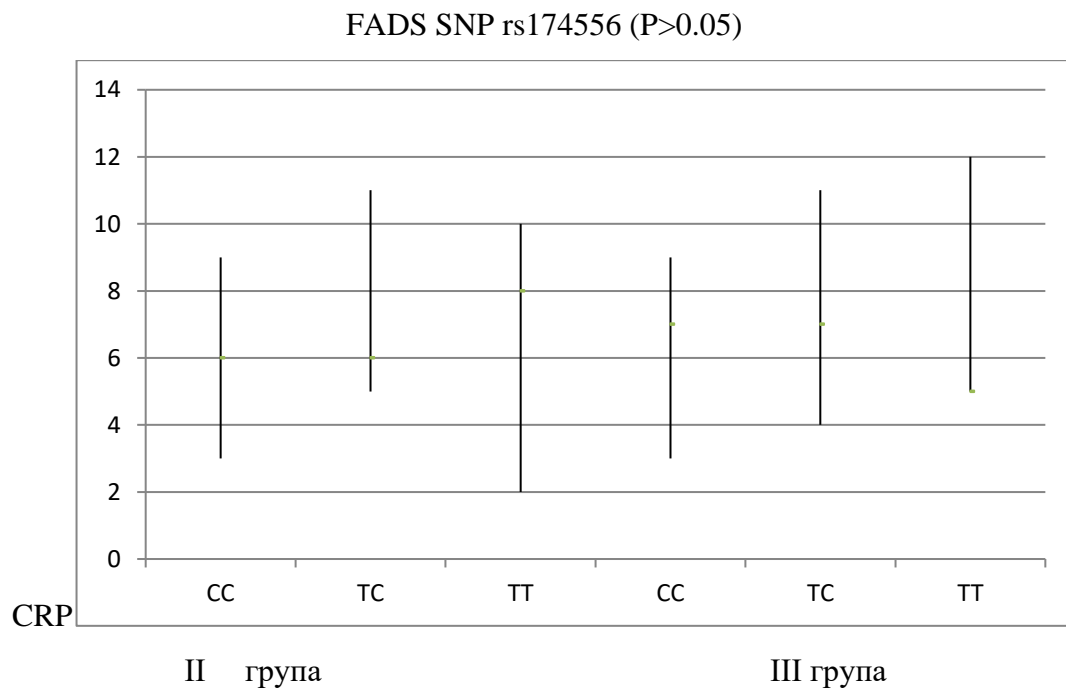
**Графикон 10.** Средња вредност CRP у првој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 11 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код друге и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина.

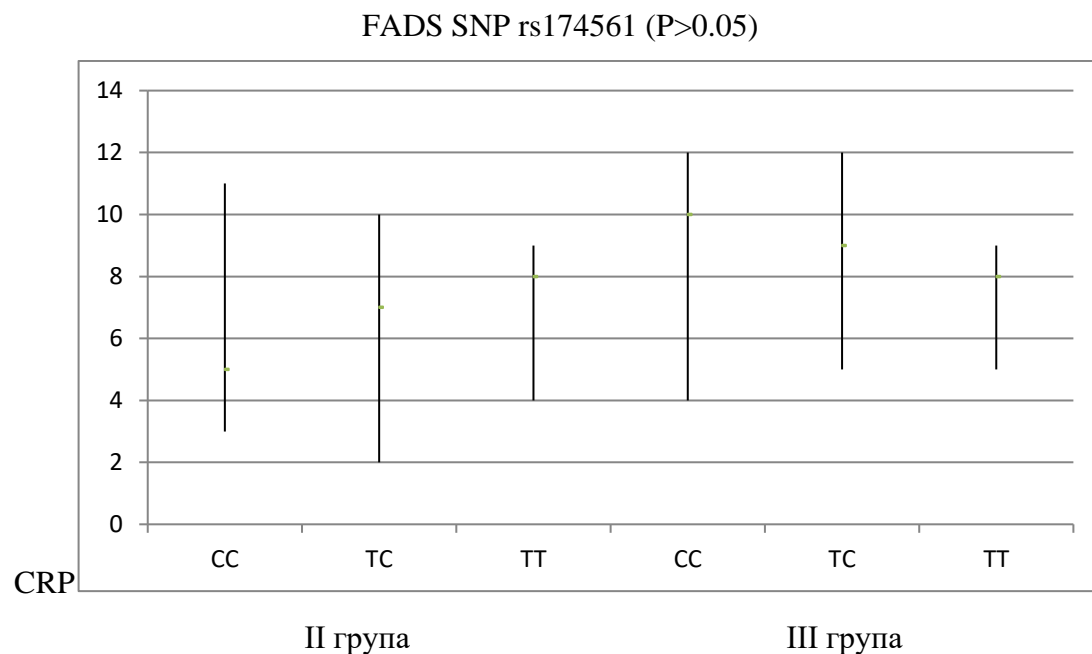
**Графикон 11.** Средња вредност CRP у другој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 12 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код друге и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина.

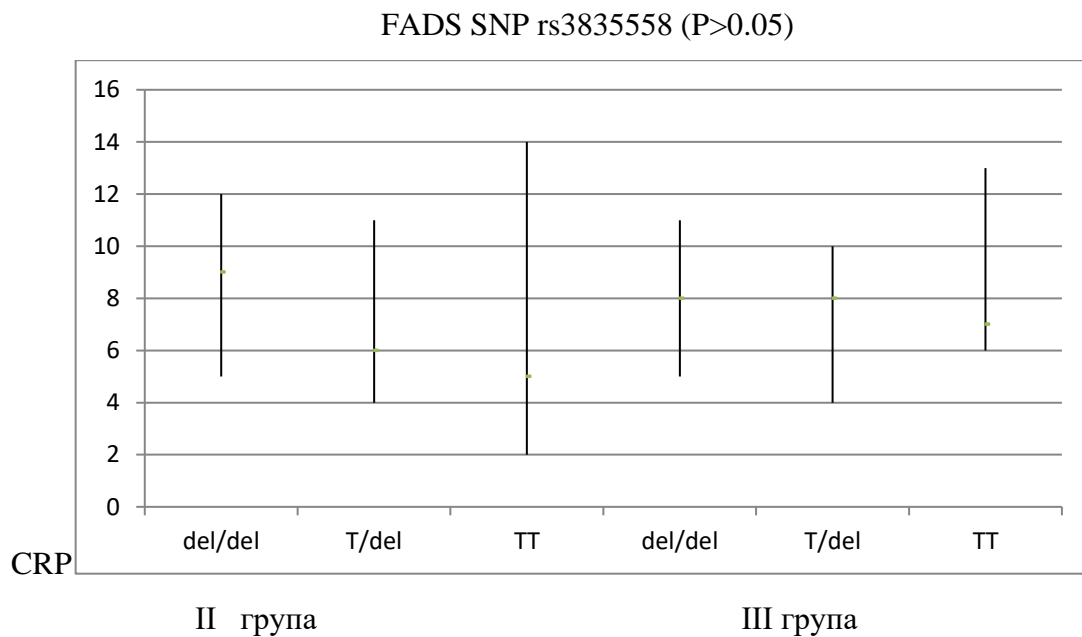
**Графикон 12.** Средња вредност CRP у другој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 13 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код друге и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина.

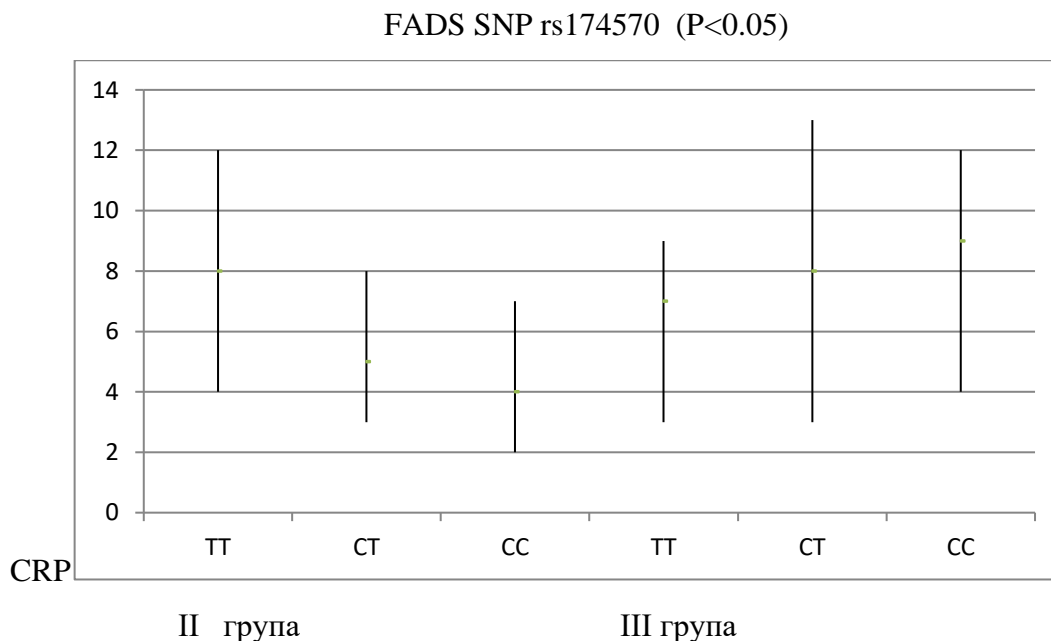
**Графикон 13.** Средња вредност CRP у другој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 14 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код друге и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензиме десатуразе масних киселина. Код носиоца алела СТ и СС нађене су статистички значајно ниже вредности ЦРП у односу на носиоце истих алела у контролној групи након периода суплементације омега-3/омега-6 масним киселинама. Носиоци хомозитога ТТ нису имали значајно ниже вредности CRP у односу на контролну групу.

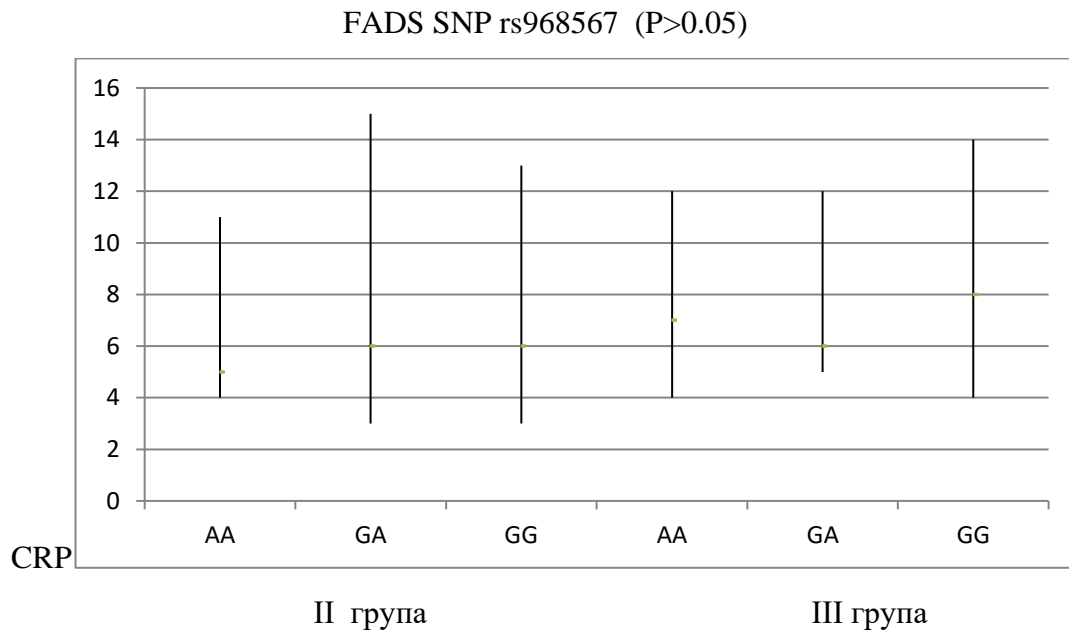
**Графикон 14.** Средња вредност CRP у другој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

На графикону 15 су приказане средње вредности CRP након периода суплементације код друге и треће групе пацијената у доносу на присуство генетичких варијанти гена за ензим десатуразе масних киселина.

**Графикон 15.** Средња вредност CRP у другој и трећој групи пацијената са реуматоидним артритисом након периода суплементације



Вредности су изражене у процентима; Статистички значајна разлика између група \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.01$ ); FADS, десатураза масних киселина; SNP, генетичка варијанта гена за ензим десатуразу масних киселина

**V**

**ДИСКУСИЈА**

Реуматоидни артритис карактерише хронично запаљење, разарање зглобова и повећан ризик за кардиоваскуларна обољевања (215).

Есенцијалне масне киселине су молекули који се не могу синтетисати у људском телу али су витални за нормални метаболизам. Прехрамбено важне  $n-3$  масне киселине су  $\alpha$ -линолеинска киселина (ALA), еикозапентаеноинска киселина (EPA), и докозахексаеноинска киселина (DHA), све од којих су полинезасићене. Уобичајени извори  $n-3$  масних киселина су рибље уље и нека биљна уља, као што су уља лана и алги.

Сисари не могу да синтетишу  $n-3$  масне киселине, али имају ограничену способност формирања дуголанчаних  $n-3$  масних киселина EPA (20 угљеника) и DHA (22 угљеника) из масне киселине ALA са осамнаест угљеника.

Уље ноћурка је природни извор линолне киселине и  $\gamma$ -линоленске киселине у релативно високој концентрацији. Други богати природни извори  $\gamma$ -линоленске киселине су биљна уља попут уља семена боражине, уље семена црне рибизле, уље семена конопље и спинулина. Ноћурак (лат. *Oenotherabiennis*) 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.

$\gamma$ -линоленске киселине је први пут изолован из семена уља жутог ноћурка. Ову биљку су узгајали Индијанци за лечење отекутина 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 *Lüftek*страхују уље од семенки ноћурка и описују необичну линоленску киселину, коју су назвали  $\gamma$ -линоленска киселина (213).

$\alpha$ -линоленска киселина, је прекурсор еикозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине, али је ефикасност конверзије ниска (Слика 4). Стога, дијететски суплементи рибљег уља су ефикаснији извор докозахексаенске киселине од суплемената који садрже  $\alpha$ -линоленску киселину као што је уље ноћурка (214-216).



Слика 4. Настајање масних киселина

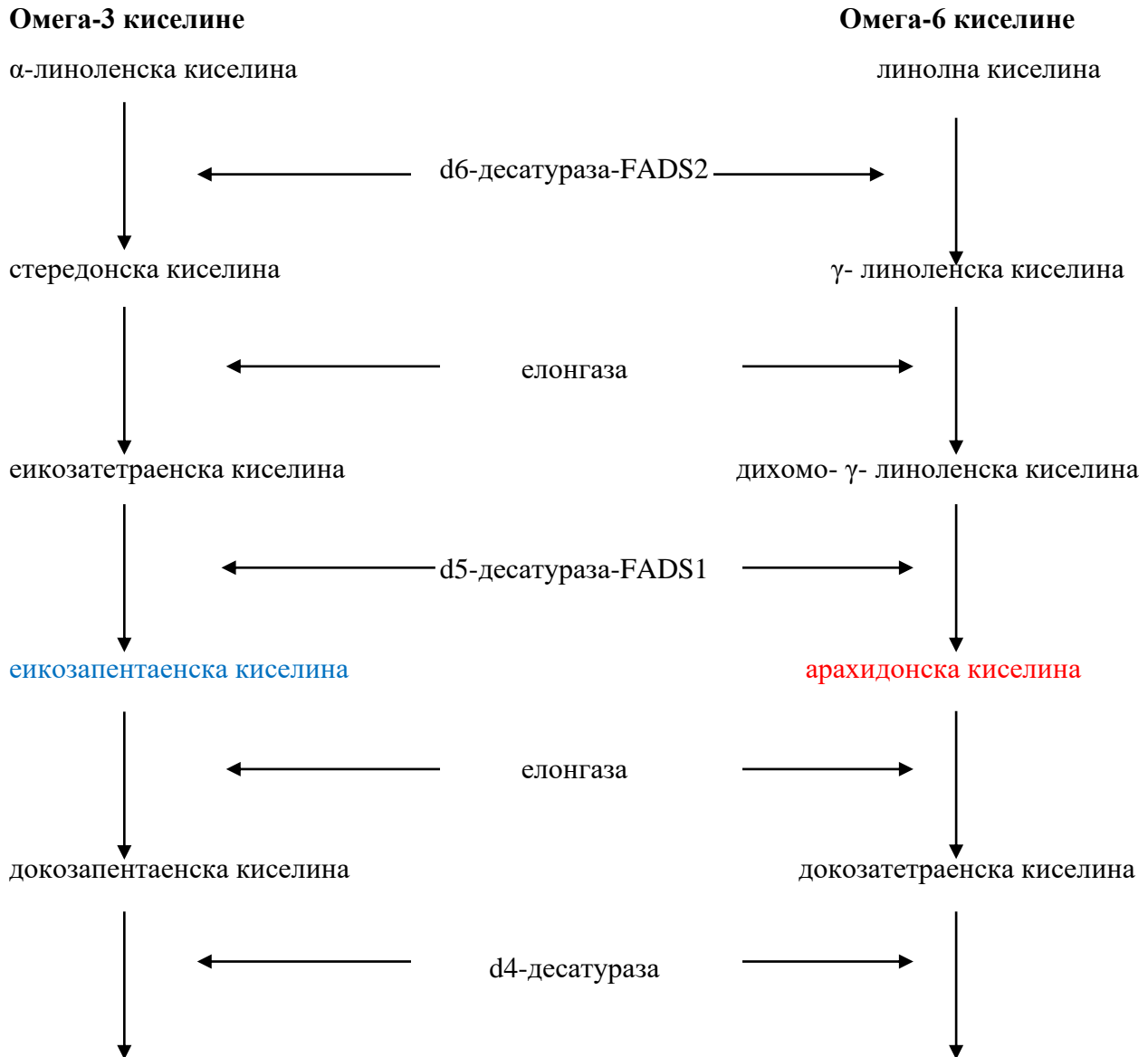


Схема приказује да из две праве есенцијалне масне киселине, ензимским процесима настају друге масне киселине. У организму је потребан баланс између инфламаторне арахидонске киселине која настаје из линолне киселине и еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине које настају из  $\alpha$ -линоленске киселине. Критични ензим који 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 еикозапентаенске

киселине/докозахексаенске киселине. Ситуацију погоршава и вишак омега-9 киселина које такођер “троше” D6-десатуразу.

Главни циљ ове студије је био да испита генетичке варијанте ензима (FADS1 и FADS2) који метаболишу пут омега-3 и омега-6 масних киселина и њихов утицај на ефекат 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. Иако здравствене користи од рибљег уља могу настати кроз више различитих механизма, изгледа да смањена инфламација да један заједнички пут (29). Примећено је да код неких људи изостаје очекивани клинички ефекат. Претпоставка је да су генетичке варијанте ензима који метаболишу пут омега-3 и омега-6 масних киселина одговорни за изостанак клиничког ефекта.

### **5.1. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ СУПЛЕМЕНТАЦИЈА ОМЕГА-3 ИЛИ ОМЕГА-3/ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА КЛИНИЧКЕ И ЛАБОРАТОРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ**

У студијама је доказано да суплементација омега-3 масним киселинама мења активност и симптоме реуматоидног (85-91). Суплементацији омега-3 масним киселинама је показала потпуну или делимичну редукцију узимања аналгетика након 3 месеца примене (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 3).

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 4). Побољшање је забележено и код пацијената који су узимали уље ноћурка (Табела 5).

## 5.2. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ СУПЛЕМЕНТАЦИЈА ОМЕГА-3 ИЛИ ОМЕГА-3/ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА КАРАКТЕРИСТИКЕ ЛАБОРАТОРИЈСКИХ И ПАРАМЕТАРА ХЕМОСТАЗЕ ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ

Плазматски фон Вилебрандов фактор (vWf) је водећи маркер ендотелне дисфункције, и маркер генерализованог развоја атеросклеротског процеса (217-219).

Васкуларни ендотел производи супстанце које имају улогу у фибринолизи, хемостази и одржавању васкуларног тонуса (220). Фон Вилебрандов фактор (vWf) се искључиво производи у ендотелу, и представља маркер ендотелне активације или дисфункције (221, 222). *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 (223).

У студији са пацијентима са реуматоидним артритисом је праћен vWF, као маркер за почетак атеросклерозе, и уочена је повезаност са новим кардиоваскуларним догађајима (224, 225). Повећан ниво фибриногена и vWF у серуму могу да укажу на ризик од настанка атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом (226).

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

Фибрин се депонује у вишку у реуматоидним зглобовима и фибринолитички процеси су инхибирани код пацијената са реуматоидним артритисом. Концентрација vWF, фибрин Д-димера, фибриногена и ткивног плазминоген антиген активатора је повећана код пацијента са реуматоидним артритисом у читавом току болести (227). Пацијенти са реуматоидним артритисом често испољавају патолошку тромбоцитопоезу (228, 229).

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 (230).

Докази из клиничких студија о ефекту омега-3 суплементације не дају јасне ставове о утицају на агрегацију тромбоцита (231). Мета анализа показује да је суплементација n-3 PUFA повезана са редукцијом ADP-индуковане тромбоцитне агрегације, као и тренд смањивања колаген – и AA-индуковане агрегације тромбоцита у односу на контролну групу али без статистичке значајности (231).

Неколико неконтролисаних студија дају конфликтне резултате о ефекту рибљег уља на агрегацију тромбоцита, тако да је њихов ефекат још увек непознат. На процес агрегације тромбоцита утичу бројни фактори. У нашој студији регистрован је различит ниво редукције АДП индуковане агрегације тромбоцита у односу на почетну вредност (ADP/TRAP) између прве груп пацијената који су примали 5 капсула омега-3 PUFA дневно у односу на групу пацијената која није примала суплементацију.

Код пацијената у првој групи, регистрована је смањена агрегација тромбоцита након стимулације ADP 0 и 90 дана у поређењу са контролном групом али без статистичке значајности. Након 3 месеца суплементације омега-3 масним киселинама код пацијента је инхибирана агрегација тромбоцита стимулирана ADP за око 7%.

Notuga, и сарадници су јасно показали да суплементација са EPA код дијабетичара са хиперлипидемијом јасно редукује тромбоцитну агрегацију (231). Друга студија показује да код здравих људи четворонедељна суплементација омега3 масним киселинама редукује активацију и агрегацију тромбоцита (232). У ранијим студија доказано је да додатак омега-3 масних киселина двострукој антиагрегационој терапији значајно редукује активацију тромбоцита у односу на плацебо (233).

Арахидонска киселина може да продукује неколико еикосаноида кроз цикооксигеназни и 5-липооксигеназни пут. Један од важних механизма ефекта омега-3

масних киселина је што компетитивно са арахидонском киселином утиче на метаболизам еикосаноида: омега 3 може да инхибира оксидацију арахидонске киселине преко циклооксигеназног ензима и последично да редукује продукцију еикосаноида тромбоксана А2 (ТХА2) и редукује ТХА2- посредовану активацију и агрегацију тромбоцита; n-3 PUFA могу да се инкорпорирају у мембранске фосфолипиде уместо арахидонске киселине и тиме редукују даљу производњу еикосаноида (234, 235).

Омега 3 масне киселине делују на мембрану тромбоцита, њихове рецепторе и јонске канале. Омега 3 масне киселине метаболишу се и могу да утичу на активност цитохрома P450 (CYP)система у јетри. Арахидонска киселина се метаболише такође преко CYP система. Продукти метаболизма арахидонске киселине епоксиди, такође познати као оксиллипиди, имају улогу у кардиоваскуларном систему. Иста оизоформа CYP метаболише омега 3 масне киселине и арахидонску киселину, што је Fer са сарадницима (236) демонстрирао када је након сумплементације EPA и DHA редуковао продукцију еоксида за 80% и 60%. Улогу CYP-метаболита омега-3 масних киселина је објавио у својој студији Arnold са сарадницима (237) где је нашо да ови метаболити су одговорни за повољан ефекат омега 3 масних киселина на кардиоваскуларни систем.

Неколико студија објављују конфликтне резултате о ефектуу рибљг уља на агрегацију тромбоцита Larson и сарадници (238 )су показали код 10 здравих волонтера да суплементација омега 3 масним киселинама није урицала на тромбоцитну агрегацију. Serebruanu, и сарадници (239) нису доказали мањену колаген- и AA- индуковану агрегацију тромбоцита након 2 недеље суплементације омега 3 масним киселинама код пацијената са коронарном болешћу који су узимали паралелно и аспирин.

Студије показују да антиагрегациони ефекат EPA и DHA зависи од пола (240). Интеракција полних хормона са омега 3 масним киселинама може да утиче на рзличит степен редуковања агрегације тромбоцита (241, 242). У нашој студији смо избегли утицај пола јер су сви наши пацијенти били жене.

У групи пацијената који су узимали суплематацију 5 капсула омега 3 масних киселина показали смо значајно снижен ADP-посредовану агрегацију тромбоцита у односу на вредност пре почетка суплементације у односу на контролну групу пацијената. Није било разлике у ADP- нити AA-индуковане агрегације тромбоцита између група које су узимале само омега 3 масне киселине и групе која је узимала комбинацију омега3/омега

6 масне киселинае. У групи пацијената који су примали и ЕРО није било редукције тромбоцитне агрегације. У студијама је показано да ЕРО може да редукује агрегацију тромбоцита само у комбинацији са антиагрегационом терапијом (243).

Вредности фибриногена су биле значајно ниже после периода суплементације у све три групе испитанка Потенцијални механизам којим  $\gamma$ -линоленска киселина и дихомо- $\gamma$ -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 8).

Хронично запаљење мења липопротеине (244), величину и густину липопротеине мале густине (LDL) (245), липопротеине високе густине (HDL) смањујући њихову способност да уклањају холестерол из атеросклеротских лезија и смањује његову антиоксидативну активност (246).

Повећање нивоа LDL у код пацијената са реуматоидним артритисом 3 пута повећава ризик за кардиоваскуларне болести. Повећано лучење фосфолипазе 2-ПА која је у корелације са Ц-реактивним протеином утиче на смањење нивоа HDL (247). У реуматоидном артритису повећање LDL и смањење HDL је повезан са хроничним запаљењем (248). Повишени нивои серумског тоталног холестерола или LDL су везане за повећани ризик од кардиоваскуларних обољења (249). Промене у плазма липопротеинима који утичу на функција тромбоцита су пронађене код хиперлипидемије (250). Висок ниво LDL може да изазове спонтани агрегацију тромбоцита (251) преко мобилизације калцијума унутар тромбоцита (252) и повећања функције и осетљивост тромбоцита (253).

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 додато значајно снижење вредности HDL, али и LDL (Табела 10).

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 8, 9 и 10)

### 5.3. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ СУПЛЕМЕНТАЦИЈА ОМЕГА-3 ИЛИ ОМЕГА-3/ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА 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, и има улогу у патогенези болести као што је реуматоидни артритис (254, 255). 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 (256, 257). Повезаност оксидативног стреса и реуматоидног артритиса је анализирано више студија и показало директну улогу у патогенези (258-261). Хронично запаљење и антиоксидативног статуса у серуму је испитиван у више студија, али мало се зна о утицају антиоксидативног статуса на почетак запаљенских реуматских болести код људи (261- 263).

Студије код пацијената са реуматоидним артритисом су показале корелацију са нивоом оксидативног стреса и активности болести (264, 265), док у другим студијама нема доказане значајне повезаности (259).

*Erdogani* сарадници (266) су сугерисали да додатак 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. 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 13, 14 и 15) (267).

Повезаност индекса липидне пероксидације и активности болести је показан у студији код пацијената са реуматоидним артритисом (256). Хронично запаљење и повећан индекса липидне пероксидације код пацијенти са реуматоидним артритисом утиче на кардиоваскуларни ризик (268).



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 оксидативног/антиоксидантног механизма одбране (265, 269).

Код пацијената са реуматоидним артритисом повећање ендogene синтезе NO има улогу у запаљењу, дисфункцији Т лимфоцита, као и у функцији митохондрија, резултати су више студија (270-275). Након увођења анти TNF- $\alpha$  лекова код пацијената реуматоидним артритисом доказано је смањење концентрације нитрита/нитрата у серуму (276). Друге студије не показују смањење концентрације нитрита након употребе анти TNF алфа терапије (277). Антиоксидативном статусу код пацијена са реуматоидним артритисом је испитиван у више сутија које су показале смањење у антиоксидативном систему (272, 276), док у другима резултати не показују промене у антиоксидативном систему (255).

Студије у којима је вршена суплементација пружају предпоставку да 3,1-8,4 g еикозапентаенске киселене + докозахексаенске киселине / дан смањује за 30-55% производњу реактивних врста кисеоника (супероксида или водоник пероксида) стимулишући хумане неутрофиле (278-282). Иако смо користили ниже дозе еикозапентаенске киселене + докозахексаенске киселине / дан, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> нивои у плазми такође су смањени (Табеле 13 и 14).

Суплементација са 6g еикозапентаенске киселене + докозахексаенске киселине / дан је показала да смањује производњу водоник пероксида од стране хуманих моноцита (280). 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 (281-284).

Студија *Halvorsen-a* и сарадника (285) 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 (280)

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* (267) није приметио никакве промене, а *Akyol* (268) није приметио никакву промену у еритроцитној SOD и инхибицији плазма SOD. *Cimen* (256) 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 (267).

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 (286). Додатно, витамина Е има значајна антиоксидантна својства. Капсуле рибљег уља садрже витамин Е, али само 1,6 mg природне мешавине токоферол (углавном токоферол- $\alpha$ ) (287). 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 (288, 289).

#### 5.4. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ СУПЛЕМЕНТАЦИЈА ОМЕГА-3 ИЛИ ОМЕГА-3/ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА 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). Оптималан унос омега-3/омега-6 масних киселина смањује се инсулинска резистенција и ризик за развој шећерне болести (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 (290, 291) и инсулинском резистенцијом (292, 293) у односу на остале антропометријске мере које се обично користе, укључујући ВМИ и обим струка. Сагиталани абдоминални дијаметар може бити најбољи антропометријски маркер за одређивање кардиоваскуларног ризика (294, 295) и морталитет, барем код мушкараца (296, 297).

Сагиталани абдоминални дијаметар је у снажној корелацији са запремином висцералне масти мерене компјутеризованом томографијом (298-300) који може бити једно од објашњења за супериорну улогу сагиталаног абдоминалног дијаметра у предвиђању инсулинске резистенције код мушкараца (301).

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 (302-306). Дијета богата n-3 полинезасићеним масним киселинама уз храну богату мастима не утичу на потрошњу масти (303, 307-309), али модулира потрошњу залиха нисходном регулацијом липогенезе и стимулацијом липидне оксидације. Оваква модулација метаболизма је повезана са променом експресије гена у многим ткивима, укључујући јетру, мишиће и масно ткиво (305, 310, 311). Примећено је да исхрана обогаћена рибљим уљем

преференцијално смањује епидидимално у поређењу са поткожним белим масним ткивом (303, 308, 311, 312).

Исхрана богата докозахексаенском киселином доводи до смањења складиштења масних наслага, које се објашњава ограниченом акумулацијом липида у адипоцитима, а не смањењем броја масних ћелија (303, 312). Студије на мишевима који су били на дијети богатој мастима су документовале смањење гојазности услед уноса *n*-3 полинезасићених масних киселина (307, 308, 313, 314) и указују да је еикозапентаенска и докозахексаенска киселина могу бити ефикасније од *n*-3 полинезасићених масних киселина биљног порекла, односно  $\alpha$ -линоленске киселине.  $\alpha$ -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 (305, 315, 316). 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 (317).

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 (302, 303, 306, 310, 318) и стимулишу експресију митохондријалних протеина 2 и 3 за одвајања (308, 319) у масном ткиву.

Дијететски суплементи рибљег уља су ефикаснији извор докозахексаенске киселине од суплемената који садрже  $\alpha$ -линоленску киселину као што је уље ноћурка (305, 315, 320).

Омега-3 полинезасићене масне киселине се даље метаболише у 3 серије еиконасоида, који би могли бити укључени у антиадипогени ефекат еикозапентаенске киселине/докозахексаенске на адипоците (310, 311).

Линолна киселина служи као прекурсор арахидонске киселине и еикосаноида 1 и 2 серије, који промовишу адипогенезу (305, 321, 322). Обилје линолне киселине у исхрани богатој мастима ограничава формирање арахидонске киселине из линолеинске киселине и потом инхибира синтезу адипогенине серија еикосаноида (320, 321). Штавише, докозахексаенска киселина инхибира циклооксигеназу, која је кључни ензим укључен у синтези ових једињења (323). Сви ови механизми могу да допринесу смањењу

складиштења масних наслага када се еикозапентаенска киселина и докозахексаенска киселина додају исхрани која је обogaћена линолном киселином.

Исхрана обogaћена еикозапентаенском 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 еикозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине повећава концентрацију ДНК у масном ткиву, што указује на смањење средње величине ћелија. Антиадипогени ефекат еикозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине током развоја гојазности указују на то да еикозапентаенска киселина/докозахексаенска киселина могу смањити акумулацију телесних масних наслага ограничавањем хипертрофије и хиперплазије масних ћелија. Низак однос еикозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине потенцира антиадипогени ефекат. Повећан дијететски унос еикозапентаенске киселине/докозахексаенске киселине може бити користан за превенцију и лечење гојазности и сродних болести без обзира на уноса линолне киселине.

### **5.5. УТИЦАЈ РАЗЛИЧИТИХ СУПЛЕМЕНТАЦИЈА ОМЕГА-3 ИЛИ ОМЕГА-3/ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ МАСНИХ КИСЕЛИНА 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 (324).

Ниво засићених масних киселина у плазма фосфолипидма и ниво палмитинске киселине у холестерол естарима судиректно повезан са кардиоваскуларним ризиком. (325, 326). Штавише, пронађени су повећани нивои палмитинске киселине и засићених масних киселина у плазмафосфолипидма код пацијената са не-Хочкиновим лимфомаима (327).

Експерименти су показали да палмитинска киселина индукује апоптозу кардиомиоцита одраслих пацова и има драматичано деструктивно дејство на миофибриле (328). Иако је стеаринска киселина засићена масна киселина (18:0), показано је да има кардиопротективан ефекат (329) и протективно деловање на рак (330).

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 киселине са 20-угљеника: арахидонска киселина (20:4 n-6), ейкозапентенска киселина (20:5 n-3) и дихомо- $\gamma$ -линоленска (20:3n-6) су прекурсори еикосаноида (331). 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- $\gamma$ -линоленска, ейкозапентенска киселина и њихов прекурсор  $\alpha$ -линолеинска киселина смањују инфламацију смањењем синтезе инфламаторних цитокина и подстицањем синтезе антиинфламаторних еикосаноида (332).

Суплементација омега-3 масним киселинама (концентровано рибље уље) у периоду од 12 недеља, резултирала је снижењем вредности стеаринске масне киселине (18:0), олеинске масне киселине (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 ейкозапентаенске 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 (333) 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 (334).

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),  $\alpha$ -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), ейкозапентаенске 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 риблиг уља и уља ноћурка може бити узрокован упараво већим ослобађањем арахидонске киселине из масног ткива.

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

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

Комбиновано давање, дакле, повећава нивое две есенцијалне антиинфламаторне масне киселине, дихомо- $\gamma$ -линоленске киселине и еикозапентаенске киселине, уз истовремено смањење нивоа проинфламаторне арахидонске киселине.  $\gamma$ -линоленска киселина је такође пријављена да инхибира формирање леукотриена из арахидонске киселине путем метаболита дихомо- $\gamma$ -линоленске киселине (335), 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.

Масне киселине у фосфолипидима плазме осликавају исхрану у протеклих неколико дана или недеља (336) као метаболизам масних киселина (337). Повишене и измењене масне киселине у серуму регистроване су у многим патолошким и физиолошким стањима (337, 338), укључујући хроничну инфламацију (339). Профил масних киселина и активност болести може нда се коригује сумплементацијом масних киселина (340,341). У нашој студији ниво масних киселина у серуму је повећан што показује добру комлијансу и биорасположивост датих сумпелеманата. Промене у концентрацији масних киселина као одговор на суплементацију потврђује да су

фосфолипиди плазме поуздани маркер за праћење суплементације масних киселина.

Код пацијената који су узимали 5g рибљег уља значајно је повећана концентрација ЕРА. Арахидонска киселина у фосфолипидима је регулатор биосинтезе проинфламаторних простаноида и леукотриена, док ЕРА има супротан ефекат. Тако да однос АА/ЕРА детерминише степен запаљења. ЕРА и ДНА помажу синтезу проресолвинг медијатора као што су протектини, ресолвини и марезини.

У шестомесечној студији, Verbert и сарадници давали су пацијентима са РА 3 g/дневно омега-3 масне киселине (1.8 g ЕРА и 1.2 g ДНА) и регистровали су смањење бола и трајања јутарње укочености (342). У другим студијама су давали 3 месеца око 3 грама омега-3 масних киселина и долазило је до смањивања активности болести (343, 344). Неке мета анализе не показују клинички бенефит омега-3 масних киселина (345, 346).

Комбинација рибљег уља и ЕРА води повећавању АА, јер GLA се трансформише у DGLA и затим десатурише са делта5 десатуразом у АА (347). Благо повећање АА у фосфолипидима након GLA суплементације код наших пацијената је очекивано. LA као главни прекурсор за синтезу АА, је такође садржана у ЕРО капсулама. У нашој студији обе групе пацијената које су узимале суплементацију имају добар клинички ефекат тако да се претпоставља да потенцијални анти-инфламаторни потенцијал GLA и DGLA, укључујући синтезу просталандина 1, превладава конверзију у инфламаторну АА.

LA се најчешће конвертује у АА и продукује даље про-инфламаторне цитокине (348). Омега-3 масне киселине могу компетитивно да спрече ову конверзију (349). Зато је препорука да се ограничи унос АА да би се испољио пун ефекат суплементације омега-3 масних киселина (350).

Многе студије показују да омега-3 масне киселине редукују параметре запаљења (345, 346, 351, 352). У нашој студији вредност седиментације еритроцита пада након суплементације што се поклапа са резултатима других студија (342, 353). Што се тиче ЦРП подаци нису јасни. Тромесечна суплементација различитим дозама омега-3 масних киселина (1.5–6 g/дневно) није показала значајно смањење вредности ЦРП као у нашој студији (354). Од дозе суплемената зависи и њихово дејство на инфламаторне параметре.



Дуготрајна употреба болест модификујућих лекова за РА посебно метотрексата често доводи до КВ догађаја, тако да би конкомитантно узимање омега-3 масних киселина могло да има бенефит за кардиоваскуларну протекцију(355). Узимање 3 g омега-3 масних киселина повећавају однос АА/ЕРА и ЕРА+ДНА индекс, што је предиктор за изненадну срчану смрт( 356-358). То је користан податак с обзиром да пацијенти са реуматоидним артритисом имају повећан ризик од изненадне срчане смрти (357, 358). Добро контролисање хроничне инфламације редукује кардиоваскуларни морталитет (359).

#### **5.6. УТИЦАЈ ГЕНЕТИЧКИХ ВАРИЈАНТИ FADS НА ЕФЕКТЕ РАЗЛИЧИТИХ СУПЛЕМЕНТАЦИЈА ОМЕГА-3 ИЛИ ОМЕГА-3/ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСелиНАМА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА РЕУМАТОИДНИМ АРТРИТИСОМ**

Истраживања су показала да генетске варијације у FADS1 и FADS2 су повезане са променом у новоу масних киселина у серуму које могу последично да модификују склоност ка одређеној болести. Индетификоване су значајне везе између FADS полиморфизама и нивоа одређених масних киселина.

У нашој студији код носиоца алели rs174556 и rs174561 код прве групе пацијената са реуматоидним артритисом који су три месеца узимали суплементацију омега-3 масним киселинама долази до значајног повећања концентрације арахидонске киселине. За концентрацију ДНА само алел rs3834458 има значајну негативну корелацију у моделу када је повезан и са другим генским алелима. Код друге групе пацијената са реуматоидним артритисом који су три месеца узимали суплементацију омега-3/омега-6 масним киселинама носиоци минор алела rs3834458 имају значајно повећање концентрације арахидонске киселине, док се концентрација ДНА повећава код носиоца минор алела rs174561.

Schaeffer и сарадници су анализирали у једној великој немачкој кохорти и пронашли су да носиоци више минор алела имају повећане вредности АЛА и LA, а снижене вредности АА и ЕРА. То би указивало да носиоци ових алела имају мањи ризик да добију аутоимуноу болест (360). Rzehak и сарадници су показали да носиоци минор алел

хаплотипова имањ смањене концентрације АА у серумским фосфолипидима и у мембранама еритроцита (361). Утицај генетичких варијанти FADS2 на метаболизам ДНА се очекује јер ензим делта-5 десатураза, која је кодирана овим геном, катализује важан корак конверзије  $n-3$  ЕРА у ДНА а не у правцу продукције АА (362). Студије показују повезаност генетичких варијанти FADS концентрације АА у плазми или еритроцитима, али повезаност са концентрацијом ДНА није у потпуности разјашњена (363- 366)

Malerba и сарадници су оквиру пројекта за кардиолошке пацијенте у Верони (Verona Heart Project) доказали да носиоци хомозитога и хетерозигота минор алела FADS утиче на смањење нивоа АА, као и на састав масних киселина у фосфолипидима плазме и мембрани еритроцита (367). Martinelli и сарадници су у истом пројекту показали да минор алели FADS појединачно не утичу на појаву коронарне болести. Имали су статистичку повезаност са нивоима АА/LA и ЕРА/ALA. У регресионој анализи када су искомбиновали више алела добили су позитивну значајност са настанком коронарне болести, утицајем на CRP и високом активности десатураза преко односа АА/LA. Закључак је да појединачни полиморфизам FADS1 и FADS2 не утиче на настанак коронарне болести, нити на активност десатуразе (368).

У нашој студији носиоци минор алела rs3835558 који су узимали сплементацију омега-3 масним киселинама три месеца имали су значајније смањење вредности ЦРП у односу на контролну групу. ЦРП је маркер хроничне инфламације која је у реуматоидном артритису параметар за активност болести и одговор на терапију. Носиоци минор алела rs174570 који су узимали тромесечну суплементацију омега-3/омега-6 масним кселинама су имали статистичко смањење CRP у односу на контролну групу.

Baylin и сарадници су испитивали најчешћу варијанту са делецијом у промотеру Fads2 (rs3834458) на концентрацију ALA у масном ткиву и ризик од инфаркта миокарда у популацији Костарике која је прележала један инфаркт миокарда. У половини испитиване групе су пронашли хетерозиготну делецију у промотеру FADS2 (rs3834458) и снижење концентрације ЕРА, GLA и АА, а повећање вредности триглицерида (369). Нису пронашли корелацију делеције са настанком инфаркта миокарда. Генске варијанте у промотеру FADS2 (rs3834458) испитивали су Tguong и сарадници и њихов утицај на настанак метаболичког синдрома (370). Носиоци FADS2 алела са делецијом ако храном појачано узимају ALA имају већи ризик да оболе од метаболичког синдрома.

Такаки и сарадници су доказали да генски полиморфизам FADS1 (rs174537) утиче на ниво АА. Носиоци минор алела имају ниже концентрације АА, ЕДА и ЕРА, а више концентрације LA и ALA у плазми; што сугерише о смањеној активности D5D. Ови испитаници су имали ниже вредности укупног холестерола и LDL фракције, што указује на повољан утицај ових алела на липидни профил и индиректно смањују ризик од настанка кардиоваскуларних болести (371). Ови подаци дају ново објашњење зашто у неким студијама имамо различит степен конверзије ALA у DHA (372-374).

Докази сугеришу да утицај генских варијанти Fads на профил масних киселина у циркулацији и ткивима, може утицати на факторе ризика за многе болести, чак може имати и трангенерацијски ефекат (375-377).

Познато је да промене у метаболизму липида су повезане са развојем многих болести (373). Регулисање метаболизма липида је комплексан биолошки систем где учествују гени и протеини у многим ткивима људског организма. Студије показују да интеракција исхране и генских варијанти мења ризик за развој хроничних болести. Ако би могли да преко индивидуалног генског полиморфизма утичемо преко исхране на клиничке параметре болести могли би да мењамо ток или превенирамо развој болести. Доказано је да припадност одређеној етничкој популацији мења интеракцију исхране и генских варијанти (378).

Будућа истраживања могу да покушају да процене утицај интер-индивидуалних разлика за ризик обољевања и идентификују генске варијанте гена који би били биомаркер за дијагнозу и индивидуализован терапијски протокол, као и да направе стратегију у исхрани за превенцију или модификацију болести.

**VI**

**ЗАКЉУЧАК**

На основу наведеног истраживања може се закључити следеће:

- 1) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог риблиг уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхраније 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 риблиг уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до је смањена агрегација тромбоцитаћ
- 4) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог риблиг уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до повећања нивоа параметара антиоксидативне заштите и смањењанивоа прооксиданата.
- 5) 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 смањењанивоапрооксиданата.
- 6) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог риблиг уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до смањења тежине и обима струка.
- 7) 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.
- 8) Код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог риблиг уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани дошло је до повећања нивоа масних киселина у серуму посебно еикозапентаеноинске киселине.
- 9) 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 масних киселина у серуму посебно арахидонске киселине.

- 10) Код носиоца минор алела rs174556 FADS испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани долази до повећања концентрације арахидонске киселине у плазми
- 11) Код носиоца минор алела rs174561 FADS испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани долази до повећања концентрације арахидонске киселине у плазми
- 12) Код носиоца алела rs3834458 FADS испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани долази до смањења концентрације докозахексаеноинска киселина у плазми
- 13) Код носиоца минор алела rs3834458 испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани долази до повећања концентрације арахидонске киселине у плазми
- 14) Код носиоца минор алела rs174561 испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани долази до повећања концентрације докозахексаеноинска киселина у плазми
- 15) Носиоци алела T/- и T/T rs3835558 FADs су имали статистички ниже вредности ЦРП код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе концентрованог рибљег уљем са омега-3 масним киселинама као додатак исхрани
- 16) Носиоци алела C/T и C/C rs174570 FADs су имали статистички ниже вредности ЦРП код испитаника са реуматоидним артритисом који су узимали суплементе са концентрованим уљем ноћурка са омега-6 масним киселинама као додатак исхрани

**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. Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson DT et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American college of rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1580-1588.
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](http://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, Yaquob 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.  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  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 A<sub>2</sub>/ prostaglandin H<sub>2</sub> 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. *JPEN 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, Angtharak 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 Nutr*1991;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, Gyurko 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 osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J*2006; 20: 401–403.
131. Smith MR, O Malley AJ, Keating NL. Gonadotrophin-releasing 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 alpha-linolenic 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. 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.
150. 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.
151. Rice-Evans C, Miller M, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci.* 1997;2(4):152-159.
152. Halliwell B, Chirco S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993;57(Suppl 5):715S-725S.
153. 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.
154. 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.
155. Cooper RA. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med.* 1977;297(7):371-377.
156. 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.
157. 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.
158. 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.

159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. New York: Garland Science, 2008..
163. Evans WE. Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Therapeutic Drug Monitoring* 2004; 26(2): 186-91.
164. Hall IP, Pirmohamed M. *Pharmacogenetics*. New York: Taylor & Francis Group, 2006.
165. Meyer, UA. Pharmacogenetics – five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* 2004; 5(9), 669-676.
166. Park BK, Breckenridge AM. Clinical implications of enzyme induction and enzyme inhibition. *Clinical pharmacokinetics*; 1981; 6:1–24.
167. Cytochrome P 450 Hepatic enzyme inhibitors and inducers, 2014., <http://www.preregpharm.co.uk>
168. Bailey DG et al. Grapefruit-medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences? *Canadian Medical Association Journal*; 2013; 185:309–316
169. Ozdemir V, Lerer B. Pharmacogenomics and the Promise of Personalized Medicine. *Pharmacogenomics Second Edition*. Kalow W, Meyer UA, Tyndale RF, Taylor & Francis Group; 2005; 13-49.
170. Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L i sur. Nutrigenetics and nutrigenomics: viewpoints on the current status and applications in nutrition research and practice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2011;4(2):69-89.
171. Kang JX. The coming of age of nutrigenetics and nutrigenomics. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2012;5(1):I-II.
172. Simopoulos AP. Nutrigenetics/nutrigenomics. *Annu Rev Public Health* 2010;31:53-68

173. Ferguson LR. Nutrigenomics approaches to functional foods. *J Am Diet Assoc* 2009;109:452- 458.
174. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet.* 1997;31:493-525.
175. Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004;5:71- 118.
176. Dina C, Meyre D, Gallina S, i sur. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724-726.
177. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, i sur. A common variant in the FTO gene is associated with body mass indeks and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889-894.
178. Cecil JE, Tavendale R, Watt P, Hetherington MM, Palmer CN. An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med* 2008;359:2558-2566.
179. Corella D, Qi L, Tai ES, i sur. Perilipin gene variation determines higher susceptibility to insulin resistance in Asian women when consuming a high-saturated fat, low-carbohydrate diet. *Diabetes Care* 2006;29:1313-1319.
180. Tai ES, Ordovas JM. The role of perilipin in human obesity and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:152-156.
181. Soriguer F, Morcillo S, Cardona F, i sur. Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. *J Nutr* 2006;136(9):2325-2330.
182. Scaglioni S, Verduci E, Salvioni M, i sur. PPAR- $\gamma$ 2 Pro12Ala variant, insulin resistance and plasma long-chain polyunsaturated fatty acids in childhood obesity. *Pediatr Res* 2006;60(4):485-489.
183. Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, i sur. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 2008;57(1):95-101.
184. Sonestedt E, Gullberg B, Ericson U, Wirfalt E, Hedblad B, Orho-Melander M. Association between fat intake, physical activity and mortality depending on genetic variation in FTO. *Int J Obes (Lond)* 2011;35(8):1041-1049.

185. Sonestedt E, Roos C, Gullberg B, Ericson U, Wirfalt E, Orho-Melander M. Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the FTO genotype and obesity. *Am J Clin Nutr* 2009;90(5):1418-1425.
186. J Thomas.. [An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product  \$\Delta 8\$ -desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3](#). *Journal of Lipid Research* 2009; 50 (6): 1195–202
187. Schaeffer L, Gohlke H, Müller M, Heid IM, Palmer LJ, Kompauer I, et al. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet*. 2006;15(11):1745–56.
188. Standl M, Lattka E, Stach B, Koletzko S, Bauer C-P, von Berg A, et al. FADS1 FADS2 gene cluster, PUFA intake and blood lipids in children: results from the GINIplus and LISApplus studies. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2012;7(5):e37780.
189. Lenihan-Geels G, Bishop KS, Ferguson LR. Cancer Risk and Eicosanoid Production: Interaction between the Protective Effect of Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Genotype. *J Clin Med* [Internet]. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2016;5(2)..
190. Qin L, Sun L, Ye L, Shi J, Zhou L, Yang J, et al. A case-control study between the gene polymorphisms of polyunsaturated fatty acids metabolic rate-limiting enzymes and coronary artery disease in a Chinese Han population. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2011;
191. Xie L, Liu G, Gan Z, Yang J, Deng J, He C. The minor allele of the fads1 gene polymorphism is associated with lower eicosapentaenoic acid in breast milk of chinese women. *Ann Nutr Metab* . 2013;63.
192. Mathias RA, Vergara C, Gao L, Rafaels N, Hand T, Campbell M, et al. *FADS* genetic variants and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acid metabolism in a homogeneous island population. *J Lipid Res* . 2010;51(9):2766–74.
193. Koletzko B, Demmelmair H, Schaeffer L, Illig T, Heinrich J. Genetically determined variation in polyunsaturated fatty acid metabolism may result in different dietary requirements. *Nestle Nutr Work Ser Pediatr Progr*. 2008;62:35–44.



194. Marquardt A, Stöhr H, White K, Weber BH .cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*. 2000;66 (2): 175–83
195. Yang Q, Yin R-X, Cao X-L, Wu D-F, Chen W-X, Zhou Y-J. Association of two polymorphisms in the FADS1/FADS2 gene cluster and the risk of coronary artery disease and ischemic stroke. *Int J Clin Exp Pathol*. e-Century Publishing Corporation; 2015 ;8(6):7318–31.
196. Cribb L, Murphy J, Froud A, Oliver G, Bousman CA, Ng CH, et al. Erythrocyte polyunsaturated fatty acid composition is associated with depression and FADS genotype in Caucasians. *Nutr Neurosci* [Internet]. Taylor & Francis; 2017;0(0):1–13.
197. Zietemann V, Kröger J, Enzenbach C, Jansen E, Fritsche A, Weikert C, et al. Genetic variation of the FADS1 FADS2 gene cluster and n-6 PUFA composition in erythrocyte membranes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam study. *Br J Nutr* . 2010;104(12):1748–59
198. Lattka E, Eggers S, Moeller G, Heim K, Weber M, Mehta D, et al. A common *FADS2* promoter polymorphism increases promoter activity and facilitates binding of transcription factor ELK1. *J Lipid Res*. 2010;51(1):182–91.
199. Probst R, Brandl R, Blumke M, Neumier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood. *Clin Chem* 1998; 44:1567-69.
200. Schaeffer L, Gohlke H, Muller M, Heid IM, Palmer LJ, Kompauer I, Demmelmair H, Illig T, Koletzko B, Heinrich J. Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet* 2006;15:1745–56.
201. Lattka E, Illig T, Koletzko B, Heinrich J. Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:64–9
202. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, editor. *Handbook of methods for oxygen radical research*. Ine: Boca Raton, CRC Press; p. 123-132.
203. 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.

204. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
205. 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.
206. 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.
207. Beutler E (1982). Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton.
208. 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.
209. Harth S, Dreyfus H, Urban PF et al (1978) Direct thin-layer chromatography of gangliosides of total lipid extracts. *Anal Biochem* 86:543–551.
210. 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.
211. Christopherson SW, Glass RL (1969) Preparation of milk methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J Dairy Sci* 52:1289–1290.
212. McInnes I, Schett G (2011). The Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365:2205-19.
213. 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.
214. Azain, M.J. (2004) Role of Fatty Acids in Adipocyte Growth and Development, *J. Anim. Sci.* 82, 916–924.
215. Sinclair, A.J., Attar-Bashi, N.M., and Li, D. (2002) What Is the Role of  $\alpha$ -Linolenic Acid for Mammals? *Lipids* 37, 1113–1123.
216. 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

217. 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.
218. Blann AD. Plasma von Willebrand factor, thrombosis, and the endothelium: the first 30 years. *Thromb Haemost* 2006; 95:49-55.
219. 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.
220. Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B (2008). von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 117(11):1449-1459.
221. 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.
222. 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.
223. 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.
224. Tousolis D, Antoniadou C, Bosniakou 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.
225. 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.
226. McEntegart A, Capell HA, Czeran 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.
227. Macías I, García-Pérez S, Ruiz-Tudela M, Medina F, Chozas N, Girón-González JA (2005). Modification of pro- and antiinflammatory cytokines and vascular related

- molecules by tumor necrosis factor- $\alpha$  blockade in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32(11):2102-8.
228. 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.
229. Ertenli I, Kiraz S, Oztürk MA, Haznedaroğlu I, Celik I, Calgüneri M (2003). Pathologic thrombopoiesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 23(2):49-60.
230. 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.
231. Nomura S, Inami N, Shouzu A, et al (2009) The effects of pitavastatin, eicosapentaenoic acid and combined therapy on platelet-derived microparticles and adiponectin in hyperlipidemic, diabetic patients. *Platelets.* 20: 16-22
232. Gao LG, Cao J, Mao QX, Lu XC, Zhou XL, Fan L (2013) Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acid-supplementation on platelet aggregation in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis.* 226(2):328-34
233. Takada K, Ishikawa S, Yokoyama N, Hosogoe N, Isshiki T (2014) Effects of eicosapentaenoic acid on platelet function in patients taking long-term aspirin following coronary stent implantation. *Int Heart J.* 55(3):228-33
234. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ (2015) PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med.* 24(6):931-41. doi:10.17219/acem/31243
235. Gajos G, Zalewski J, Nessler J, Zmudka K, Undas A, Piwowarska W (2012) Polyunsaturated omega-3 fatty acids improve responsiveness to clopidogrel after percutaneous coronary intervention in patients with cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism. *Kardiol Pol.* 70(5):439-45
236. Fer M, Corcos L, Dréano Y, Plée-Gautier E, Salaün JP, Berthou F, Amet Y (2008) Cytochromes P450 from family 4 are the main omega hydroxylating enzymes in humans: CYP4F3B is the prominent player in PUFA metabolism. *J Lipid Res.* 49(11):2379-89

237. Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH (2010) Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep.* 62: 536–547
238. Larson MK, Tormoen GW, Weaver LJ, Luepke KJ, Patel IA, Hjelmén CE, Ensz NM, McComas LS, McCarty OJ (2013) Exogenous modification of platelet membranes with the omega-3 fatty acids EPA and DHA reduces platelet procoagulant activity and thrombus formation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304(3):C273-9
239. Serebruany VL, Miller M, Pokov AN, et al (2011) Early impact of prescription Omega-3 fatty acids on platelet biomarkers in patients with coronary artery disease and hypertriglyceridemia. *Cardiology* 118: 187-94
240. Phang M, Sinclair AJ, Lincz LF, Garg ML (2012) Gender-specific inhibition of platelet aggregation following omega-3 fatty acid supplementation. *NutrMetabCardiovasc Dis.* 22(2):109-14
241. Phang M, Lincz LF, Garg ML (2013) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementations reduce platelet aggregation and hemostatic markers differentially in men and women. *J Nutr.* 143(4):457-63
242. Bagge A, Schött U, Kander T (2016) Effects of naturopathic medicines on Multiplate and ROTEM: a prospective experimental pilot study in healthy volunteers. *BMC Complement Altern Med.* 16:64
243. Abo-Gresha NM, Abel-Aziz EZ, Greish SM (2014) Evening primrose oil ameliorates platelet aggregation and improves cardiac recovery in myocardial-infarct hypercholesterolemic rats. *Int J PhysiolPathophysiolPharmacol.* 6(1):23-36
244. Libby P (2008). Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 121(Suppl 1):S21-S31.
245. 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.
246. 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.

247. 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.
248. Sherer Y, Shoenfeld Y (2006). Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(2):99-106.
249. 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.
250. Surya I, Mommersteeg M, Gorter G, Erkelens DW, Akkerman JWN. Abnormal platelet functions in a patient with abetalipoproteinemia. *Thromb Haemost* 1991; 65: 306-11.
251. 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.
252. 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.
253. 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.
254. Stocker R, Keaney JF Jr (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84(4):1381-478.
255. Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6(6):265-78.
256. 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.
257. 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.
258. 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.

259. 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.
260. 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.
261. 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.
262. 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.
263. 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.
264. 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.
265. Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiba M et al (2002). Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 38:765–72.
266. 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.
267. 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.
268. 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.

269. 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.
270. Balakumar P, Taneja G (2012) Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free Radic Biol Med* 53:271–279, Review.
271. Vanhoutte PM (2000). Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 81:271–7.
272. Karppi J, Nurmi T, Kurl S, Rissanen TH, Nyssönen K (2010). Lycopene, lutein and beta-carotene as determinants of LDL conjugated dienes in serum Atherosclerosis 209(2):565-72.
273. 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.
274. 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.
275. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Filloy 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.
276. 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.
277. 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.
278. 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.
279. Calder PC (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83:1505–1519, Review.



280. 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.
281. 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.
282. 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.
283. 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.
284. Miles EA, Banerjee T, Dooper MWBW et al (2004) The influence of different combinations of  $\gamma$ -linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr* 91:893–903.
285. 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.
286. 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.
287. 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.
288. 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.
289. 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.
290. 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.

291. 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.
292. 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.
293. 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.
294. 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.
295. 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.
296. 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.
297. 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.
298. 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.
299. 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.
300. Keller C, Chintapalli K, Lancaster J: Correlation of anthropometry with CT in Mexican-American women. *Research in nursing & health* 1999, 22(2):145-153.

301. 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.
302. 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.
303. 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.
304. 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.
305. Azain, M.J. (2004) Role of Fatty Acids in Adipocyte Growth and Development, *J. Anim. Sci.* 82, 916–924.
306. 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.
307. 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.
308. 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.
309. 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.
310. 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.
311. Raclot, T., and Oudart, H. (1999) Selectivity of Fatty Acids on Lipid Metabolism and Gene Expression, *Proc. Nutr. Soc.* 58, 633–646.

312. 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.
313. 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/6nJcl Mice, *J. Nutr.* 131, 2636–2642.
314. 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.
315. Sinclair, A.J., Attar-Bashi, N.M., and Li, D. (2002) What Is the Role of  $\alpha$ -Linolenic Acid for Mammals? *Lipids* 37, 1113–1123.
316. 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.
317. 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.
318. 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.
319. 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).
320. 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.
321. 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.
322. Sessler, A.M., and Ntambi, J.M. (1998) Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Expression, *J. Nutr.* 128,923–926.
323. 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.
324. Nikolaidis MG, Mougios V (2004) Effects of exercise on the fatty acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med* 34:1015–1076.
325. 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.
326. 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.
327. 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.
328. Dyntaxa, 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.
329. 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.
330. 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.
331. Zhou, L., & Nilsson, A. (2001). Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *Journal of Lipid Research*, 42, 1521-1542.
332. Pedersen, B., Bruunsgaard, H., Ostrowski, K., Krabbe, K., Hansen, H., Krzykowski, K., et al. (2000). Cytokines in aging and exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 21(Suppl 1), 4S-9S.

333. 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.
334. 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.
335. 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.
336. Arab L., Akbar J (2002). Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr.* 5, 865–871.
337. Cvetković Z., Vučić V., Cvetković B., Petrović M., Ristić-Medić D., Tepšić J., Glibetić M (2010 )Abnormal fatty acid distribution of the serum phospholipids of patients with non-Hodgkin lymphoma. *Ann. Hematol.* 89, 775–782.
338. Ristic-Medic D., Takic M., Vucic V., Kostic N., Glibetic M (2013)Abnormalities in serum phospholipids fatty acid profile in patients with alcoholic liver currhosis- a pilot study. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 53,49–54.
339. Vučić V (2013) The role of dietary polyunsaturated fatty acids in inflammation. *Serbian J. Exp. Clin. Res.* 14,93–99.
340. Murphy R.A., Mourtzakis M., Chu Q.S., Baracos V.E., Reiman T., Mazurak V.C (2011) Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer.*117, 3774–3780.
341. Wang C., Harris W.S., Chung M., Lichtenstein A.H., Balk E.M., Kupelnick B., Jordan H.S., Lau J (2006) *n*-3 Fatty acids from fish or fishoil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: A systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 5–17.
342. Berbert A.A., Kondo C.R., Almendra C.L., Matsuo T., Dichi (2005) Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition.* 21,131–136.
343. Das Gupta A.B., Hossain A.K., Islam M.H., Dey S.R., Khan A.L (2009) Role of omega-3 fatty acid supplementation with indomethacin in suppression of disease activity in rheumatoid arthritis. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.* 35,63–68.
344. Dawczynski C., Schubert R., Hein G., Müller A., Eidner T., Vogelsang H., Basu S., Jahreis G (2009) Long-term moderate intervention with *n*-3 long-chain PUFA

- supplemented dairy products: Effects on pathophysiological biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Nutr.* 101,1517–1526.
345. Calder P.C.(2015) Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1851,469–484.
346. Lee Y.H., Bae S.C., Song G.G.(2012) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Arch. Med. Res.* 43,356–362.
347. Barham J.B., Edens M.B., Fonteh A.N., Johnson M.M., Easter L., Chilton F.H (2000) Addition of eicosapentaenoic acid to gamma-linolenic acid supplemented diets prevents serum arachidonic acid accumulation in humans. *J. Nutr.* 130,1925–1931.
348. Bhangle S., Kolasinski S.L.(2011) Fish oil in rheumatic diseases. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 37,77–84.
349. Miles E.A., Calder P.(2012). Influence of marine *n*-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br. J. Nutr.* 107,171–184.
350. Rajaei E., Mowla K., Ghorbani A., Bahadoram S., Bahadoram M., Dargahi-Malamir M (2015) The Effect of Omega-3 Fatty Acids in Patients With Active Rheumatoid Arthritis Receiving DMARDs Therapy: Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Glob. J. Health Sci.* 8,18–25.
351. Olendzki B.C., Leung K., Van Buskirk S., Reed G., Zurier R.B (2011) Treatment of rheumatoid arthritis with marine and botanical oils: Influence on serum lipids. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2011,8272–8286.
352. Klein K., Gay S. (2015) Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 27,76–82.
353. Fenton J.I., Hord N.G., Ghosh S., Gurzell E.A (2013) Immunomodulation by dietary long chain omega-3 fatty acids and the potential for adverse health outcomes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 89, 379–390
354. Sandoo A., Veldhuijzen van Zanten J.J., Metsios G.S., Carroll D., Kitis G.D.(2011) Vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: A systematic review. *Rheumatology (Oxf.)* 50,2125–2139.
355. Harris W.S., Von Schacky C (2004) The Omega-3 Index: A new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev. Med.* 39,212–220.

356. Jabbar R., Saldeen T (2006) A new predictor of risk for sudden cardiac death. *Ups. J. Med. Sci.* 111,169–177.
357. Dawczynski C., Hackermeier U., Viehweger M., Stange R., Springer M., Jahreis G (2011) Incorporation of *n*-3 PUFA and  $\gamma$ -linolenic acid in blood lipids and red blood cell lipids together with their influence on disease activity in patients with chronic inflammatory arthritis—A randomized controlled human intervention trial. *Lipids Health Dis.* 10,130.
358. Aviña-Zubieta J.A., Choi H.K., Sadatsafavi M., Etminan M., Esdaile J.M., Lacaille D (2008) Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum.* 59, 1690–1697.
359. Meune C., Touzé E., Trinquart L., Allanore Y (2009) Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxf.)* 48,1309–1313.
360. Schaeffer L, Gohlke H, Muller M, Heid I, Palmer L, Kompauer I, Demmelair H, Illig T, Koletzko B, Heinrich J (2009) Common genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum Mol Genet* 15(11),1745-1756.
361. Rzehak P, Heinrich J, Klopp N, Schaeffer L, Hoff S, Wolfram G, Illig T, Linseisen J(2009) Evidence for an association between genetic variants of the fatty acid desaturase 1 fatty acid desaturase 2 (FADS1 FADS2) gene cluster and the fatty acid composition of erythrocyte membranes. *Br J Nutr* 101(1),20-26.
362. Voruganti VS, Higgins PB, Ebbesson SO, Kennish J, Goring HH, Haack K, Laston S, Drigalenko E, Wenger CR, Harris WS, et al (2012) Variants in CPT1A, FADS1, and FADS2 are associated with higher levels of estimated plasma and erythrocyte delta-5 desaturases in Alaskan Eskimos. *Front Genet* 3, 86.
363. Lattka E, Illig T, Heinrich J, Koletzko B (2009) FADS gene cluster polymorphisms: important modulators of fatty acid levels and their impact on atopic diseases. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2,119–28.
364. Lattka E, Illig T, Heinrich J, Koletzko B (2010) Do FADS genotypes enhance our knowledge about fatty acid related phenotypes? *Clin Nutr* 29,277–87.



365. Lattka E, Illig T, Koletzko B, Heinrich J (2010) Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster as related to essential fatty acid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 21,64–9.
366. Lattka E, Koletzko B, Zeilinger S, Hibbeln JR, Klopp N, Ring SM, Steer CD (2013) Umbilical cord PUFA are determined by maternal and child fatty acid desaturase (FADS) genetic variants in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Br J Nutr* 109,1196–210.
367. Malerba G, Schaeffer L, Xumerle L, Klopp N, Trabetti E, Biscuola M, Cavallari U, Galavotti R, Martinelli N, Guarini P(2008) SNPs of the FADS gene cluster are associated with polyunsaturated fatty acids in a cohort of patients with cardiovascular disease. *Lipids* 43(4),289-299.
368. Martinelli N, Girelli D, Malerba G, Guarini P, Illig T, Trabetti E, Sandri M, Friso S, Pizzolo F, Schaeffer L, et al(2008) FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease. *Am J Clin Nutr* 88(4),941-949
369. Baylin A, Ruiz-Narvaez E, Kraft P, Campos H (2007)  $\alpha$ -Linolenic acid,  $\Delta$ 6-desaturase gene polymorphism, and the risk of nonfatal myocardial infarction. *Am J Clin Nutr* 85(2),554-560.
370. Truong H, DiBello JR, Ruiz-Narvaez E, Kraft P, Campos H, Baylin A (2009) Does genetic variation in the  $\Delta$ 6-desaturase promoter modify the association between  $\alpha$ -linolenic acid and the prevalence of metabolic syndrome? *Am J Clin Nutr* 89(3),920-925.
371. Tanaka T, Shen J, Abecasis GR, Kisiailiou A, Ordovas JM, Guralnik JM, Singleton A, Bandinelli S, Cherubini A, Arnett D, et al (2009) Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI Study. *PLoS Genet* 5(1), e1000338.
372. Brenna JT (2002) Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(2),127-132.
373. Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N Jr (2001) Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* 42(8),1257-1265.

374. Childs CE, Romeu-Nadal M, Burdge GC, Calder PC (2008) Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. *Proc Nutr Soc* 67(1),19-27.
375. Caspi A, Williams B, Kim-Cohen J, Craig IW, Milne BJ, Poulton R, Schalkwyk LC, Taylor A, Werts H, Moffitt TE: Moderation of breastfeeding effects on the IQ by genetic variation in fatty acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104(47):18860-18865.
376. Molto-Puigmarti C, Plat J, Mensink RP, Muller A, Jansen E, Zeegers MP, Thijs C: (2010) FADS1 FADS2 gene variants modify the association between fish intake and the docosahexaenoic acid proportions in human milk. *Am J Clin Nutr* 91(5),1368-1376.
377. Xie L, Innis S (2008) Genetic variants of the FADS1 FADS2 gene cluster are associated with altered (n-6) and (n-3) essential fatty acids in plasma and erythrocyte phospholipids in women during pregnancy and in breast milk during lactation. *J Nutr* 138(11),2222-2228.
378. Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko AR, Auton A, Indap A, King KS, Bergmann S, Nelson MR, et al (2008) Genes mirror geography within Europe. *Nature* 456(7218), 98-101.

## **БИОГРАФИЈА**

### **1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ**

Име и презиме: Маријана Томић Смиљанић

Датум и место рођења: 02.08.1974. Београд

Адреса: Пере Велимировића 64/15, Београд

Телефон: 064-17-166-18

### **2. ОБРАЗОВАЊЕ**

Медицински факултет у Београду, дипломирала 2000. године

### **3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА**

Енглески (напредни ниво)

### **4. РАДНО ИСКУСТВО**

Директорат цивилног ваздухопловства Републике Србије

### **5. РАЗНО**

Учесник националних и иностраних конгреса

## **БИБЛИОГРАФИЈА**

### **РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА НА СС/SCI ЛИСТИ:**

1. **Tomic-Smiljanic M**, Vasiljevic D, Lucic-Tomic A, Andjelkovic N, Jakovljevic V, Bolovich S, Veselinovic M. Influence of different supplementation on platelet aggregation in patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019;38(9):2443-2450. **M23**
2. Vukadinović D, Samardžić N, Janković S, **Tomić Smiljanić M**, Pavlović R, Stefanović S. Factors associated with early treatment failure in adult hospitalized patients with community-acquired pneumonia. Vojnosanit Pregl 2017;74(9):803-813. **M23**

### **РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА ЦИТИРАНИМ У EMBASE-У**

**Tomic Smiljanic M**, Radonjic V, Djuric D. Evaluation of antibiotic consumption at Rakovica community health center from 2011 to 2015. Ser J Exp Clin Res. 2017;18(3):245-250. **M51**

## AUTHORS CURRICULUM VITAE

### 1.PERSONAL DATA

Name and surname: Marijana Tomic Smiljanic

Date and place of birth: 02.08.1974. Belgrade

Address: Pere Velimirovic 64/15, Belgrade

Phone: 064-17-166-18

### 2. EDUCATION

Medical faculty University of Belgrade, graduated - 2000.

### 3.FOREIGN LANGUAGE

English (advanced)

### 4. WORK EXPERIENCE

Civil Aviation Directorate of the Republic of Serbia

### 5. MISCELLANEOUS

Participant in large number of national and international congresses.

LIST OF PUBLICATIONS ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS

**Tomic-Smiljanic M**, Vasiljevic D, Lucic-Tomic A, Andjelkovic N, Jakovljevic V, Bolovich S, Veselinovic M. Influence of different supplementation on platelet aggregation in patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019;38(9):2443-2450.

**M23**

Vukadinović D, Samardžić N, Janković S, **Tomić Smiljanić M**, Pavlović R, Stefanović S. Factors associated with early treatment failure in adult hospitalized patients with community-acquired pneumonia. Vojnosanit Pregl 2017;74(9):803-813. **M23**

ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS CITED IN EMBASE

**Tomic Smiljanic M**, Radonjic V, Djuric D. Evaluation of antibiotic consumption at Rakovica community health center from 2011 to 2015. Ser J Exp Clin Res. 2017;18(3):245-250. **M51**

**VIII**

**ПРИЛОЗИ**

## 8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број:**

**РБ**

**Идентификациони број:**

**ИБР**

**Тип документације:** Монографска публикација

**ТД**

**Тип записа:** Текстуални штампани материјал

**ТЗ**

**Врста рада:** Докторска дисертација

**ВР**

**Аутор:** Маријана Томић-Смиљанић

**АУ**

**Ментор/коментор:** проф др Александра Томић Лучић

**МН**

**Наслов рада:** “Утицај генетских варијанти ензима метаболизма масних киселина на њихов ефекат код пацијената са реуматоидним артритисом“

**НР**

**Језик публикације:** српски

**ЈП**

**Језик извода:** српски

**ЈИ**

**Земља публикавања:** Република Србија

**ЗП**

**Уже географско подручје:** Централна Србија

**УГП**

**Година:** 2019.

**ГО**

**Издавач:** Ауторски репринт

**ИЗ**

**Место и адреса:** 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

**МС**

**Физичи опис рада-ФО:** 164 страна, 4 слика, 29 табела, 15 графика

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина:**

**ДИ**

**Предметна одредница/ кључне речи**

**ПО**



**УДК**

**Чува се:** У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

**ЧУ**

**Важна напомена:**

**МН**

**Извод:**

**ИД**

**Увод:** Реуматоидни артритис (РА) карактерише хронично запаљење, разарање зглобова и повећан ризик за кардиоваскуларна обољевања. Унос храном омега-3 и омега-6 полинезасићених масних киселина утиче на инфламацију и кардиоваскуларни ризик. Генетске варијације утичу на начин на који тело одговара на неке нутријенте и састојке хране, и које материје се могу разградити и исправно искористити.

**Циљ:** Проценити улоге генетичких варијанти у генима који кодирају ензиме у метаболичком путу омега-3 и омега-6 масних киселина у модификацији клиничког ефекта суплементација са омега-3 и омега-6 масним киселинама, и утицај суплементација са омега-3 и омега-6 масним киселинама на активност болести, оксидативни стрес, ендотелну функцију и хемостазу код пацијената са РА.

**Материјал и методе:** 60 пацијенткиња са РА је подељено у прву групу (20 пацијената) који су узимали 5 гел капсула Омега 3Кардио® у току 3 месеца, другу групу (20 пацијената) који су узимали по 3 гел капсула Омега 3Кардио® и две гел капсуле уља ноћурка у току 3 месеца и трећу, контролну групу (20 пацијената) који су нису узимали суплементацију. Рађена је анализа генетичких варијанти у генима који кодирају ензиме метаболизма пута омега-3 и омега-6 масних киселина: rs174556, rs174561, rs3834458, rs174570 и rs968567 по методологији заснованој на PCR-укао и сквенцирање по Sangerуабиохемијске и хематолошке анализе су урађене у лабораторијима Клиничког центра Крагујевац. Концентрација масних киселина у крви је урађена пре и после суплементације методом гасне хроматографије. Редокс статус је одређиван спектрофотометријски.

**Резултати:** Присуство одређених генетичких варијанти гена за ензиме десатуразе масних киселина код пацијената са РА који су узимали суплементацију омега 3 и омега 6 масним киселинама у току 3 месеца утичу на концентрацију арахидонске киселине и докозахексаеноинска киселина у фосфолипидима еритроцита, као и на смањење параметара инфламације у односу на контролну групу. Суплементација омега3 и омега 6

масним киселинама редукује агрегацију тромбоцита код пацијента са РА.Прооксидациони и антиоксидациони параметри су у групама пацијената са РА које су узимале суплементацију омега 3 и омега 6 масним киселинама показали смањење оксидационог стреса и повећање активности антиоксидационог система заштите. Суплементација омега 3 и омега 6 масним киселинама код пацијената са РА утиче на смањење активности болести.

**Закључак:**Код пацијената са РА који су узимали суплементацију омега 3 и омега 6 масним киселинама долази до смањења активности болести, параметара инфламације, хемостазе и оксидативног стреса. Геномске информације доносе боље разумевање интеракција гена и нутијената, а с крајњим циљем развоја персонализованих смерница за правилну исхрану која може допринети лечењу реуматоидног артритиса.

**Кључне речи:** реуматоидни артритис, омега 3/омега 6 масне киселине, нутригенетика, оксидациони стрес

**Датум прихватања теме од стране ННВ:** 27.12.2017.  
ДП

**Датум одбране:**  
ДО

**Чланови комисије:**  
КО

1. **Доц др Мирјана Веселиновић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Интерна медицина, председник
2. **Др Соња Павловић**, научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду, члан
3. **Проф др Милан Петронијевић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске Академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Интерна медицина, члан

## 8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:** Monographic publication

DT

**Type of record:** Textual printed material

TR

**Contents code:** Ph. D. Thesis

CC

**Author:** Marijana Tomic Smiljanic

AU

**Menthor/co-mentor** prof Aleksandra Tomic Lucic

MN

**Title:** The impact of genetic variants of the enzyme fatty acid metabolism on their effect in patients with rheumatoid arthritis

TI

**Language of text:** **Serbian / Cyrillic**

LT

**Language of abstract:** Serbian / English

**Country of publication:** Republic of Serbia

CP

**Locality of publication:** Central Serbia

LP

**Publication year:** 2019.

PY

**Publisher:** Author reprint

PU

**Publication place:** 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

PP

**Physical description** 164 pages, 4 pictures, 29 tables, 15 charts

PD

**Scientific field:** Medicine

SF

**Scientific discipline:**

SD

**Subject/key words:**

SKW

UDC

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

**Note:**

N

**Abstract:**

**AB**

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by chronic inflammation, joint destruction and an increased risk for cardiovascular morbidity dietary intakes of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids affects inflammation and cardiovascular risk. Genetic variations affect the way the body responds to certain nutrients and food components, and materials that can break down and properly utilized.

**Aim:** To assess the role of genetic variants in genes encoding enzymes in the metabolic pathway of omega-3 and omega-6 fatty acids in the modification of the clinical effect of supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids, and the effect of supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids on the activity of the disease, oxidative stress, endothelial function and hemostasis in patients with RA

**Material and methods:** 60 patients with RA is divided into the first group (20 patients), to which 5 of gel capsules Omega 3 Kardio® for 3 months, the second group (20 patients) who have taken after 3 of gel capsules Omega 3 Kardio® and two gel capsules oil evening primrose oil for 3 months, and the third, control group (20 patients) who were taking no supplements. Performed the analysis of genetic variants in genes encoding the metabolic enzyme times omega-3 and omega-6 fatty acids: rs174556, rs174561, rs3834458, rs174570 and rs968567 according to a methodology based on the PCR as well as skvenciranje by Sanger and the biochemical and haematological analyzes were performed in laboratories of Clinical center Kragujevac. Is the concentration of fatty acids in blood was performed before and after the supplementation of the GC method. Redox status was determined by spectrophotometry

**Results:** The presence of specific genetic variants of the gene for the enzyme fatty acid desaturases in RA patients who received supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids for 3 months, affecting the concentration of arachidonic acid and docosahexaenoic acid in the erythrocyte phospholipids, as well as the reduction of the parameters of inflammation in relation to control group. Supplementation of omega 3 and omega 6 fatty acids reduces platelet aggregation in a patient with RA. Prooxidant and antioxidant actions are parameters in the groups of patients with RA who received supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids

showed a decrease in oxidative stress and the increase in activity of the antioxidant protection system. Supplementation of omega 3 and omega 6 fatty acids in patients with RA affects the reduction in disease activity.

**Conclusions:** The presence of specific genetic variants of the gene for the enzymes desaturase in patients with RA who received supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids, a decrease in disease activity parameters of inflammation, hemostasis and oxidative stress. Genomic information yields better understanding of the interaction of genes and of nutrient, and with the ultimate goal of developing personalized guidelines for proper nutrition that can contribute to the treatment of rheumatoid arthritis. disease.

**Key words:** rheumatoid arthritis, omega-3/omega-6 fatty acids, nutrigenetic, oxidative stress

**Accepted by the Scientific Board on: 27.12.2017.**  
**ASB**

**Defended on:**  
**DE**  
**Thesis defended board**  
**(Degree/name/surname/title/faculty)**  
**DB**

1. **Associate Professor Mirjana Veselinovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Internal medicine, chairman;
2. **Sonja Pavlovic**, M.D, Ph.D, Institute of Molecular Genetics and genetic engineering, University of Belgrade, , member;
3. **Full Professor Milan Petronijevic**, M.D, Ph.D, MMA Medical Faculty, University of Defence, Military Medical Academy, Belgrade, scientific field Internal medicine member

**Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)**

**Tomic-Smiljanic M**, Vasiljevic D, Lucic-Tomic A, Andjelkovic N, Jakovljevic V, Bolovich S, Veselinovic M. Influence of different supplementation on platelet aggregation in patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019;38(9):2443-2450.

**M23**

Vukadinović D, Samardžić N, Janković S, **Tomić Smiljanić M**, Pavlović R, Stefanović S. Factors associated with early treatment failure in adult hospitalized patients with community-acquired pneumonia. Vojnosanit Pregl 2017;74(9):803-813. **M23**

**Tomic Smiljanic M**, Radonjic V, Djuric D. Evaluation of antibiotic consumption at Rakovica community health center from 2011 to 2015. Ser J Exp Clin Res. 2017;18(3):245-250. **M51**



*Influence of different supplementation  
on platelet aggregation in patients with  
rheumatoid arthritis*

**Marijana Tomic-Smiljanic, Dragan  
Vasiljevic, Aleksandra Lucic-Tomic,  
Nebojsa Andjelkovic, Vladimir  
Jakovljevic, Sergey Bolovich, et al**

**Clinical Rheumatology**

Journal of the International League of  
Associations for Rheumatology

ISSN 0770-3198

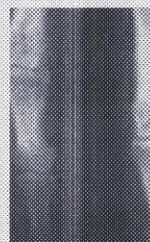
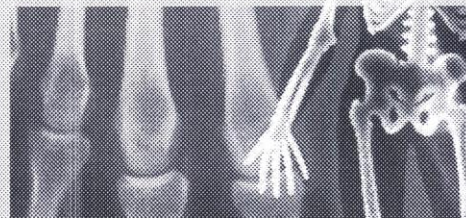
Clin Rheumatol

DOI 10.1007/s10067-019-04569-3

**Clinical  
Rheumatology**

Journal of the International League  
of Associations for Rheumatology

**ONLINE  
FIRST**



VOLUME 32  
NUMBER 9  
SEPTEMBER 2013



 Springer

 Springer



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by International League of Associations for Rheumatology (ILAR). This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".





## Influence of different supplementation on platelet aggregation in patients with rheumatoid arthritis

Marijana Tomic-Smiljanic<sup>1</sup> · Dragan Vasiljevic<sup>2</sup> · Aleksandra Lucic-Tomic<sup>3</sup> · Nebojsa Andjelkovic<sup>3</sup> · Vladimir Jakovljevic<sup>4,5</sup> · Sergey Bolovich<sup>5</sup> · Mirjana Veselinovic<sup>3</sup>

Received: 28 January 2019 / Revised: 16 April 2019 / Accepted: 18 April 2019  
© International League of Associations for Rheumatology (ILAR) 2019

### Abstract

**Introduction** Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs; eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA)) have been reported to reduce platelet aggregation. Our aim was to prospectively assess the potential influence of different supplementation omega-3 PUFA on the antiplatelet effects in rheumatoid arthritis (RA) patients.

**Methods** The study included 60 patients with RA at the Department of Rheumatology, Clinical Center Kragujevac. Patients were divided into three groups depending on who used concentrated fish oil only or concentrated fish oil in combination with evening primrose oil or control group without supplementation in a period of 3 months. Platelet aggregation was measured using the multiplate analyzer and expressed through the value of adenosine diphosphate (ADP) test, arachidonic acid-induced aggregation (ASPI) test, thrombin receptor-activating peptide (TRAP) test (to assess baseline platelet aggregation), and the ratio of ADP/TRAP and ASPI/TRAP representing the degree of inhibition of platelet aggregation compared to the basal value. The platelet function analysis in whole blood was performed 18–24 h before starting supplementation and after 90 days. Considerations were taken in the representation of demographic, clinical characteristics, and laboratory parameters between the groups.

**Results** Patients who used concentrated fish oil only had a significantly lower value of the ratio of ADP/TRAP ( $0.68 \pm 0.20$ ) compared to patients without supplementation ( $0.83 \pm 0.12$ ;  $p = 0.008$ ), while there was no statistically significant difference in values of other laboratory parameters of platelet function between other groups.

**Conclusions** Co-administration of supplementation-concentrated fish oil may reduce platelet aggregation in adults with RA.

### Key Points

- Omega-3 PUFAs are essential for health and are known to possess anti-inflammatory properties, improving cardiovascular health as well as benefiting inflammatory diseases..
- In this paper, we report on anti-aggregation effects n-3 PUFAs and  $\gamma$ -linolenic acid in RA.
- The risk of cardiovascular morbidity and mortality is increased in RA, and dietary supplementation of n-3 PUFA may have preventive potential for the cardiovascular management in rheumatoid arthritis.

**Keywords** Fatty acids · Platelet aggregation · Rheumatoid arthritis

Mirjana Veselinovic  
veselinovic.m@sbb.rs

Marijana Tomic-Smiljanic  
michkosm@ptt.rs

Dragan Vasiljevic  
dvg\_gana@yahoo.com

Aleksandra Lucic-Tomic  
sanlusa@ptt.rs

Vladimir Jakovljevic  
drvladakovg@yandex.ru

Sergey Bolovich  
bolevich2011@yandex.ru

<sup>1</sup> Public Health Center, DZ Rakovica, 22 Kraljiće Jelene, 11000, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Hygiene and Ecology, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica, 34000, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Internal medicine, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica, 34000, Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup> Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica, 34000, Kragujevac, Serbia

<sup>5</sup> Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Trubetskaya Street 8, Str. 2, Moscow, Russia 119991

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease that affects the joints, leading to cartilage and bone destruction. The worldwide prevalence of this chronic disease ranges between 0.5 and 1.0%. In recent years, attention has been drawn to the similarity between atherosclerotic inflammatory processes and inflammatory changes in the course of systemic connective tissue diseases, in particular RA [1]. The risk of cardiovascular (CV) disease and mortality is increased in RA [2]. Although traditional CV risk factors may not explain the excess CV risk in RA, they do play an important role and should not be neglected when it comes to CV risk prevention. Since there are no CV risk assessment models for RA specifically, the national guidelines for CV risk management can best be used to determine CV risk and treatment, as advised by the European League Against Rheumatism (EULAR) guidelines for CV risk management in RA [3].

Omega-3 polyunsaturated fatty (PUFA) acids are essential for health and are known to possess anti-inflammatory properties, improving cardiovascular health as well as benefiting inflammatory diseases [1]. Studies support the efficacy of omega-3 PUFA in reducing pain, number of tender joints, duration of morning stiffness, disease activity, use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, and improving physical performance in RA patients [4]. The dose of n-3 PUFAs used in these trials has typically been high, between about 1 and 7 g/day and averaging about 3.5 g/day [5]. Omega-3 PUFA can improve heart rate variability, lower heart rate and blood pressure, improve endothelial function, decrease platelet aggregation, and lower blood triglyceride levels in healthy subjects or CV patients [6].

Activated platelets contribute to plaque formation within blood vessels in the early and late stages of atherogenesis, and therefore, they have been proposed as a risk factor for cardiovascular disease [7]. Clinical studies have demonstrated that activation of circulating platelets occurs in patients with RA. Most studies evidenced omega-PUFA antithrombotic effects [8–12] with no excess in clinically significant bleeding risk [13]. Major (n-3) PUFA includes alpha-linolenic acid (ALA, 18:3n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3), and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3). ALA is the plant-derived (n-3) PUFA, found in certain seeds, nuts, and their oils. EPA and DHA are the major long-chain (n-3) PUFA derived from seafood consumption [4]. The effect of different supplementation omega-3 PUFA on platelet aggregation in RA patients has not been studied yet.

Currently, there are numbers of platelet (PLT) tests available. Whole blood impedance aggregometry (WBA) has a high sensitivity. The method is based on PLT activation stimulated *in vitro* in different assays, including arachidonic acid (AA), adenosine diphosphate (ADP), and thrombin receptor-activating peptide (TRAP) [12].

The aim of our study was to examine the influence of different supplementation omega-3 PUFA on platelet aggregation induced by ADP, AA, and TRAP in patients with RA.

## Methods

The study group included 60 female patients (mean age 63.1 ± 9.6 years) with RA. The study was prospective, randomized-controlled. Patients were recruited into the study after routine control from the outpatient unit of the Rheumatology Department at the Clinical Center Kragujevac, Serbia, in 2014. RA was diagnosed according to the American College of Rheumatology 2010 revised criteria [13]. The mean duration of the disease was 59 months, SD ± 60 (12–180 months). All patients were on identical rheumatic therapy. Patients treated with low doses of steroids (< 10 mg/day), oral methotrexate (mean dose 15 mg/week) with folic acid 10 mg/week, and non-steroidal anti-inflammatory drugs were given only occasionally.

They were randomly assigned to 3 groups of 20 patients. The first group receive daily after meals 5000 mg of omega-3 PUFA (5 gel capsules Omega-3 Cardio®, Natural Wealth, NBTY Inc., New York, U.A., in which 1 gel capsule contains 1000 mg of concentrated fish oil with 300 mg of docosahexaenoic acid (DHA), 200 mg of eicosapentaenoic acid (EPA), and 100 mg of other omega-3 fatty acids), the second group receive daily after meals 2 gel capsules Omega-3 Cardio® and 2 gel capsules Evening Primrose Oil® (Natural Wealth, NBTY Inc., New York, USA, in which 1 gel capsule contains 1300 mg of evening primrose oil (EPO) (*Oenothera biennis*, seed) with linoleic acid 949 mg and gamma linolenic acid 117 mg), and the third group receive only previous described rheumatologic therapy in the period of 3 months.

Clinical assessment of rheumatology was based on disease activity score (DAS) 28. DAS 28 involves the number of 28 swollen and tender joints, including the proximal interphalangeal joints, metacarpophalangeal joints, wrists, elbows, shoulders, and knees along with erythrocyte sedimentation rate (ESR) and visual analog score (VAS). The VAS was used a 100-mm horizontal line where patients indicated the level of the global health assessment by placing a mark on a line between “best” (left end, 0 mm) and “worst” (right end, 100 mm). DAS 28 was calculated using automatic DAS 28 calculator V1.1-beta by Alfons and Michel available at [www.umcn.nl/DAS28](http://www.umcn.nl/DAS28).

Laboratory testing of platelet reactivity, other laboratory tests, and clinical evaluation were performed on two occasions: before administering omega-3 PUFA and 3 months after randomization.

The following exclusion criteria were used: history of ischemic heart disease, hypertension, diabetes mellitus, smoking habit (in the last 5 years), hyperlipidemia, family



**Table 1** Baseline clinical and laboratory characteristics in patients with rheumatoid arthritis

Patient characteristics	Group I (n = 20)	Group II (n = 20)	Group III (n = 20)	p value
Age (x ± SD; years)	54 ± 8	57.3 ± 8	59 ± 7.5	0.80 <sup>a</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.48 ± 4.15	26.52 ± 4.37	24.65 ± 6.29	0.313 <sup>b</sup>
PTL (×10 <sup>3</sup> /μl; mean ± SD)	173 ± 52	186 ± 52	219 ± 53	0.517 <sup>b</sup>
Fibrinogen (mean ± SD)	5.38 ± 1.97	4.74 ± 0.91	4.52 ± 0.56	0.869 <sup>b</sup>
CRP, mg/l	12.4 ± 8.2	16.0 ± 18.3	12.7 ± 7.2	0.184 <sup>b</sup>
Disease duration (x ± SD; years)	6.6 ± 4	8.1 ± 2.75	7.25 ± 2.6	0.566 <sup>b</sup>
Tender joint count	6.25 ± 2	5.45 ± 1.9	5.0 ± 2	0.719 <sup>b</sup>
Swollen joint count	1.85 ± 1	1.5 ± 1.6	1.0 ± 1.3	0.363 <sup>b</sup>
VAS (global health assessment)	55.7 ± 10.1	58.95 ± 9.1	61.5 ± 8.9	0.302 <sup>b</sup>
ESR, mm/h	35 ± 24	36.7 ± 19.2	33.25 ± 17.14	0.674 <sup>b</sup>
DAS 28 (ESR)	4.99 ± 0.88	4.76 ± 0.85	4.66 ± 0.80	0.720 <sup>b</sup>
HAQ	1.4 ± 0.38	1.36 ± 0.19	1.36 ± 0.23	0.616 <sup>b</sup>

Values are expressed in mean ± SD. *Abbreviations:* ANOVA analysis of variance, NS not statistically significant, BMI body mass index, PTL platelets, CRP C-reactive protein, VAS visual analog scales, ESR erythrocyte sedimentation rate, DAS 28 disease activity score 28, HAQ health assessment questionnaire, w2 chi-square

<sup>a</sup> ANOVA test

<sup>b</sup> w2 test

<sup>c</sup> Significant at  $p < .05$

Table 4 shows the mean, standard deviation, and median values for ADP, ASPI, and TRAP test and the ratio of ADP/TRAP and ASPI/TRAP between the groups after 3 months of supplementation. The ANOVA of the variable ADP indicated that differences between the 3 compared groups were not significant ( $F_{3, 327} = 2.502, p = 0.057$ ).

Because of the borderline level of significance, we have decided to make contrast analysis between the group with lowest ADP mean value, in contrast to all other groups combined, and, in the second step, to compare it with the group with highest ADP mean value. Contrast analysis indicated significantly lower mean in group I, than the rest of the 2 groups combined ( $t_{327} = 2121, p = 0.035$ ), and significantly lower mean compared to group III ( $t_{327} = 2.679, p = 0.008$ ), which could indicate that, despite non-significant finding in ANOVA test, a significant difference between group I and III could be present. The variable ASPI did not have a normal distribution, so we performed the Kruskal-Wallis test, which indicated there were no significant differences between the three different groups.

The ANOVA of the variable TRAP did not find significant differences between the three compared groups. There was a significant difference in the ANOVA test of the variable ADP/TRAP between the compared groups for the 3 conditions ( $F_{3, 327} = 2.846, p = 0.042$ ). In order to identify between which groups the difference was significant, and to decrease the probability of type I error in multiple comparisons, we performed the Bonferroni post hoc analysis, which indicated that the mean value of the ADP/TRAP in group I ( $0.68 \pm 0.20$ ) was significantly lower than the mean value of the ADP/TRAP in group III ( $0.83 \pm 0.12$ ). Post hoc contrast analysis

indicated that group I had a significantly lower mean of the ADP/TRAP value, than the rest of the 2 groups combined ( $t_{327} = 2612, p = 0.009$ ), and also significantly lower compared to group III only ( $t_{327} = 2.848, p = 0.005$ ).

The variables ASPI/TRAP did not show normal distribution, so we performed the Kruskal-Wallis test, which indicated there were no significant differences between the three different groups.

### Adverse effects

Adverse effects related to the study treatment were mild, and their rate did not differ between the placebo and omega-3 PUFA groups. Mild gastrointestinal discomfort (mild diarrhea, abdominal pain, dyspepsia, or nausea lasting less than 72 h) that did not require any additional intervention was noted in 2 patients in the omega-3 PUFA group.

### Discussion

Patients with rheumatoid arthritis (RA) suffer significantly increased CV morbidity and mortality when compared to the general population. Both traditional CV risk factors and high levels of systemic inflammation have been linked to the increased CV risk in RA patients, but significant uncertainty remains regarding the mechanisms through which these factors contribute to CV disease. In addition, ongoing questions remain regarding how best to identify RA patients at high risk for CV disease and what primary and secondary prevention strategies are effective at influencing CV outcome [15].

**Table 2** Comparisons of fatty acid distribution in plasma phospholipids after 12 weeks

Fatty acid	Group I	Group II	Group III
20:4 n-6 AA	10.22 ± 1.81	11.29 ± 2.14 <sup>#</sup>	9.60 ± 2.90
20:5 n-3 EPA	1.01 ± 1.02 <sup>**</sup>	0.49 ± 0.23 <sup>**</sup>	0.40 ± 0.25
22:5 n-3 DPA	0.58 ± 0.30	0.45 ± 0.16	0.56 ± 0.69
22:6 n-3 DHA	2.74 ± 1.08 <sup>*</sup>	2.22 ± 0.74 <sup>*</sup>	1.83 ± 0.72
n-3	4.55 ± 2.26 <sup>**</sup>	3.33 ± 1.00 <sup>*</sup>	3.09 ± 1.15
n-6	39.05 ± 3.22	40.75 ± 2.86	40.03 ± 2.71
n-6/n-3	10.62 ± 5.07 <sup>*</sup>	13.50 ± 4.81 <sup>*</sup>	14.27 ± 4.44
SFA	46.24 ± 3.97	45.19 ± 2.80	46.26 ± 3.67
MUFA	10.16 ± 1.34	10.67 ± 1.12	10.61 ± 1.74
PUFA	43.13 ± 3.17	44.07 ± 2.96	43.60 ± 4.22

<sup>#</sup>Significantly different compared groups ( $p \leq 0.05$ )

<sup>\*\*</sup> $p \leq 0.01$

<sup>\*</sup>Significantly different from group I ( $p \leq 0.05$ ). Assessed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test

Data are expressed as the mean ± SD. NS not statistically significant. AA arachidonic acid, EPA eicosapentaenoic acid, DPA docosapentaenoic acid, DHA docosahexaenoic acid, SFA saturated fatty acids, MUFA mono-unsaturated fatty acids, PUFA polyunsaturated fatty acids

The consumption of omega-3 in combination with standard drugs can improve symptoms of cardiovascular problems. In our study, patients intake capsules with n-3 PUFA or GLA and these resulted in an increased incorporation of the anti-inflammatory eicosanoid precursor FAs (EPA, DHA, DGLA) in plasma phospholipids. The AA/EPA ratio and the n-3 FA index, which represent highly discriminative risk factors for sudden cardiac death [16–18], were significantly improved due to the consumption of 3 g of n-3 PUFA. This is an added benefit because CV mortality is strongly elevated in patients with RA [19, 20].

Despite the abundance of studies concerning omega-3 supplements, evidence is not clear about the benefits of these supplements, with both positive and negative trials [21]. Meta-analysis shows that supplementation with n-3 PUFAs is associated with a significant reduction in ADP-induced platelet aggregation and PAU when using the RPFA VerifyNow® system. Furthermore, there is a trend toward a decrease in collagen- and AA-induced platelet aggregation compared with controls, in the absence of statistical significance [21].

Several uncontrolled studies have reported conflicting results regarding the effects of fish oil supplementation on platelet aggregation; thus, its putative effects remain unclear and controversial. We report for the first time to our knowledge in a controlled study the antiaggregatory effects of EPA, DHA, and LA in RA patients. Process of platelet activation aggregation is influenced by numerous factors. During data collection and analysis, we considered all demographic, clinical, and laboratory factors that could affect the aggregation test, but

did not find a significant difference in their distribution between the groups. Values of laboratory parameters including hemostasis parameters and inflammation markers did not significantly differ between the compared groups. In our study, we observed different levels of reduction in ADP-induced platelet aggregation compared to baseline values (ADP/TRAP) between the groups of patients who used omega-3 PUFA and the group of patients without supplementation, which cannot be attributed to other factors.

In patients treated with omega-3 PUFA, we also noted a lower platelet aggregation upon stimulation with ADP at both 0/90 days compared to the control group, but not significant statistically. Thus, the 3-month treatment with omega-3 PUFA resulted in an additional inhibition of platelet aggregation upon stimulation with ADP by nearly 7%.

Nomura et al. clearly showed that platelet activation significantly decreased with EPA treatment in hyperlipidemic and diabetic patients [21]. The 4-week supplementation of omega-3 PUFA reduced the measures of platelet aggregation and activation in healthy subjects showed a recent study [22]. The previous study clearly demonstrated that the addition of omega-3 PUFA to standard dual antiplatelet therapy was associated with a significant reduction of platelet reactivity compared to placebo [23].

As we know, arachidonic acid can produce several eicosanoids through cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) pathways. One important mechanism for the effect of n-3 PUFAs can be attributed to its competing role with arachidonic acid in eicosanoids metabolism; n-3 PUFAs can inhibit the oxidation of arachidonic acid by cyclooxygenase (COX) enzymes, and thus reducing the production of eicosanoid thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) and reduced TXA<sub>2</sub>-mediated platelet activation and aggregation; n-3 PUFAs can be incorporated into membrane phospholipids at the expense of arachidonic acid and thus reduce the production of eicosanoids from arachidonic acid [24, 25].

Omega-3 PUFA were shown to affect properties of the platelet membrane, its receptors, and ion channels. Omega-3 PUFA may also affect metabolic processes related to the hepatic cytochrome P450 (CYP) activity. PUFA and related eicosanoids were shown to be metabolized by the CYP system [24]. Most literature data refer to arachidonic acid which is oxidized, epoxidized, and hydroxylated by the CYP system [25]. The latter epoxide products of arachidonic acid metabolism, also known as oxylipids, play complex and often counter-regulatory autocrine and paracrine roles in the CV system [21]. There are few data in the literature regarding CYP-related metabolism of omega-3 PUFA and interactions with arachidonic acid metabolism or drugs metabolized by the CYP system. As the same CYP isoforms also metabolize arachidonic acid, Fer et al. [26] were able to demonstrate experimentally that administration of EPA and DHA reduces the production of epoxide derivatives of arachidonic acid by



**Table 3** Differences in platelet aggregability values among the groups before supplementation

Test		Group I	Group II	Group III	p value
ADP	Mean ± SD	600.00 ± 285.0	671.90 ± 255.20	676.20 ± 193.18	0.352 <sup>a</sup>
	Median	520.00	698.50	708.00	
ASPI	Mean ± SD	641.70 ± 311.59	667.65 ± 339.76	820.40 ± 278.42	0.733 <sup>b</sup>
	Median	641.00	801.00	828.00	
TRAP	Mean ± SD	838.15 ± 314.56	960.60 ± 199.73	864.70 ± 196.82	0.320 <sup>a</sup>
	Median	860.50	1007.50	874.00	
ADP/TRAP	Mean ± SD	0.99 ± 0.34	0.70 ± 0.19	0.78 ± 0.15	0.176 <sup>b</sup>
	Median	0.77	0.79	0.75	
ASPI/TRAP	Percentage of reduction	99	70	78	0.534 <sup>a</sup>
	Mean ± SD	0.89 ± 0.31	0.70 ± 0.35	0.93 ± 0.22	
	Median	0.95	0.85	0.96	
	Percent of reduction	89	70	93	

Abbreviations: ADP adenosine diphosphate, ANOVA analysis of variance, SD standard deviation

<sup>a</sup> ANOVA test

<sup>b</sup> Kruskal-Wallis test

<sup>c</sup> Significant at  $P < .05$

80% and 60%, respectively. The role of CYP-related metabolites of omega-3 PUFA was recently highlighted by Arnold et al. [27] who reviewed experimental and clinical studies in this area and found that these metabolites may be partially responsible for the beneficial effects of omega-3 PUFA in the CV system. It has been recently reported that omega-3 PUFA has some other beneficial properties, including decreased thrombin generation, reduction of oxidative stress, and favorable modification of fibrin clot characteristics [25].

Several uncontrolled studies have reported conflicting results regarding the effects of fish oil supplementation on platelet aggregation. Larson et al. [28] demonstrated in ten healthy volunteers using whole-blood impedance aggregometry that omega-3 PUFAs alone were not able to change platelet aggregation. Serebruany et al. evaluated

platelet function following 2 weeks of omega-3 fatty acid supplementation in patients with CAD who were taking ASA. Collagen- and AA-induced aggregation were not affected by the treatment [29]; thus, its putative effects remain unclear and controversial.

In a controlled study report that the antiaggregatory effects of EPA and DHA are sex specific [30]. They offer a plausible explanation whereby sex, a non-modifiable determinant of cardiovascular disease, may likely explain the inconsistent results in the fish oil and platelet aggregation literature [31]. Interactions between sex hormones and omega-3 fatty acids exist to differentially reduced platelet aggregation [31, 32]. Our study group consisted exclusively of women, in which we avoid the influence of sex as an independent CV factor on platelet aggregation.

**Table 4** Differences in platelet aggregability values among the groups after supplementation

Test		Group I	Group II	Group III	p value
ADP	Mean ± SD	560.55 ± 251.32	651.50 ± 204.35	667.50 ± 189.49	0.057 <sup>a</sup>
	Median	489.50	704.50	738.00	
ASPI	Mean ± SD	609.80 ± 332.24	662.40 ± 314.08	783.95 ± 309.47	0.480 <sup>b</sup>
	Median	611.00	728.00	835.00	
TRAP	Mean ± SD	836.20 ± 242.17	893.60 ± 253.05	864.25 ± 209.83	0.586 <sup>c</sup>
	Median	818.00	893.00	827.50	
ADP/TRAP	Mean ± SD	0.68 ± 0.20 <sup>c</sup>	0.79 ± 0.14	0.83 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.042 <sup>b</sup>
	Median	0.65	0.78	0.89	
ASPI/TRAP	Percentage of reduction	68	79	83	0.565 <sup>a</sup>
	Mean ± SD	0.76 ± 0.39	0.80 ± 0.30	0.96 ± 0.23	
	Median	0.91	0.87	0.95	
	Percentage of reduction	76	80	96	

Abbreviations: ADP adenosine diphosphate, ANOVA analysis of variance, SD standard deviation

<sup>a</sup> ANOVA test

<sup>b</sup> Kruskal-Wallis test

<sup>c</sup> Significant at  $p < .05$

**Table 3** Differences in platelet aggregability values among the groups before supplementation

Test		Group I	Group II	Group III	<i>p</i> value
ADP	Mean ± SD	600.00 ± 285.0	671.90 ± 255.20	676.20 ± 193.18	0.352 <sup>a</sup>
	Median	520.00	698.50	708.00	
ASPI	Mean ± SD	641.70 ± 311.59	667.65 ± 339.76	820.40 ± 278.42	0.733 <sup>b</sup>
	Median	641.00	801.00	828.00	
TRAP	Mean ± SD	838.15 ± 314.56	960.60 ± 199.73	864.70 ± 196.82	0.320 <sup>a</sup>
	Median	860.50	1007.50	874.00	
ADP/TRAP	Mean ± SD	0.99 ± 0.34	0.70 ± 0.19	0.78 ± 0.15	0.176 <sup>b</sup>
	Median	0.77	0.79	0.75	
ASPI/TRAP	Percentage of reduction	99	70	78	0.534 <sup>a</sup>
	Mean ± SD	0.89 ± 0.31	0.70 ± 0.35	0.93 ± 0.22	
	Median	0.95	0.85	0.96	
	Percent of reduction	89	70	93	

Abbreviations: ADP adenosine diphosphate, ANOVA analysis of variance, SD standard deviation

<sup>a</sup> ANOVA test

<sup>b</sup> Kruskal-Wallis test

<sup>c</sup> Significant at *P* < .05

80% and 60%, respectively. The role of CYP-related metabolites of omega-3 PUFA was recently highlighted by Arnold et al. [27] who reviewed experimental and clinical studies in this area and found that these metabolites may be partially responsible for the beneficial effects of omega-3 PUFA in the CV system. It has been recently reported that omega-3 PUFA has some other beneficial properties, including decreased thrombin generation, reduction of oxidative stress, and favorable modification of fibrin clot characteristics [25].

Several uncontrolled studies have reported conflicting results regarding the effects of fish oil supplementation on platelet aggregation. Larson et al. [28] demonstrated in ten healthy volunteers using whole-blood impedance aggregometry that omega-3 PUFAs alone were not able to change platelet aggregation. Serebruany et al. evaluated

platelet function following 2 weeks of omega-3 fatty acid supplementation in patients with CAD who were taking ASA. Collagen- and AA-induced aggregation were not affected by the treatment [29]; thus, its putative effects remain unclear and controversial.

In a controlled study report that the antiaggregatory effects of EPA and DHA are sex specific [30]. They offer a plausible explanation whereby sex, a non-modifiable determinant of cardiovascular disease, may likely explain the inconsistent results in the fish oil and platelet aggregation literature [31]. Interactions between sex hormones and omega-3 fatty acids exist to differentially reduced platelet aggregation [31, 32]. Our study group consisted exclusively of women, in which we avoid the influence of sex as an independent CV factor on platelet aggregation.

**Table 4** Differences in platelet aggregability values among the groups after supplementation

Test		Group I	Group II	Group III	<i>p</i> value
ADP	Mean ± SD	560.55 ± 251.32	651.50 ± 204.35	667.50 ± 189.49	0.057 <sup>a</sup>
	Median	489.50	704.50	738.00	
ASPI	Mean ± SD	609.80 ± 332.24	662.40 ± 314.08	783.95 ± 309.47	0.480 <sup>b</sup>
	Median	611.00	728.00	835.00	
TRAP	Mean ± SD	836.20 ± 242.17	893.60 ± 253.05	864.25 ± 209.83	0.586 <sup>c</sup>
	Median	818.00	893.00	827.50	
ADP/TRAP	Mean ± SD	0.68 ± 0.20 <sup>c</sup>	0.79 ± 0.14	0.83 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.042 <sup>b</sup>
	Median	0.65	0.78	0.89	
ASPI/TRAP	Percentage of reduction	68	79	83	0.565 <sup>a</sup>
	Mean ± SD	0.76 ± 0.39	0.80 ± 0.30	0.96 ± 0.23	
	Median	0.91	0.87	0.95	
	Percentage of reduction	76	80	96	

Abbreviations: ADP adenosine diphosphate, ANOVA analysis of variance, SD standard deviation

<sup>a</sup> ANOVA test

<sup>b</sup> Kruskal-Wallis test

<sup>c</sup> Significant at *p* < .05



In patients with RA, we found significantly lower ADP-induced residual platelet aggregation compared to baseline values in the group of patients who used omega-3 PUFA 3 months to the group of patients who did not use supplementation. There was no significant difference in neither ADP nor arachidonic acid-induced platelet aggregation between the groups of patients with RA who used omega-3 PUFA and the patients with RA who used omega-3 PUFA and EPO.

Meta-analysis of 15 randomized controlled trials demonstrates that n-3 PUFA-supplementation is associated with a significant reduction in platelet aggregation when the participants were at poor health status, but not in healthy persons [32].

Our findings did not show that platelet hyperactivity was reduced when EPO was added to the diet. EPO may affect the modulation of hyperaggregability. Thus, the modulation of platelet aggregation percentage using EPO may potentiate the effect of other medications commercially used in CVD.

We can also assume that some of the observed differences in the values of aggregation test (especially regarding ADP test) could not manifest due to the smaller number of patients included in our study, so further research with a larger number of patients is needed. The weakness of this study is the lack of a blinded placebo-controlled group, which would have made the interpretation of the data stronger.

Small study sizes and lack of comparability between methods to assess platelet function currently limit robust evidence on the efficacy of dietary bioactives in specific patient groups. Implementation of uniform point-of-care tests to assess platelet function, and enhanced knowledge of the efficacy by which specific dietary compounds and their metabolites affect platelet function, may enable the identification of functional antiplatelet ingredients that are eligible for a health claim, or combined treatment strategies, including both pharmacological antiplatelet treatment as well as dietary intervention, to tackle CV disease prevention in RA. Further ongoing investigations could be helpful in that regard.

#### Compliance with ethical standards

Disclosures None.

#### References

- Souza PR, Norling LV (2015) Implications for eicosapentaenoic acid- and docosahexaenoic acid-derived resolvins as therapeutics for arthritis. *Eur J Pharmacol* 785:165–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.072>
- Hollan I, Dessen PH, Ronda N, Wasko MC, Svenungsson E, Agewall S, Cohen-Tervaert JW, Maki-Petaja K, Grundtvig M, Karpouzias GA, Meroni PL (2015) Prevention of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev pii S1568-9972(15):00135–00134*. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.06.004>
- Peters M, Symmons D, McCarey D, Dijkmans B, Nicola P, Kvien T et al (2010) EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 69:325–331
- Miles EA, Calder PC (2012) Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr* 107(Suppl 2):171–184
- Calder PC (2013) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* 75(3):645–662
- Mozaffarian D, Wu JH (2012) (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J Nutr* 142(3):614–625
- Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, de Roos B (2014) Dietary manipulation of platelet function. *Pharmacol Ther* 144(2):97–113
- Byelashov OA, Sinclair AJ, Kaur G (2015) Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid. *Lipid Technol* 27(4):79–82
- Larson MK, Shearer GC, Ashmore JH, Anderson-Daniels JM, Grasic EL, Tholon JT, Vogelaar JL, Korh AJ, Narceddy V, Sprich M, Harris WS (2011) Omega-3 fatty acids modulate collagen signaling in human platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 84:93–98
- Mozaffarian D, Marchiolo R, Gardner T et al (2011) The omega-3 fatty acids for prevention of post-operative atrial fibrillation (OPERA) trial—rationale and design. *Am Heart J* 162:56–63
- Wachira JK, Larson MK, Harris WS (2014) n-3 Fatty acids affect haemostasis but do not increase the risk of bleeding: clinical observations and mechanistic insights. *Br J Nutr* 111(9):1652–1662
- Ho KK, Abrams-Ogg AC, Wood RD, O'Sullivan ML, Kirby GM, Blois SL (2015) Assessment of platelet function in healthy sedated cats using three whole blood platelet function tests. *J Vet Diagn Invest* 27(3):352–360. <https://doi.org/10.1177/1040638715584994>
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraciolli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62:2569–2581
- Pullman-Moore S, Laposata M, Lcm D, Holman RT, Leventhal LJ, Demarco D, Zurier RB (1990) Alteration of the cellular fatty acid profile and the production of eicosanoids in human monocytes by gamma-linolenic acid. *Arthritis Rheum* 33:1526–1533
- Mohebi-Nejad A, Bikdeli B (2014) Omega-3 supplements and cardiovascular diseases. *Tanaffos* 13(1):6–14
- Harris WS, Von Schacky C (2004) The omega-3 index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 39:212–220
- Jabbar R, Saldeen T (2006) A new predictor of risk for sudden cardiac death. *Ups J Med Sci* 111:169–177
- Dawczynski C, Hackermeier U, Viehweger M, Stange R, Springer M, Jahreis G (2011) Incorporation of n-3 PUFA and  $\gamma$ -linolenic acid in blood lipids and red blood cell lipids together with their influence on disease activity in patients with chronic inflammatory arthritis—a randomized controlled human intervention trial. *Lipids Health Dis* 10:130
- Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Escdalle JM, Lacaille D (2008) Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum* 59:1690–1697

20. Meune C, Touzé E, Trinquart L, Allanore Y (2009) Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)* 48:1309–1313
  21. Nomura S, Inami N, Shouzu A, Omoto S, Kimura Y, Takahashi N, Tanaka A, Urase F, Maeda Y, Ohtani H, Iwasaka T (2009) The effects of pitavastatin, eicosapentaenoic acid and combined therapy on platelet-derived microparticles and adiponectin in hyperlipidemic, diabetic patients. *Platelets* 20:16–22
  22. Gao LG, Cao J, Mao QX, Lu XC, Zhou XL, Fan L (2013) Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acid-supplementation on platelet aggregation in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 226(2):328–334
  23. Takada K, Ishikawa S, Yokoyama N, Hosogoe N, Isshiki T (2014) Effects of eicosapentaenoic acid on platelet function in patients taking long-term aspirin following coronary stent implantation. *Int Heart J* 55(3):228–233
  24. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ (2015) PUFAs: structures, metabolism and functions. *Adv Clin Exp Med* 24(6):931–941. <https://doi.org/10.17219/acem/31243>
  25. Gajos G, Zalewski J, Nessler J, Zmudka K, Undas A, Piwowarska W (2012) Polyunsaturated omega-3 fatty acids improve responsiveness to clopidogrel after percutaneous coronary intervention in patients with cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism. *Kardiol Pol* 70(5):439–445
  26. Fer M, Corcos L, Dréano Y, Plé-Gautier E, Salaün JP, Berthou F, Amet Y (2008) Cytochromes P450 from family 4 are the main omega hydroxylating enzymes in humans: CYP4F3B is the prominent player in PUFA metabolism. *J Lipid Res* 49(11):2379–2389
  27. Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH (2010) Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep* 62:536–547
  28. Larson MK, Tormoen GW, Weaver LJ, Luepke KJ, Patel IA, Hjelmén CE, Ensz NM, McComas LS, McCarty OJ (2013) Exogenous modification of platelet membranes with the omega-3 fatty acids EPA and DHA reduces platelet procoagulant activity and thrombus formation. *Am J Physiol Cell Physiol* 304(3):C273–C279
  29. Serebruany VL, Miller M, Pokov AN, Lynch D, Jensen JK, Hallén J, Atar D (2011) Early impact of prescription Omega-3 fatty acids on platelet biomarkers in patients with coronary artery disease and hypertriglyceridemia. *Cardiology* 118:187–194
  30. Phang M, Sinclair AJ, Linez LF, Garg ML (2012) Gender-specific inhibition of platelet aggregation following omega-3 fatty acid supplementation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22(2):109–114
  31. Phang M, Linez LF, Garg ML (2013) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementations reduce platelet aggregation and hemostatic markers differentially in men and women. *J Nutr* 143(4):457–463
  32. Bagge A, Schött U, Kander T (2016) Effects of naturopathic medicines on multiplate and ROTEM: a prospective experimental pilot study in healthy volunteers. *BMC Complement Altern Med* 16:64
- Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



YU ISSN 0042-8450

# ВОЈНОСАНИТЕТСКИ ПРЕГЛЕД

*Часопис лекара и фармацеутика Војске Србије*

*Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia*



## *Vojnosanitetski pregljed*

Vojnosanit Pregl 2017; September Vol. 74 (No. 9): p. 799–908.

Vojnosanitetski Pregled 2017 September Vol. 74 (No. 9): p. 799–908.

Vojnosanitetski Pregled



— WORLD —  
**LYMPHOMA**  
DAY



## Factors associated with early treatment failure in adult hospitalized patients with community-acquired pneumonia

Faktori udruženi sa ranim neuspehom u lečenju odraslih hospitalizovanih bolesnika sa vanbolnički stečenom pneumonijom

Dubravka Vukadinović\*, Natalija Samardžić<sup>†</sup>, Slobodan Janković\*,  
Marijana Tomić Smiljanić<sup>‡</sup>, Radiša Pavlović\*, Srdjan Stefanović\*

University of Kragujevac, \*Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia; Clinical Center of Serbia, <sup>†</sup>Clinic for Pulmonary Diseases, Belgrade, Serbia; <sup>‡</sup>Primary Health Care Center Rakovica, Belgrade, Serbia

### Abstract

**Background/Aim.** Early treatment failure (ETF) in patients hospitalized for community-acquired pneumonia (CAP) is associated with prolonged hospitalization, increased risk of mortality and high treatment costs. The aim of this study was to analyze the relative importance of factors influencing ETF in hospitalized adult patients with CAP that are still insufficiently explored. **Methods.** A retrospective case-control study was carried out on a sample of 126 adult patients treated for serious CAP at the Clinic for Pulmonary Diseases, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia, during the 5-year period (2007–2011). The cases (n = 63) were consecutive patients with ETF, observed within the three days upon the admission to hospital, while the control group consisted of the equal number of randomly selected patients without such an outcome. The association between potential risk/protective factors and ETF was estimated using logistic regression analysis. **Results.** The coexistence of gastrointestinal disorders [adjusted odds ratio (OR) 18.83, 95% confidence interval (CI) 1.15–309.04], higher CURB-65 (C – confusion; U – urea 7 mmol/L; R – respiratory

rate  $\geq 30$  breaths/min; B – systolic blood pressure  $< 90$  mmHg or diastolic blood pressure  $\leq 60$  mmHg; 65 – age  $\geq 65$  years) score on admission (adjusted OR 2.57, 95%CI 1.05–6.25), initial use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in hospital (adjusted OR 38.19, 95%CI 3.61–404.51) and previous outpatient use of inhaled corticosteroids (adjusted OR 22.41, 95%CI 1.03–489.06) were found to be significant risk factors for ETF. On the other hand, older age and use of antibiotics before the hospitalization were associated with a significantly lower chance of experiencing ETF, reducing the odds for 98% and almost 90%, respectively. **Conclusion.** The avoidance of the routine in-hospital use of NSAIDs as well as the outpatient use of appropriate antibiotics may be beneficial for patients hospitalized for CAP in terms of reducing the risk of ETF. The CURB-65 score could be a better predictor of ETF than Pneumonia Severity Index. Further prospective studies are required to confirm these findings.

### Key words:

pneumonia; hospitalization; treatment outcome; risk factors; comorbidity.

### Apstrakt

**Uvod/Cilj.** Rani neuspeh u lečenju (*early treatment failure* – ETF) hospitalizovanih bolesnika sa vanbolnički stečenom pneumonijom (*community-acquired pneumonia* – CAP) udruženi je sa produženom hospitalizacijom, većim rizikom od smrtnog ishoda i visokim troškovima lečenja. Cilj ove studije bio je da analizira relativni značaj faktora koji utiču na pojavu ETF kod odraslih hospitalno lečenih bolesnika zbog CAP, a koji još uvek nisu dovoljno istraženi. **Metode.** Sprovedena je retrospektivna studija tipa slučaj-kontrola na uzorku od 126 odraslih bolesnika lečenih zbog težih oblika CAP na Klinici za plućne bolesti Kliničkog centra Srbije u Beogradu, u periodu 01.01.2007–31.12.2011. godine. „Slučajevе“ su činila 63 uzastopno odabrana bolesnika sa uočenim neuspehom u lečenju u toku prva tri dana nakon prijema u bolnicu, dok se kontrolna grupa

sastojala od identičnog broja nasumično izabranih bolesnika kod kojih takav ishod nije zabeležen. Povezanost između potencijalnih faktora rizika, odnosno protektivnih faktora i ETF procenjena je logističkom regresionom analizom. **Rezultati.** Udružena gastrointestinalna oboljenja [korigovani *odds ration* (OR) 18,83, 95% interval poverenja (CI) 1,15–309,04], viši CURB-65 (C – konfuzija; U – urea 7 mmol/L; R – frekvencija disanja  $\geq 30$  udisaja/min; B – sistolni krvni pritisak  $< 90$  mmHg ili dijastolni krvni pritisak  $\leq 60$  mmHg; 65 – životno doba  $\geq 65$  godine) skor na prijemu (korigovani OR 2,57, 95% CI 1,05–6,25), inicijalna primena nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) u bolnici (korigovani OR 38,19, 95% CI 3,61–404,51) i prethodno ambulantno lečenje inhalacionim kortikosteroidima (korigovani OR 22,41, 95% CI 1,03–489,06), predstavljali su značajne faktore rizika za pojavu ETF. S druge strane, starije životno doba i upotreba antibiotika

**Correspondence to:** Srdjan M. Stefanović, University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Svetozara Markovica 69, 34 000, Kragujevac, Serbia. Phone/Fax. +381 34 306 800 ext 225. E-mail: [sstefanovic@medf.kg.ac.rs](mailto:sstefanovic@medf.kg.ac.rs)



zbog iste infekcije pre prijema u bolnicu bili su povezani sa znatno nižim rizikom od razvoja ETF, smanjujući pritom šansu za 98%, odnosno za blizu 90%. **Zaključak.** Izbegavanje rutinske primene NSAID u bolničkim uslovima i upotreba odgovarajućih antibiotika pre hospitalizacije mogu biti korisni za bolesnike obolele od CAP kod kojih je indikovano bolničko lečenje u smislu smanjenja rizika za nastanak ETF. CURB-65

skor na prijemu u bolnicu može biti bolji prediktor ETF od indeksa težine pneumonije. Dodatne prospektivne studije su potrebne kako bi se potvrdili ovi nalazi.

**Ključne reči:**  
**pneumonija; hospitalizacija; lečenje, ishod; faktori rizika; komorbiditet.**

## Introduction

In spite of recent progress in prevention, diagnosis and therapy of community-acquired pneumonia (CAP) remain serious public health problem worldwide. It is due to the relatively high incidence of CAP and its significant association with morbidity, mortality, reduced quality of life as well as increased healthcare costs, mainly in hospitalized older patients suffering from substantial comorbidities<sup>1-8</sup>. However, serious CAP requiring hospitalization and/or admission to the intensive care unit (ICU) also increases the risk of the aforementioned worse health outcomes even in younger adults without underlying chronic disorders<sup>2,4,5,7,8</sup>.

While the majority of hospitalized patients with CAP achieve an adequate clinical response to initial empiric antibiotic and supportive therapy, some of them experience an early treatment failure (ETF) within 72 hours after initiation of the treatment, developing progression of underlying infection<sup>9-15</sup>. ETF inevitably leads to the more extensive use of microbiological and diagnostic tests, change in antimicrobial treatment and use of invasive therapeutic procedures, followed by prolonged hospitalization and much higher treatment costs<sup>9,11,13,14</sup>. Moreover, there is a piece of evidence supporting a strong association between ETF and increased mortality<sup>9,10,12-16</sup>. As a consequence of considerable diversity in criteria used to define early CAP non-responders in hospitalized patients, there is a marked heterogeneity in reported prevalence of ETF with an average rate of 10–15%<sup>9-13,15,16</sup>. These criteria were mainly based on the deterioration of nonspecific clinical and radiological parameters previously used to diagnose CAP or the necessity to change antibiotic(s)<sup>9-16</sup>. However, previous studies showed that risk of death was significantly higher, up to five times, in patients experiencing ETF in comparison to satisfactory responders, regardless of criteria that were used to distinguish these two populations of inpatients with CAP<sup>9,10,12,13,15-17</sup>.

Pursuant to the foregoing, adequate response to initial therapy is being regarded as essential for successful treatment of severe CAP. Therefore, a number of prior observational studies were particularly focused on determination of factors contributing to ETF<sup>9-18</sup>. According to their results, the occurrence of ETF can be influenced by factors related to characteristics of the pathogen, host and applied antimicrobial therapy, including also their mutual interactions. Many of these factors are well recognized, such as high-risk CAP according to Pneumonia Severity Index (PSI) scoring system (i.e., risk class IV or V)<sup>12,15,16</sup>, multilobar lung involvement, pleural effusion, presence of pulmonary cavitations on radiological examination, CAP caused by *Legionella* or by Gram-negative bacteria, aspiration pneumonia, leucopenia,

hyponatremia, high blood level of C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT) and interleukin-6 (IL-6) in the first 24 hours upon admission to hospital, then coexisting malnourishment, malignant disease, neurological disorders and renal failure as well as initial use of inappropriate antibiotics (which is not aligned to susceptibility testing of causative pathogens)<sup>12-18</sup>. On the other hand, older age ( $\geq 65$  years)<sup>16</sup>, previous vaccination against influenza<sup>12</sup> and initial empiric use of moxifloxacin or combination of beta-lactam and macrolide antibiotics<sup>11</sup>, may significantly reduce the risk of ETF. However, the literature data confirming consistency of clinical relevance of all aforementioned factors as well as the studies determining the relevance of the other potential risk and protective factors for ETF in hospitalized adults with CAP are lacking. Moreover, only a handful of previous studies<sup>12,15,18</sup> additionally addressed the factors contributing to late (after 72 hours) and/or any (early or late) treatment failure. These studies revealed not only the different factors associated with the observed outcomes (e.g., liver failure as a significant risk factor for late and any type of failure, and chronic obstructive pulmonary disease and initial use of levofloxacin as the important protective factors for any type of failure<sup>12</sup>), but also the differences in the strength of association for factors found to have a significant influence on the occurrence of ETF.

Thus, the purpose of this study was to analyze relative importance and potential synergistic effects of factors affecting the phenomenon of ETF in hospitalized adult patients with CAP that are still insufficiently explored.

## Methods

### Study settings

This study was conducted among adult patients who were admitted to the Clinic for Pulmonary Diseases (CPD), Belgrade, Serbia, due to serious CAP during the 5-year period (from January the 1st, 2007 to December the 31st, 2011). CPD, as a reference institution for lung disease operating within Clinical Center of Serbia (CCS), provides tertiary care to all adult inhabitants of city of Belgrade, and also to entire adult population of the Republic of Serbia as needed (patients referred to no CPD due to serious pulmonary disorders that can't be adequately treated in local hospitals). The diagnosis of CAP requiring hospitalization was based on typical clinical, laboratory and radiological signs according to internationally established standards<sup>19</sup>, and left at the discretion of the attending physicians. All relevant data referring to demographic and clinical characteristics of patients, results of performed diagnostic exams as well as information on applied treatments and observed outcomes were gathered from

the patients' files. The study protocol had been approved by Ethics Committee of the CCS before the investigation begun.

#### *Study design*

A case-control design was chosen for this retrospective observational study. Based on outcome of interest, i.e. ETF in hospitalized patients with CAP, all participants were separated into two groups, as following: the cases were all patients from the study population in whom ETF was observed within the three days upon the admission to hospital, whereas the control group comprised of the equal number of patients treated in the same facility, but without such an outcome. Cases and controls were individually matched by age ( $\pm 1$  year), gender and time of hospitalization ( $\pm$  one month), and then compared regarding the differences in the prevalence of exposure to putative risk factors. In addition, two groups were also compared in terms of differences in the death rate and the length of hospital stay. For each case, one of the matched controls was randomly chosen to participate in the study.

Pursuant to the recent study by Akram et al.<sup>20</sup>, the identification of patients with ETF included the clinical instability according to standardized and validated Halm's criteria<sup>21</sup> in conjunction with any increase of CRP levels or decrease by less than 50% on third or fourth hospital day in relation to the values measured on admission to hospital, given that combined set of diagnostic parameters was found to be of greatest accuracy in predicting certain worse health outcomes [mortality, use of mechanical ventilation (MV) or vasopressor therapy, complicated pneumonia as well as their combination] in adult inpatients with CAP. In the present study, clinical instability was ascertained if any of the Halm's criteria had been "de novo" persistently abnormal for up to 72 hours upon the admission, i.e., temperature level above 37.8°C, pulse rate of over 100 beats *per* minute, systolic blood pressure of less than 90 mmHg, respiratory rate above 24 breaths *per* minute, oxygen saturation level of less than or equal to 90% or arterial partial pressure of oxygen below 8 kPa, altered mental function or inappetence<sup>21</sup>.

#### *Study population*

A total of 126 consecutive adult patients (18 years of age and older) who required the hospital treatment of CAP during the observational period and underwent empiric antibiotic therapy within the 24 hours of admission lasting for at least two days, were enrolled in this study. As mentioned above, the allocation ratio of participants considering their outcome status was 1:1 (i.e. 63 patients were cases and 63 patients were randomly selected for the control group). All patients were referred to the CPD by their respective general practitioners and other medical doctors working at the primary health care facilities in the city of Belgrade and treated according to local CAP protocol of the CPD.

In order to distinguish the patients with high risk of nosocomial or health care-associated pneumonia due to the significant differences in their etiology, therapeutic approach and the prevalence of poor health outcomes compared to CAP<sup>22</sup>, those who met any of the following criteria were not considered eligible for

the study: transfer of patients from other hospitals or other wards who developed pneumonia after more than two days of admission, previous hospitalization for two or more days within the 90 days of pneumonia onset, use of intravenous antibiotics, chemotherapy or invasive procedures in the preceding 30 days, referral from nursing homes, actual hemodialysis treatment in health facilities, and underlying immunodeficiency due to any reason (e.g. malignant disease undergoing chemo- and/or radiotherapy, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), terminal stage of chronic progressive illness, use of long-term systemic corticosteroid therapy or other immunosuppressant drugs, etc.). Exclusion criteria also included patients who died due to any reason within the first two days of admission (that could be related to extremely severe, progressive infection with high risk of mortality despite the use of antibiotics), those with documented swine flu (influenza A H1N1 virus infection), those with tuberculosis, then pregnant and breastfeeding women as well as patients with lack of relevant information in their medical files.

#### *The sample size calculation*

A calculation of the adequate sample size was made by G\*Power software<sup>23</sup>, and based on the following input parameters: predicted differences between compared groups in the level of exposure to the most important risk factors for ETF in hospitalized CAP patients of 25% (which was assumed as a clinically relevant effect according to previous studies<sup>11, 12, 16-18</sup>), with its prevalence in the control group of 20%; statistical power of 90%; equal number of cases and controls; and a significance level (alpha) of 5% when using one-tailed z-test to compare two independent proportions of patients. Under these assumptions, a total of 118 participants (i.e., 59 *per* compared groups) were needed to provide for minimum sample size for this study.

#### *Potential risk factors and other variables measured in the study*

In the present study the following factors were investigated in terms of their association with ETF in adult hospitalized patients with CAP for each participant: body mass index of patients ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ); active smoking; alcohol consumption; associated chronic obstructive pulmonary disease (COPD); regular use of inhaled corticosteroids (ICS) for at least six months prior to the date of hospital admission; all patients were receiving ICS due to COPD; cardiovascular (CVS) comorbidity (e.g. arterial hypertension, angina pectoris, arrhythmias, chronic heart failure, cerebrovascular disorders and peripheral artery disease or combination of these disorders); coexisting diabetes mellitus (DM) type 1 or type 2; coexisting chronic renal failure (CRF) with exception of the patients on current dialysis treatment (as mentioned previously); it was defined as persistent decrease in creatinine clearance below 60 milliliters *per* minute *per* 1.73 square meters of body surface at least for three months<sup>24</sup> before the onset of the CAP; associated gastrointestinal disorders (GID) responsive to acid-suppressing medications, i.e., histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists (H<sub>2</sub> blockers) and/or proton pump inhibitors (PPIs), such as chronic gastritis, peptic ulcer disease, gastroe-



sophageal reflux disease, etc.; all study subjects were treated with PPIs or H2 blockers before the hospitalization; use of PPIs in the preceding one month; use of H2 blockers in the preceding one month; pneumonia severity index (PSI) score calculated on admission to hospital based on retrospective data extracted from patients' files; it was set as an ordinal variable, distinguishing the patients into five classes (I–V) according to predicted risk of death<sup>25</sup>; CURB-65 (C – confusion, U – urea > 7 mmol/L, R – respiratory rate  $\geq$  30 breaths/min, B – systolic blood pressure < 90 or diastolic blood pressure  $\leq$  60 mmHg and 65 – age  $\geq$  65 years) score<sup>26</sup>, which was also computed on admission to hospital based on retrospective data; presence of the multilobar involvement of lung parenchyma on initial radiographic exam; evidence of the pleural effusion based on initial radiographic exam; level of CRP on admission; leucopenia on admission, defined as the total white blood count below  $4 \times 10^9/L$ ; hyponatremia on admission, defined as the sodium concentration below 130 mmol/L; initial admission to intensive care unit (ICU); initial use of mechanical ventilation; time interval in days from the onset of CAP symptoms to hospital admission; pre-hospital antibiotics therapy for the same infection; beta-lactams and macrolides were the only drugs from this group that were used before the admission to hospital; pre-hospital use of beta-lactam antibiotic (benzylpenicillin or amoxicillin  $\pm$  clavulanic acid or oral cephalosporin); pre-hospital use of macrolides (azithromycin or clarithromycin); initial use of beta-lactams (amoxicillin + clavulanic acid or ceftriaxone or ertapenem); initial use of macrolides (azithromycin or clarithromycin); initial use fluoroquinolones (ciprofloxacin); ciprofloxacin was the only antibiotic from this group available as intravenous formulation and approved for the empiric treatment during the entire observational period; initial antimicrobial treatment with the combination of ceftriaxone and azithromycin or ceftriaxone and ciprofloxacin; these were the only combinations of antibiotics that had been used in our study patients; initial use of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs); only parenteral diclofenac 75 mg or ketorolac 30 mg were used in all patients treated with NSAIDs; initial use of paracetamol; initial use of H<sub>2</sub> blockers; intravenous ranitidine 50 mg was the only drug used in all patients treated with acid-suppressive medications; initial use of systemic corticosteroids; CAP of suspected pneumococcal origin based on detection of *Streptococcus pneumoniae* in the routine sputum culture; another tests that would increase the probability of confirming the diagnosis of pneumococcal CAP, such as isolation of pathogen from lung aspirate or pleural fluid or blood culture or urinary antigen assay, etc. were not performed in any of the patients with positive sputum culture; in addition, none of the patients was identified with penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* based on the usual antibiogram results, but E-test methods measuring minimal inhibitory concentrations as a gold standard for detection of resistant strains were not carried out; atypical CAP caused by *Mycoplasma pneumoniae* based on positive results of specific IgM and IgG antibodies testing; the other atypical pathogens, such as *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, etc. were not detected in any of our study patients.

The age and gender of patients, as well as the date of admission to hospital, were recorded as the strong potential confounding

variables used for matching cases and controls, as mentioned above. At that, the age was dichotomized in order to distinguish elderly patients (65 years and older) from younger participants. Finally, the mortality and the length of hospitalization were also observed as secondary outcomes in both compared groups.

#### Data analysis

All the collected data were summarized with descriptive statistics, as following: means and standard deviations were used for continuous data if they had followed normal distribution based on Kolmogorov-Smirnov test for normality ( $p > 0.05$ ), while medians and interquartile ranges (IQR 25–75) were calculated when presenting non-normally distributed continuous data as well as ordinal variables; on the other hand, categorical variables were expressed as frequencies and percentages. Depending on the normality of actual data distribution the significance of differences in continuous variables between cases and controls was estimated using Independent Student t-test or alternate, non-parametric Mann-Whitney U test which was also used to compare ordinal data, while categorical data were analyzed using  $\chi^2$  tests for frequencies with Yates continuity correction only in 2\*2 contingency tables. In order to determine factors influencing the observed dichotomous outcome (ETF) significantly as well as their possible additive effects, crude and adjusted odds ratios (OR) with corresponding 95% confidence intervals (95% CI) were calculated using univariate and a stepwise backwards conditional multivariate logistic regression analysis (with respect to matched pairs study design, as mentioned above). The alpha level of 5% was set in all analyses, while stepwise regression model removed all variables with an additional probability ( $p$  value) of 0.1 and above. The association between observed risk/protective factors and ETF was considered significant if 95% CI of adjusted OR did not include the value of 1. All statistical tests were performed using commercial software SPSS version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

#### Results

Baseline characteristics of cases and controls and differences among them in the level of exposure to putative risk factors are presented in Tables 1, 2 and 3. In both groups, there were twice as many women than men and almost an equal number of elderly without significant differences regarding the both confounders observed. Two compared groups were also very similar in terms of majority of other demographic characteristics, clinical features and unhealthy behaviors as well as regarding the frequency of identified causative agent of CAP and initial therapy they were receiving, with exception of considerably higher prevalence of CRF (Table 2), initial admission to ICU and initial use of mechanical ventilation (MV) (Table 3) in the group of cases. Relative to controls, the cases were also found to have a significantly higher CURB-65 score on admission (Table 2). Significant differences between compared groups in the

frequency of any of modalities of empirical initial antibiotic treatment were not observed (Table 3).

The results of both univariate and well-strengthened multivariate logistic regression analysis (the last step of stepwise backward elimination method: Cox & Snell R square 0.440, Nagelkerke R square 0.578, Hosmer-Lemeshow  $\chi^2$  3.725, df = 8,  $p$  = 0.881, overall model accuracy of 80.8%) are shown in Tables 1, 2, 3 and 4.

Statistically significant but also clinically important (according to large effect size) association with the occurrence of ETF in hospitalized patients with CAP was found only for the coexistence of GID, higher CURB-65 score on admission, initial use of NSAIDs and use of ICS on a daily basis for at least six months prior to admission to hospital (see adjusted OR with 95%CI in Table 4). Albeit the crude OR for the coexistence of CRF, initial admission to ICU and initial ap-

Table 1

Demographic characteristics of the study population				
Variable	Cases (n = 63)	Controls (n = 63)	Test value and significance of null hypothesis	Crude odds ratio with confidence intervals (1.96*SE)
Gender (male/female), n (%)	42 (66.7)/21 (33.3)	44 (69.8)/30.2	$\chi^2 = 0.035$ $p = 0.852$	0.87 (0.42, 1.81)
Age (years), mean $\pm$ SD	57.8 $\pm$ 17.6	57.8 $\pm$ 18.1	T = 0.00 $p = 1.00$	1.00 (0.98, 1.02)
Elderly ( $\geq$ 65 years age), n (%)	26 (41.3)	27 (42.9)	$\chi^2 = 0.00$	0.94 (0.46, 1.90)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), mean $\pm$ SD	28.3 $\pm$ 3.1	24.5 $\pm$ 7.6	T = -1.846 $p = 0.070$	1.09 (0.97, 1.21)

$\chi^2$  – Chi-squared test; T – Independent samples *t*-test; SD – standard deviation; SE – standard error; BMI – body mass index.

Table 2

Lifestyle habits, comorbidities and therapy of the study subjects before the hospitalization				
Variable	Cases (n = 63)	Controls (n = 63)	Test value and significance of null hypothesis	Crude odds ratios with confidence intervals (1.96*SE)
Active smokers, n (%)	40 (63.5)	31 (49.2)	$\chi^2 = 2.614$ $p = 0.106$	1.80 (0.88, 3.66)
Alcohol consumers, n (%)	4 (6.3)	6 (9.5)	$\chi^2 = 0.434$ $p = 0.510$	0.64 (0.17, 2.40)
Coexisting COPD, n (%)	10 (15.9)	8 (12.7)	$\chi^2 = 0.065$ $p = 0.799$	1.30 (0.48, 3.54)
Prior regular use of ICS, n (%)	8 (12.7)	6 (9.5)	$\chi^2 = 0.321$ $p = 0.571$	1.38 (0.45, 4.24)
Coexisting CVS diseases, n (%)	39 (61.9)	34 (54.0)	$\chi^2 = 0.521$ $p = 0.470$	1.39 (0.68, 2.82)
Coexisting DM, n (%)	11 (17.5)	10 (15.9)	$\chi^2 = 0.057$ $p = 0.811$	1.12 (0.44, 2.86)
Coexisting CRF, n (%)	8 (12.7)	1 (1.6)	$\chi^2 = 4.308$ $p = 0.038^*$	9.02 (1.09, 74.41)*
Coexisting GID, n (%)	7 (11.1)	4 (6.3)	$\chi^2 = 0.151$ $p = 0.697$	1.84 (0.51, 6.64)
Prior use of PPIs, n (%)	6 (9.5)	2 (3.2)	$\chi^2 = 0.640$ $p = 0.424$	3.21 (0.62, 15.56)
Prior use of H <sub>2</sub> blockers, n (%)	5 (7.9)	3 (4.8)	$\chi^2 = 0.896$ $p = 0.344$	1.72 (0.39, 7.55)
Duration of symptoms onset to hospital admission (days), mean $\pm$ SD	6.2 $\pm$ 3.8	6.8 $\pm$ 4.5	T = 0.855 $p = 0.394$	0.99 (0.95, 1.04)
Pre-hospital use of antibiotics, n (%)	32 (50.8)	39 (61.9)	$\chi^2 = 1.581$ $p = 0.209$	0.64 (0.31, 1.29)
Pre-hospital use of beta-lactams, n (%)	20 (31.7)	24 (38.1)	$\chi^2 = 0.559$ $p = 0.455$	0.76 (0.36, 1.58)
Pre-hospital use of macrolides, n (%)	9 (14.3)	8 (12.7)	$\chi^2 = 0.068$ $p = 0.794$	1.15 (0.41, 3.19)

$\chi^2$  – Chi-squared test; T – Independent samples *t*-test; \* – significant association; SD – standard deviation; COPD – chronic obstructive pulmonary disease; ICS – inhaled corticosteroids; CVS – cardiovascular comorbidity; DM – diabetes mellitus; CRF – chronic renal failure; GID – gastrointestinal disorders; PPIs – proton pump inhibitors; H<sub>2</sub> blockers – histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists.



**Table 3**  
**Etiology of CAP, clinical and laboratory parameters on admission and initial in-hospital therapy of the study subjects**

Variable	Cases (n = 63)	Controls (n = 63)	Test value and significance of null hypothesis	Crude odds ratios with confidence intervals (1.96*SE)
Suspected pneumococcal CAP, n (%)	17 (27.0)	18 (28.6)	$\chi^2 = 0.040$ $p = 0.842$	0.92 (0.42, 2.02)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> CAP, n (%)	5 (7.9)	6 (9.5)	$\chi^2 = 0.00$ $p = 1.00$	0.82 (0.24, 2.84)
PSI risk class (I–V), median (IQR)	3 (2.5–4)	3 (2–4)	U = 1759.500 Z = -1.143 $p = 0.253$	1.24 (0.89, 1.74)
CURB-65 score (0–4) <sup>§</sup> , median (IQR)	2 (1–2)	1 (0–2)	U = 1510.500 Z = -2.408 $p = 0.016^*$	1.53 (1.08, 2.15)*
Multilobar pneumonia, n (%)	21 (35.0)	29 (46.8)	$\chi^2 = 1.748$ $p = 0.186$	0.61 (0.30, 1.27)
Pleural effusion, n (%)	10 (16.9)	4 (6.7)	$\chi^2 = 3.030$ $p = 0.082$	2.86 (0.84, 9.69)
CRP (mg/L) mean $\pm$ SD	128.1 $\pm$ 127.8	155.0 $\pm$ 118.3	T = 0.359 $p = 0.722$	0.99 (0.99, 1.01)
Leucopenia, n (%)	3 (4.8)	4 (6.3)	$\chi^2 = 0.151$ $p = 0.697$	0.74 (0.16, 3.44)
Hyponatremia, n (%)	2 (3.2)	3 (4.8)	$\chi^2 = 0.208$ $p = 0.648$	0.66 (0.11, 4.07)
Initial ICU admission, n (%)	20 (31.7)	8 (12.7)	$\chi^2 = 5.556$ $p = 0.018^*$	3.20 (1.29, 7.96)*
Use of MV, n (%)	11 (17.5)	1 (1.6)	$\chi^2 = 7.309$ $p = 0.007^*$	12.90 (1.61, 103.32)*
Empirical use of beta-lactams, n (%)	53 (84.1)	50 (79.4)	$\chi^2 = 0.479$ $p = 0.489$	1.38 (0.55, 3.43)
Empirical use of macrolides, n (%)	9 (14.3)	15 (23.8)	$\chi^2 = 1.853$ $p = 0.173$	0.53 (0.21, 1.33)
Empirical use of ciprofloxacin, n (%)	44 (69.8)	37 (58.7)	$\chi^2 = 1.694$ $p = 0.193$	1.63 (0.78, 3.40)
Empirical use of ceftriaxone plus azithromycin, n (%)	8 (12.7)	12 (19.0)	$\chi^2 = 0.535$ $p = 0.465$	0.62 (0.23, 1.64)
Empirical use of ceftriaxone plus ciprofloxacin, n (%)	24 (38.1)	30 (47.6)	$\chi^2 = 0.810$ $p = 0.368$	0.68 (0.33, 1.38)
Use of NSAIDs, n (%)	24 (38.1)	14 (22.2)	$\chi^2 = 3.768$ $p = 0.081$	2.15 (0.99, 4.71)
Use of paracetamol, n (%)	50 (79.4)	47 (74.6)	$\chi^2 = 0.672$ $p = 0.179$	1.31 (0.57, 3.01)
Use of H <sub>2</sub> blockers, n (%)	30 (47.6)	22 (34.9)	$\chi^2 = 2.096$ $p = 0.148$	1.69 (0.83, 3.47)
Use of systemic corticosteroids, n (%)	10 (15.9)	5 (7.9)	$\chi^2 = 1.892$ $p = 0.169$	2.19 (0.70, 6.82)

$\chi^2$  – Chi-squared test; T – Independent samples t-test; <sup>§</sup>CURB-65 – CURB-65 (C – confusion, U – urea > 7 mmol/L, R – respiratory rate  $\geq$  30 breaths/min, B – systolic blood pressure < 90 or diastolic blood pressure  $\leq$  60 mmHg and 65 – age  $\geq$  65 years) score of 5 was not calculated in any of study patients; \* – statistically significant association; SD – standard deviation; SE – standard error; CAP – community-acquired pneumonia; PSI – pneumonia severity index; CRP – C-reactive protein; MV – mechanical ventilation; NSAID – nonsteroidal anti-inflammatory drugs; H<sub>2</sub> blockers – histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists; ICU – intensive care unit.

plication of MV hinted at potentially significant contribution to the observed outcome after adjustment for other variables such effects disappeared. Contrary to the above mentioned, the older age and outpatient use of antibiotics before the hospitalization were associated with a significantly lower likelihood of experiencing ETF, decreasing the chance for 98% and almost 90%, respectively (Table 4).

By exploring the mutual interactions between observed predictors of ETF in a clinically meaningful manner, with the inclusion of the factors for which the possible additive effects had been anticipated, clearly evident

synergism was demonstrated for a higher CURB-65 score on admission and initial use of NSAIDs (adjusted OR 5.169; 95% CI 1.466, 18.222). The joint effects on observed outcome between the initial use of NSAIDs and GID comorbidity, then between initial use of NSAIDs and prior regular use of ICS as well as between older age and use of antibiotics before admission were found not to be statistically significant.

Ultimately, 11 of total 63 patients (11.7%) in the group of subjects who experienced ETF died in contrast with only one death (1.6%) in the control group, yielding a high level

**Table 3**  
**Etiology of CAP, clinical and laboratory parameters on admission and initial in-hospital therapy of the study subjects**

Variable	Cases (n = 63)	Controls (n = 63)	Test value and significance of null hypothesis	Crude odds ratios with confidence intervals (1.96*SE)
Suspected pneumococcal CAP, n (%)	17 (27.0)	18 (28.6)	$\chi^2 = 0.040$ $p = 0.842$	0.92 (0.42, 2.02)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> CAP, n (%)	5 (7.9)	6 (9.5)	$\chi^2 = 0.00$ $p = 1.00$	0.82 (0.24, 2.84)
PSI risk class (I–V), median (IQR)	3 (2.5–4)	3 (2–4)	U = 1759.500 Z = -1.143 $p = 0.253$	1.24 (0.89, 1.74)
CURB-65 score (0–4) <sup>§</sup> , median (IQR)	2 (1–2)	1 (0–2)	U = 1510.500 Z = -2.408 $p = 0.016^*$	1.53 (1.08, 2.15)*
Multilobar pneumonia, n (%)	21 (35.0)	29 (46.8)	$\chi^2 = 1.748$ $p = 0.186$	0.61 (0.30, 1.27)
Pleural effusion, n (%)	10 (16.9)	4 (6.7)	$\chi^2 = 3.030$ $p = 0.082$	2.86 (0.84, 9.69)
CRP (mg/L) mean $\pm$ SD	128.1 $\pm$ 127.8	155.0 $\pm$ 118.3	T = 0.359 $p = 0.722$	0.99 (0.99, 1.01)
Leucopenia, n (%)	3 (4.8)	4 (6.3)	$\chi^2 = 0.151$ $p = 0.697$	0.74 (0.16, 3.44)
Hyponatremia, n (%)	2 (3.2)	3 (4.8)	$\chi^2 = 0.208$ $p = 0.648$	0.66 (0.11, 4.07)
Initial ICU admission, n (%)	20 (31.7)	8 (12.7)	$\chi^2 = 5.556$ $p = 0.018^*$	3.20 (1.29, 7.96)*
Use of MV, n (%)	11 (17.5)	1 (1.6)	$\chi^2 = 7.309$ $p = 0.007^*$	12.90 (1.61, 103.32)*
Empirical use of beta-lactams, n (%)	53 (84.1)	50 (79.4)	$\chi^2 = 0.479$ $p = 0.489$	1.38 (0.55, 3.43)
Empirical use of macrolides, n (%)	9 (14.3)	15 (23.8)	$\chi^2 = 1.853$ $p = 0.173$	0.53 (0.21, 1.33)
Empirical use of ciprofloxacin, n (%)	44 (69.8)	37 (58.7)	$\chi^2 = 1.694$ $p = 0.193$	1.63 (0.78, 3.40)
Empirical use of ceftriaxone plus azithromycin, n (%)	8 (12.7)	12 (19.0)	$\chi^2 = 0.535$ $p = 0.465$	0.62 (0.23, 1.64)
Empirical use of ceftriaxone plus ciprofloxacin, n (%)	24 (38.1)	30 (47.6)	$\chi^2 = 0.810$ $p = 0.368$	0.68 (0.33, 1.38)
Use of NSAIDs, n (%)	24 (38.1)	14 (22.2)	$\chi^2 = 3.768$ $p = 0.081$	2.15 (0.99, 4.71)
Use of paracetamol, n (%)	50 (79.4)	47 (74.6)	$\chi^2 = 0.672$ $p = 0.179$	1.31 (0.57, 3.01)
Use of H <sub>2</sub> blockers, n (%)	30 (47.6)	22 (34.9)	$\chi^2 = 2.096$ $p = 0.148$	1.69 (0.83, 3.47)
Use of systemic corticosteroids, n (%)	10 (15.9)	5 (7.9)	$\chi^2 = 1.892$ $p = 0.169$	2.19 (0.70, 6.82)

$\chi^2$  – Chi-squared test; T – Independent samples *t*-test; <sup>§</sup>CURB-65 – CURB-65 (C – confusion, U – urea > 7 mmol/L, R – respiratory rate  $\geq$  30 breaths/min, B – systolic blood pressure < 90 or diastolic blood pressure  $\leq$  60 mmHg and 65 – age  $\geq$  65 years) score of 5 was not calculated in any of study patients; \* – statistically significant association; SD – standard deviation; SE – standard error; CAP – community-acquired pneumonia; PSI – pneumonia severity index; CRP – C-reactive protein; MV – mechanical ventilation; NSAID – nonsteroidal anti-inflammatory drugs; H<sub>2</sub> blockers – histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists; ICU – intensive care unit.

plication of MV hinted at potentially significant contribution to the observed outcome after adjustment for other variables such effects disappeared. Contrary to the above mentioned, the older age and outpatient use of antibiotics before the hospitalization were associated with a significantly lower likelihood of experiencing ETF, decreasing the chance for 98% and almost 90%, respectively (Table 4).

By exploring the mutual interactions between observed predictors of ETF in a clinically meaningful manner, with the inclusion of the factors for which the possible additive effects had been anticipated, clearly evident

synergism was demonstrated for a higher CURB-65 score on admission and initial use of NSAIDs (adjusted OR 5.169; 95% CI 1.466, 18.222). The joint effects on observed outcome between the initial use of NSAIDs and GID comorbidity, then between initial use of NSAIDs and prior regular use of ICS as well as between older age and use of antibiotics before admission were found not to be statistically significant.

Ultimately, 11 of total 63 patients (11.7%) in the group of subjects who experienced ETF died in contrast with only one death (1.6%) in the control group, yielding a high level



disease in outpatient settings<sup>29</sup>. However, the recent observational studies<sup>30,31</sup> suggest that early use of these drugs in patients suffering from CAP may put them at risk of postponing hospital admission and effective antimicrobial treatment due to initial alleviation of symptoms, thus leading to progression of the infection with higher incidence of local complications, particularly pleural empyema and pulmonary cavitations; on the other hand, significant association between the NSAIDs and distant organ dysfunction<sup>30</sup> or death rate<sup>31</sup> in these studies was not observed. Similarly, the multicenter case-control study by Legras et al.<sup>32</sup> did not show any connection between the use of NSAIDs and development of severe sepsis or septic shock in various community-acquired infections of bacterial origin of whom pneumonia was the most frequent, but it demonstrated an important contribution of these drugs to the delay in receiving appropriate antibiotics. Such distinct effect of NSAIDs in terms of increasing local while blunting systemic inflammatory response<sup>30</sup>, may be explained by possible imbalance in inhibition of prostaglandin and leukotriene action, the mediators who were found to be among the major factors influencing the complex immune response of lungs to acute infection<sup>33</sup>, but whose role in the pathogenesis and evolution of CAP was not fully elucidated in humans. Additionally, various experimental models indicate either augmented or reduced phagocytic and bactericidal activities of leukocytes and alveolar macrophages after applying different cyclo-oxygenase inhibitors<sup>34-36</sup>. Anyway, a causal association between use of NSAIDs and bad clinical outcomes could not be ascertained, so current treatment guidelines do not advise against their use in patients with CAP<sup>29</sup>. Yet we are concerned with the finding that initial use of NSAIDs in the hospital could largely increase the risk of developing ETF in CAP patients. Despite the lack of complete retrospective data on pre-hospital use of NSAIDs and their dosage regimens when they were applied in the hospital, taking into account the fact that clinically relevant association between use of NSAIDs and ETF was evident after adjustment for the effects of other confounders, we believe that these drugs should be used with extreme caution in hospitalized patients with CAP, especially in patients with coexisting CRF or cardiovascular diseases and those with severe infection as assessed by CURB-65 score on admission, because these conditions may also predispose patients to the serious adverse effects of NSAIDs. Therefore, in these patients, paracetamol may be antipyretic of choice due to much better safety profile while not affecting the ETF as it was shown in our study.

Strong positive association between prior regular use of ICS for COPD and ETF in patients hospitalized for CAP is a novel and particularly exciting finding of this study, given that the previous observational studies examining the impact of these medications use on other relevant clinical outcomes have yielded inconsistent results. Namely, there are reports suggesting potentially beneficial effects of ICS used in ambulatory settings for COPD on the short-term risk of death<sup>37,38</sup> and the need for use of MV<sup>38</sup> in patients who developed CAP and required hospitalization, while in contrast, some studies did not find any significant influence of these

drugs on both short- and long-term mortality<sup>39,40</sup> as well as on the occurrence of complicated CAP<sup>40</sup>. Regardless of the absence of impact on mortality, Ferrer et al.<sup>39</sup> demonstrated a favorable effect of the previous use of ICS in terms of mitigating the systemic inflammatory response, which is similar to the above-mentioned effect of NSAIDs<sup>30</sup>. But opposite to NSAIDs, there is evidence about the protective role of prior treatment with ICS on the development of pleuropulmonary complications in patients with CAP suffering from various coexisting chronic respiratory diseases<sup>41</sup>. The patients with CAP experiencing ETF in our study had less pronounced systemic inflammatory response on admission based on average baseline level of CRP (< 150 mg/L) than the subjects without such an outcome (155 mg/L); interestingly, utilization of both NSAIDs and ICS was higher in group of cases compared to controls, but without significant differences. In addition, despite well-known favorable effects of ICS in the treatment of COPD, there are also conflicting data regarding their association with increased risk of CAP in such patients<sup>42,43</sup>. The mechanisms of these controversial effects of ICS in CAP patients with co-existing COPD have not yet been fully clarified, and it may be strongly influenced by medication type, dosage regimen and duration of outpatients use, then by the severity of COPD as well as by concomitant use of systemic corticosteroids<sup>37-43</sup>. As we were unable to adjust the observed association between regular use of ICS in outpatient settings and ETF in patients hospitalized for CAP for the most of the confounders listed here due to incompleteness of retrospectively obtained data, this our finding require further confirmation in prospective studies with appropriate design and conducted on larger sample of inpatients with CAP and coexisting COPD.

Although coexistence of chronic GID observed as potential risk factor for ETF in CAP in our study (e.g. peptic ulcer disease or gastroesophageal reflux), was not identified as independent predictor of CAP previously<sup>44</sup>, there is a lot of data indicating that use of PPIs and/or H2 blockers (which are considered as a gold standard for pharmacological treatment of these disorders) may increase risk of developing CAP significantly<sup>45-47</sup>. Such effects of acid-suppressive drugs could be explained by increased bacterial growth and colonization of the upper gastrointestinal tract due to suppression of gastric acid secretion, followed by secondary aspiration and translocation of pathogens to lungs<sup>45,47</sup>. Additionally, PPIs may lead to bacterial overgrowth directly in the lungs by affecting pH of seromucinous secretion due to inhibition of proton pump in the mucous cells and ducts of respiratory tract<sup>48</sup>. Finally, there is also evidence from *in vitro* studies suggesting inhibitory effects of both PPIs and H2 blockers on function of leukocyte and natural killer cells<sup>49-51</sup>. As all our patients were treated with acid-suppressive medications before the hospitalization, we believe that aforementioned mechanisms of the effects of these medications regarding host-pathogen interaction, could be also involved to some extent in explanation of the significant association between GID and ETF in CAP as observed in this study.

Nowadays, the outpatient antibiotic use for CAP requiring subsequent hospitalization is relatively common, with a prevalence of more than 20%<sup>52</sup>. This phenomenon is particularly important since it can strongly influence clinical picture and severity of disease at initial presentation, inflammatory response of the patient, selection of diagnostic tests to identify a causative agent of infection as well as a choice of empirical antibiotic treatment<sup>52,53</sup>. However, there are scarce and contradictory data regarding the relevance of its association with the in-hospital mortality and other relevant outcomes. Simonetti et al.<sup>53</sup> did not find significant differences in 30-day mortality and ICU admission rate among the patients with and without pre-hospital antibiotic use, respectively, while bacteraemia was less prevalent, and the occurrence of lung cavitations was more frequent in patients who had received antibiotics before the hospitalization. Moreover, Johnson et al.<sup>54</sup> showed that patients who had been pre-treated with antibiotics were significantly less likely to die, especially if they received suitable antibiotics in line with the applicable guidelines. On the other hand, van de Garde EM et al.<sup>55</sup> found pre-hospital antibiotic use to be a significant risk factor for death only in patients with coexisting chronic heart failure, while the significant difference in the length of hospital stay between compared groups was not observed. Protective role of the outpatient use of antibiotics before the hospitalization on the development of ETF in patients with CAP, as shown in our study, has reaffirmed the importance of prompt and appropriate empirical antibacterial treatment when serious lower respiratory tract infection is suspected.

Older age is another significant factor associated with the reduced likelihood of experiencing ETF in hospitalized patients with CAP in our study. This finding is similar to the previous study by Rosón et al.<sup>16</sup>, but still remains unclear. Additionally, authors did not find the more prevalent initial use of broad spectrum antibiotics in a group of patients aged 65 years and over, which also was not observed in our study. As the vast majority of our elderly patients had more severe CAP on initial presentation at hospital according to PSI and CURB-65 score (i.e. 42/53 or 79% of them), we believe that these patients were probably receiving more appropriate symptomatic and supportive therapy due to a greater awareness of attending physicians regarding the increased risk of potential complications.

At last, this study also hinted at the potential contribution of ETF to mortality of hospitalized patients with CAP, but it was neither designed nor powered to examine the magnitude of such effect (due to small number of deceased patients), as were the previous studies who did find a clear association between these two phenomena<sup>9,10,12,13,15,16</sup>. In contrast to many prior investigations<sup>9,11,13,14</sup>, the difference in duration of hospital stay between patients with and without ETF, respectively, in this study was not observed.

There are certain limitations of this study that deserve to be mentioned mainly lying in its retrospective nature. Due to incompleteness of data extracted from the inpatient medical records we could not assess all relevant factors that are likely to be associated with the observed primary outcome of interest correctly, such as physicians' consultations before hospitalization for CAP, dose regimens and duration of pre-hospital drug therapy (antibiotics, NSAIDs, ISC, systemic steroids, PPIs, H2 blockers) as well as compliance with these treatments, severity of coexisting chronic disorders, extent of smoking and alcohol consumption and baseline serum levels of procalcitonin. Therefore, these variables were not analyzed at all. Furthermore, any erroneous or contradictory information taken from the patients' files could have led to an inaccurate estimation of both the risk factors and the outcomes that we have observed. Eventually, the generalizability of the results could be questionable given that this study was carried out in a single hospital and in a small country such as Serbia.

### Conclusion

With the aim of reducing the risk of early treatment failure, this study advises against the routine use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in adult patients hospitalized for community-acquired pneumonia, particularly in those with increased severity of disease as assessed by increased CURB-65 score on admission. The CURB-65 score on admission is not only easy to calculate but also better predicts the development of early treatment failure in patients with community-acquired pneumonia compared to Pneumonia Severity Index. Previous regular use of inhaled corticosteroids as well as gastrointestinal disorders responsive to acid-suppressive medications may be also associated with the increased risk of early treatment failure in this population of patients. On the other hand, prompt empirical use of appropriate antibiotics in outpatient settings could be beneficial for patients with community-acquired pneumonia requiring hospitalization as it may reduce the risk of early treatment failure. However, due to possible selection and measurement bias, these findings should be further confirmed in larger prospective studies.

### Acknowledgements

This study was partially financed by grant No 175007, given by Serbian Ministry of Education, Science and Technical Development.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest in this study.



## REFERENCES

- Torres A, Peetermans WE, Viegi G, Blasi F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: A literature review. *Thorax* 2013; 68(11): 1057–65.
- Broulette J, Yu H, Pyenson B, Iwasaki K, Sato R. The incidence rate and economic burden of community-acquired pneumonia in a working-age population. *Am Health Drug Benefits* 2013; 6(8): 494–503.
- Bao Z, Yuan X, Wang L, Sun Y, Dong X. The incidence and etiology of community-acquired pneumonia in fever outpatients. *Exp Biol Med* (Maywood) 2012; 37(11): 1256–61.
- Restrepo MI, Faverio P, Anzueto A. Long-term prognosis in community-acquired pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 2013; 26(2): 151–8.
- Yende S, Alvarez K, Loeber L, Folsom AR, Newman AB, Weissfeld LA, et al. Epidemiology and long-term clinical and biologic risk factors for pneumonia in community-dwelling older Americans: analysis of three cohorts. *Chest* 2013; 144(3): 1008–17.
- Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U. S. Adults. *N Engl J Med* 2015; 373(5): 415–27.
- Welle T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012; 67(1): 71–9.
- Rozenbaum MH, Mangen MJ, Huijts SM, Werf TS, Postma MJ. Incidence, direct costs and duration of hospitalization of patients hospitalized with community acquired pneumonia: A nationwide retrospective claims database analysis. *Vaccine* 2015; 33(28): 3193–9.
- Menéndez R, Torres A. Treatment failure in community-acquired pneumonia. *Chest* 2007; 132(4): 1348–55.
- Gonçalves-Pereira J, Conceição C, Póvoa P. Community-acquired pneumonia: Identification and evaluation of nonresponders. *Ther Adv Infect Dis* 2013; 1(1): 5–17.
- Ott SR, Hauptmeier BM, Ermen C, Lippner PM, Niesch E, Platz MW, et al. Treatment failure in pneumonia: Impact of antibiotic treatment and cost analysis. *Eur Respir J* 2012; 39(3): 611–8.
- Menéndez R, Torres A, Zalacain R, Aspa J, Martín VJ, Borderías L, et al. Risk factors of treatment failure in community acquired pneumonia: Implications for disease outcome. *Thorax* 2004; 59(11): 960–5.
- Oster G, Berger A, Edelsberg J, Weber DJ. Initial treatment failure in non-ICU community-acquired pneumonia: Risk factors and association with length of stay, total hospital charges, and mortality. *J Med Econ* 2013; 16(6): 809–19.
- Blasi F, Ostermann H, Racketa J, Medina J, McBride K, Garau J. REACH study group. Early versus later response to treatment in patients with community-acquired pneumonia: Analysis of the REACH study. *Respir Res* 2014; 15(1): 6.
- Menéndez R, Cavalcanti M, Reyes S, Mensa J, Martínez R, Marcos MA, et al. Markers of treatment failure in hospitalised community acquired pneumonia. *Thorax* 2008; 63(5): 447–52.
- Rosón B, Carratalá J, Fernández-Sabé N, Tubau F, Manresa F, Gudiol F. Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 2004; 164(5): 502–8.
- Genne D, Sommer R, Kaiser L, Saaidia A, Pasche A, Unger P, et al. Analysis of factors that contribute to treatment failure in patients with community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(3): 159–66.
- Martin-Laeches I, Valles X, Menéndez R, Sibila O, Montull B, Cilloniz C, et al. Predicting treatment failure in patients with community acquired pneumonia: A case-control study. *Respir Res* 2014; 15(1): 75.
- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44(Suppl 2): S27–72.
- Akram AR, Chalmers JD, Taylor JK, Rutherford J, Singanayagam A, Hill AT. An evaluation of clinical stability criteria to predict hospital course in community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(12): 1174–80.
- Hahn EA, Fine MJ, Marrie TJ, Coley CM, Kapoor WN, Obrusky DS, et al. Time to clinical stability in patients hospitalized with community-acquired pneumonia: Implications for practice guidelines. *JAMA* 1998; 279(18): 1452–7.
- American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(4): 388–416.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007; 39(2): 175–91.
- Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012; 379(9811): 165–80.
- Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336(4): 243–50.
- Lim WS, van der Eerden MM, Laing R, Boersma WG, Kavalus N, Town GI, et al. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: An international derivation and validation study. *Thorax* 2003; 58(5): 377–82.
- Blasi F, Garau J, Medina J, Avila M, McBride K, Ostermann H. REACH study group. Current management of patients hospitalized with community-acquired pneumonia across Europe: Outcomes from REACH. *Respir Res* 2013; 14(1): 44.
- Wesemann T, Nüllmann H, Pflug MA, Heppner HJ, Pientka L, Thiem U. Pneumonia severity, comorbidity and 1-year mortality in predominantly older adults with community-acquired pneumonia: A cohort study. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 2.
- Dirou S, Voiriot G. Anti-inflammatory drugs and community-acquired pneumonia. *Rev Mal Respir* 2015; 32(8): 841–4. (French)
- Voirit G, Dury S, Parrot A, Mayaud C, Fartoukh M. Nonsteroidal antiinflammatory drugs may affect the presentation and course of community-acquired pneumonia. *Chest* 2011; 139(2): 387–94.
- Messika J, Sztrymski B, Bertrand F, Billard-Pomares T, Barnaud G, Branger C, et al. Risks of nonsteroidal antiinflammatory drugs in undiagnosed intensive care unit pneumococcal pneumonia: Younger and more severely affected patients. *J Crit Care* 2014; 29(5): 733–8.
- Legras A, Giraudeau B, Jonville-Bera AP, Camus C, François B, Runge I, et al. A multicentre case-control study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as a risk factor for severe sepsis and septic shock. *Crit Care* 2009; 13(2): R43.
- Steel HC, Cockran R, Anderson R, Feldman C. Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 490346.
- Sereqani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(5): 562–70.
- Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-

- prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 2004; 173(1): 559–65.
36. Stables MJ, Newson J, Ayoub SS, Brown J, Hyams CJ, Gilroy DW. Priming innate immune responses to infection by cyclooxygenase inhibition kills antibiotic-susceptible and -resistant bacteria. *Blood* 2010; 116(16): 2950–9.
  37. Chen D, Restrepo MI, Fine MJ, Pugh MJ, Anzueto A, Metersky ML, et al. Observational study of inhaled corticosteroids on outcomes for COPD patients with pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(3): 312–6.
  38. de Molina MR, Mortensen EM, Restrepo MI, Copeland LA, Pugh MJ, Anzueto A. Inhaled corticosteroid use is associated with lower mortality for subjects with COPD and hospitalised with pneumonia. *Eur Respir J* 2010; 36(4): 751–7.
  39. Ferrer M, Torres A, Martínez R, Ramírez P, Polverino E, Montull B, et al. Inhaled corticosteroids and systemic inflammatory response in community-acquired pneumonia: A prospective clinical study. *Respirology* 2014; 19(6): 929–35.
  40. Singanayagam A, Chalmers JD, Akram AR, Hill AT. Impact of inhaled corticosteroid use on outcome in COPD patients admitted with pneumonia. *Eur Respir J* 2011; 38(1): 36–41.
  41. Sellares J, López-Giraldo A, Lucena C, Cilloniz C, Amaro R, Polverino E, et al. Influence of previous use of inhaled corticoids on the development of pleural effusion in community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(11): 1241–8.
  42. Crim C, Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, et al. Pneumonia risk in COPD patients receiving inhaled corticosteroids alone or in combination: TORCH study results. *Eur Respir J* 2009; 34(3): 641–7.
  43. Sin DD, Tashkin D, Zhang X, Radner F, Sjöbring U, Thorén A, et al. Budesonide and the risk of pneumonia: A meta-analysis of individual patient data. *Lancet* 2009; 374(9691): 712–9.
  44. Almirall J, Bolibar I, Serra-Prat M, Róg J, Hospital I, Carandell E. Community-Acquired Pneumonia in Catalan Countries (PACAP) Study Group. New evidence of risk factors for community-acquired pneumonia: A population-based study. *Eur Respir J* 2008; 31(6): 1274–84.
  45. Rodríguez LA, Ruizgómez A, Wallander MA, Johansson S. Acid-suppressive drugs and community-acquired pneumonia. *Epidemiology* 2009; 20(6): 800–6.
  46. Myles PR, Hubbard RB, McKeever TM, Pagon Z, Smith CJ, Gibson JE. Risk of community-acquired pneumonia and the use of statins, ace inhibitors and gastric acid suppressants: A population-based case-control study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2009; 18(4): 269–75.
  47. Eom CS, Jeon CY, Lim JW, Cho EG, Park SM, Lee KS. Use of acid-suppressive drugs and risk of pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *CMAJ* 2011; 183(3): 310–9.
  48. Altman KW, Waltonon JD, Tarjan G, Radosevich JA, Haines GK. Human lung mucous glands manifest evidence of the H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase proton pump. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007; 116(3): 229–34.
  49. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, et al. The effects of cimetidine, ranitidine, and famotidine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1999; 89(1): 218–24.
  50. Zedwitz-Liebenstein K, Wensch C, Patruta S, Parschalk B, Daxböck F, Graninger W. Omeprazole treatment diminishes intra- and extracellular neutrophil reactive oxygen production and bactericidal activity. *Crit Care Med* 2002; 30(5): 1118–22.
  51. Capodicasa E, de Bellis F, Pelli MA. Effect of lansoprazole on human leukocyte function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 21(2): 357–77.
  52. van de Garde EM, Endeman H, van Hemert RN, Voorn GP, Deneer VH, Leufkens HG, et al. Prior outpatient antibiotic use as predictor for microbial aetiology of community-acquired pneumonia: Hospital-based study. *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64(4): 405–10.
  53. Simonetti AF, Viasus D, Garcia-Vidal C, Grillo S, Molero L, Dorca J, et al. Impact of pre-hospital antibiotic use on community-acquired pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(9): O531–7.
  54. Johnson D, Carriere KC, Jin Y, Marrie T. Appropriate antibiotic utilization in seniors prior to hospitalization for community-acquired pneumonia is associated with decreased in-hospital mortality. *J Clin Pharm Ther* 2004; 29(3): 231–9.
  55. van de Garde EM, Souverein PC, van den Bosch JM, Deneer VH, Goettsch WG, Leufkens HG. Prior outpatient antibacterial therapy as prognostic factor for mortality in hospitalized pneumonia patients. *Respir Med* 2006; 100(8): 1342–8.

Received on February 11, 2016.

Revised on March 09, 2016.

Accepted on March 24, 2016.

Online First April, 2016.



## EVALUATION OF ANTIBIOTIC CONSUMPTION AT RAKOVICA COMMUNITY HEALTH CENTER FROM 2011 TO 2015

Marijana Tomic Smiljanic<sup>1</sup>, Vesela Radonjic<sup>2</sup>, Dusan Djuric<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Community Health Center in Rakovica, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Belgrade; Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Faculty of Medical sciences, University of Kragujevac, Serbia.

## EVALUACIJA POTROŠNJE ANTIBIOTIKA U DOMU ZDRAVLJA RAKOVICA U PERIODU 2011-2015. GODINA

Marijana Tomic Smiljanic<sup>1</sup>, Vesela Radonjic<sup>2</sup>, Dusan Djuric<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dom zdravlja Rakovica, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Beograd; Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Srbija

<sup>3</sup>Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Srbija

Received / Primljen: 08.06.2016.

Accepted / Prihvaćen: 12.07.2016.

### ABSTRACT

Antibacterial drugs are among the major discoveries of the 20<sup>th</sup> century because they significantly reduced the rate of morbidity and mortality as well as the risk of infections related to invasive medical procedures. Indiscriminate and wrongful use of these powerful life-saving drugs has led to the development of resistance of numerous microorganisms, resulting in an increase in the number of hospital-acquired infections with a fatal outcome. Thus, it is very important to establish the volume of antibiotic consumption and surveillance of antimicrobial resistance in order to rationalize the use of this important group of medications. The usage unique ATC/DDD methodology results expressed as Defined Daily Doses (DDD)/1000 inhabitants per day (DID) has enabled the comparison of antibiotic consumption in Serbia to that in other countries for a better understanding of our results. The community health center in Rakovica provides treatment for approximately 70,820 patients. The volume of overall antibiotic consumption has been calculated as well as the use of certain antibiotics in the total consumption and comparison of the guides for good clinical practice. The most prescribed antibiotics were antibiotics for diseases of the respiratory system. The most prescribed groups of antibiotics were penicillin drugs, which are an optimal choice as per the guides for good clinical practice. Amoxicillin are the most frequently prescribed individual antibiotic. A yearly increase in prescribing penicillin was observed. A rise in consumption of all generations of quinolones was observed, particularly for levofloxacin, which is not in accordance with the recommendations.

**Keywords:** Rational use of antibiotics, DID, antibiotic consumption

### SAŽETAK

Antibakterijski lekovi su među najvećim otkrićima 20. veka, jer su znatno smanjili stopu obolevanja i smrtnosti od infektivnih bolesti i rizik od infekcije kod invazivnih medicinskih procedura. Neodgovorna i pogrešna upotreba ovih moćnih lekova koji spasavaju život dovela je do razvoja rezistencije mnogih mikroorganizama na njih, a rezultat toga je i porast bolničkih infekcija sa smrtnim ishodom. Veoma je važno utvrđivanje obima potrošnje antibiotika i nadzora nad antimikrobnom rezistencijom, radi racionalizacije upotrebe ove važne grupe lekova. Primenjena je jedinstvena ATC/DDD metodologija, rezultati su izraženi kao broj upotrebljenih definisanih dnevnih doza (DDD)/1000 stanovnika /dan (DID) omogućila je poredenje potrošnje antibiotika u Srbiji sa drugim zemljama i bolje razumevanje naših rezultata. U Domu zdravlja Rakovica leči se oko 70820 pacijenata. Izračunat je obim ukupne potrošnje antibiotika kao i učešće pojedinih antibiotika u ukupnoj potrošnji i poredenje sa vodičima dobre kliničke prakse.

Najviše su propisivani antibiotici za bolesti respiratornog sistema. Najpropisivanija grupa antibiotika su penicilini, što je u skladu sa vodičima dobre kliničke prakse. Zapažen je porast propisivanja penicilina iz godine u godinu sa dominacijom amoksicilina. Zapaža se i porast propisivanja hinalona, posebno levofloksacina, što nije u skladu sa preporukama vodiča dobre kliničke prakse.

**Ključne reči:** racionalna upotreba antibiotika, DID, potrošnja antibiotika





## INTRODUCTION

In 1985, the World Health Organization (WHO) defined the rational use of drugs as a process in which the patients obtain medications that suit their needs, in doses suitable for them, within an appropriate length of time and at the lowest cost for them and the society they live in (1).

Currently, the irrational use of medications, with all of its negative implications, represents a continuing process that takes on increasing proportions and is thus considered to be one of the biggest global public health issues (2).

Of all the drugs, antibiotics have played the greatest role in indiscriminate drug prescriptions. The discovery and use of antimicrobial drugs for the treatment of infections constitutes the biggest success of modern medicine. Approximately 80 % of all antibiotics prescribed in health care institutions are being prescribed within primary health care settings and most frequently for respiratory tract infections. A non-clinical factor, such as the pressure that is exerted on doctors by the patients, also has a large impact on antibiotic prescriptions, but the doctors themselves prescribe antibiotics quite often and unjustifiably (3). A study has been performed involving patients with symptoms of cough where antibiotics are quite frequently administered, showing that there is no difference in the degree of recovery between the patients treated with antibiotics and the ones who did not receive them (4).

The introduction of a mandatory continuing medical education (CME) requirement for health workers in the Republic of Serbia regulated by the Law on Health Care and Rules will probably have an impact on solving this problem.

Apart from other public health measures that have led to the extension of life expectancy, the use of antibiotics is certainly of great importance. However, the success in treatment of infections is compromised by their irrational use, which has led to bacterial resistance of these medications. Irrational use is defined as microbiologically inefficient antimicrobial therapy that can have adverse effects on the outcome of treatment. The irrational use of antimicrobial drugs is important not only from the clinical aspect, i.e. because of the outcome of the patient treatment, but also from the public health aspect since it represents one of the main factors for the emergence of resistance of infectious agents (5).

With an aim at preventing resistance, antimicrobial drugs should be administered rationally, which according to current concepts means that their usage should not be empirical but rather targeted and based on diagnostic evidence.

Over the last 30 years, the development of new antibiotics has considerably decreased, while the options to treat infections caused by resistant agents, which are increasingly on the rise, have become increasingly limited. Tens of thousands of people die each year from infections caused by resistant bacteria. The reasons for delayed development of antibiotics are simple: drug development is risky and expensive, while medicines used to treat infections are not

as profitable as the ones that treat chronic illnesses. Indiscriminate use of antibiotics has led to the emergence of multidrug resistant microorganisms—MRSA, VRSA, VRE, etc. The problem of the increasing resistance of microorganisms to antibiotics has become a global health issue (6).

The choice of therapy should rely either on the culture and identification of bacterial pathogens and the results of the sensitivity test (directed therapy) or on the familiar common pathogens in the given state and their common forms of resistance (empirical therapy).

The basic principles of the rational use of antibiotics are as follows:

- Based on the localization of the infection, the causative agent that is in question can be assumed.
- An empirical antibiotic choice during the initial patient contact should be made.
- Sampling for microbiological survey should be conducted prior to administering antibiotics.
- Within 48-72 hours, the effectiveness of antibiotics should be reconsidered, and in view of microbiological findings, the choice of whether to continue or change the application of antibiotics should be decided.
- Apply the antibiotic for a sufficient length of time to treat the infection in question.

One of the ways to achieve this goal is to evaluate and correct the antibiotic prescribing habits in all health care institutions, principally in the primary health care system such as community health centers (7). This study has examined the protocols on antibiotic prescribing at Rakovica Community Health Center, Belgrade.

## GOAL

The main goal of this study is to provide insight into the volume of consumption of antibiotics and the participation of certain antibiotics in their overall consumption at Rakovica Community Health Center, as well as to compare the volume to the national guidelines effective in Serbia and the ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption) recommendations.

## METHODOLOGY

The monitoring of antibiotic use refers to a five-year period (2011 -2015) involving patients over 18 years of age at the adult health care service at Rakovica Community Health Center. The community health center in Rakovica provides treatment for approximately 70,820 patients (30,016 male and 40,657 female).

In order to assess the quality of medicinal treatment (type and scope of unreasonable pharmacotherapy), multiple and varied objective methods have been established in practice, several of which have been standardized and structured by the World Health Organization and International Network for Rational Use of Drugs (INRUD) (8).





Consumption is expressed by the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) /Defined Daily Doses (DDD) methodology recommended by WHO and by the number of DDD/1000 inhabitants per day (DID). The internationally accepted classification system for medicines is the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification prescribed by the World Health Organization. Each non-proprietary name of the drug code corresponds to seven alphanumeric characters that are divided into five levels of classification. J01 is a subgroup of the System for Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification. These are antibiotics that are intended for systemic use. Subgroup J01 is a part of anatomical group J (anti-infective drugs for systemic use). Subgroup J01 is furthermore divided into J01A - tetracyclines, J01C - beta lactam antibiotics and penicillins, J01D - other beta lactam antibiotics and cephalosporins, J01F - macrolides, J01M - quinolone antibiotics, J01E - sulfonamides and trimethoprim, and J01G - aminoglycoside antibiotics.

ATC/DDD methodology has been proven beneficial in overcoming the differences, and the WHO proposed that this methodology should become a European criterion in 1981, whereas it became a world criterion in 1993.

Data from the community health center in Rakovica have been obtained by the Heliant programme. The Heliant programme has enabled us to gain insight into overall antibiotic consumption, which serve as an overview of indications for which antibiotics were prescribed as well as an insight into antibiotic consumption according to the age and gender of patients.

Within the framework of the ATC/DDD methodology, the existing (real) and expected consumption of medications can be compared. Moreover, the ATC/DDD methodology enables us to compare the use and consumption of drugs among various healthcare institutions, regions and states.

Additionally, the rate of adherence to national guidelines and the rate of consumption of the recommended antibiotics is calculated in compliance with the European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) recommendations.

The ESAC has proposed a list of disease-specific quality indicators for outpatient antibiotic prescriptions: 1. acute bronchitis/bronchiolitis, 2. acute upper-respiratory infection, 3. cystitis, 4. acute tonsillitis, 5. sinusitis, 6. acute otitis media, and 7. pneumonia (10).

The rate of adherence to national guides and ESAC recommendations for pneumonia has been calculated in this study.

## RESULTS

In the period from 2011-2015, at Rakovica Community Health Center, the most prescribed antibiotics were for diseases of the respiratory system, followed by urinary infections, and then skin and soft tissue infections (Figure

1). As for respiratory system infections, amoxicillin was the most frequently prescribed individual antibiotic, followed by azithromycin, then amoxicillin and clavulanic acid (Figure 2). These prescriptions for respiratory system infections were most frequently prescribed for diagnosis of J02 (acute pharyngitis), then J20 (acute bronchitis) and J03 (acute tonsillitis). For urinary tract infections, the most widely prescribed medications were cephalexin, ciprofloxacin and piperimic acid (Figure 2).

When considering the use of antibiotics in relation to age, the most widely prescribed antibiotics were penicillin and macrolides for patients under 65, whereas cephalosporins and penicillin drugs were predominant for those over 65 years of age.

Overall use of antibiotics (ATC group J01) is expressed in the form of DID at Rakovica Community Health Center. An increase in total antibiotic consumption can be noticed in the period from 2011 to 2015 (from 8,7 DID in 2011 up to 12,4 DID in 2015). Consumption per year for the last five years has been calculated for each group and subgroup of antibiotics. The most prescribed groups of antibiotics

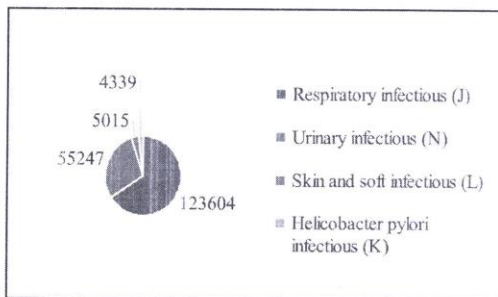


Figure 1. Number of dispensing packages according to indications over the period 2011-2015

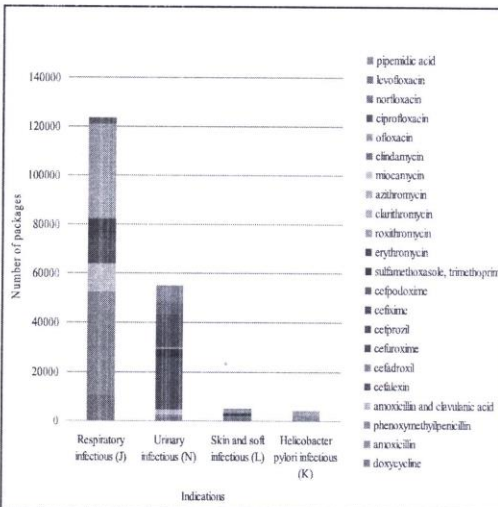


Figure 2. The most frequently prescribing antibiotics according to indications over the period 2011-2015



Consumption is expressed by the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) /Defined Daily Doses (DDD) methodology recommended by WHO and by the number of DDD/1000 inhabitants per day (DID). The internationally accepted classification system for medicines is the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification prescribed by the World Health Organization. Each non-proprietary name of the drug code corresponds to seven alphanumeric characters that are divided into five levels of classification. J01 is a subgroup of the System for Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification. These are antibiotics that are intended for systemic use. Subgroup J01 is a part of anatomical group J (anti-infective drugs for systemic use). Subgroup J01 is furthermore divided into J01A - tetracyclines, J01C - beta lactam antibiotics and penicillins, J01D - other beta lactam antibiotics and cephalosporins, J01F - macrolides, J01M - quinolone antibiotics, J01E - sulfonamides and trimethoprim, and J01G - aminoglycoside antibiotics.

ATC/DDD methodology has been proven beneficial in overcoming the differences, and the WHO proposed that this methodology should become a European criterion in 1981, whereas it became a world criterion in 1993.

Data from the community health center in Rakovica have been obtained by the Heliant programme. The Heliant programme has enabled us to gain insight into overall antibiotic consumption, which serve as an overview of indications for which antibiotics were prescribed as well as an insight into antibiotic consumption according to the age and gender of patients.

Within the framework of the ATC/DDD methodology, the existing (real) and expected consumption of medications can be compared. Moreover, the ATC/DDD methodology enables us to compare the use and consumption of drugs among various healthcare institutions, regions and states.

Additionally, the rate of adherence to national guidelines and the rate of consumption of the recommended antibiotics is calculated in compliance with the European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) recommendations.

The ESAC has proposed a list of disease-specific quality indicators for outpatient antibiotic prescriptions: 1. acute bronchitis/bronchiolitis, 2. acute upper-respiratory infection, 3. cystitis, 4. acute tonsillitis, 5. sinusitis, 6. acute otitis media, and 7. pneumonia (10).

The rate of adherence to national guides and ESAC recommendations for pneumonia has been calculated in this study.

## RESULTS

In the period from 2011-2015, at Rakovica Community Health Center, the most prescribed antibiotics were for diseases of the respiratory system, followed by urinary infections, and then skin and soft tissue infections (Figure

1). As for respiratory system infections, amoxicillin was the most frequently prescribed individual antibiotic, followed by azithromycin, then amoxicillin and clavulanic acid (Figure 2). These prescriptions for respiratory system infections were most frequently prescribed for diagnosis of J02 (acute pharyngitis), then J20 (acute bronchitis) and J03 (acute tonsillitis). For urinary tract infections, the most widely prescribed medications were cephalexin, ciprofloxacin and piperimic acid (Figure 2).

When considering the use of antibiotics in relation to age, the most widely prescribed antibiotics were penicillin and macrolides for patients under 65, whereas cephalosporins and penicillin drugs were predominant for those over 65 years of age.

Overall use of antibiotics (ATC group J01) is expressed in the form of DID at Rakovica Community Health Center. An increase in total antibiotic consumption can be noticed in the period from 2011 to 2015 (from 8,7 DID in 2011 up to 12,4 DID in 2015). Consumption per year for the last five years has been calculated for each group and subgroup of antibiotics. The most prescribed groups of antibiotics

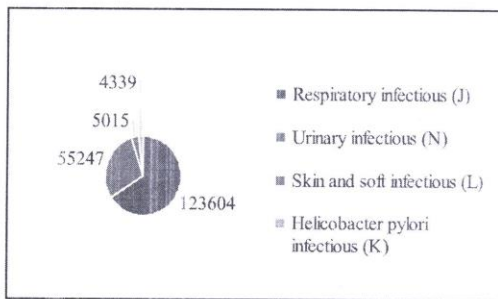


Figure 1. Number of dispensing packages according to indications over the period 2011-2015

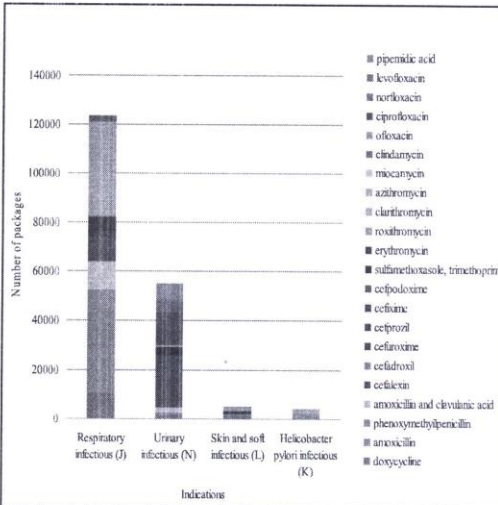


Figure 2. The most frequently prescribing antibiotics according to indications over the period 2011-2015





**Table 1.** Top INN used for pneumonia treatment in comparison with National Serbian Guideline (NSG)

ATC	INN	DID	% from total antibiotics use for pneumonia	NSG recommended as first choice	NSG recommended as second choice
J01MA12	levofloxacin	0.0617	49.04		X
J01DD08	cefixime	0.0199	15.82		
J01FA09	clarithromycin	0.0119	9.42	X	
J01CA04	amoxicillin	0.0074	5.86		
J01FA10	azithromycin	0.0072	5.69	X	
J01AA02	doxycycline	0.0055	4.33		X
J01MA02	ciprofloxacin	0.0050	4.00		X
J01CR02	amoxicillin and clavulanic acid	0.0031	2.43		
J01FA01	erythromycin	0.0010	0.79		
J01EE01	sulfamethoxazole, trimethoprim	0.0008	0.65		
J01FA06	roxithromycin	0.0006	0.46		
J01DD13	cefpodoxime	0.0005	0.40		
J01FF01	clindamycin	0.0004	0.35		
J01DC02	cefprozil	0.0003	0.28		
J01DB01	cefalexin	0.0002	0.17		
J01DC02	cefuroxime	0.0002	0.15		
J01CE02	phenoxymethylpenicillin	0.0001	0.10		
J01MA01	ofloxacin	0.0001	0.06		
	<b>total</b>	<b>0.1259</b>	<b>100</b>	<b>15.11%</b>	<b>57.37%</b>

**Table 2.** Top INN used for pneumonia treatment in comparison with ESAC disease specific quality indicators

ATC	INN	DID	% from total antibiotics use for pneumonia	DSQ17b <sup>a</sup>	DSQ17c <sup>a,b</sup>
J01MA12	levofloxacin	0.0617	49.04		X
J01DD08	cefixime	0.0199	15.82		
J01FA09	clarithromycin	0.0119	9.42		
J01CA04	amoxicillin	0.0074	5.86	X	
J01FA10	azithromycin	0.0072	5.69		
J01AA02	doxycycline	0.0055	4.33	X	
J01MA02	ciprofloxacin	0.0050	4.00		X
J01CR02	amoxicillin and clavulanic acid	0.0031	2.43		
J01FA01	erythromycin	0.0010	0.79		
J01EE01	sulfamethoxazole, trimethoprim	0.0008	0.65		
J01FA06	roxithromycin	0.0006	0.46		
J01DD13	cefpodoxime	0.0005	0.40		
J01FF01	clindamycin	0.0004	0.35		
J01DC02	cefprozil	0.0003	0.28		
J01DB01	cefalexin	0.0002	0.17		
J01DC02	cefuroxime	0.0002	0.15		
J01CE02	phenoxymethylpenicillin	0.0001	0.10		
J01MA01	ofloxacin	0.0001	0.06		
	<b>total</b>	<b>0.1259</b>	<b>100</b>	<b>10.18%</b>	<b>53.04%</b>



**Table 1.** Top INN used for pneumonia treatment in comparison with National Serbian Guideline (NSG)

ATC	INN	DID	% from total antibiotics use for pneumonia	NSG recommended as first choice	NSG recommended as second choice
J01MA12	levofloxacin	0.0617	49.04		X
J01DD08	cefixime	0.0199	15.82		
J01FA09	clarithromycin	0.0119	9.42	X	
J01CA04	amoxicillin	0.0074	5.86		
J01FA10	azithromycin	0.0072	5.69	X	
J01AA02	doxycycline	0.0055	4.33		X
J01MA02	ciprofloxacin	0.0050	4.00		X
J01CR02	amoxicillin and clavulanic acid	0.0031	2.43		
J01FA01	erythromycin	0.0010	0.79		
J01EE01	sulfamethoxazole, trimethoprim	0.0008	0.65		
J01FA06	roxithromycin	0.0006	0.46		
J01DD13	cefpodoxime	0.0005	0.40		
J01FF01	clindamycin	0.0004	0.35		
J01DC02	cefprozil	0.0003	0.28		
J01DB01	cefalexin	0.0002	0.17		
J01DC02	cefuroxime	0.0002	0.15		
J01CE02	phenoxymethylpenicillin	0.0001	0.10		
J01MA01	ofloxacin	0.0001	0.06		
	<b>total</b>	<b>0.1259</b>	<b>100</b>	<b>15.11%</b>	<b>57.37%</b>

**Table 2.** Top INN used for pneumonia treatment in comparison with ESAC disease specific quality indicators

ATC	INN	DID	% from total antibiotics use for pneumonia	DSQ17b <sup>a</sup>	DSQ17c <sup>a,b</sup>
J01MA12	levofloxacin	0.0617	49.04		X
J01DD08	cefixime	0.0199	15.82		
J01FA09	clarithromycin	0.0119	9.42		
J01CA04	amoxicillin	0.0074	5.86	X	
J01FA10	azithromycin	0.0072	5.69		
J01AA02	doxycycline	0.0055	4.33	X	
J01MA02	ciprofloxacin	0.0050	4.00		X
J01CR02	amoxicillin and clavulanic acid	0.0031	2.43		
J01FA01	erythromycin	0.0010	0.79		
J01EE01	sulfamethoxazole, trimethoprim	0.0008	0.65		
J01FA06	roxithromycin	0.0006	0.46		
J01DD13	cefpodoxime	0.0005	0.40		
J01FF01	clindamycin	0.0004	0.35		
J01DC02	cefprozil	0.0003	0.28		
J01DB01	cefalexin	0.0002	0.17		
J01DC02	cefuroxime	0.0002	0.15		
J01CE02	phenoxymethylpenicillin	0.0001	0.10		
J01MA01	ofloxacin	0.0001	0.06		
	<b>total</b>	<b>0.1259</b>	<b>100</b>	<b>10.18%</b>	<b>53.04%</b>