



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

др Ана Стојановић

# Промене у метаболизму масних киселина код пацијената са карциномом плућа

*докторска дисертација*

**Ментор:** др сц. Весна Вучић, научни саветник

Крагујевац, 2018. године

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>3</b>
1.1 Карцином плућа.....	4
1.1.1 Инциденца.....	4
1.1.2 Смртност.....	5
1.1.3 Фактори ризика.....	6
1.1.4 Скрининг.....	7
1.1.5 Клиничка слика.....	7
1.1.6 Дијагностика.....	8
1.1.7 Хистологија.....	9
1.1.8 Стадијум болести.....	12
1.1.9 Лечење.....	15
1.2 Карцином плућа и метаболизам липида.....	16
1.3 Фосфолипиди.....	18
1.3.1 Дефиниција.....	18
1.3.2 Биолошки значај фосфолипида.....	20
1.4 Масне киселине.....	21
1.4.1 Номенклатура и класификација.....	21
1.4.2 Есенцијалне масне киселине.....	24
1.4.3 Пuteви синтезе масних киселина.....	25
1.4.4 Десатуразе и елонгаза.....	28
1.4.5 Биолошки значај масних киселина.....	32
1.5 Исхрана и канцер.....	33
1.5.1 Препоруке за унос масти.....	35
1.5.2 Савремена исхрана.....	35
1.5.3 Исхрана као фактор ризика за карцином плућа.....	35
<b>2. ЦИЉ РАДА</b> .....	<b>37</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>40</b>
3.1 Време и место истраживања.....	41
3.2 Испитаници.....	41
3.3 Клиничка методологија.....	42
3.3.1 Општи преглед.....	42
3.3.2 Дијетарни унос.....	42
3.3.3 База података о саставу намирница.....	43
3.3.4 Узорковање ткива.....	45

3.3.5	АНАЛИЗА МАСНИХ КИСЕЛИНА ФОСФОЛИПИДА ПЛАЗМЕ И ТКИВА.....	46
3.4	Статистичка обрада резултата.....	49
<b>4.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>50</b>
4.1	Општи подаци.....	51
4.2	Липидни профил серума и инфламаторни фактори .....	53
4.3	Дијетарни унос.....	54
4.3.1	Дијетарни унос енергије и макронутријената.....	54
4.3.2	Дијетарни унос по групама намирница.....	56
4.3.3	Дијетарни унос микронутријената.....	58
4.4	Профил масних киселина у фосфолипидима плазме болесника са карциномом плућа и контролне групе.....	60
4.5	Профил масних киселина у здравом и оболелом ткиву болесника .....	62
4.5.1	Профил масних киселина у здравом и оболелом ткиву болесника са NSCLC .....	65
4.5.2	Профил масних киселина у здравом и оболелом ткиву болесника са SCLC.....	67
4.6	Упоредивање статуса масних киселина у фосфолипидима плазме и малигног ткива .	70
4.7	Анализа повезаности уноса и статуса масних киселина у фосфолипидима плазме .....	74
<b>5.</b>	<b>ДИСКУСИЈА</b> .....	<b>77</b>
5.1	Дијетарни унос код оболелих од карцинома плућа.....	78
5.2	Дијетарни унос микронутријената код оболелих од карцинома плућа.....	82
5.3	Профил масних киселина у плазми пацијената са карциномом плућа.....	84
5.4	Промене у активности система десатураза/елонгаза у плазми болесника са карциномом плућа .....	87
5.5	Профил масних киселина у малижном и здравом ткиву пацијената са карциномом плућа .....	88
5.5.1	Поређење профила масних киселина у малижном ткиву пацијената са NSCLC и SCLC .....	90
5.6	Промене у активности система десатураза/елонгаза у малижном ткиву плућа .....	91
5.7	Промене у саставу масних киселина фосфолипида плазме и малигног ткива пацијената са карциномом плућа.....	92
5.8	Повезаност дијетарног уноса и профила масних киселина фосфолипида плазме .....	93
<b>6.</b>	<b>ЗАКЉУЧАК</b> .....	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>98</b>

# **1. УВОД**

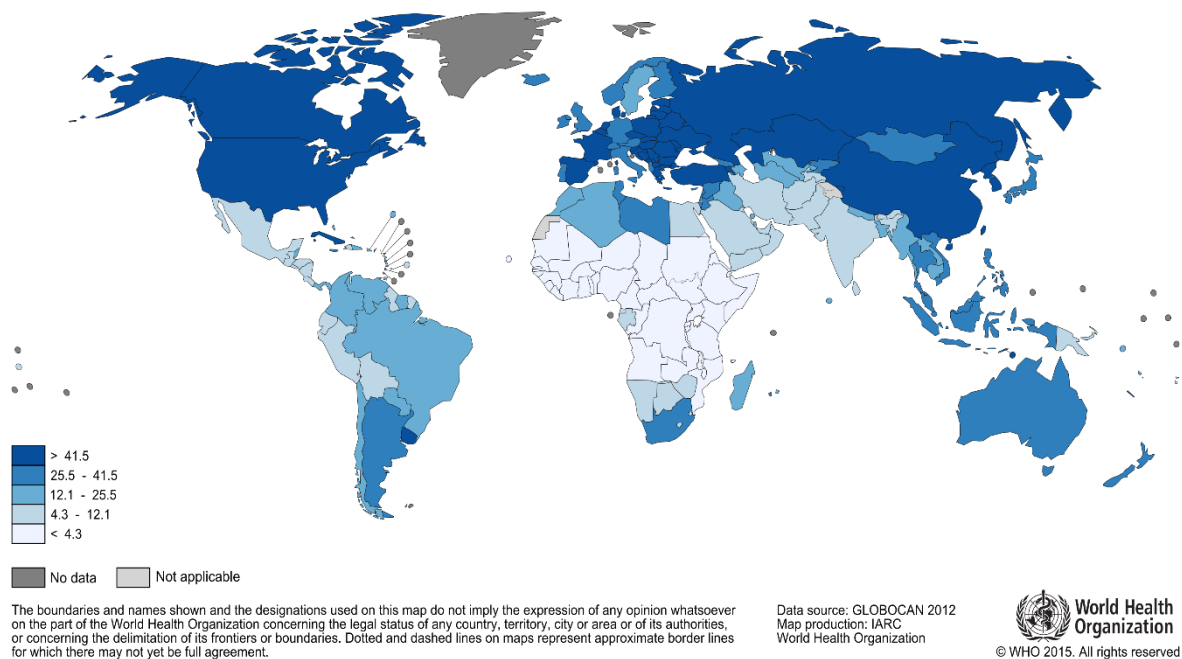
## 1.1 Карцином плућа

Почетком двадесетог века карцином плућа био је ретка болест. Од осамдесетих година прошлог века, ово је карцином са највећом инциденцом у свету. Широко распрострањена навика пушења цигарета, као и неповољни фактори спољашње средине, допринели су пандемији ове болести. Рано откривање и започињање лечења кључан су фактор за дужину преживљавања оболелих (1).

### 1.1.1 ИНЦИДЕНЦА

Карцином плућа водећи је светски здравствени проблем. Сваке године дијагностикује се 1 600 000 новооткривених случајева, а око 1 300 000 пацијената премине од последица ове болести (2). Код мушкараца је ово најчесталији карцином, а водећи је узрок смртности у оба пола. Карцином плућа чини 13% свих дијагностикованих малигнома у Европи и Сједињеним Америчким Државама (3). Европа, Азија и Северна Америка имају највишу, а Африка и Јужна Америка најнижу стопу обољевања од канцера плућа (4).

Стопа обољевања међу европским земљама значајно се разликује. Код мушкараца, највиша стопа обољевања је код Мађара (109 на 100000) и у Бившој Југословенској Републици Македонији, а најнижа код Финаца и Швеђана. Жене најчешће оболевају од карцинома плућа у Данској и Мађарској, а најређе у Руској Федерацији, Украјини и Белорусији (9 на 100000) (3, 5). Илустрација инциденце карцинома плућа у свету приказана је на Слици 1.



**СЛИКА 1.** Инциденца карцинома плућа у свету (преузето са сајта Светске Здравствене Организације).

### 1.1.2 СМРТНОСТ

Од карцинома плућа у 2012. години умрло је 1.59 милиона људи широм света што чини око 19,4% смрти узрокованих малигним болестима. Дакле сваки пети смртни исход код пацијената оболелих од различитих врста канцера, последица је малигне болести плућа (3).

У складу са подацима за инциденцу, највишу стопу смртности од карцинома плућа у Европи имају Мађари (96 на 100 000), а најнижу Швеђани (26 на 100 000). Између 1970. и 2007. морталитет од карцинома плућа код жена достигао је плато, а затим је стопа смртности у Северној и Источној Европи почела да опада, што корелира са смањењем и престанком пушења у овим областима последњих деценија (6, 7).

### 1.1.3 ФАКТОРИ РИЗИКА

Одавно је позната чињеница да је пушење цигарета главни фактор ризика за настанак карцинома плућа (4). Ризик за настанак болести расте са бројем попушених цигарета на дан и са дужином пушачког стажа. Пасивно пушење је такође могући узрок настанка карцинома плућа и региструје се у око 10 % оболелих (8).

Веза између пушења и инциденце карцинома плућа види се и из следећих података: Мађари имају највишу стопу обољевања у Европи, а 26,5% популације старије од 15 година су пушачи. Тек 14% одрасле популације у Шведској су пушачи, а стопа обољевања од карцинома плућа најнижа је у Европи (8). Може се рећи да на нивоу светских размера, инциденца обољевања од карцинома плућа одражава заступљеност пушачке навике.

Интересантна је чињеница да је појава карцинома плућа код жена које никада нису пушиле висока у Источној и Јужној Азији (61% и 83%), што указује на чињеницу да се ради о различитом ентитету, а то је предмет даљих испитивања (9).

Фактори спољашње средине као што су радон и азбест значајни су карциногени (10, 11). Анализа 13 студија из 9 европских земаља пацијената у чијој се животној средини налази радон, показују повишен ризик за обољевање нарочито код пушача и бивших пушача. Слично радону и азбест утиче на настајање карцинома плућа, али је тешко овај ризик издвојити од других узрочника, пушења на пример. Ризик од настанка карцинома расте са степеном изложености аерозагађењу (11).

Око половина светске популације користи биомасе и отворено кућно ложиште за кување и загревање, што такође представља умерено повишен ризик (12). Патогенеза карцинома плућа је сложен процес у којем услед генетских мутација, долази до промена у структури и функцији нормалних ћелија. Добро су изучене мутације K-ras онкогена и мутације тумор супресорских гена p16 и p53. Значајну улогу у расту и ширењу тумора имају дешавања на ћелијском нивоу. Појачано лучење васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) и епидермалног фактора раста (EGFR) доводи до појачане васкуларизације и убрзаног раста ћелија тумора. Имунохистохемијским путем доказана је и повећана експресивност рецептора за епидермални фактор раста на туморским ћелијама (13, 14).

#### 1.1.4 СКРИНИНГ

Примарна превенција карцинома плућа подразумева престанак пушења. 90% оболелих мушкараца и 80% оболелих жена су пушачи (15, 16). Код бивших пушача, ризик од обољевања и даље остаје висок (16). Истраживање спроведено 2012. године, које је укључивало по 1000 случајно изабраних испитаника из сваке европске земље, показује да 28% одрасле европске популације пуши, 21% испитаника били су бивши пушачи а 51% испитаника никада није пушило (17).

Секундарна превенција или скрининг у карциному плућа, предмет је бројних клиничких испитивања у Европи и Сједињеним Америчким Државама. Смањење смртности и цена/добит је оно што се у овим студијама прати. Резултати студије спроведене у Сједињеним Државама (*US National Lung Screening Trial - NLST*), публиковани 2011. године, показали су недвосмислен значај скрининга ниско дозним скенером грудног коша у поређењу са радиографским снимком плућа, у смањењу морталитета у високо ризичним групама пацијената (6).

У Европи је спроведено и у току је осам клиничких студија које се баве оправданошћу скрининга карцинома плућа нискодозном компјутеризованом томографијом грудног коша. Три студије су објавиле негативне резултате, али без одговарајуће снаге студије. NELSON (*Dutch-Belgian Randomised Lung Cancer Screening Trial*) студија је у току, она показује оправданост скрининга иако наглашава постојање неконзистентности поређених група (18-21).

Тренутне препоруке за одабир пацијената за скрининг, засноване су на препорукама NLST студије. То су пацијенти старости од 55 до 80 година, са пушачким стажом већим од 30 пакло/година (22).

#### 1.1.5 КЛИНИЧКА СЛИКА

Клиничко испољавање тумора плућа последица је локалног, регионалног или метастатског раста тумора, или пак системских ефеката тумора (13, 23, 24). Општи симптоми болести су слабост, анорексија, губитак у телесној тежини. Кашаљ, искашљавање крви, отежано дисање, бол у грудима, бол у рамену, најчешћи су



симптоми оболелих. У зависности од локализације тумора и захватања околних структура у грудном кошу, болест се манифестује као Хорнеров синдром или као синдром горње шупље вене.

Метастазе тумора манифестују се симптомима од стране органа у којима се налазе. У тренутку дијагностиковања више од половине пацијената има проширену малигну болест (13, 23-25). Најчешће су метастазе у јетри, надбубрежним жлездама и интракранијално.

Уколико испољаваље симптома није узроковано метастатским растом тумора, већ системским деловањем продуката туморског лучења, реч је о паранеопластичном синдрому. Најчешћи производи туморског лучења са системским деловањем су полипептидни хормони, хормонима слични пептиди, антитела, простагландини и цитокини (24-26).

### **1.1.6 ДИЈАГНОСТИКА**

Дијагностички поступак код плућних неоплазми заснован је, као и у већини болести, на клиничким, лабораторијским, и радиографским софистицираним процедурама.

Скенер високе резолуције, сцинтиграфија костију, магнетна резонанца, позитронска емисиона томографија- ПЕТ скенер и ендоскопска ултрасонографија, неке су од примењиваних неинвазивних процедура (27-32).

Централно место у дијагностичком поступку заузимају инвазивне дијагностичке методе. Флексибилна бронхоскопија са биопсијом бронха и трансбронхијалном биопсијом плућа спроводе се у специјано за то опремљеним кабинетима. Поступак изводи високостручан и образован кадар (33-37). Ригидна бронхоскопија, перкутана иглена биопсија плућа, торакоцентеза и биопсија плеуре као и медијастиноскопија изводе се у циљу процене проширености болести. Захваљујући овим поступцима могућа је прецизна патохистолошка дијагностика и одређивање стадијума болести, а потом и одлука о начину лечења (38-41).

### 1.1.7 ХИСТОЛОГИЈА

Да би смо адекватно лечили пацијента оболелог од плућног малигнома, неопходно је најпре да утврдимо анатомске, морфолошке и молекуларне карактеристике тумора. Потврда малигнитета било из цитолошког или патохистолошког узорка, први је корак у овом процесу. Утврђујемо да ли се ради о примарном или метастатском карциному плућа.

Важећа патохистолошка класификација Светске здравствене организације је из 2015. године и она дефинише осам категорија тумора плућа (42-44):

- аденокарцином (*adenocarcinoma* - ADC);
- сквамозелуларни карцином (*squamous cell carcinoma* - SCC);
- неуроендокрини тумори (*small cell lung cancer* - SCLC, LCNEC, карциноид);
- карцином великих ћелија;
- аденосквамозни карцином;
- саркоматоидни карцином;
- други неклассификовани карциноми и
- карцином плувачних жлезда.

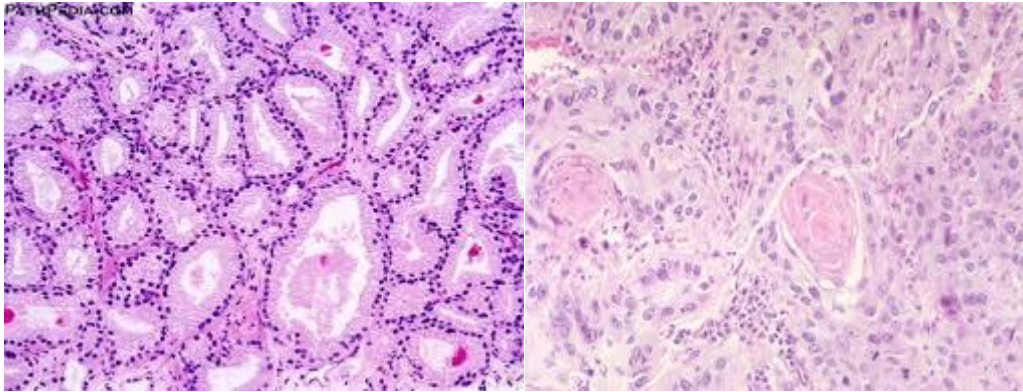
Уобичајена патохистолошка подела је на неситноћелијски и ситноћелијски карцином плућа.

#### 1.1.7.1 Неситноћелијски карцином плућа

Групу неситноћелијских карцинома плућа (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) чине аденокарцином и сквамозелуларни карцином.

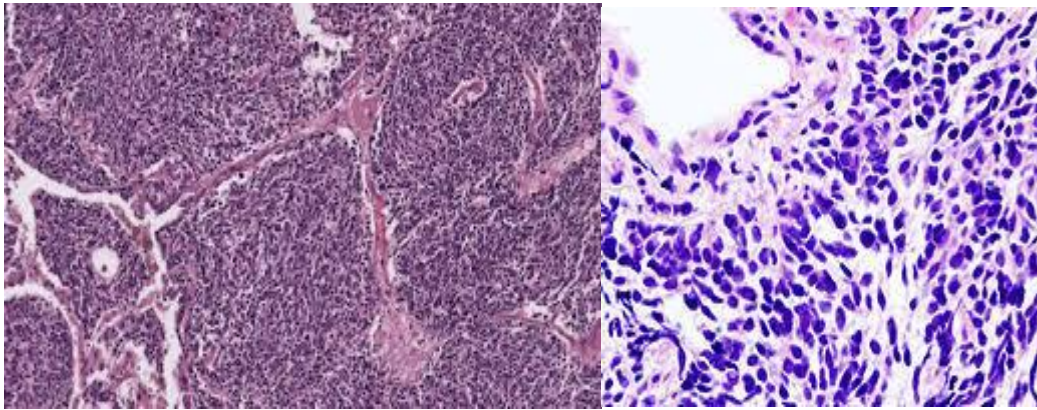
Аденокарцином (ADC) је малигни епителни тумор који показује glandуларну диференцијацију (Слика 2). Овај тумор расте у периферном паренхималном делу плућа и може настати из преинвазивне диспластичне аденоматозне хиперпластичне лезије. Овакве лезије у великом проценту луче тиреоидни транскрипциони фактор 1 (ТТФ1) који

је у 80 – 85 % позитиван код аденокарцинома (43, 45-48). Аденокарцином је чешћи код жена него код мушкараца, а његова инциденца је у порасту код оба пола у развијеним земљама. Најчешћи је тип тумора и јавља се у 30 - 35% оболелих.



**СЛИКА 2.** Аденокарцином плућа

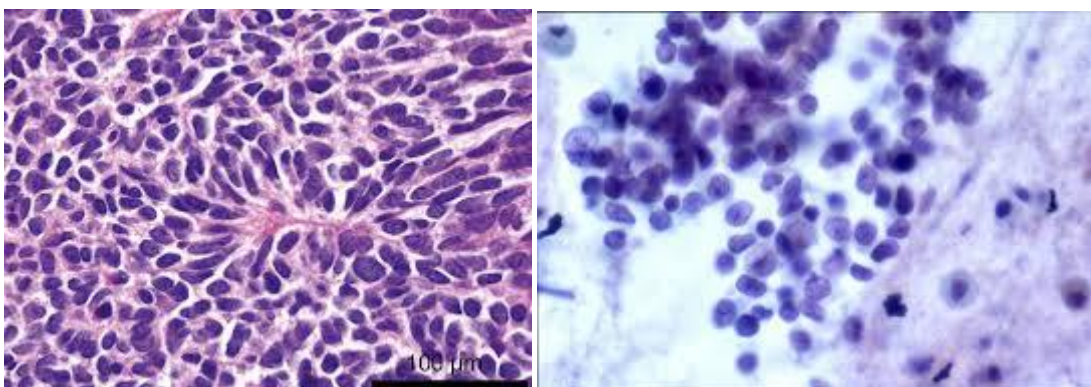
Сквамоцелуларни карцином (SCC) је малигни епителни тумор који показује морфолошке знаке сквамозне диференцијације а то су продукција кератина и појава интерцелуларних мостова (Слика 3). Централно је локализован, појављује се у великим бронхиима и то на месту прекурсорских лезија какве су сквамозна дисплазија и тумор *in situ* (49, 50). Код мушкараца, сквамоцелуларни карцином је најчесталији тип карцинома, а његова инциденца је у паду. Дијагностикује се у око 30% оболелих, углавном пушача.



**СЛИКА 3:** Сквamoцелуларни карцином плућа

#### 1.1.7.2 Ситноћелијски карцином плућа

Ситноћелијски карцином плућа (SCLC) чини око 20% свих карцинома плућа, а његова инциденца са годинама опада (5), што је одраз смањења пушачке навике као и промена у саставу цигарета. Захвата велике дисајне путеве уз веома изражену лимфаденопатију и често су већ при дијагностиковању испољене удаљене метастазе, те болест има системски карактер (16, 17, 29, 42, 49).



**СЛИКА 4:** Ситноћелијски карцином плућа

### 1.1.8 СТАДИЈУМ БОЛЕСТИ

Одређивање стадијума карцинома плућа врши се према осмој Интернационалној редигованој TNM класификацији из 2016. године. Карциноми плућа се класификују у четири клиничка стадијума и то на основу величине примарног тумора (Т), увећања околних лимфонодуса (N) и присуства или одсуства удаљених метастаза (M). TNM дескриптори карцинома плућа и клинички стадијуми по овим критеријумима су приказани у Табели 1а и б (51, 52).

**ТАБЕЛА 1а. TNM дескриптори карцинома плућа**

<b>T - DESKRIPTOR (T – primarni tumor)</b>	
<b>Tx</b>	Primarni tumor se ne može utvrditi
<b>T0</b>	Nema evidentnog primarnog tumora
<b>T1</b>	Tumor 3 cm ili manje u svom najvećem dijametri okružen plućnim tkivom ili visceralnom pleurom, ne zahvatajući glavni bronh
<b>T1a(mi)*</b>	Minimalno invazivni adenokarcinom
<b>T1a</b>	Tumor 1 cm ili manje u svom najvećem dijametri
<b>T1b</b>	Tumor veći od 1 cm ali ne veći od 2 cm
<b>T1c</b>	Tumor veći od 2 cm ali ne veći od 3 cm
<b>T2</b>	Tumor veći od 3 cm ali ne veći od 5 cm; ili tumor sa nekom od navedenih osobina: zahvata glavni bronh (bez zahvatanja karine traheje), invazija visceralne pleure, postoji atelektaza ili opstruktivni pneumonitis koji se prostire do predela hilusa
<b>T2a</b>	Tumor veći od 3 cm ali ne veći od 4 cm
<b>T2b</b>	Tumor veći od 4 cm ali ne veći od 5 cm
<b>T3</b>	Tumor veći od 5 cm ali ne veći od 7 cm zid grudnog koša, frenični nerv, parijetalni list perikarda, ili je udružen sa separatnim tumorskim nodulom(ima) u istom lobusu gde je i primarni tumor
<b>T4</b>	Tumor veći od 7 cm ili tumor koji direktno zahvata, urasta u nešto od navedenih struktura: dijafragmu, medijastinum, srce, velike krvne sudove, traheju, rekurentni laringealni nerv, ezofagus, pršljensko telo, karinu; separadni tumorski nodul(i) u različitom ipsilateralnom lobusu u odnosu na primarni tumor

<b>N - DESKRIPTOR</b>	<b>M - DESKRIPTOR (M – udaljene metastaze)</b>
<b>Nx</b>	<b>M0</b>
Limfni nodusi se ne mogu utvrditi	Nema udaljene metastaze
<b>N0</b>	<b>M1</b>
Nisu zahvaćeni limfni nodusi	Ima udaljene metastaze
<b>N1</b>	<b>M1a</b>
Zahvaćeni ipsilateralni hilarni	Separatni tumorski nodul(i) u kontralateralnom lobusu; tumor sa pleuralnim ili perikardnim nodulima ili malignim pleuralnim ili perikardnim izlivom
<b>N2</b>	<b>M1b</b>
Zahvaćeni ipsilateralni medijastinalni i/ili subkarinalni	Solitarna ekstratoraksna metastaza u jednom organu
<b>N3</b>	<b>M1c</b>
Zahvaćeni kontralateralni medijastinalni / hilarni ili pak - supraklavikularni bilateralni - Skalenus limfni nodusi obostrano	Multiple ekstratoraksne metastaze u jednom ili više organa

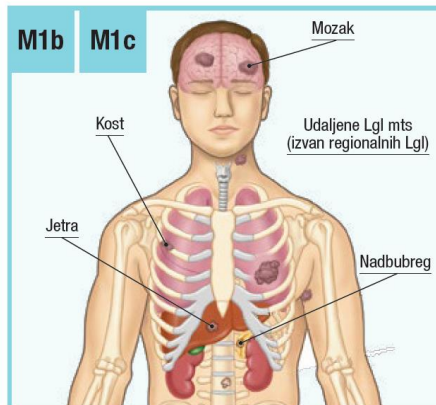
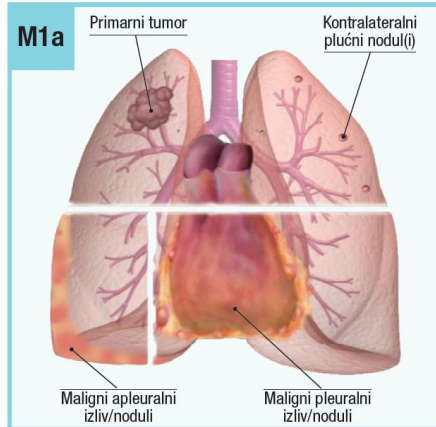
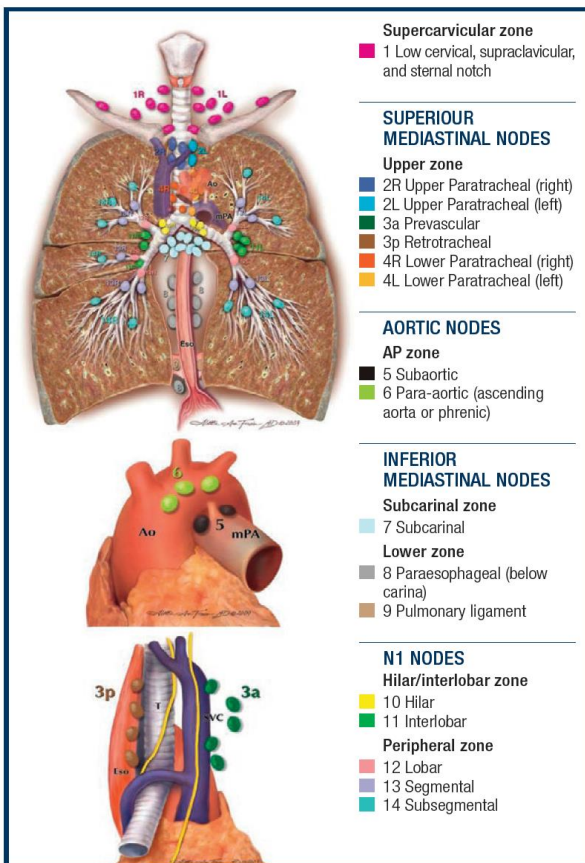
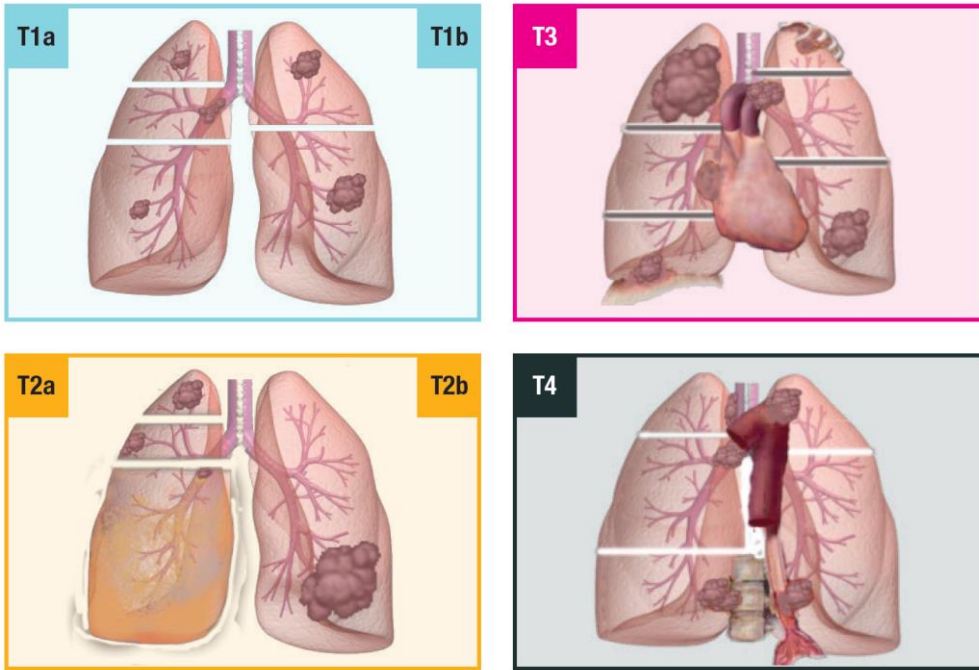
**ТАБЕЛА 16.** Клинички стадијуми карцинома плућа

STADIJUM	T	N	M
Okultni	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1a (mi) / T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a - T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a - T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0 / N1	M0
IIIB	T1a-T2b	N3	M0
	T3 / T4	N2	M0
IIIC	T3 / T4	N3	M0
IVA	Any T	Any N	M1a / M1b
IVB	Any T	Any N	M1c



Стадијуми болести приказани су и на Слици 5.

СЛИКА 5. Стадијуми карцинома плућа према ТНМ класификацији.



### 1.1.9 ЛЕЧЕЊЕ

Према TNM класификацији потенцијално ресектабилни су тумори у стадијуму I до IIIa. А највеће шансе за излечење имају оболели у I и II клиничком стадијуму. Већ од II стадијума болести разматрамо комбиновани модалитет лечења који подразумева постоперативну адјувантну хемиотерапију или пак индукциону, преоперативну хемио-или радиотерапију (53-55). У Табели 2 приказане су препоруке Европског друштва за медицинску онкологију (*European Society for Medical Oncology – ESMO*) (56) за лечење и праћење пацијената са NSCLC.

**ТАБЕЛА 2.** Водич за лечење и праћење пацијената са неситноћелијским карциномом плућа (ESMO препоруке (56))

<b>Лечење болесника у стадијуму I – II болести:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Хируршка ресекција је стандард у лечењу раног карцинома плућа. Постоперативна хемиотерапија може бити размотрена (II, A). Постоперативна радиотерапија није препоручљива (I, A)*</li><li>✓ Радикалном радиотерапијом као јединим модалитетом лечења постиже се петогодишње преживљавање код око 40% болесника у стадијуму II и треба је размотрити у случајевима раног иноперабилног карцинома плућа, стадијум I, II</li></ul>
<b>Лечење болесника у стадијуму III болести:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Преоперативна радиотерапија је стандард у лечењу болесника у IIIa стадијуму болести. Према резултатима рандомизованих студија, преживљавање болесника у IIIa стадијуму болести је значајно боље ако се примени комбинована преоперативна хемиотерапија плус хирургија него само хирургија (I, A)*</li><li>✓ Хемиотерапијски протокол базиран на платини и торакална радиотерапија су стандард у лечењу болесника са локално узнапредовалим, нересектабилним IIIb и иноперабилним IIIa стадијумом болести (I, A)*</li></ul>
<b>Лечење болесника у стадијуму IV болести:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Хемиотерапијски протокол базиран на платини у комбинацији са винорелбином, гемцитабином или таксанима продужује преживљавање, побољшава квалитет живота и контролу симптома код болесника са добрим општим стањем (I, A)*</li></ul>
<b>Секударна хемиотерапија</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Ублажује симптоме и продужава живот код одређених група болесника (II, B)*</li></ul>



\*Ниво доказа (I – V) и степен препоруке (A – D) коришћени су сходно препорукама Америчког удружења за клиничку онкологију (ASCO). Где није наглашено другачије, препорука је формирана на основу консензуса експерата.

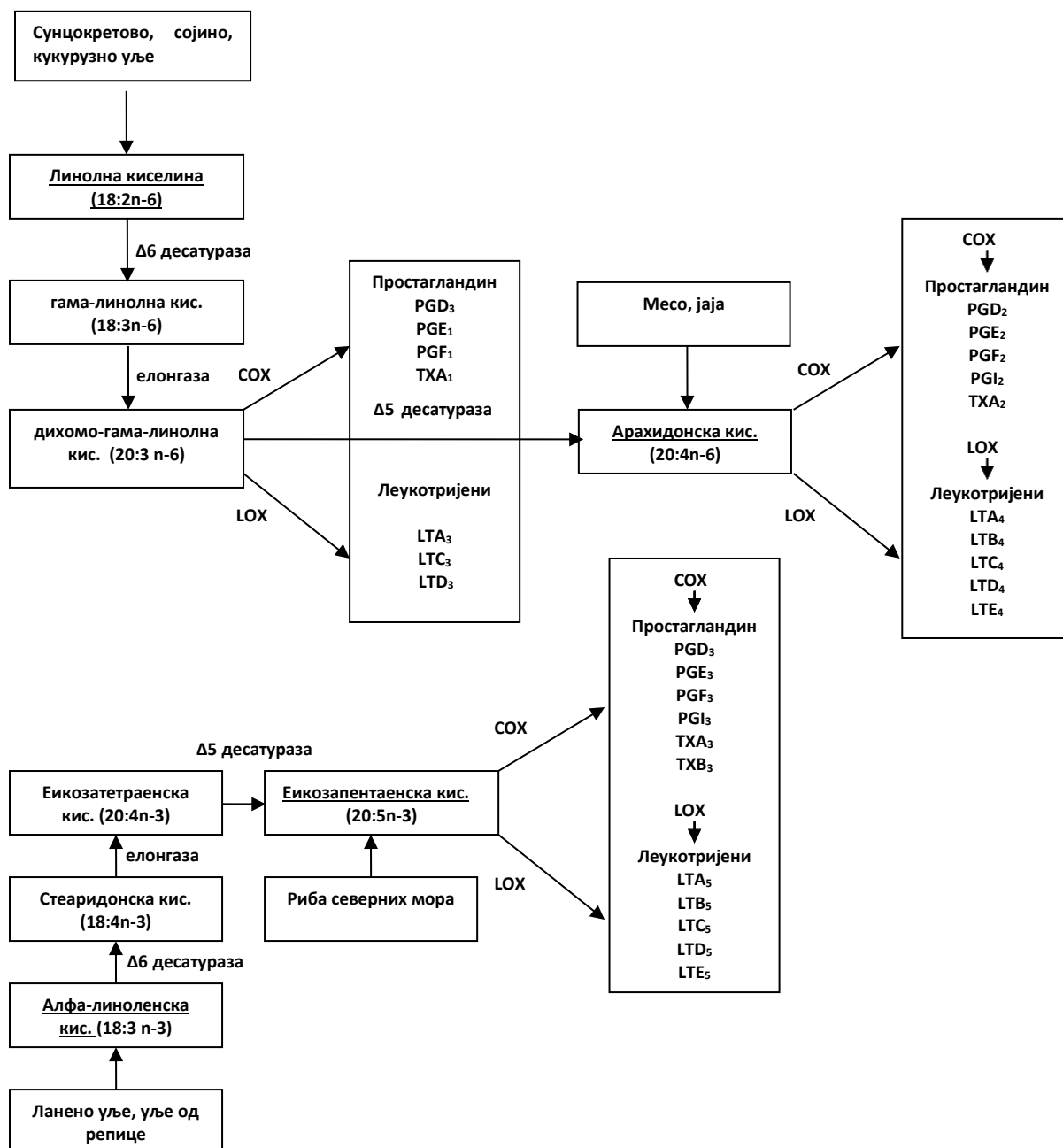
## 1.2 Карцином плућа и метаболизам липида

Једна од најзначајнијих карактеристика малигног ћелијског раста је метаболичко репрограмирање. Промена у метаболизму масти, угљених хидрата и протеина обезбеђује убрзану пролиферацију туморских ћелија која је, за разлику од здравог ткива, независна од нутритивног уноса.

Иако је већина промена везана за метаболизам угљених хидрата, у последње се време уочава *de novo* липогенеза у многим агресивним туморима (57). У ћелијама тумора појачана је активност ензима одговорних за липогенезу, а то су АТФ цитрат лиаза (ACLY) и синтетаза масних киселина (FAS).

Недавно објављене студије показују да је активација фактора раста неопходних за раст тумора у условима ограничене оксигенације, зависна од полинезасићених масних киселина. Такође бројене студије показују да исхрана богата n-6 полинезасићеним масним киселинама (*polyunsaturated fatty acids* – PUFA) може бити повезана са повећаним ризиком обољевања од малигнома. Смањена количина n-3 PUFA, налази се у плазми и еритроцитима код оболелих од карцинома простате, плућа и не-Хочкиновог лимфома (58-60). Вредности n-3 PUFA у плазми нарочито су снижене код оболелих на хемиотерапији и пацијената у терминалној фази болести (61).

PUFA n-3 групе имају инхибиторни ефекат на туморски раст преко синтезе антиинфламаторних простагландина (62). Антитуморски ефекат n-3 еикозапентаенске киселине (EPA) испољава се путем компетитивне инхибиције са арахидонском киселином (AA) за продукцију еикозаноида. Еикозаноиди пореклом од n-3 PUFA делују антиинфламаторно, за разлику од оних пореклом од n-6 PUFA који делују проинфламаторно (63, 64). На слици 6 схематски је приказан поједностављени метаболизам n-3 и n-6 PUFA из хране и њихова конверзија у еикозаноиде.



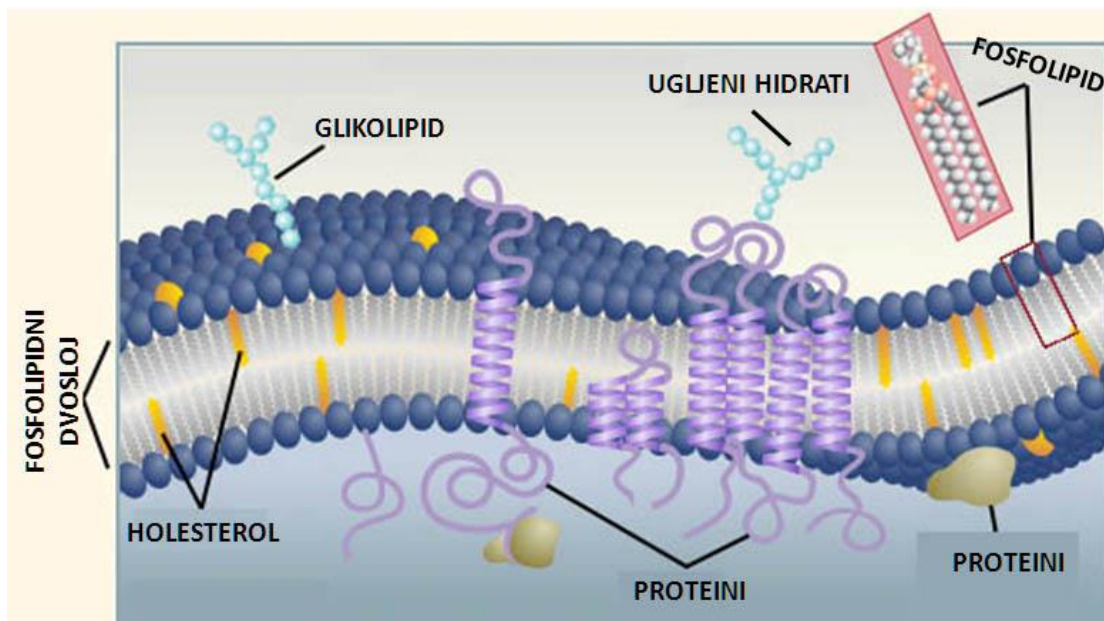
**СЛИКА 6.** Упрощени метаболизам дијетарних n-3 and n-6 PUFA. COX- циклооксигеназа, LOX- липооксигеназа, кис. - киселина. Преузето из Vučić V, Ristić-Medić D (65). Eicosapentaenoic Acid: The Role in Malignant Diseases. In Eicosapentaenoic Acid: Sources, Health Effects and Role in Disease Prevention. Editors: Theodore G. Bradley and Francisco P. Vargas. ISBN: 978-1-62257-480-3 Nova Science Publishers, Inc. pp 99-116, 2012.).

Промене у дистрибуцији и концентрацији липидних молекула могу послужити као потенцијални биомаркери различитих болести, укључујући канцер (66). Због овог потенцијала, истраживање промена у саставу и концентрацији липида у ћелијама као и у биолошким течностима је од великог интереса (67, 68). Квантификовање нивоа фосфолипида (ФЛ) у нормалним и канцерозним ткивима и проучавање њихових међусобних односа, могу бити значајни за разумевање промена у мембранским својствима и њихово модулисање у циљу побољшања ефеката терапије. Различите студије су показале да су концентрације појединачних ФЛ и њихових метаболита у нормалним и туморским ткивима различите. Ове промене у саставу ФЛ мењају флуидност ћелијских мембрана, што доводи до промене и у пропустљивости мембране (69). Новија истраживања показују и системске промене липида у плазми пацијената са неким врстама канцера, нпр. простате, бубрега и штитне жлезде (70-73). Детектовани су и значајно нижи нивои холестерола, ХДЛ холестерола и укупних ФЛ у серуму пацијената са не-Хочкиновим лимфомом и код пацијената са канцером простате, него код здравих субјеката (74). Сулентроп и сарадници су открили да су концентрације ФЛ у плазми пацијената са канцером бубрега зависиле од стадијума и проширености болести (72). Упркос томе, подаци о метаболизму липида код болесника са карциномом плућа су ограничени.

## **1.3 Фосфолипиди**

### **1.3.1 ДЕФИНИЦИЈА**

Ћелијска мембрана је флуидна, мозаична и асиметрична структура, и изграђена је од приближно једнаке количине липида и протеина, са придруженим полисахаридима. Липиди граде двослој у који су урођени молекули протеина, ови се молекули непрекидно померају и чине такозвани течни мозаик. Полисахариди се везују само за спољашњу страну ћелијске мембране (Слика 7).

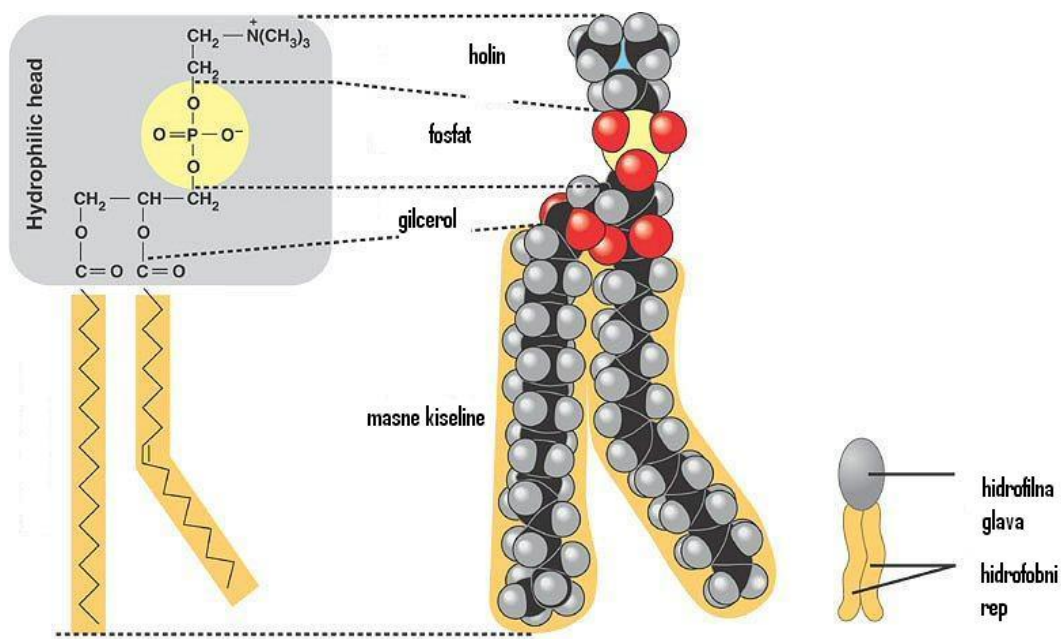


**СЛИКА 7.** Схематски приказ ћелијске мембране. Хидрофилна глава фосфолипида окренута је ка цитоплазми и спољашњој средини, а хидрофобни реп ка унутрашњости двослоја. У фосфолипидни двослој урoњени су холестерол и протеини. Угљени хидрати су везани за протеине и липиде и налазе се са спољашње стране мембране.

У грађи ћелијске мембране учествују три врсте сложених липида и то фосфолипиди, гликолипиди и холестерол (75, 76). Фосфолипиди (ФЛ) су најзаступљенији мембрански липиди. Њихову грађу чини алкохол (глицерол или сфингозин), масна киселина, фосфорна киселина и азотна база. Према врсти алкохола који садрже, фосфолипиди се деле на глицерофосфолипиде, који садрже глицерол, и сфингофосфолипиде, који садрже сфингозин (75, 77).

Фосфолипиди су поларни молекули. Њихов поларни – хидрофилни део је фосфатни естар, а неполарни – хидрофобни део чине масне киселине. Хидрофилни пол (глава фосфолипида) је окренут ка воденом миљеу, тј. ка спољашњој средини или цитоплазми, а хидрофобни маснокиселински реп ка неполарној унутрашњости двослоја (76, 77).

Фосфолипиди су поређани асиметрично у ћелијској мембрани. Имају одређено наелектрисање и оно зависи од јонизације и природе поларних група, па тако разликујемо неутралне и киселе фосфолипиде. Кисели фосфолипиди постављени су на унутрашњој страни ћелијске мембране, а неутрални на спољашњој страни и у сталној су динамичкој равнотежи са фосфолипидима серума. Ниво фосфолипида серума и њихових фракција (фосфатидилхолина, фосфатидилетаноламина, сфингофосфолипида и лизофосфатидилхолина) је зато показатељ стања мембранских фосфолипида (78-80). Схематски приказ грађе ФЛ представљен је на Слици 8.



**СЛИКА 8:** Структура фосфолипида

### 1.3.2 БИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ ФОСФОЛИПИДА

Разноликост функција фосфолипида заснована је на њиховој могућности преласка из гел у сол стање и последица је велике мобилности, латералне дифузије,

ротације око своје осе и кретања између спољашњег и унутрашњег слоја ћелијске мембране.

Најзначајније функције ФЛ су (80, 81):

- Очување интегритета ћелијских мембрана;
- Омогућавање флуидности и пропустљивости мембране, што је дефинисано дужином, незасићеношћу и просторном изомеријом полинезасићених масних киселина (PUFA) које улазе у састав фосфолипида, али у значајној мери зависи и од количине холестерола у мембрани;
- Регулација активности мембранских ензима (аденилциклазе, 5-нуклеозидазе, Na-K АТП-азе;
- Пренос сигнала хормона и цитокина;
- Инфлукс калцијума.

## 1.4 Масне киселине

Масне киселине су основни липидни молекули и саставни део сложених масти какви су триглицериди, холестеролски естри и фосфолипиди. То су заправо карбоксилне киселине са дугим неразгранатим ланцем а могу бити засићене и незасићене. Физичка својства масних киселина зависе од дужине ланца, степена незасићености и разгранатости ланца.

### 1.4.1 НОМЕНКЛАТУРА И КЛАСИФИКАЦИЈА

Масне киселине означавају се према IUPAC модификованој номенклатури (International Union of Pure and Applied Chemistry). Ова номенклатура садржи два симбола, прва цифра означава број угљеникових атома (C) а друга број двоструких веза у ланцу (82, 83).

Масне киселине се према броју атома угљеника деле на:

- кратколанчане – садрже 4 до 8 C атома,
- средњеланчане – садрже 8 до 12 C атома,
- дуголанчане – садрже више од 12 C атома.

Према присуству и броју двогубих веза у молекулу, масне киселине се деле на

- засићене – не садрже двогубе везе (Saturated fatty acid -SFA)
- незасићене - садрже једну до шест двогубих веза (Unsaturated fatty acid – UFA).

Засићене масне киселине не садрже двоструке ковалентне везе у молекуларном ланцу. Сви молекули угљеника максимално су засићени јонима водоника, а на крају низа је карбоксилна група COOH, и тај крај ланца означава се са n или **омега**.

Незасићене масне киселине се према броју незасићених веза деле на:

- мононезасићене (Monounsaturated fatty acid – MUFA).
- полинезасићене (Polyunsaturated fatty acid – PUFA).

Број двогубих веза у незасићеним масним киселинама одређује тачку топљења триглицерида, у чији састав улазе масне киселине. Даље, степен незасићености масних киселина утиче на флуидитет мембране чија су структурна компонента фосфолипиди. Које ће масне киселине ући у састав фосфолипида плазме, зависи од њиховог присуства у циркулацији. Наиме, масне киселине се по правилу уграђују у фосфолипиде у односу који постоји у плазми, а који код здравих људи највише зависи од дијетарног уноса. Дакле, већи дневни унос неке масне киселине утицаће да се она у већој количини нађе у фосфолипидима плазме, због чега се фосфолипиди сматрају биомаркером уноса масних киселина (84).

У незасићеним масним киселинама двострука веза се може налазити на различитој удаљености од омега C атома, па тако у зависности од положаја двоструке везе разликујемо следеће групе:

- Омега 3 или n-3
- Омега 6 или n-6
- Омега 9 или n-9

У Табели 3 приказани су називи и номенклатура најзначајнијих масних киселина у животињским ткивима.

**ТАБЕЛА 3.** Најзначајније масне киселине у животињским мастима

Назив масне киселине	Номенклатура
<b><i>Засићене масне киселине /SFA/</i></b>	
бутерна	C 4:0
капронска	C 6:0
каприлна	C 8:0
капринска	C 10:0
лауринска	C 12:0
мистинска	C 14:0
палмитинска	C 16:0
стеаринска	C 18:0
арахинска	C 20:0
бехенска	C 22:0
<b><i>Мононезасићене масне киселине /MUFA/</i></b>	
палмитолеинска	C 16:1 n-7
олеинска	C 18:1 n-9
гонадонска	C 20:1 n-9
еручна	C 22:1 n-9
<b><i>Полинезасићене масне киселине/PUFA/</i></b>	
Линолна /LA/	C 18:2 n-6
γ-линолеинска /γLNA или GLA/	C 18:3 n-6
α-линоленска /αLNA или ALA/	C 18:3 n-3
дихомо γ-линоленска /DGLA/	C 20:3 n-6
еикосатриенска	C 20:3 n-9
арахидонска /AA/	C 20:4 n-6
еикосапентаенска /EPA/	C 20:5 n-3
докосатетраенска	C 22:4 n-6
докосапентаенска	C 22:5 n-6
докосахексанска /DHA/	C 22:6 n-3



Према геометријској изомерији масне киселине се могу појавити у цис и транс облику у зависности од положаја молекула водоника на истој или супротним странама двоструке везе. Незасићене масне киселине у природи су скоро увек цис конфигурације и садрже 18 до 24 C атома (82, 83). Транс масне киселине се у природи налазе само у млеку и месу преживара, а и ту у малој количини. Већина транс масти присутних у храни су индустријске масти и добијају се делимичном хидрогенизацијом биљних уља (85). Веома су штетне по здравље, а чест су састојак индустријских производа, пре свега маргарина. Због негативних утицаја на здравље, многе земље су увеле законско ограничење количине транс масних киселина у намирницама.

Масне киселине се у организму налазе у неестерификованом, слободном стању или естерификоване. Само се 5% масних киселина налази у слободном облику и транспортују се углавном реверзибилно везане за албумине (86). Концентрација дуголанчаних слободних масних киселина у серуму је око 200 до 600  $\mu\text{mol/l}$ . Ова вредност се значајно повећава у сепси, дијабетесу и малигним болестима.

Естерификоване масне киселине чине 95% масних киселина у циркулацији и то у облику триглицерида, фосфолипида, холестерол естара, а транспорт ових материја обавља се путем липопотеина (82).

#### **1.4.2 ЕСЕНЦИЈАЛНЕ МАСНЕ КИСЕЛИНЕ**

Есенцијалне масне киселине (*Essential fatty acids* - EFA) се не могу синтетисати у људском организму и њихова концентрација зависи искључиво од уноса путем хране. У ову групу спадају алфа линолеинска киселина (ALA 18:3 n-3) и линолна киселина (LA 18:2 n-6). ALA и LA су прекурсори за биосинтезу свих осталих масних киселина n-3 и n-6 серије, а за синтезу дуголанчаних PUFA одговорни су ензими десатураза  $\Delta 5$  и  $\Delta 6$ , као и елонгаза (Ело-2, Ело-4 и Ело-5).

ALA се налази у многим биљним производима, у соји, у семену лана и чије, орасима и у зеленом поврћу (87-89). LA се налази у уљима кукуруза, шафрана, сунцокрета као и у животињском месу (90, 91). Осим њих, условно есенцијалне масне киселине су дуголанчане полинезасићене масне киселине еикосапентаенска (EPA 20:5 n-3) и докосахекаенска киселина (DHA 22:6n-3), које се могу синтетисати из ALA, али је та синтеза недовољна у односу на потребе

организма за овим n-3 PUFA. EPA и DHA се углавном налазе у рибљем месу и уљу, и то у скуши, туну и лососу, дакле у плавој риби Северног мора (64, 90).

### 1.4.3 ПУТЕВИ СИНТЕЗЕ МАСНИХ КИСЕЛИНА

У организму сисара масне киселине се могу синтетисати “*de novo*”, што се назива липогенеза, или се може вршити продужење и/или десатурација ланца већ постојећих масних киселина.

Липогенеза се врши у цитосолу ћелија и то превасходно у ћелијама јетре, бубрега, мозга, плућа, млечне жлезде и масног ткива. Продужење масних киселина са већим бројем C атома од 16, одвија се у микрозомима и митохондријама ћелија наведених ткива. Основни супстрат и почетни молекул за овај процес је ацетил-коензим А (Ac-CoA), који може настати на три начина:

- Разградњом аминокиселина;
- $\beta$ -Оксидацијом масних киселина;
- Из пирувата насталог гликолизом.

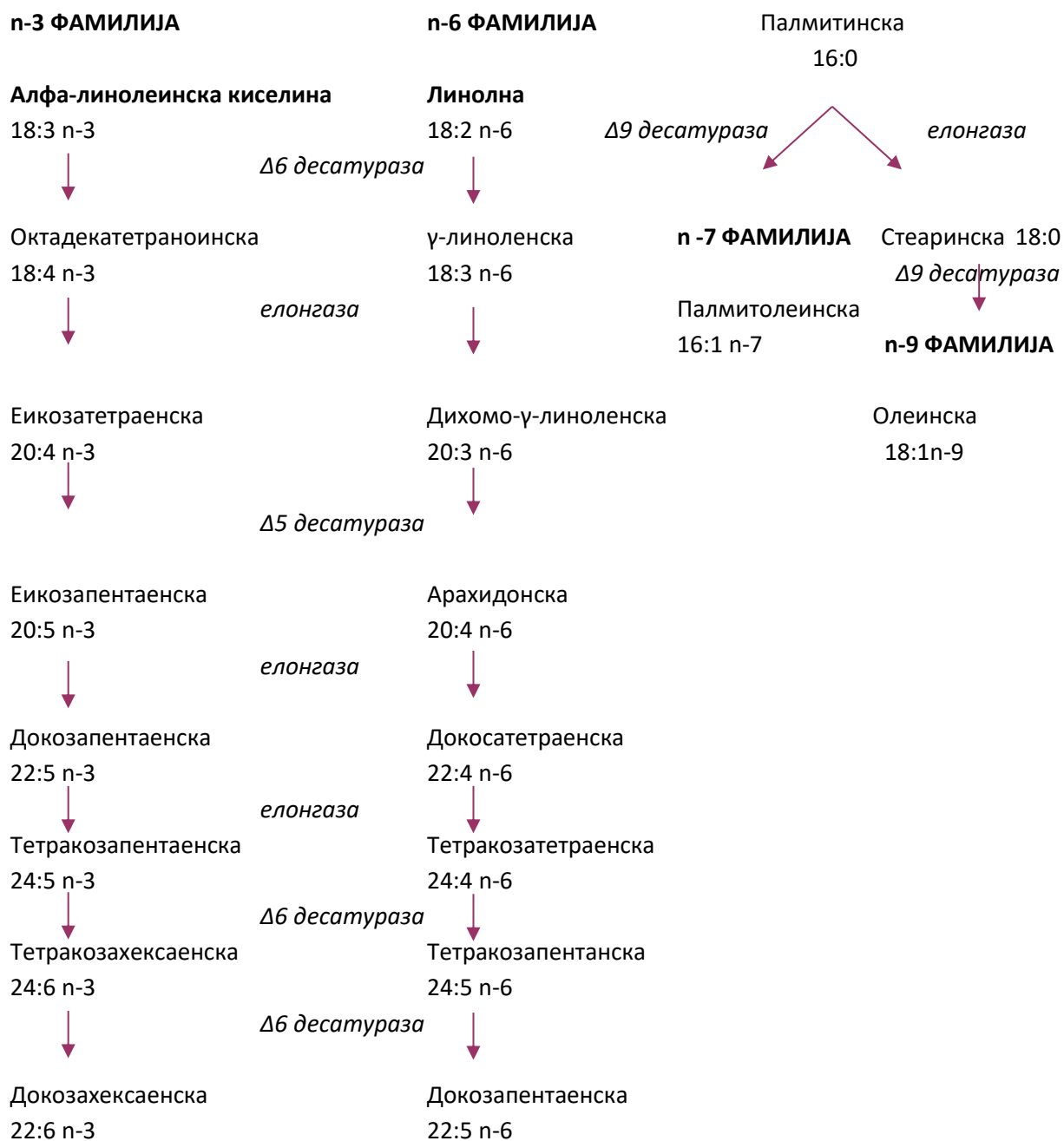
Као производ гликолизе, пируват се налази у цитосолу, одакле прелази у митохондрије и под дејством пируват дехидрогеназе настаје Ac-CoA (83). Ac-CoA који настаје оксидацијом масних киселина и пирувата нема могућност проласка кроз митохондријалну мембрану. Зато се у митохондријама везује са оксалацетатом и формира цитрат, који онда прелази у цитосол. Ензим АТФ-цитратна липаза у цитосолу преводи овај молекул поново у Ac-CoA, из кога деловањем карбоксилазе настаје малонил-CoA.

Сукцесивним понављањем процеса карбоксилације, редукције и дехидрације долази до продуживања ацил-остатака до максималних 16 угљеникових атома а уз утрошак енергије. Тако настаје палмитоил-CoA који делује инхибиторно на иницијални ензим Ac-CoA карбоксилазу, и из кога се под дејством тиоестеразе ослобађа палмитат (83). Ензими који учествују у синтези масних киселина до 16 C-атома повезани су у један полипептидни ланац од 7 домена, који се назива синтаза масних киселина (*engl. Fatty acid synthase* - FAS). Доказано је да се функција FAS значајно мења код малигних болести (92).

Синтеза масних киселина са већим бројем С- атома одвија се у ендоплазматском ретикулуму, најчешће у микрозомима јетре. За ову синтезу неопходна је адекватна функција јетре и добар нутритивни статус. Елонгација масних киселина је четворостепени процес. Прво се масна киселина преводи у ацил-СоА, који потом реагује са малонил-СоА и путем редукције, дехидрогенизације и поновне редукције долази до продужења постојећег ланца. Ензим одговоран за ову фазу синтезе масних киселина је елонгаза (93).

У микрозомима се налазе и системи десатураза који су одговорни за стварање двоструких веза у молекулима масних киселина. У организму сисара постоје три типа десатураза и то  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  и  $\Delta 5$ . Под дејством десатураза настају незасићене масне киселине, и то мононезасићене и полинезасићене масне киселине фамилија n-3, n-6 и n-9. У основи  $\Delta 9$  десатураза је одговорна за биосинтезу MUFA (16:1 и 18:1), док друге две десатуразе катализују синтезу PUFA n-3 и n-6 серије. Добијене масне киселине су метаболити палмитинске, LA и ALA (94, 95).

Схематски приказ процеса десатурације и елонгације и улога ензима у различитим фазама процеса, дат је на Слици 9.



**СЛИКА 9.** Схематски приказ биосинтезе масних киселина

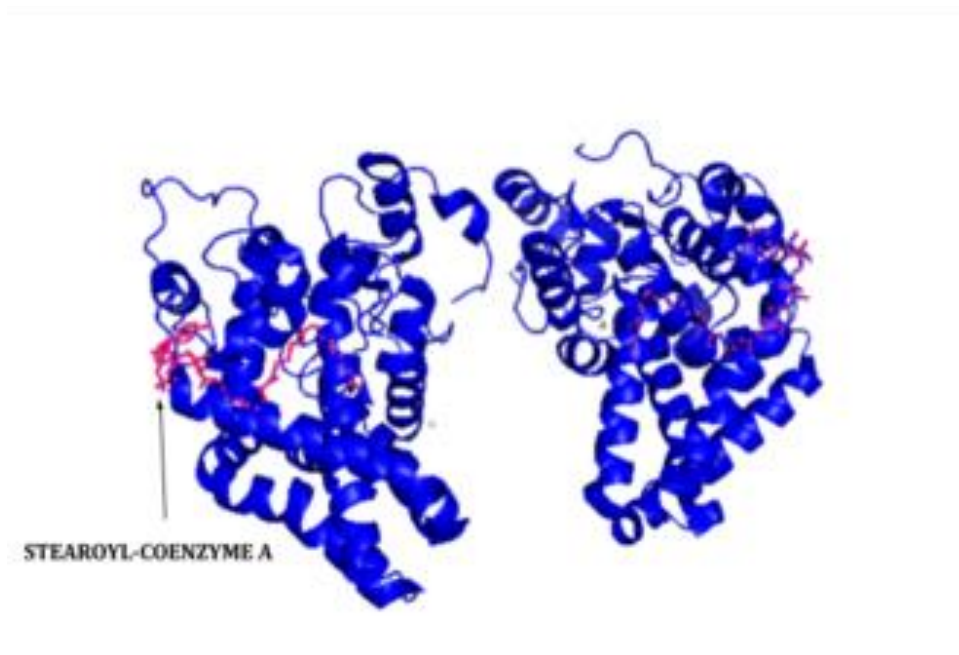
#### 1.4.4 ДЕСАТУРАЗЕ И ЕЛОНГАЗА

Ензими задужени за синтезу масних киселина из прекурсора су елонгаза и десатуразе. Десатуразе уводе двоструку везу између тачно одређених угљеникових атома у маснокиселинским ланцима, и у зависности од тог места настају n-3, n-6 или n-9 моно- и полинезасићене масне киселине. У ткивима сисара постоје  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  и  $\Delta 9$  десатуразе. Дуго се сматрало да и сисари имају  $\Delta 4$  десатуразу, која је задужена за синтезу докозахексаенске киселине, тако да се тај податак и даље може наћи у старијој литератури, међутим последњих година се зна да сисари немају ову десатуразу, већ њену улогу врши  $\Delta 6$  десатураза (96).

##### 1.4.4.1 Стеароил-СоА десатураза - $\Delta 9$ десатуразе

Синтезу мононезасићених масних киселина обавља  $\Delta 9$  десатураза. Овај ензим се назива и стеароил-СоА десатураза (SCD), и он конвертује засићене масне киселине (било унете храном или синтетисане *de novo*) у MUFA.  $\Delta 9$  десатураза катализира увођење двоструке *cis*- $\Delta 9,10$  везе у ацил-СоА са 12-19 угљеникових атома, првенствено у палмитоил-СоА и стеароил-СоА (97).

Биолошку активност ензим постиже као димер. Структура ензима као и активно место за његов главни лиганд – стеароил- СоА, приказани су схематски на Слици 10.



**СЛИКА 10.** Структура Стеароил-КоА десатуразе ( $\Delta 9$  десатуразе) и активно место за везивање Стеароил-КоА.

Будући да је мерење активности  $\Delta 9$  десатуразе веома комплексно, као индикатори активности у литератури се користе односи производа и прекурсора реакције коју катализира овај ензим. Тако је однос између палмитолеинске и палмитинске киселине ( $16:1n-7 / 16:0$ ) мера за десатурациони индекс  $n-7$ , док је однос олеинске и стеаринске киселине ( $18:1n-9 / 18:0$ ) десатурациони индекс  $n-9$ . Подаци из *in vitro* студија, као и анималних и хуманих студија показују да десатурациони индекси са добром прецизношћу рефлектују експресију SCD-1 гена, који кодира полипептидни ланац  $\Delta 9$  десатуразе (98, 99). Корелација између десатурационих индекса и стварне активности  $\Delta 9$  десатуразе је посебно јака у адипозном ткиву и јетри здравих особа. Такође, показано је да висок индекс десатурације у плазми значајно корелира са гојазношћу, хиперлипидемијом, метаболичким синдромом, и ризиком од малигнитета (98, 99).

$\Delta 9$  десатураза је потенцијални таргет за циљано терапијско деловање. Студије на *knock-out* мишевима, којима је недостајао ген за  $\Delta 9$  десатуразу, указале су да смањење активности овог ензима може ефикасно да превенира настанак гојазности, масне јетре

и инсулинске резистенције (96, 100). Фармаколошки агенси који инхибирају активност  $\Delta 9$  десатуразе имају велики потенцијал и као антитуморски терапеутици. Запажено је да је активност овог ензима повећана код неколико ћелијских линија различитих канцера, као и у многим хуманим карциномима. У складу са тим, инхибиција  $\Delta 9$  десатураза смањује степен преживљавања и пролиферације ћелија канцера, инвазивност и ширење тумора. Активост  $\Delta 9$  десатуразе је од кључног значаја за преживљавање липотоксичног стреса индукованог високим нивоима SFA (96, 100).

#### 1.4.4.2 $\Delta 6$ десатураза

Десатуразе се експримирају у многим ткивима, а највиши ниво експресије је у јетри. Десатуразе сисара  $\Delta 6$  и  $\Delta 5$  уводе двоструку везу између већ постојеће двоструке везе, нпр. у MUFA, и карбоксилног краја масне киселине. Гени који кодирају десатуразе  $\Delta 5$  и  $\Delta 6$  су FADS1 и FADS2 и налазе се на 11. хромозому. На истом хромозому је и ген FADS3, али функција ензима кодираног FADS3 још увек није позната (101, 102).

Супстрат за  $\Delta 6$  десатуразу сисара су следеће масне киселине: LA, ALA, тетракозапентаенска киселина (24:5 n-3), тетракозатетраенска (24:4 n-6) и палмитинска киселина (16:0), као што је приказано на Слици 9. Први корак у процесу биосинтезе дуголанчаних PUFA је конверзија ALA у октадекатетраноинску киселину (18:4n-3), односно LA у  $\gamma$ -линоленску киселину (18:3 n-6), а ове процесе катализира  $\Delta 6$  десатураза (Слика 9). Овај ензим уједно одређује брзину елонгације/десатурације целог процеса синтезе PUFA. Десатурацијом тетракозапентаенске и тетракозатетраенске киселине формирају се производи који се у последњем кораку биосинтезе, у пероксизомима преводе у докозахексаенску киселину (22:6 n-3, DHA) и докозапентаенску киселину n-6 фамилије (22:5 n-6, DPA). DHA је од круцијалног значаја за нормалан развој мозга, ока и других органа, затим за бројне физиолошке функције организма, укључујући имуни одговор, па се претпоставља да се DHA потребна за ћелијске функције непосредно након синтезе уграђује у мембранске фосфолипиде, док се остатак оксидује у пероксизомима (96, 102).

Иако су основни супстрат за  $\Delta 6$  десатуразу LA и ALA, дакле PUFA, у лојним жлездама  $\Delta 6$  преводи палмитинску киселину у палмитолеинску. Палмитолеинска

киселина (16:1 n-7) је најзаступљенија масна киселина у хуманом себуму, што сугерише да специфичност  $\Delta 6$  десатуразе зависи од тога у ком типу ћелија се експримира.

#### 1.4.4.3 $\Delta 5$ десатураза

Десатураза  $\Delta 5$  катализује трансформацију дихомо- $\gamma$ -линоленске киселине (DGLA, 20:3 n-6) у арахидонску киселину, док у случају n-3 серије, овај ензим преводи еикозатетраенску киселину (20:4 n-3) у еикозапентаенску -EPA (слика 9). Мишеви са дефицијентним FADS2 геном, дакле без  $\Delta 5$  десатуразе, имају повећану концентрацију DGLA у фосфолипидима (96, 102). Као мера активности  $\Delta 5$  десатуразе користи се однос AA и DGLA, и студије показују да је овај однос у плазми и скелетним мишићима у корелацији са инсулинском резистенцијом. Недавна студија пресека утврдила је да је индекс десатурације  $\Delta 5$  десатуразе у еритроцитима већи код гојазних особа које имају нормалну осетљивост на инсулин него код инсулин резистентних гојазних особа. Сем тога, суплементација исхране производима на бази сојиних протеина и лецитина код особа са дијабетесом типа 2 и придруженим хиперлипидемијама, резултовала је не само побољшањем гликорегулације, већ истовремено порастом индекса активности  $\Delta 5$  десатуразе (103). Међутим, још увек није разјашњено да ли је промена активности десатураза узрок или последица промена осетљивости на инсулин. У складу са овим резултатима су и налази из епидемиолошких студија вишегодишњег праћења пацијената, који су установили реверзну асоцијацију индекса активности  $\Delta 5$  десатуразе, са ризиком од настанка дијабетеса (104).

Иако су запажене промене у активности  $\Delta 5$  десатуразе и у неким канцерима, улога овог ензима у настанку и развоју малигнух болести и даље је непозната.

#### 1.4.4.4 Елонгаза

Процес продужавања маснокиселинског ланца додавањем два атома угљеника назива се елонгација масних киселина, и ову реакцију катализују ензими елонгазе. До сада је идентификовано 7 елонгаза (Ело 1-7). Већина елонгаза као супстрат користи SFA и/или MUFA (Ело-1, 3, 4, 6, 7), док су Ело- 2, 4 и 5 укључене у метаболизам PUFA (96). Као



и у случају десатураза, испитивања функције елонгаза вршена су на анималном моделу мишева са дефицијентним геном за елонгазе. Животиње којима недостаје Ело-5 редовно развијају масну јетру, па се претпоставља да је акумулација супстрата за Ело-5 један од могућих разлога за настанак масне јетре. У јетри мишева без Ело-5 повећана је елонгација АА и ЕРА активацијом Ело-2 и претпоставља се да је то компензаторни механизам за смањење нивоа DHA (105). Ело-4 катализује елонгацију PUFA у ретини, мозгу, кожи и тестисима, док мутације и делеције у региону гена за Ело-4 доводе до дегенерације макуле.

#### **1.4.5 БИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ МАСНИХ КИСЕЛИНА**

Маснокиселински састав ФЛ ћелијске мембране и количина холестерола одређују њену флуидност и пропустљивост, што даље утиче на активност ензима и транспортни систем мембране, а посредно и на ћелијски раст и пролиферацију (63, 106).

Промене у релативном саставу липида ћелије, као и у биолошким течностима, потенцијални су биомаркери различитих обољења, укључујући карциноме (66). Различите студије су показале да се фосфолипиди и њихови деградациони производи разликују у здравој и оболелој ћелији, што значајно утиче на пропустљивост ћелијске мембране (69). Такође, постоје истраживања која показују разлику у саставу липида плазме између здравих особа и оболелих од карцинома (74, 107).

Полинезасићене масне киселине n-3 групе могу значајно утицати на очување здравља или настанак болести. Оне утичу на развој плода, на појаву кардиоваскуларних обољења, на ментално здравље и развој малигних обољења. Масне киселине n-3 фамилије улазе у састав фосфолипида ћелијске мембране и утичу на инфламацију, агрегацију тромбоцита, као и на вазоконстрикцију или дилатацију крвних судова (108). Фосфолипиди имају два места за везивање масних киселина. На једно су везане засићене масне киселине а за друго место се везују компетитивно моно и полинезасићене масне киселине. Бројне студије показују да су палмитинска киселина (16:0) и линолна киселина (18:2n-6) најзаступљеније у фосфолипидима плазме. Незасићене масне киселине дугих ланаца n-3 групе се налазе у много мањој количини

што утиче на процес ензимске сигнализације и на процес инфламације. Данас се сматра да је добар однос n-3 и n-6 масних киселина 1:2 до 1:4 (109).

Полинезасићене масне киселине n-3 серије (EPA и DHA) на неколико начина испољавају повољан утицај на оболеле од карцинома:

1. Могу супримирати факторе раста, као што је васкуларни ендотелни фактор раста, што инхибира процес ангиогенезе, неопходан за раст тумора (65).
2. Инхибирају продукцију азот монооксида који је такође неопходан у процесу ангиогенезе.
3. Могу повољно утицати на одговор на хемиотерапију појачањем цитотоксичног транспорта и оксидативног стреса (110).

Удео EPA у фосфолипидима плазме и еритроцита код здравих особа зависи од уноса храном и од ендогеног метаболизма особе, и значајно је већи код здравих особа у односу на пацијенте оболеле од карцинома (111-113). Такође исхрана богата EPA спречава губитак телесне масе и утиче на дужину преживљавања код пацијената са карциномском кахексијом (114, 115).

## 1.5 Исхрана и канцер

Начин живота, укључујући исхрану и пушење, дуго се повезује са развојем карцинома. Опсервационе епидемиолошке студије су пријавиле значајне корелације између дијетарних навика и инциденци неколико врста канцера (116). Пошто се ови фактори ризика могу модификовати, промене у начину живота могу смањити ризик од малигнитета и побољшати ефекат лечења неких врста тумора.

Најновије препоруке за превенцију канцера подразумевају већи унос воћа, поврћа, интегралних житарица и орашастих плодова, са малим количинама црвеног меса, без месних прерађевина и са ограниченим уносом соли. Поред тога, здрава исхрана подразумева избегавање заслађених напитака и ограничен унос алкохола и енергетски богате хране, чиме доприноси постизању и одржавању пожељне телесне масе. Познато је, наиме, да је и гојазност фактор ризика за неке врсте карцинома (117).

Ове препоруке су у складу са резултатима велике Европске проспективне студије о вези исхране и канцера (*European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer - EPIC*), која је испитивала везу између инциденце малигнитета и начина живота по препорукама Светске фондације за истраживање канцера и Америчког института за истраживање канцера. Резултати студије су показали да особе које живе у складу са препорукама имају 34% мањи ризик од обољења и смрти од канцера у односу на популацију која не живи у складу са препорукама (118, 119).

Односи између исхране и настанка карцинома су сложени. Многе дијететске компоненте се свакодневно конзумирају широм света, али количине биоактивних компоненти унутар одређене хране могу се значајно разликовати, и самим тим имати различите ефекте на карциногенезу (120). Свака биоактивна супстанца појединачно може да утиче на различите фазе настанка и развоја малигнитета, али и комбинације супстанци могу утицати на реакцију ћелија (117). Због тога је утицај исхране вероватно комбинација ефеката макро- и микронутријената на неколико путева који су укључени у развој канцера.

Повећан ризик од неких типова карцинома је повезан са прекомерним уносом калорија и са гојазношћу, а експерименталне студије показале су да рестрикција калоријског уноса супримира карциногенезу. Иако механизми који повезују исхрану и канцерогенезу још увек нису разјашњени, они могу укључивати хроничну инфламацију, оксидативни стрес, инсулинску резистенцију, промене у метаболизму полних хормона и повећање производње цитокина у адипозном ткиву (121). Исхрана богата простим угљеним хидратима може условити карциногенезу повећањем оксидативног стреса, повећањем синтезе инсулина и стварањем адипозног ткива које је извор инфламаторних цитокина (122). Са друге стране, исхрана може имати и анти-канцерогене ефекте, посебно код људи који су изложени другим канцерогенима из окружења (123). Важно је зато упоредити дијетарне навике код оболелих од карцинома са навикама здравих људи истог животног доба.

### **1.5.1 ПРЕПОРУКЕ ЗА УНОС МАСТИ**

По препоруци Светске здравствене организације дневни унос масти не треба да буде већи од 30% дневних енергетских потреба. Мање од 10% тог уноса треба да чине засићене масне киселине. Полинезасићене масне киселине (PUFA) би требало да чине 6 до 10% дневног енергетског уноса. Препоручени однос n-6 / n-3 PUFA у дијетарном уносу је 2-4 : 1 (124). Унос холестерола требало би да буде ограничен на 300 mg.

### **1.5.2 САВРЕМЕНА ИСХРАНА**

Савремена исхрана најчешће се на уклапа у препоручене оквире. Повећано конзумирање хране животињског порекла, маргарина и биљних уља, узрок је високог уноса засићених и транс масних киселина и дисбаланса n-6 и n-3 масних киселина. У развијеним земљама однос n-6 / n-3 PUFA износи 20-30 :1.

Данашњи начин исхране карактерише се малим уносом зеленог поврћа, коштуњавог воћа и плодова мора (рибе, ракови, шкољке), што су главни извори благотворних n-3 PUFA, а великим уносом сунцокретовог, кукурузног и сојиног уља, која су богати извори проинфламаторних n-6 PUFA.

### **1.5.3 ИСХРАНА КАО ФАКТОР РИЗИКА ЗА КАРЦИНОМ ПЛУЋА**

Познато је да је пушење највећи фактор ризика за настанак канцера плућа. Дим цигарета садржи бројне активне кисеоничне и азотне врсте, које индукују оксидативна оштећења ДНК ланца и тако делују проканцерогено (125). Са друге стране, антиоксиданти из хране, као што су каротеноиди, витамини Е, Ц и други, „хватају“ слободне радикале и тиме спречавају оштећења ДНК узрокована пушењем. То указује да адекватна исхрана може да заштити од канцера плућа чак и вишегодишње пушаче. Потенцијално протективан ефекат воћа и поврћа показан је у неколико кохортних

студија (126), мада има и студија које нису показале овакав ефекат (80). Велика студија спроведена у Кини је показала инверзну асоцијацију између уноса поврћа богатог каротеноидима и канцера плућа (127). У другој мултиетничкој студији уочена је инверзна корелација између концентрације каротена у циркулацији и канцера плућа код мушкараца, али не и код жена (128). Ипак, друге дијетарне компоненте су мање испитиване, те је питање улоге исхране у настанку и развоју карцинома плућа и даље отворено.

## **2. ЦИЛЬ РАДА**

Општи циљ рада је испитивање уноса, статуса и улоге полинезасићених масних киселина код пацијената са ситноћелијским и неситноћелијским карциномом плућа.

Сагласно општем циљу постављени су следећи **задачи**:

1. Одредити дијетарни унос енергије и макронутријената методом валидираних дијетарних упитника;
2. Одредити дијетарни унос микронутријената методом валидираних дијетарних упитника;
3. Одредити дијетарни унос масних киселина методом валидираних дијетарних упитника;
4. Одредити профил масних киселина у фосфолипидима плазме пацијената са NSCLC и SCLC карциномом плућа;
5. Одредити профил масних киселина у фосфолипидима плазме условно здравих испитаника (контролна група);
6. Одредити процењену активност десатураза и елонгазе у фосфолипидима плазме пацијената са ситноћелијским и неситноћелијским карциномом плућа;
7. Одредити процењену активност десатураза и елонгазе у фосфолипидима плазме условно здравих испитаника;
8. Одредити профил масних киселина у малигном и здравом ткиву пацијената са неситноћелијским карциномом плућа;
9. Одредити профил масних киселина у малигном и здравом ткиву пацијената са ситноћелијским карциномом плућа;
10. Одредити процењену активност десатураза и елонгазе у фосфолипидима здравог ткива пацијената са ситноћелијским и неситноћелијским карциномом плућа;
11. Одредити процењену активност десатураза и елонгазе у фосфолипидима малигног ткива пацијената са ситноћелијским и неситноћелијским карциномом плућа;
12. Упоредити профиле масних киселина у плазми и ткиву пацијената са неситноћелијским карциномом плућа;

13. Упоредити профиле масних киселина у плазми и ткиву пацијената са ситноћелијским карциномом плућа;
14. Утврдити повезаност дијетарног уноса и статуса масних киселина у фосфолипидима плазме код пацијената са ситноћелијским и неситноћелијским карциномом плућа.



# **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1 Време и место истраживања

Студија је проспективна и изведена је у Клиничко болничком центру „Бежанијска Коса“ у Београду и у Центру изузетних вредности за истраживања исхране и метаболизма Института за медицинска истраживања у Београду, у периоду од јуна 2015. до септембра 2016. године. Истраживање је планирано као студија пресека.

### 3.2 Испитаници

У студију су ушли болесници оболели од карцинома плућа који су дијагностиковани и лечени у КБЦ „ Бежанијска Коса“.

Критеријуми за укључење у студију били су:

- Патохистолошки потврђен новооткривени ситноћелијски и неситноћелијски карцином плућа;
- Потписан информисани пристанак.

Критеријуми за искључење из студије:

- Друге врсте карцинома плућа осим SCLC и NSCLC;
- Метастатски карциноми плућа;
- Присуство канцера других органа;
- Присуство других значајних метаболичких обољења;
- Инфаркт миокарда у последњих 6 месеци пре укључења у студију;
- Акутна обољења јетре или бубрега;
- Узимање статина и других лекова који могу значајно да утичу на метаболизам липида;
- Узимање суплемената рибљег уља, уља од жутог ноћурка и осталих суплемената који утичу на статус масних киселина;
- Лош перформанс статус (ECOG scor мањи од 1).

Процењујући ове критеријуме у студију су ушла 72 пацијента. Контролну групу чинило је 70 условно здравих људи приближних демографских карактеристика.

## 3.3 Клиничка методологија

### 3.3.1 ОПШТИ ПРЕГЛЕД

Болесници су по доласку у болницу најпре потписивали информисани пристанак за учешће у студији. Сваком болеснику узета је детаљна анамнеза, укључујући и социоепидемиолошке податке о пушачкој навици, кроз одређивање индекса пакло/година. Значајан је био податак из личне анамнезе о придруженим обољењима. Детаљним клиничким прегледом утврђивали смо опште стање болесника (Eastern Cooperative Oncology Group-ECOG scor).

Болесницима је узимана крв за рутинске лабораторијске тестове: комплетну крвну слику и биохемију. Анализа триглицерида, холестерола, ХДЛ холестерола, протеина и ЦРП-а одређивана је из серума на биохемијском анализатору COBAS C-501. ЛДЛ-холестерол је такође одређиван директно за вредност триглицерида веће од 4,0 mmol/l, а уколико је вредност триглицерида била мања од 4,0 mmol/l, вредност ЛДЛ холестерола се израчунавала на основу формуле по Friedewald-у (129). Такође је рађен биохемијски преглед урина.

Део плазме је упућиван у Центар изузетних вредности за истраживања исхране и метаболизма Института за медицинска истраживања у Београду, ради одређивања статуса масних киселина у фосфолипидима плазме.

### 3.3.2 ДИЈЕТАРНИ УНОС

Болесник је потом самостално попуњавао валидирани упитник о учесталости конзумирања намирница (Food Frequency Questionnaire /FFQ ), у присуству компетентног дијетотерапеута (130). За попуњавање упитника било је потребно између 30 и 40 минута. Упитник се састоји од 142 питања која се односе на 90 врста намирница класификованих у одговарајуће групе, укључујући суплементе. Групе су подељене на: млеко и млечни

производи, месо и месне прерађевине, риба и јаја, масти и уља, житарице, воће и поврће, орашasti плодови, брза храна и напаци. Болесници су одговарали на питања о својим навикама у исхрани узимајући у обзир последња три месеца. За сваку намирницу болесник је дефинисао просечну учесталост узимања за одређени период, а која се кретала од „никад“ до „свакодневно“. Пример упитника који су болесници попуњавали је приложен као суплементни материјал ове докторске дисертације.

Први део упитника је општи упитник са питањима о животним навикама, о пушењу, конзумирању алкохола, кафе и чаја, као и о дијететским суплементима. Други део се састоји од питања која се односе на одређене групе намирница, а то су млечни производи, месо и риба, уља и масти, житарице, поврће, воће, јаја, грицкалице, житне пахуљице и мусли и витамински напаци. Трећи део упитника се односи на величину порција која је приказана фотографијама, уз могућност да болесник упише величину порције у грамима. Након завршетка попуњавања упитника стручно лице (дијетотерапеут) је проверавало да ли су дати прецизни одговори на сва питања из упитника.

Количина конзумираних намирница трансформисана је у вредности просечног дневног уноса израженог у грамима (131). Уз помоћ електронске базе о саставу намирница нашег поднебља (Food Composition DataBase, FCDB), израчунаван је дневни енергетски унос и унос макро и микронутријената (132).

### **3.3.3 БАЗА ПОДАТАКА О САСТАВУ НАМИРНИЦА**

Електронска база података о нутритивном саставу намирница у нашој земљи садржи 1144 намирнице са нашег подручја које су подељене по групама према Lanqual класификацији (133). За сваку намирницу доступни су подаци о њеним макро и микронутријентима уз опис метода које су коришћене за њихову анализу. Lanqual шифрарник је нов, посебно дизајниран и стандардизован. Циљ је да све базе података о саставу намирница буду усклађене са овим шифрарником што би омогућило једноставније и униформније претраживање. Репрезентативни пример базе података о нутритивном саставу намирница у Србији, приказан је на Слици 11. Такође, за сваку

намирницу постоји детаљан opis свих макро и микро нутријената који улазе у састав дате намирнице, и један такав пример може се видети на Слици 12.

The screenshot shows the EuroFIR FOODS database interface. It features a table with columns for CODE, NAME, NAME (ENGLISH), FOOD GROUP, PIECE WEIGHT, and BAR CODE. The table lists various food items such as almonds, fruit candy, buckwheat flour, jam, apples, egg yolk, liver pate, cocoa powder, coffee, peanuts, caraway seeds, plum compote, cognac, cornflakes, yeast, liqueur, hazelnut, and watermelon. To the right of the table is a photo of almonds. Below the table are buttons for INSERT, EDIT, DELETE, PRINT, STANDARD VOCABULARIES, SEARCH, DATA STATISTICS, and DATA BACKUP.

CODE	NAME	NAME (ENGLISH)	FOOD GROUP	PIECE WEIGHT	BAR CODE
0018	Badem oljusteni suvi	Almonds, blanched, dried	FRUIT OR FRUIT PRODUCT	100.0000	
0049	Bomboni vocni	Fruit candy	SUGAR OR SUGAR PRODUCT	100.0000	
0061	Heljдино brasno	Buckwheat flour, whole-goat	GRAIN OR GRAIN PRODUCT	100.0000	
0147	Dzem	Jam	SUGAR OR SUGAR PRODUCT	100.0000	
0250	Jabuka cela	Apple, whole, raw	FRUIT OR FRUIT PRODUCT	90.0000	
0257	Jabuka-mesnati deo	Apple, flesh, raw	FRUIT OR FRUIT PRODUCT	77.0000	
0280	Jaje kokosije-zumance	Egg yolk, raw, fresh	EGG OR EGG PRODUCT	100.0000	
0298	Jetrena pasteta	Pate, liver, canned	MEAT OR MEAT PRODUCT	100.0000	
0314	Kakao u prahu, nezaseceren	Cocoa powder, no suger added	BEVERAGE (NON-MILK)	100.0000	
0328	Kafa instant	Coffee, instant	BEVERAGE (NON-MILK)	100.0000	
0354	Kikiriki, sirov, nesoljeni	Peanut, raw, without salt	NUT, SEED OR KERNEL PRODUCT	69.0000	
0357	Kim, sive semenke	Caraway seeds, dried	MISCELLANEOUS FOOD PRODUCT	100.0000	
0418	Kompot od sljiva sa kosticom	Compote, plum, whole fruit ston	FRUIT OR FRUIT PRODUCT	90.0000	
0422	Konjak	Cogac	BEVERAGE (NON-MILK)	100.0000	
0495	Kukuruzne pahuljice, Kornfleks	Cornflakes	GRAIN OR GRAIN PRODUCT	100.0000	
0508	Kvasac pekarski, svez	Yeast, baker's, raw	MISCELLANEOUS FOOD PRODUCT	100.0000	
0518	Liker	Liqueur	BEVERAGE (NON-MILK)	100.0000	
0532	Lesnik suvi	Hazelnut, dried	FRUIT OR FRUIT PRODUCT	50.0000	
0540	Lubenica, mesnati deo	Watermelon, flesh, raw	FRUIT OR FRUIT PRODUCT	50.0000	

СЛИКА 11. Пример дела Српске базе података о саставу намирница.

VALUE	METHOD	REFERENCE	RETENTION FACTORS
<i>Analytical Statistics</i>			
COMPONENT GROUP	Energy	1.1.1	No OF VALUES
COMPONENT*	energy, total metabolisable; calculated from	ENERC	ANALYTICAL PORTION SIZE
VALUEID	0018_02		No. OF ANALYTICAL PORTION REPLICATES
SELECTED VALUE	581.0000		MEAN
UNIT*	kilocalorie	kcal	MEDIAN
MATRIX UNIT	per 100g edible portion	W	MINIMUM
ACQUISITION TYPE*	Food composition table	F	MAXIMUM
DATE OF GENERATION	06.06.2010		STANDARD DEVIATION
DATE OF EVALUATION	10.07.2009		STANDARD ERROR
VALUE TYPE*	value type not known	X	

\* Fields marked with \* are MANDATORY type and MUST BE FILLED

**СЛИКА 12.** Вредности енергије и појединачних нутријената за сваку намирницу из базе података.

### 3.3.4 УЗОРКОВАЊЕ ТКИВА

Сви болесници су, након процене општег стања, хемодинамског статутса, лабораторијских параметара и коагулационог статуса подвргнути инвазивној плућној дијагностици. На основу радиографског снимка плућа и мултислајсног скенера грудног коша одређивали смо одговарајући дијагностички поступак. Болесници су добијали локалну анестезију а затим им је урађена флексибила бронхоскопија, помоћу флексибилног бронхоскопа марке Olympus BF tip TE2 (радни канал ширине 2мм). Малим клештима узиман је патохистолошки узорак са места здраве слузнице бронха, а потом и са места туморске промене. Узорци из туморске промене упућени су на патохистолошки преглед у КБЦ „Бежанијска Коса“, ради одређивања врсте карцинома. Биоптирано ткиво са места без промене и са места туморске промене је замрзвано на  $-60^{\circ}\text{C}$ . Ови су узорци

касније анализирани у Центру изузетних вредности за истраживања исхране и метаболизма Института за медицинска истраживања у Београду.

### **3.3.5 АНАЛИЗА МАСНИХ КИСЕЛИНА ФОСФОЛИПИДА ПЛАЗМЕ И ТКИВА**

#### **3.3.5.1 Екстракција и раздвајање липидних фракција**

За екстракцију укупних липида плазме и ткива коришћена је смеша органских растварача хлороформ-метанол 2:1 (в/в). У 0,5 мл плазме уз снажно мућкање додато је 4,5 мл смеше хлороформ-метанол 2:1 (в/в) који садржи 50 мг бутилхидрокситолуена (БХТ), као антиоксиданса у 100 мл смеше растварача (134). Добијени липидни екстракт је пропуштен кроз натријум сулфат и упарен до сува. Суви пречишћен екстракт је растворен у 0.2 мл смеше хлороформ-метанол и коришћен за хроматографско раздвајање липидних класа (135).

На исти начин припремљени су и екстракти ткива, с тим што је 0.5 g узорка ткива хомогенизовано 15 минута са 1 мл смеше хлороформ-метанол 2:1 (в/в), након чега је додато још 2 мл исте смеше и остављено да се екстрахује 3 сата у фрижидеру.

Липидне класе су раздвојене једнодимензионом танкослојном хроматографијом (ТЛЦ), на силика гелу (GH<sub>600</sub>, MERCK Велика Британија), дебљине 0.5 мм. Укупни липидни екстракт плазме или ткива наносен је на претходно активiranу плочу. За развијање је коришћена смеша растварача петролетар-диетилетар-сирћетна киселина (87:12:1, в/в/в). Раздвојене фракције липида идентификоване су под УВ лампом (Слика 13). Са плоче су одвојене фосфолипидне фракције, масне киселине су естерификоване, а добијени метил естри су раздвајани гасно-течном хроматографијом (136).



**СЛИКА 13.** ТЛЦ хроматограм неутралних липида.

PL = фосфолипиди, DG = диацилглицероли, HOL = холестерол, TG = триацилглицероли, HOL-E = естри холестерола.

### 3.3.5.2 Метилација масних киселина

Естерификација масних киселина вршена је по модификованој методи трансестерификације (137). Фракција фосфолипида плазме и ткива естрахована је са одговарајућег слоја силика гела помоћу 1.5 ml хексана. Смеша је најпре третирана са 0.2 ml 2M NaOH у метанолу и термостатирана на 85°C 1 сат, а затим је додато 0.2 ml 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> у метанолу и термостатирана још 2 сата на 85°C. Након метилације охлађене епрувете су центрифугиране на 1860 x g, 15 минута, одвојен је хексански слој са метил естрима масних киселина и упарен до сува у струји азота.

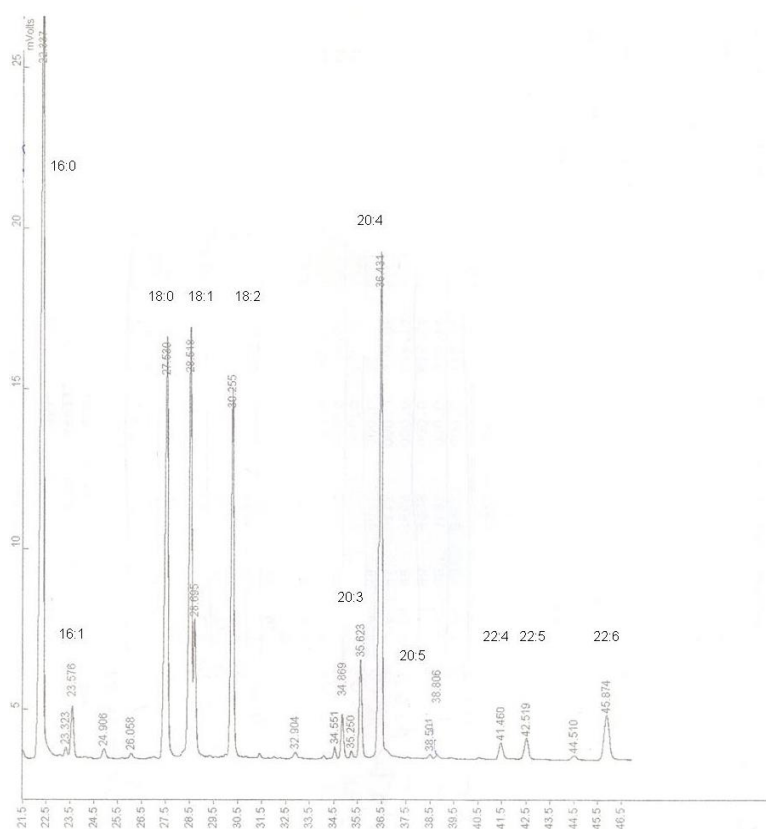
### 3.3.5.3 Анализа масних киселина гасно-течном хроматографијом

За анализу масних киселина коришћена је гасно-течна хроматографија (*Gas liquid chromatography* - GLC) на апарату SHIMADZU2014, Куото, Јапан, опремељена капиларном



колоном Rtx2330, RESTEC, USA, димензија 60 m и 0.25 mm. Дебљина филма стационарне фазе је 0.20  $\mu\text{m}$ . Проток носећег гаса (хелијума) био је 5 ml/мин, проток ваздуха 320 ml/мин, а водоника 30 ml/мин. Температура детектора била је 240°C а ињектора 220°C. Температура колоне са 140°C колика је била на старту, је подизана до 190°C, брзином 3°C/мину, а затим до 210°C брзином од 1°C/мин. Узорци припремљених метил-естара растворени су непосредно пре ињектовања у око 20  $\mu\text{l}$  хексана (зависно од количине сувог остатка), од чега је 1  $\mu\text{l}$  наносен на колону.

Масне киселине су идентификоване упоређивањем са хроматограмом стандарда масних киселина PUFA-2 стандард (Supelco, Inc., Bellefonte, Pa., USA). Резултати су изражени у процентима од укупно раздвојених масних киселина. Репрезентативни пример GLC хроматограма масних киселина фосфолипида плазме приказан је на слици 14.



**СЛИКА 14.** Репрезентативни хроматограм метил естара масних киселина раздвојених гасном хроматографијом.

#### 3.3.5.4 Процена активности десатураза и елонгазе

Одређивање активности система ензима за синтезу масних киселина, десатураза и елонгазе, уобичајено се врши из примарних података о уделу појединих масних киселина. Однос 20:4/20:3 је коришћен као процењена мера активности  $\Delta^5$ -десатуразе. Као мерило активности  $\Delta^6$ -десатуразе и елонгазне активности користи се однос 20:3/18:2, док вредност 18:1/18:0 показује процењену активност  $\Delta^9$ -десатуразе. Однос 18:0/16:0 је мера активности елонгазе (138).

### 3.4 Статистичка обрада резултата

У овој тези добијени резултати су обрађени помоћу статистичког пакета SPSS for Windows 23.0 (Чикаго, Илионис, САД), коришћењем дескриптивних и аналитичких статистичких метода. Резултати су приказани као апсолутни и релативни бројеви, мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана) и мере дисперзије (стандардна девијација, интервал). Од аналитичких метода коришћени су тестови разлике и анализа повезаности.

Код свих нумеричких варијабли најпре је испитиван тип дистрибуције (нормалност расподеле) Шапиро-Вилковим или Колмогоров-Смирновим тестом. У зависности од расподеле података, коришћени су параметарски и непараметарски тестови. У случајевима нормалне дистрибуције података, разлике међу групама су поређене Студентовим т-тестом, односно спареним т-тестом код поређења масних киселина у малигном и здравом ткиву истог болесника. За поређење варијабли које нису показале нормалну расподелу, коришћени су Ман-Витнијев У тест и Вилкоксон тест. За анализу повезаности коришћене су Пирсонова и Спирманова корелациона анализа. Као најнижи степен значајности узета је вредност вероватноће од  $p < 0.05$ .

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

## 4.1 Општи подаци

Ова студија пресека обухватила је 72 пацијента са карциномом плућа дијагностикованих и лечених у КБЦ „Бежанијска Коса“ у периоду од јуна 2015. до септембра 2016. године.

Испитивану групу чинило је 50 мушкараца и 22 жене. Просечна старост износила је 63 године, најмлађи пацијент имао је 46 година а најстарији 80 година.

Пушача је било 55, бивших пушача 7 а непушача 10, дакле група пацијената са пушачком навиком чинила је 86 % испитаника. У групи оболелих пушача највише је било оних који су пушили преко 30 пакло/година, чак 51 испитаник (Табела 4). Међу непушачима било је 6 пацијената оболелих од аденокарцинома и 4 пацијента оболела од сквамозелуларног карцинома.

**ТАБЕЛА 4:** Степен тежине пушачке навике оболелих

Пакло/година	≤30	30-50	≥50
Број испитаника	4	32	19

Контролну групу чинило је 70 здравих испитаника, 50 мушкараца, 20 жена, старости 47-76 година. У овој групи било је 34 пушача и бивших пушача, остало су чинили непушачи.

У испитиваној групи болесника, 45 особе боловале су од неситноћелијског карцинома – NSCLC а 27 је било оболелих од ситноћелијског карцинома плућа – SCLC. Међу пацијентима са NSCLC 16 их је имало аденокарцином, а 29 сквамозелуларни карцином. Већина испитаника била је у неком од одмаклих стадијума болести. У групи NSCLC чак су 42 (93%) болесника припадала III и IV стадијуму болести, а у групи оболелих од SCLC 21 (78%) пацијент је имао проширену болест (Табеле 5 и 6).

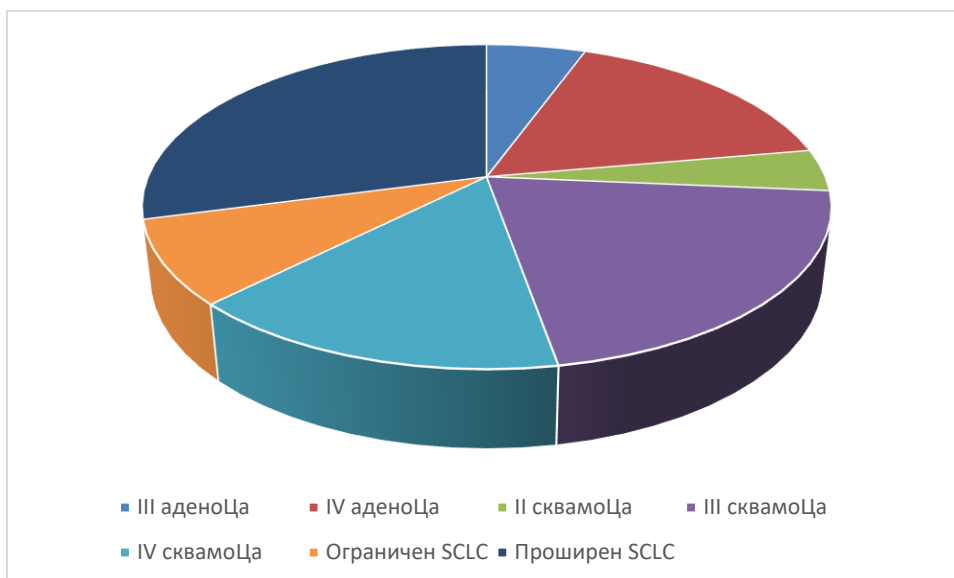
**ТАБЕЛА 5:** Клинички стадијуми оболелих од NSCLC

NSCLC		I	II	III	IV
	аденоЦа			4	12
	сквамоЦа		3	15	11

**ТАБЕЛА 6:** Клинички стадијуми оболелих од SCLC

SCLC	Ограничена болест	Проширена болест
	6	21

Графички приказ свих пацијената укључених у студију, подељених према типу канцера плућа и стадијуму, тј. проширености болести, приказан је на слици 15.



**СЛИКА 15.** Клинички стадијум пацијената са карциномом плућа укључених у студију.

## 4.2 Липидни профил серума и инфламаторни фактори

У групи болесника са NSCLC и SCLC поредили смо липидни састав серума и инфламаторне факторе. Испитивање нормалности показало је нормалну дистрибуцију код свих поређених параметара осим за триглицериде и ЦРП. Из тог разлога за упоређивање NSCLC и SCLC група је рађен Студентов Т тест, осим код триглицерида и ЦРП када је рађен Ман-Витнијев У тест. Резултати показују да пацијенти са SCLC имају статистички значајно више вредности триглицерида ( $p < 0.01$ ), док се вредности осталих липида серума и параметара инфламације не разликују, што је приказано у Табели 7.

**ТАБЕЛА 7:** Поређење вредности липидних и инфламаторних параметара у серуму пацијената са NSCLC и SCLC

Назив	NSCLC (n=45)	SCLC (n=27)
Хол	4,62±1,06	4,80±1,29
ХДЛ	1,04±0,37	1,01±0,39
ЛДЛ	2,97±0,89	3,04±1,30
ТГ	1,19±0,42	1,65±0,78**
Протеини	69,6±6,2	67,7±5,6
ЦРП	39,7±42,6	49,3±54,5
Фибриноген	5,5±1,3	5,1±0,9

\*\* $p < 0,01$

Хол– холестерол, ХДЛ-холестерол високе густине, ЛДЛ-холестерол ниске густине, ТГ- триглицериди, ЦРП -Ц реактивни протеин.

## 4.3 Дијетарни унос

Да бисмо упоредили дијетарне навике код две групе испитаника, поредили смо дијетарни унос код здравих особа са уносом у групи оболелих од карцинома плућа. Колмогоров-Смирнов тест нормалности показује да унос свих макро и микронутритијената, са изузетком масти, има нормалну расподелу.

У даљем поређењу уноса намирница између група користили смо Студентов Т тест, осим код масти где смо користили непараметарски Мен-Витнијев У тест. Разлика између испитиваних група сматрана је значајном за  $p \leq 0.05$ .

### 4.3.1 ДИЈЕТАРНИ УНОС ЕНЕРГИЈЕ И МАКРОНУТРИЈЕНАТА

Као што се види у Табели 8, средња вредност дневног енергетског уноса у групи болесника износила је 1912 kcal а кретала се од 741 до 4458 kcal. Дневни енергетски унос у контролној групи није се значајно разликовао од ових вредности. У групи здравих испитаника бележи се значајно нижи унос угљених хидрата и повећани унос масти, укључујући засићене масне киселине, мононезасићене масне киселине и полинезасићене масне киселине n-3 групе. Иако се унос n-6 полинезасићених масних киселина кретао у широком распону у обе испитиване групе, он је ипак био виши у групи оболелих, док је унос свих осталих масти (SFA, MUFA, PUFA, n-3 PUFA и укупне масти) значајно виши у групи здравих испитаника. Унос холестерола, који се такође повезује са развојем хроничних незаразних болести, слични је у обе групе и превазилази препоручени дневни унос од 300 mg.

**ТАБЕЛА 8:** Просечан дневни енергетски унос и унос макронутритијената

	Пацијенти (опсег)	Контрола
Енергија (kcal)	1912±644 (741-4458)	1931±444 (1109-3081)
Протеини (g)	85,3±30,6 (35,9-169,4)	83,2±21,5 (45,0-156,1)
Угљени хидрати (g)	238,6±87,5(82,8-599,5)*	210,0±53,5(74,2-434,0)
Масти (g)	48,8±21,1 (14,5-120)***	63,5±18,7 (27,7-119,3)
SFA (g)	21,0±11,9 (3,9-79,2)*	26,1±8,7 (12,0-54,1)
MUFA (g)	23,0±14,4 (4-99)*	27,7±11,7 (12,1-58,7)
PUFA (g)	9,5±3,9 (2,9-21)	10,8±4,7 (4,1-25,0)
n-3 PUFA (mg)	594±314 (78-1633)***	708±210 (352-1436)
n-6 PUFA (mg)	5340±1852 (1828-9346)***	3762±1763 (1793-11305)
холестерол (mg)	342± 203 (41-1125)	392±145 (141-770)

\*p<0.05 \*\*\*p<0.001

SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.



#### 4.3.2 ДИЈЕТАРНИ УНОС ПО ГРУПАМА НАМИРНИЦА

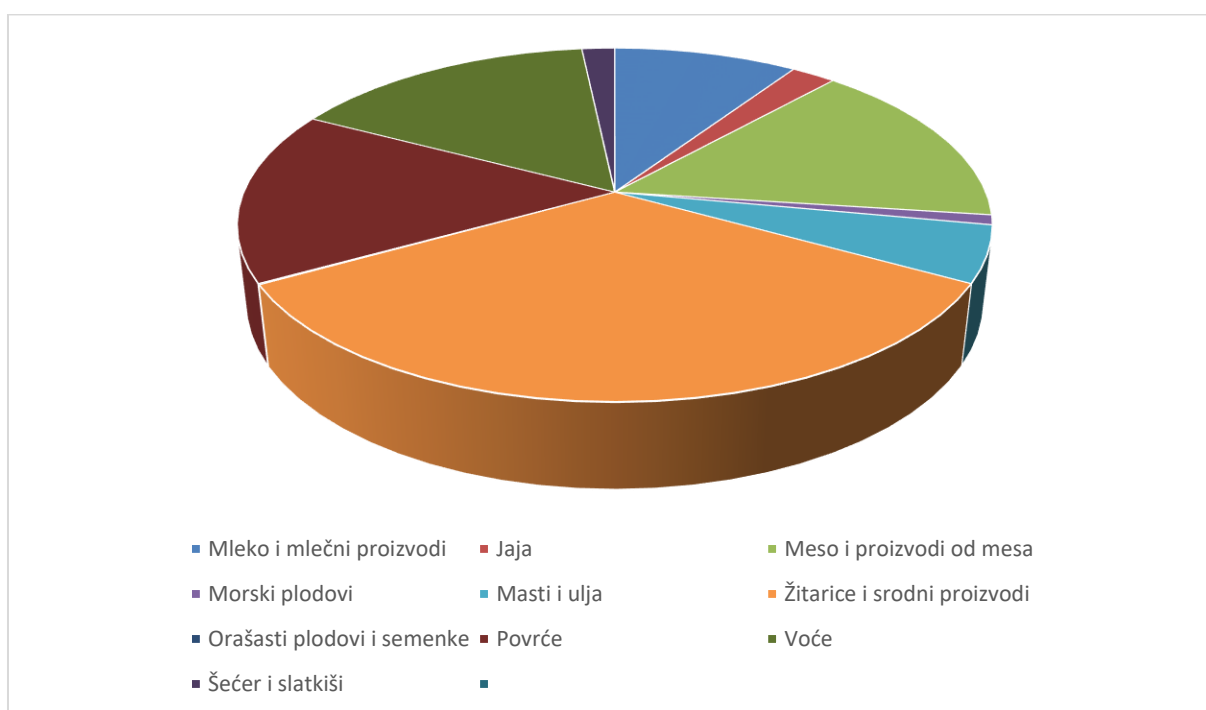
Затим, упоредили смо унос појединих група намирница у испитиваним групама и утврдили значајну разлику. Добијени резултати су приказани у Табели 9. Оболели од карцинома плућа значајно мање у исхрани користе млеко и млечне производе, јаја, морске плодове, воће и поврће у поређењу са здравом популацијом. Код њих се уочава значајно већа употреба житарица и сродних производа. Унос шећера и слаткиша већи је у контролној групи здравих испитаника.

**ТАБЕЛА 9:** Дневни дијетарни унос испитаника по групама намирница

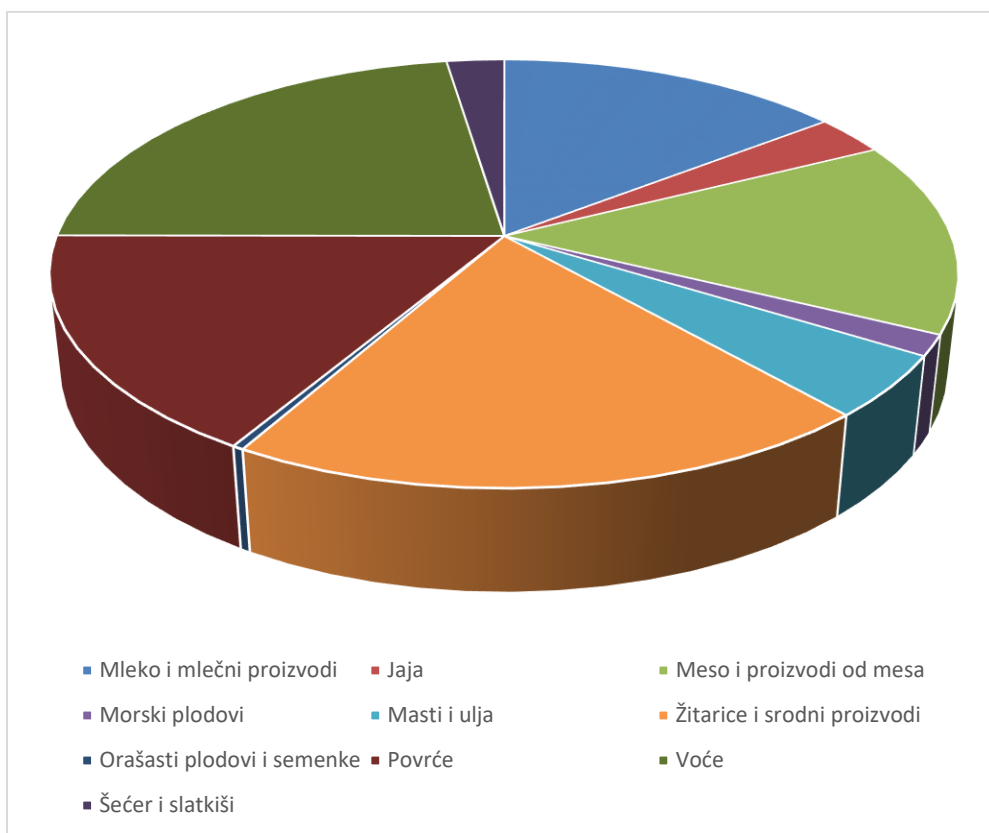
Група намирница	Пацијенти (g)	Контрола (g)
Млеко и млечни производи	95±103	168±125 ***
Јаја	23±22	35±24 **
Месо и производи од меса	156±106	169±56
Морски плодови	9±12	18±13 ***
Масти и уља	52±32	54±28
Житарице и сродни производи	341±139	228±68 ***
Орашасте производи и семенке	0.7±0.9	3.4±6.4 ***
Поврће	160±101	190±61 *
Воће	158±145	260±148 ***
Шећер и слаткиши	17±22	28±19 **

\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$

Разлике у дијетарним навикама ове две групе испитаника приказане су и на Сликама 16 и 17.



**СЛИКА 16:** Просечан дневни дијетарни унос одређених група намирница код болесника са карциномом плућа



**СЛИКА 17:** Просечан дневни дијетарни унос одређених група намирница код здравих испитаника

#### 4.3.3 ДИЈЕТАРНИ УНОС МИКРОНУТРИЈЕНАТА

Резултати уноса олигоелемената приказани су у Табели 10. Олигоелементи као што је натријум, хром и пантенол значајно се више налазе у исхрани оболелих, него у испитаника контролне групе. Супротно важи за јод и витамине Ц, Е и К који се значајно више налазе у исхрани здравих испитаника. Између оболелих од SCLC и NSCLC постоји само незнатна разлика у односу на унос јода и мангана који је нешто виши код SCLC, док остале разлике нису статистички значајне, тако да ови резултати нису приказани.

**ТАБЕЛА 10:** Дијетарни унос микронутријената.

Олигоелемент	Контрола (mg)	Пацијенти (mg)
Mg	317,1±93,4	305,2±145,4
Ca	522,2±209,0	561,0±224,5
Na	1414,8±353,1	2228,1±744,3***
K	2742,1±903,1	2832,2±1117,8
Se <sup>#</sup>	52,3±28,3	58,6±32,6
Zn	15,0±5,0	13,5±8,6
Fe	13,0±3,9	14,6±5,9
Cu	1,1±1,5	0,7±0,4*
Cr <sup>#</sup>	12,9±4,9	24,8±10,8***
Mn	16,6±121,0	2,1±2,2
P	1185,3±362,0	1234,2±452,1
I <sup>#</sup>	87,4±37,7	67,8±34,7**
Тиамин	3,1±14,8	1,4±0,5
Витамин А	142,2±64,5	126,9±105,9
Витамин B12 <sup>#</sup>	8,9±4,2	8,5±6,1
Витамин B6	28,9±14,2	24,3±16,0
Витамин С	122,8±60,6	71,4±42,0***
Витамин D <sup>#</sup>	2,9±1,8	3,3±1,6
Витамин Е	40,9±23,9	27,3±27,2**
Витамин К <sup>#</sup>	32,8±23,3	25,3±15,7*
Фолати <sup>#</sup>	260,4±90,8	291,1±121,6
Пантенол	3,6±1,0	6,0±4,5***
Биотин <sup>#</sup>	16,5±79,6	5,7±5,0

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Унос микронутријената приказан је у mg осим за елементе означене # у табели, где је унос приказан у µg.

## 4.4 Профил масних киселина у фосфолипидима плазме болесника са карциномом плућа и контролне групе

Профил масних киселина у фосфолипидима плазме испитиване групе оболелих од карцинома плућа значајно је различит у односу на контролну групу здравих (Табела 11). Код оболелих налазимо повишене вредности масних киселина 16:0, 18:1n-7, 20:4 n-6, као и повишене вредности SFA и односа n-6/n-3 PUFA. Такође се код оболелих региструје значајно снижење у фосфолипидима плазме следећих масних киселина: 18:1 n-9; 18:2 n-6; 22:6 n-3; укупних PUFA, као и PUFA n-3 и n-6 серије.

Масникиселински профил болесника подељених према дијагнози на NSCLC и SCLC поређен је са профилима здравих особа (статистички значајне разлике су означене \*, Табела 11), а испитиване су и разлике између ове две подгрупе болесника (статистички значајне разлике су означене #, Табела 11). У односу на здраву популацију, промене код обе подгрупе болесника пратиле су тренд који је већ уочен код групе свих пацијената. Једине значајне разлике у саставу масних киселина фосфолипида плазме између две испитиване подгрупе оболелих, уочава се као повећање палмитолеинске киселине (16:1) а смањење дихомо  $\gamma$ -линоленске киселине (20:3 n-6) код оболелих од ситноћелијског карцинома плућа.

**ТАБЕЛА 11:** Састав масних киселина фосфолипида плазме болесника са карциномом плућа и контролне групе

Назив	Контрола (n=70)	Пацијенти-сви (n=68)	NSCLC (n=45)	SCLC (n=23)
16:0	26,9±2,2	30,5±1,9***	30,2±2,0***	30,9±1,4***
16:1	0,7±0,9	0,5±0,2	0,5±0,2	1,4±0,9#
18:0	15,6±1,7	15,9±1,5	16,1±1,4	15,8±1,6
18:1 n-9	9,7±1,5	8,5±1,3***	8,8±1,4**	8,2±0,9***
18:1 n-7	1,4±0,2	2,0±0,4***	1,9±0,4***	2,0±0,4***
18:2 n-6	26,6±3,2	23,0±2,9***	22,9±2,9***	23,3±2,9***
18:3 n-3	0,1±0,0	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0
20:3 n-6	2,7±0,9	3,0±0,7	3,1±0,7	2,7±0,7#
20:4 n-6	11,1±1,9	12,5±2,4**	12,4±2,4*	12,7±2,3**
20:5 n-3	0,3±0,2	0,3±0,3	0,3±0,3	0,3±0,3
22:4 n-6	0,4±0,1	0,4±0,2	0,4±0,1	0,5±0,1
22:5 n-3	0,6±0,1	0,5±0,2	0,5±0,1	0,5±0,2
22:6 n-3	3,4±1,2	2,7±0,9**	2,7±0,9**	2,7±1,0*
SFA	42,7±3,6	46,4±1,8***	46,3±1,7***	46,7±1,8***
MUFA	11,9±1,7	11,0±1,5*	11,3±1,6	10,5±1,2**
PUFA	45,4±3,7	42,6±2,5***	42,4±2,6***	42,7±2,3**
n-3 PUFA	4,4±1,4	3,6±1,2**	3,6±1,2**	3,6±1,2*
n-6 PUFA	41,0±3,4	38,9±2,3***	38,8±2,3**	39,1±2,3*
n-6/n-3 PUFA	10,2±3,1	12,0±4,3*	11,9±4,1*	12,4±5,1*

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 у поређењу са контролном групом здравих

# p<0,05 у поређењу између NSCLC И SCLC

16:0 – палмитинска киселина, 16:1 – палмитолеинска киселина, 18:0 – стеаринска киселина, 18:1 n-9 – олеинска киселина, 18:1 n-7 – ваксенска киселина, 18:2 n-6 – линолна киселина, 18:3 n-3 – α-линоленска киселина, 20:3 n-6 - дихомо γ-линоленска киселина, 20:4 n-6 – арахидонска киселина, 20:5 n-3 – еикозапентаенска киселина, 22:4

n-6 - докозатетраенска киселина, 22:5 n-3 - докозапентаенска киселина, 22:6 n-3 - докозахексаенска киселина, SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

Процењене активности десатураза и елонгазе у фосфолипидима плазме представљене су у Табели 12. И у овом случају поређене су вредности свих пацијената (NSCLC + SCLC) у односу на контролну групу, затим подгрупе NSCLC и SCLC са контроном групом и међусобно. Активности свих ензима су приближно исте код оболелих и здраве популације, сем значајног повећања активности  $\Delta 6$  десатуразе код болесника са NSCLC.

**ТАБЕЛА 12:** Разлике у ензимској активности десатураза и елонгазе у фосфолипидима плазме здравих особа и оболелих од карцинома плућа

Назив	Контрола (n=70)	Пацијенти-сви (n=68)	NSCLC (n=45)	SCLC (n=23)
$\Delta 5$ десатураза	4,3±1,1	4,5±1,5	4,1±1,1	5,1±1,8
$\Delta 6$ десатураза	0,09±0,03	0,13±0,04**	0,14±0,04**	0,11±0,03
$\Delta 9$ десатураза	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1
Елонгаза	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1

\*\*p<0,01

## 4.5 Профил масних киселина у здравом и оболелом ткиву болесника

Ради поређења маснокиселинских профила фосфолипида здравог и малигног ткива, узорци здравог ткива плућа и канцера узимани су бронхиобиопсијом код сваког пацијента. Спареним Т тестом поредили смо састав масних киселина у здравом и малижном ткиву испитиване групе и резултате приказали у Табели 13. Запажене су

значајне разлике у саставу масних киселина. У малигнуом ткиву налазе се снижене вредности SFA, као и 16:0, 18:2 n-6, 18:3 n-3 и 22:5 n-3 масних киселина, а више су вредности следећих масних киселина: 18:1 n-9, 18:1 n-7, 20:4 n-6, 22:4 n-6, као и MUFA и односа n-6/n-3 масних киселина.

**ТАБЕЛА 13:** Поређење састава масних киселина малигног и здравог ткива истог испитаника

Назив	Здраво ткиво (n=64)	Малигну ткиво (n=64)
16:0	29,5±4,8	27,1±3,6**
16:1	1,4±0,9	1,3±1,0
18:0	26,4±6,4	25,4±5,2
18:1 n-9	17,0±3,3	18,2±4,0*
18:1 n-7	3,0±0,9	4,3±1,3***
18:2 n-6	10,3±3,2	8,8±3,6**
18:3 n-3	0,3±0,2	0,2±0,1**
20:3 n-6	1,8±0,7	1,8±0,6
20:4n-6 AA	7,2±2,4	9,2±2,7***
20:5n-3 EPA	0,2±0,1	0,2±0,2
22:4n-6	1,3±0,5	1,9±0,9***
22:5n-3	0,6±0,3	0,5±0,3*
22:6n-3	1,2±0,6	1,1±0,5
SFA	55,7±7,2	52,2±6,6**
MUFA	21,5±3,7	24,0±4,8**
PUFA	22,6±5,7	23,6±5,9
n-3 PUFA	1,9±0,7	1,8±0,8
n-6 PUFA	20,6±5,4	21,9±5,5
n-6/n-3 PUFA	11,8±3,7	13,9±4,7**
EPA/AA	0,028±0,025	0,021±0,025

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001



16:0 – палмитинска киселина, 16:1 – палмитолеинска киселина, 18:0 – стеаринска киселина, 18:1 n-9 – олеинска киселина, 18:1 n-7 – ваксенска киселина, 18:2 n-6 – линолна киселина, 18:3 n-3 –  $\alpha$ -линоленска киселина, 20:3 n-6 - дихомо  $\gamma$ -линоленска киселина, 20:4 n-6 AA– арахидонска киселина, 20:5 n-3 EPA– еикозапентаенска киселина, 22:4 n-6 - докозатетраенска киселина, 22:5 n-3 - докозапентаенска киселина, 22:6 n-3 - докозахексаенска киселина, SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

Што се тиче разлике у ензимској активности десатураза и елонгазе између здравог и оболелог ткива испитиване групе, разлика је значајна само за десатуразу  $\Delta 6$ , која је повишена у малигном ткиву (Табела 14), као и у фосфолипидима плазме.

**ТАБЕЛА 14:** Процењене вредности десатураза и елонгазе у здравом и малигном ткиву пацијената

Назив	Здраво ткиво (n=64)	Малигно ткиво (n=64)
$\Delta 5$ десатураза	4,5 $\pm$ 2,1	5,5 $\pm$ 2,1
$\Delta 6$ десатураза	0,17 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,07***
$\Delta 9$ десатураза	0,7 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3
Елонгаза	0,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2

\*\*\*p<0,001

#### 4.5.1 ПРОФИЛ МАСНИХ КИСЕЛИНА У ЗДРАВОМ И ОБОЛЕЛОМ ТКИВУ БОЛЕСНИКА СА NSCLC

Будући да је могуће да промене у метаболизму масних киселина нису исте код болесника са SCLC и NSCLC, у даљем раду анализирали смо масне киселине у фосфолипидима здравог и малигног ткива, код пацијената подељених на основу типа карцинома плућа. У групи оболелих од NSCLC било је 37 узорака, док код преосталих 8 пацијената количина узорка није била довољна за анализу. Према овим резултатима, након испитивања нормалности дистрибуције варијабли, спарени т-тест је урађен код следећих масних киселина 16:0, 18:1 n-9, 18:2, 20:4, 22:4, MUFA, PUFA, n-3 PUFA, n-6 PUFA, n3/n6 PUFA, као и за десатуразе Δ6 и Δ9 и елонгазе. За остале масне киселина урађен је Вилкоксонов (*Wilcoxon*) тест јер је уочена неправилна дистрибуција варијабли.

У саставу фосфолипида неситноћелијског карцинома плућа статистички значајно је већа присутност следећих масних киселина: 18:1 n-7, 20:3 n-6, 20:4 n-6, 22:4 n-6, PUFA и n-6 PUFA. Масне киселине 16:0, 18:3 n-3 (ALA) и SFA су значајно мање заступљене у ткиву NSCLC у односу на здраво ткиво истог пацијента. Резултати поређења маснокиселинских профила здравог и туморског ткива код пацијената са NSCLC, приказани су у Табели 15.

**ТАБЕЛА 15:** Поређење састава масних киселина здравог и малигног ткива плућа код оболелих од NSCLC

Назив	Здраво ткиво (n=37)	Малигно ткиво NSCLC (n=37)
16:0	30,2±4,9	26,3±4,0***
16:1	1,5±0,9	1,5±1,2
18:0	24,6±5,4	23,6±4,1
18:1 n-9	17,4±3,3	18,2±4,2
18:1 n-7	3,0±1,0	4,4±1,5***
18:2 n-6	10,3±3,2	10,2±3,3
18:3 n-3	0,3±0,2	0,2±0,1**
20:3 n-6	1,7±0,7	2,0±0,6*
20:4n-6 AA	7,6±2,4	9,5±2,3***
20:5n-3 EPA	0,2±0,1	0,2±0,2
22:4n-6	1,3±0,5	1,9±0,7***
22:5n-3	0,6±0,2	0,6±0,2**
22:6n-3	1,2±0,8	1,2±0,6
SFA	54,8±7,0	49,9±5,9***
MUFA	21,9±3,9	24,2±5,3*
PUFA	22,9±5,6	25,7±5,8***
n-3 PUFA	1,9±0,8	2,0±0,8
n-6 PUFA	21,0±5,2	23,7±5,5***
n-6/n-3 PUFA	12,2±3,7	13,0±4,4
EPA/AA	0,027±0,022	0,021±0,018

\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001

16:0 – палмитинска киселина, 16:1 – палмитолеинска киселина, 18:0 – стеаринска киселина, 18:1 n-9 – олеинска киселина, 18:1 n-7 – ваксенска киселина, 18:2 n-6 – линолна киселина, 18:3 n-3 – α-линоленска киселина, 20:3 n-6 - дихомо γ-линоленска киселина, 20:4 n-6 AA– арахидонска киселина, 20:5 n-3 EPA– еикозапентаенска киселина, 22:4 n-6 - докозатетраенска киселина, 22:5 n-3 - докозапентаенска киселина, 22:6 n-3 - докозахексаенска киселина, SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

Упоређивањем процењене активности десатураза и елонгазе у здравом и малгном ткиву, код пацијената са NSCLC утврдили смо да постоји статистичка значајност у порасту активности десатуразе Δ6 у малигном ткиву у односу на здраво ткиво плућа истих болесника, што се види у Табели 16.

**ТАБЕЛА 16:** Процењене активности десатураза и елонгазе у здравом и малигном ткиву плућа пацијената са NSCLC

Назив	Здраво ткиво (n=37)	Малигно ткиво NSCLC (n=37)
Δ5 десатураза	5,1±2,4	5,1±1,6
Δ6 десатураза	0,17±0,05	0,20±0,04***
Δ9 десатураза	0,7±0,2	0,8±0,3
Елонгаза	0,8±0,2	0,9±0,2

\*\*\* p<0,001

#### 4.5.2 ПРОФИЛ МАСНИХ КИСЕЛИНА У ЗДРАВОМ И ОБОЛЕЛОМ ТКИВУ БОЛЕСНИКА СА SCLC

Као и код групе болесника са NSCLC, упоређивали смо однос масних киселина у фосфолипидима и процењену вредност ензима у здравом и оболелом ткиву сваког појединачног испитаника са SCLC-ом. У овој групи било је 27 пацијената, а добијене вредности су приказане у Табели 17.

**ТАБЕЛА 17.** Поређење састава масних киселина здравог и малигног ткива плућа код оболелих од SCLC

Назив	Здраво ткиво (n=27)	Малигно ткиво SCLC (n=27)
16:0	28,8±4,5	28,0±2,7
16:1	1,3±1,0	1,1±0,7
18:0	28,4±6,7	27,4±5,1
18:1 n-9	16,1±3,1	18,4±4,0*
18:1 n-7	3,0±0,7	4,4±1,2***
18:2 n-6	10,3±3,5	6,6±2,7***
18:3 n-3	0,2±0,2	0,2±0,1
20:3 n-6	1,9±0,7	1,5±0,5*
20:4n-6 AA	6,7±2,2	9,0±2,9***
20:5n-3 EPA	0,2±0,1	0,1±0,1
22:4n-6	1,2±0,5	1,9±1,0***
22:5n-3	0,6±0,4	0,4±0,3***
22:6n-3	1,1±0,4	0,9±0,3***
SFA	57,2±7,8	55,4±6,6
MUFA	20,5±3,4	23,9±4,4**
PUFA	22,1±6,1	20,5±5,1
n-3 PUFA	1,9±0,6	1,4±0,6***
n-6 PUFA	20,1±5,8	19,1±4,9
n-6/n-3 PUFA	11,0±3,6	15,4±4,4***
EPA/AA	0,033±0,032	0,016±0,017*

\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001

16:0 – палмитинска киселина, 16:1 – палмитолеинска киселина, 18:0 – стеаринска киселина, 18:1 n-9 – олеинска киселина, 18:1 n-7 – ваксенска киселина, 18:2 n-6 – линолна киселина, 18:3 n-3 – α-линоленска киселина, 20:3 n-6 - дихомо γ-линоленска киселина, 20:4 n-6 AA– арахидонска киселина, 20:5 n-3 EPA– еикозапентаенска киселина, 22:4 n-6 - докозатетраенска киселина, 22:5 n-3 - докозапентаенска киселина, 22:6 n-3 - докозахексаенска киселина, SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

Као што се види у Табели 17, састав фосфолипида ситноћелијског карцинома плућа значајно се разликује од здравог плућног ткива. У оболелом ткиву су повишене вредности следећих масних киселина: 18:1 n-9, 18:1 n-7, АА, 22:4n-6, MUFA, као и односа n-6/n-3 PUFA. Са друге стране, фосфолипиди малигног ткива SCLC садрже мањи удео масних киселина линолне (18:2 n-6), ЕРА, 22:5 n-3, 22:6 n-3, и укупне n-3 PUFA.

Упоредивали смо затим активност десатураза и елонгазе у здравом и малижном ткиву плућа код оболелих од SCLC и закључили да су десатуразе Δ5, Δ6 и Δ9 повишене у малижном ткиву (Табела 18).

**ТАБЕЛА 18:** Процењене активности десатураза и елонгазе у здравом и малижном ткиву плућа пацијената са NSCLC

Назив	Здраво ткиво (n=27)	Малигно ткиво SCLC (n=27)
Δ5 десатураза	4,0±1,6	6,1±2,4**
Δ6 десатураза	0,18±0,05	0,25±0,07***
Δ9 десатураза	0,6±0,2	0,7±0,3*
Елонгаза	1,0±0,3	1,0±0,2

\*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001

Поређење састава масних киселина SCLC и NSCLC ткива, показало је да између ове две врсте карцинома плућа постоје значајне разлике. У Табели 19 представљене су масне киселине и ензими десатуразе/елонгаза чије се вредности разликују код SCLC и NSCLC ткива. Виши нивои стеаринске киселине и SFA нађени су у ткиву ситноћелијског карцинома, док су виши нивои LA, PUFA, n-3 PUFA и n-6 PUFA детектовани у ткиву NSCLC. Процењене активности десатуразе Δ6 и елонгазе су више у ткиву SCLC, док је активност Δ9 десатураза виша у NSCLC ткиву.

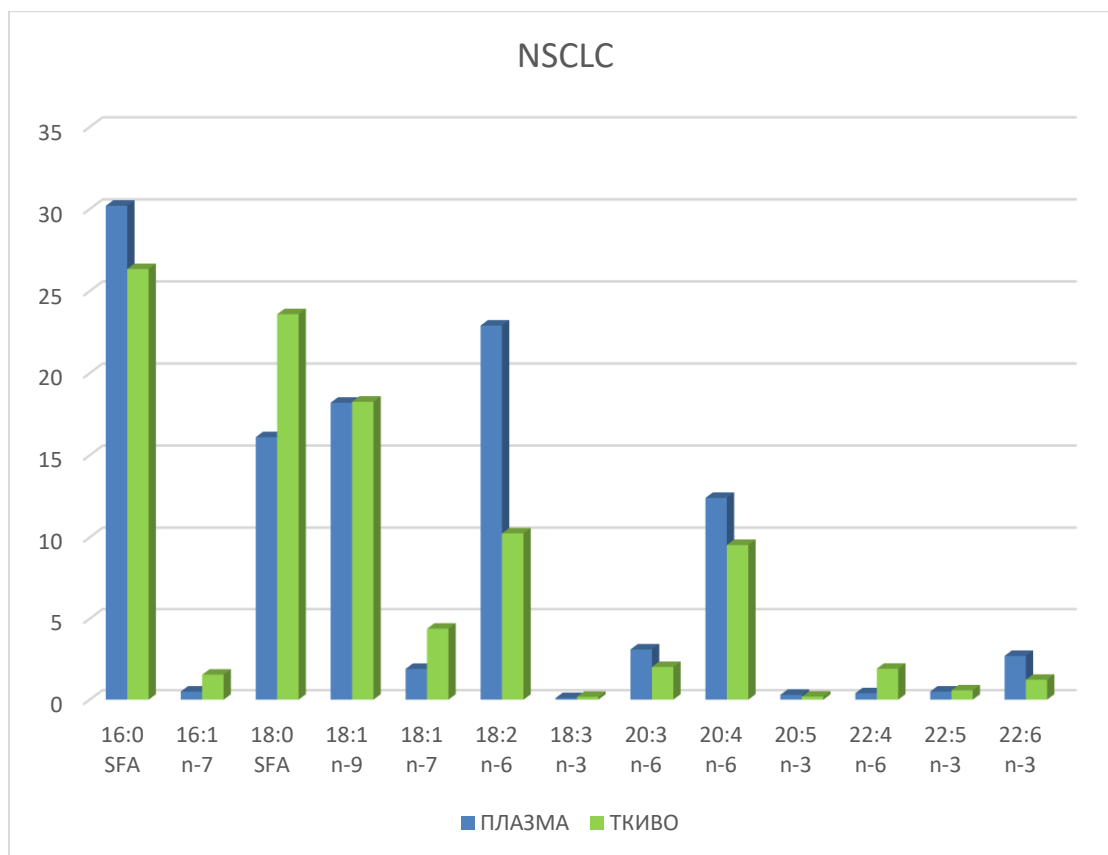
**ТАБЕЛА 19:** Разлике у нивоу појединих масних киселина и активности десатураза код SCLC и NSCLC ткива

Назив	Ткиво NSCLC (n=37)	Ткиво SCLC (n=27)
18:0	23,6±4,1	27,4±5,1***
18:2 n-6	10,2±3,3	6,6±2,7**
SFA	49,9±5,9	55,4±6,6**
PUFA	25,7±5,8	20,5±5,1**
n-3 PUFA	2,0±0,8	1,4±0,6*
n-6 PUFA	23,7±5,5	19,1±4,9**
Δ6 десатураза	0,20±0,04	0,25±0,07**
Δ9 десатураза	0,8±0,3	0,7±0,3*
Елонгаза	0,9±0,2	1,0±0,2**

## 4.6 Упоредивање статуса масних киселина у фосфолипидима плазме и малигног ткива

Да бисмо испитали да ли промене у маснокиселинском саставу фосфолипида плазме одсликавају промене у оболелом ткиву, поређени су профили масних киселина у плазми и ткиву код NSCLC и SCLC пацијената.

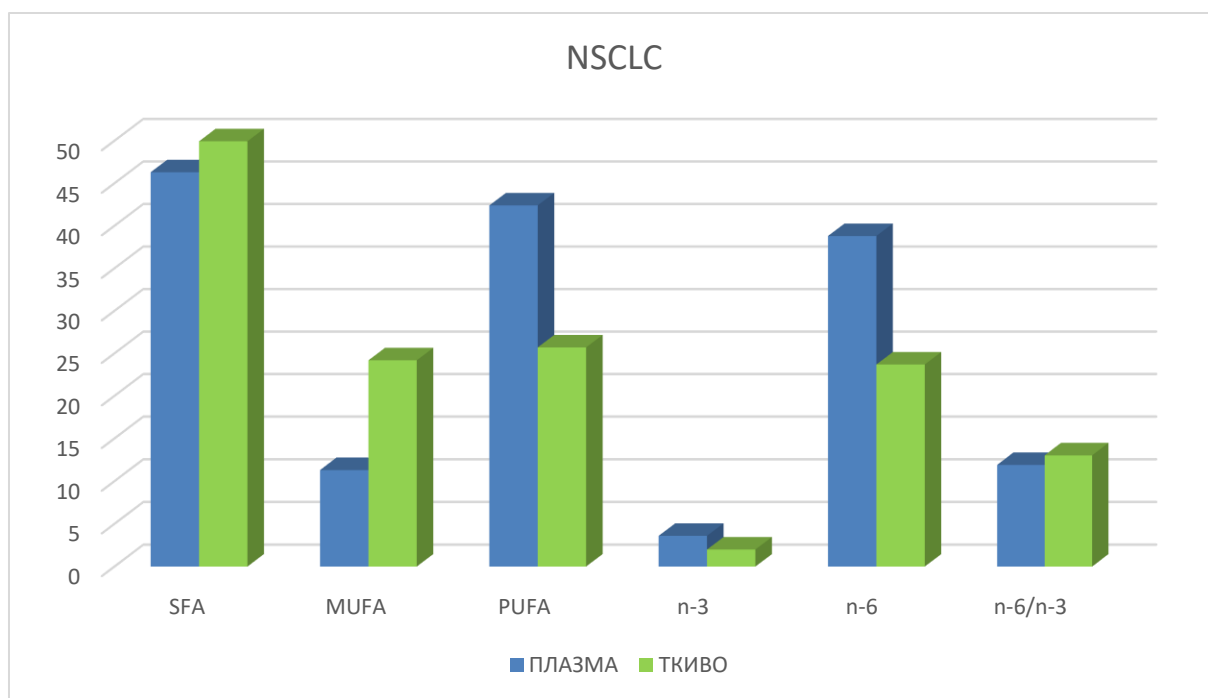
Графикони процентуалног удела појединачних масних киселина (Слика 18) и група масних киселина (Слика 19) показују да се промене у ткиву не одражавају на исти начин у циркулацији. У ткиву су знатно ниже све полинезасићене масне киселине, однос n-6/n-3 је нешто виши, као и вредности стеаринске и олеинске киселине.



**СЛИКА 18.** Релативне концентрације појединачних масних киселина у фосфолипидима плазме и ткива код пацијената са NSCLC.

16:0 – палмитинска киселина, 16:1 – палмитолеинска киселина, 18:0 – стеаринска киселина, 18:1 n-9 – олеинска киселина, 18:1 n-7 – ваксенска киселина, 18:2 n-6 – линолна киселина, 18:3 n-3 – α-линоленска киселина, 20:3 n-6 - дихомо γ-линоленска киселина, 20:4 n-6 AA– арахидонска киселина, 20:5 n-3 EPA– еикозапентаенска киселина, 22:4 n-6 - докозатетраенска киселина, 22:5 n-3 - докозапентаенска киселина, 22:6 n-3 - докозахексаенска киселина.

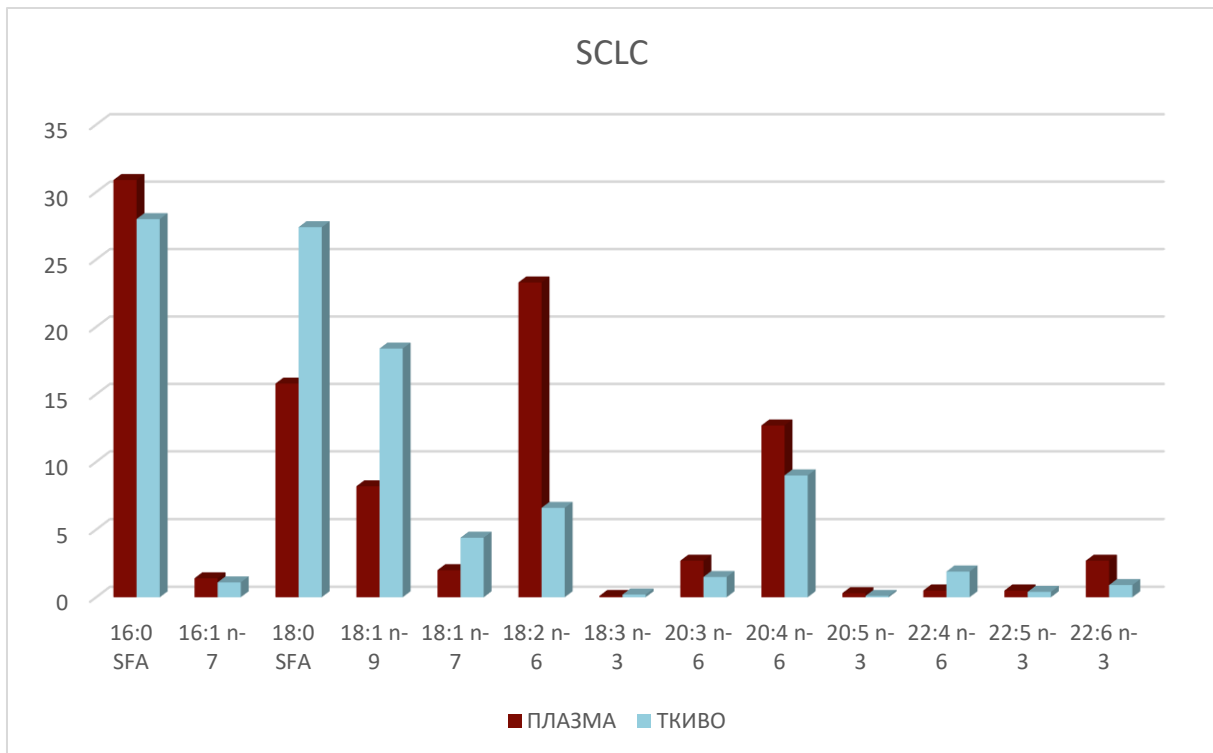




**СЛИКА 19.** Релативне концентрације група масних киселина у фосфолипидима плазме и ткива код пацијената са NSCLC.

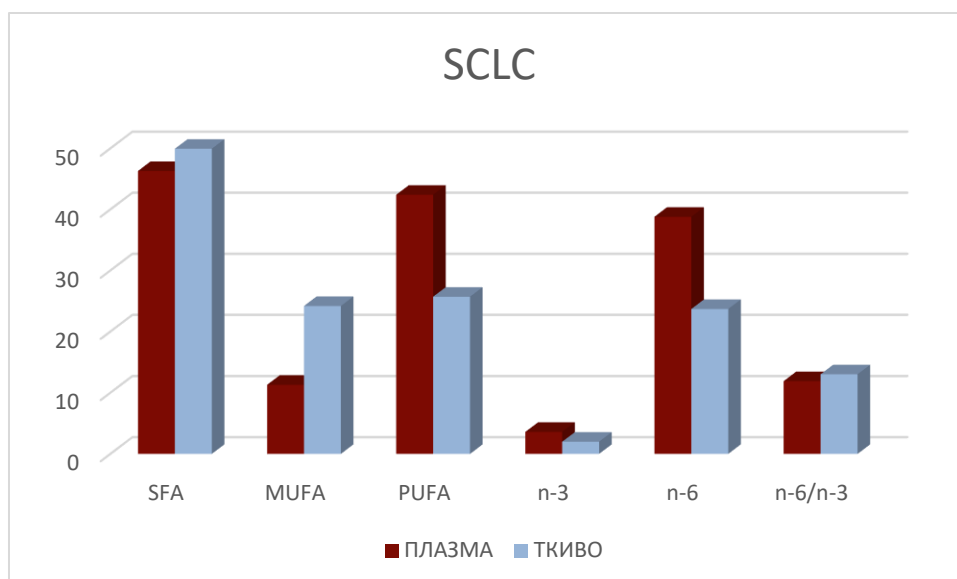
SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

И код пацијената са SCLC промене у ткиву се не рефлектују на промене у фосфолипидима плазме. У овој групи пацијената, слично као код NSCLC, приметно су ниже полинезасићене масне киселине, док су виши однос n-6/n-3 и релативне концентрације стеаринске и олеинске киселине. Посебно је линолна киселина виша у плазми него у ткиву пацијената. Графички приказ појединачних и група масних киселина види се на Сликама 20 и 21.



**СЛИКА 20.** Релативне концентрације појединачних масних киселина у фосфолипидима плазме и ткива код пацијената са SCLC.

16:0 – палмитинска киселина, 16:1 – палмитолеинска киселина, 18:0 – стеаринска киселина, 18:1 n-9 – олеинска киселина, 18:1 n-7 – ваксенска киселина, 18:2 n-6 – линолна киселина, 18:3 n-3 –  $\alpha$ -линоленска киселина, 20:3 n-6 - дихомо  $\gamma$ -линоленска киселина, 20:4 n-6 AA– арахидонска киселина, 20:5 n-3 EPA– еикозапентаенска киселина, 22:4 n-6 - докозатетраенска киселина, 22:5 n-3 - докозапентаенска киселина, 22:6 n-3 - докозахексаенска киселина.



**СЛИКА 21.** Релативне концентрације појединачних масних киселина у фосфолипидима плазме и ткива код пацијената са NSCLC.

SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

## 4.7 Анализа повезаности уноса и статуса масних киселина у фосфолипидима плазме

Да би се испитала веза између уноса одређених масних киселина и њихова количина у фосфолипидима плазме, анализа повезаности уноса и статуса масних киселина у фосфолипидима плазме тестирана је Пирсоновом (*Pearson*) и Спирмановом (*Spearman*) корелацијом. Добијени резултати представљени су у Табелама 20 и 21.

**ТАБЕЛА 20.** Коефицијент корелације R између дијетарног уноса група масних киселина и њихове релативне концентрације у фосфолипидима плазме

	SFA	MUFA	PUFA	n-3 PUFA	n-6 PUFA
p-SFA	-0,010	0,067	-0,117	0,021	-0,040
p-MUFA	0,010	0,160	-0,043	0,227	0,179
p-PUFA	0,004	-0,135	0,043	-0,133	-0,062
p- n-3 PUFA	0,110	-0,067	-0,008	0,111	-0,045
p- n-6 PUFA	-0,047	-0,117	0,110	-0,197	-0,049

SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

p- означава да су масне киселине из плазме. Одређивање коефицијента корелације је вршено Пирсоновом корелацијом.

**ТАБЕЛА 21.** Спирманов коефицијент корелације r између дијетарног уноса група масних киселина и њихове релативне концентрације у фосфолипидима плазме

	SFA	MUFA	PUFA	n-3 PUFA	n-6PUFA
p-SFA	0,132	0,186	-0,041	0,028	-0,041
p-MUFA	0,158	0,212	0,131	0,220	0,228
p-PUFA	-0,184	-0,249	-0,043	-0,156	-0,117
p- n-3PUFA	-0,128	-0,219	-0,062	0,072	-0,048
p- n-6PUFA	-0,136	-0,117	-0,002	-0,160	0,072

SFA – засићене масне киселине, MUFA - мононезасићене масне киселине, PUFA - полинезасићене масне киселине.

p- означава да су масне киселине из плазме. Коефицијент корелације r одређен је Спирмановим тестом.

Као што се види из табела, не постоји статистичка значајност повезаности дијетарног уноса масних киселина и њихове концентрације у плазми болесника, иако је доказано да таква повезаност постоји код здравих људи. Добијени резултати указују да је метаболизам масних киселина код оболелих од карцинома плућа измењен.

## **5. ДИСКУСИЈА**

Карцином плућа један је од водећих светских здравствених проблема. Данас ова болест има пандемијски карактер и представља један од највећих финансијских и социјалних изазова. Подаци из целог света потврђују да је карцином плућа и даље болест са леталним исходом, иако су дужина преживљавања и квалитет живота последњих година нешто побољшани.

Међу малигним болестима, карцином плућа има највишу инциденцу и смртност на глобалном нивоу. Тако је у 2012. години дијагностиковано 1,8 милиона ново оболелих (139). Стопа обољевања међу европским земљама значајно се разликује. Стандардизована стопа обољевања у Србији износи 45,6 а стопа смртности 39,1 на 100000 становника, при чему је значајно већа у мушкој популацији. Код мушкараца је инциденца 70,3 а смртност 61,8, док је код женског дела популације инциденца 23,9 а смртност 19,4 на 100000 становника.

Најзначајнији фактор ризика за обољевање од карцинома плућа је пушење, па инциденца обољевања корелира са распрострањеношћу пушачке навике (140). По подацима из литературе међу оболелима је 85% - 90% пушача и бивших пушача (141-143). Испитивану групу у нашој студији чинило је 55 пушача, 7 бивших пушача и 10 непушача. Дакле група пацијената са пушачком навиком чинила је 86% испитаника, што је у складу са литературним подацима. У групи оболелих пушача највише је било оних који су пушили преко 30 пакло/година, чак 51 испитаник.

## **5.1 Дијетарни унос код оболелих од карцинома плућа**

Бројне студије показују да и начин исхране игра важну улогу у настајању карцинома. Дијетарни унос и навике у исхрани значајно корелирају са стопом обољевања и смртности код оболелих од малигних болести (121, 144). Начин исхране и унос одређених намирница могуће је кориговати и на тај начин превенирати настајање

малигног обољења, побољшати квалитет живота оболелих, смањити карциномску кахексију (115).

Исхрана и физичка активност сматрају се главним факторима ризика за настанак више врста канцера, које је могуће модификовати (145, 146). Одржавање здраве телесне масе, вежбање током целог живота, и правилна исхрана могу значајно да умање ризик од обољевања и смрти услед малигнитета (147-149). Исти начин живота је протективан и од развоја дијабетеса и кардиоваскуларних обољења (144).

Ова студија показала је постојање значајних разлика у начину исхране пацијената са новооткривеним карциномом плућа у односу на контролну групу здравих особа, а кроз анализу валидираних упитника о исхрани (FFQ). Нутритивни унос је израчунат помоћу Српске базе података о саставу намирница.

Када упоређујемо дијетарни унос код испитаника укључених у ову студију, налазимо сличност у енергетском и протеинском уносу а разлике у уносу масти и угљених хидрата. Контролна група здравих испитаника имала је значајно већи унос укупних масти, мононезасићених и полинезасићених масних киселина n-3 групе, као и засићених масних киселина, док је унос PUFA n-6 групе био снижен у односу на групу оболелих. У контролној групи бележи се и нижи унос угљених хидрата. Иако масти значајно доприносе калоријском уносу, и према томе могло би се очекивати да промовишу карциногенезу, већи значај има тип масти него њихов укупан дневни унос.

Оболели су значајно мање у исхрани користили морске плодове а они су најбољи извор полинезасићених масних киселина n-3 групе. У студији *Takezaki et al.* показано је да употреба куване и сирове рибе у исхрани смањује ризик обољевања од аденокарцинома плућа код Јапанаца. Испитаници који су јели рибу три или више пута недељно имали су 81% мањи ризик обољевања од аденокарцинома плућа у односу на оне који су рибу јели једном недељно (150).

Иако је унос масти и уља био сличан у обе испитиване групе, врста коришћених намирница била је различита. У групи оболелих од карцинома плућа чак 71 од 72 испитаника свакодневно је у исхрани користило сунцокретово уље, које је главни извор n-6 PUFA у нашем региону. Само је један испитаник користио искључиво маслиново уље за припремање хране, а 27 болесника је повремено користило маслиново уље у исхрани, али у значајно мањој мери него сунцокретово уље.



У контролној групи 63 од 70 испитаника користило је сунцокретово уље у исхрани, али је 33 испитаника употребљавало и маслиново уље, а седморо је користило искључиво маслиново уље за припремање хране. То показује да је унос врсте масних киселина био значајно различит, и као последица тога, однос n-6/n-3 PUFA у исхрани значајно је виши код оболелих испитаника. Мали је број студија у којима је однос n-6/n-3 PUFA анализиран код оболелих од карцинома плућа, упркос његовој значајној улози у карциногенези (151).

Утицај дуголанчаних масних киселина n-3 групе, нарочито еикосапентенске (EPA, C20:5 n-3) и докозахексаенске киселине (DHA, C22:6 n-3) киселине, на спречавање туморског раста показан је у неколико студија (152-155). Начин исхране утиче на липидни састав ћелијске мембране. Дијетарни унос n-3 PUFA доводи до њихове уградње у мембранске фосфолипиде (131, 132). У зависности од удела у мембранским ФЛ, EPA и DHA могу мењати пропустљивост и структуру ћелијске мембране и тако утицати на њена антиинфламаторна својства и ћелијску сигнализацију. EPA је прекурсор синтезе антиинфламаторних цитокина који супримирају раст и прогресију тумора (64, 111).

У последње време велики интерес у свету побуђују болести узроковане повећаним уносом полинезасићених масних киселина n-6 групе. Иако је линолеинска киселина (LA; C18:2 n-6) есенцијална масна киселина, она се повезује са повећаном инциденцом обољевања од карцинома и са туморском прогресијом (156). *Mouradian* и сар. су дефинисали више процеса сигнализације кроз ћелијску мембрану стимулираних LA, који су условили појачану активност циклооксигеназе и синтезу простагландина E2, а који утиче на ћелијски раст у хуманом моделу карцинома дојке и плућа (157).

У складу са овим истраживањима и у нашој испитиваној група оболелих од карцинома плућа бележи се повишени унос n-6 PUFA. Промена у дијетарном уносу полинезасићених масних киселина могла би бити додатни терапијски модалитет у лечењу оболелих од карцинома. Недавно објављена мета анализа 8 проспективних кохортних студија, показала је да високи унос PUFA није био повезан са карциномом плућа (RR 0.91; 95% CI 0.78–1.06) (158). Аутори међутим нису анализирали PUFA n-3 и n-6 групе одвојено, тако да резултати ове мета анализе нису конклузивни.

Неколико студија испитивало је повезаност дијетарног уноса млека и млечних производа са ризиком од настанка карцинома плућа. Резултати ових студија су контрадикторни. Две новије мета анализе не показују значајну повезаност (159, 160) што

је у складу са нашим истраживањима. Према нашим резултатима контролна група испитаника имала је већи дијетарни унос млека и млечних производа, али обе испитиване групе користиле су млеко и млечне производе у мањој количини од препоручене.

Сматра се да исхрана богата воћем и поврћем, има протективни ефекат на развој малигних обољења. У складу са тим су и резултати нашег испитивања, где се бележи значајно већи дијетарни унос поврћа и посебно воћа у контролној групи здравих испитаника. Мета анализа 18 студија потврђује протективни значај дијетарног уноса воћа и поврћа за развој карцинома плућа, са смањењем ризика за 14% (RR 0.86, 95% CI 0.78–0.94) (161). Механизам овог ефекта није у потпуности испитан, а претпоставља се да би могао бити посредован многобројним супстанцама какве су бетакаротен, витамин Ц и Е, влакна и фитохемикалије, и да укључује модулацију метилације ДНК ланца, заштиту од оксидативног стреса и оштећења ДНК, индукцију апоптозе као и одређених ензима који имају улогу у детоксикацији (123).

Иако је у групи оболелих од карцинома плућа мањи дијетарни унос воћа, поврћа и шећера, запажа се већа заступљеност угљених хидрата због повишеног уноса житарица и производа од жита. Постоје радови који показују да би редукција уноса угљених хидрата могла спречити или одложити обољевање од карцинома. Такође би раст тумора, са смањеним уносом угљених хидрата, могао бити успорен (162). Ипак, када је у питању карцином плућа, студије се углавном баве испитивањима везаним за унос воћа, поврћа и микронутритијената, а мало је референци које се односе на угљене хидрате.

Недавна испитивања показују да особе које узимају храну са високим гликемијским индексом имају 49% већи ризик да оболе од карцинома плућа, чак и када су непушачи (163). У групи оболелих у овом истраживању запажа се занемарљив дијетарни унос хране са ниским гликемијским индексом као што је хлеб од целог зрна пшенице, овсена каша, воће, нескробно поврће, а повећани унос рафинисаних житарица и хране са високим гликемијским индексом (бели хлеб, производи од белог брашна, бели пиринач, кромпир). Употреба производа од целог зрна пшенице и воћа обрнуто је пропорционална ризику од настајања карцинома плућа (164), што је у сагласности са резултатима добијеним у овој студији. Са друге стране, храна са високим гликемијским индексом значајно повећава шећер у серуму након obroка, што доводи до пораста IGF-1 (insulin-like growth factor 1). IGF-1 путем ћелијске сигнализације може довести до

пролиферације туморских ћелија, те је повишен ризик од настанка карцинома (165). Међутим, у овом раду оболели од карцинома плућа су уносили мање простих шећера у односу на контролну групу, што је у супротности са улогом шећера у настајању канцера, али указује да су неки други нутријенти могли имати већу улогу у настанку и развићу карцинома плућа. Наши испитаници са канцером плућа имали су значајно различит начин исхране од здравих испитаника, што сугерише да промене у начину исхране могу да допринесу превенцији настанка канцера плућа.

## **5.2 Дијетарни унос микронутријената код оболелих од карцинома плућа**

Микронутријенти представљају компоненте исхране које су у малим количинама потребне за успостављање нормалног метаболизма. Око четрдесетак микронутријената сматра се есенцијалним, и требало би да буду део свакодневне исхране. Међутим, на популационом нивоу унос микронутријената није задовољавајући, посебно код социо-економски угрожених нижих друштвених слојева. Микронутријенти играју кључне улоге у функцији већег броја ензима, у одговору на оксидативни стрес организма, као и у поспешивању имуног одговора на различите стимулусе, модулирањем активности инфламаторних медијатора.

Статус олиго- и микронутријената, њихове међусобне реакције и интеракција са различитим макронутријентима, представљају битну компоненту настанка и пропагације инфламације и модулирања оксидативног статуса ћелије. Из тог разлога се статус микронутријената, као и њихове интеракције на молекуларном и ћелијском нивоу екстензивно испитују у области превенције и развоја хроничних незаразних болести, пре свега малигних и кардио-васкуларних обољења. Због широког спектра деловања микронутријената у ћелијама, посебно је значајно истраживање комбинованог ефекта суплементације различитим микронутријентима и PUFA, чија су имуномодулаторна дејства већ описана.

Поређење дијетарног уноса олиго- и микронутријената показује значајне разлике између групе пацијената и здраве популације, што је и очекивано с обзиром на различит унос одређених група намирница. Подаци из литературе највише говоре о протективном дејству каротеноида и витамина А на развој карцинома плућа (80, 166-168). Међутим, у нашој студији нису нађене разлике у уносу ових нутријената између група здравих и оболелих учесника. У групи болесника значајно је нижи унос витамина Ц и Е. Ови витамини су снажни антиоксиданси и приписује им се тумор-протективно дејство. Публикације показују да особе са вишим уносом витамина Ц и Е имају мањи ризик за развој канцера плућа, што је посебно запажено код пушача (169-171), мада је тај ефекат релативно мали, а у неким студијама и није потврђен (172). Витамин К такође има антиканцерогене ефекте који су показани и на ћелијским линијама и *in vivo* (173-176). У складу са овим литературним подацима, пацијенти са канцером плућа имали су значајно нижи унос витамина К од контролне групе.

Када су у питању минерали, код оболелих је нађен значајно нижи унос бакра и јода. Бакар има важну улогу у организму као кофактор ензима, и показано је да већи дијетарни унос бакра штити од развоја канцера плућа (177), што је у складу са нашим резултатима. Недовољан унос јода је значајан фактор ризика за канцер штитне жлезде, док веза са осталим врстама канцера још увек није расветљена (178). Са друге стране, сматра се да висок дијетарни унос хрома промовише настанак канцера (179). Механизам овог ефекта није у потпуности јасан, али је могуће да хром спречава антитуморска дејства селена, и на тај начин потенцира канцерогенезу (180).

Селен је један од микронутријената, за које је утврђена веза између статуса у организму и неких од карактеристика малигнитета. Показано је да особе са ниским нивоом селена у серуму имају већи морталитет и морбидитет од канцера, што се на молекуларном нивоу објашњава модулисањем оксидативног стреса. Наиме, недовољан унос селена исхраном доводи до екстензивног генерисања реактивних кисеоничних врста (*Reactive Oxygen Species- ROS*,) које доказано учествују у настанку и развоју канцера (181). Због тога се многе антитуморске терапије заснивају на особини лекова да уклањају молекуле ROS-а, а међу њима значајно место заузимају метални комплекси селена (селено-семикарбазони). Ова једињења показала су значајне резултате у уклањању ROS у ћелијској култури канцера дојке и грлића материце (182). Цитотоксични ефекти селено-семикарбазона додатно су појачани у комбинацији са цинком, који такође припада

групи есенцијалних микронутријената, што је показано на низу ћелијских линија канцера различитих ткива хуманог и животињског порекла. Ипак, у нашој студији унос селена и цинка није се разликовао код оболелих особа у односу на унос код здравих. За нашу популацију карактеристичан је низак унос селена, што је и могући разлог сличног уноса селена у обе испитиване групе, тј. унос је у обе групе релативно низак.

Висок унос натријума је пре свега фактор ризика за развој кардиоваскуларних болести, али нека истраживања показују да повећава и ризик за настанак малигнитета, посебно гастроинтестиналног тракта (183, 184). Резултати добијени анализом дијетарних упитника у овој студији су у сагласности са подацима из литературе.

### **5.3 Профил масних киселина у плазми пацијената са карциномом плућа**

Један од циљева ове докторске дисертације био је да се упореде маснокиселински профили фосфолипида плазме болесника са карциномом плућа и контролне групе здравих особа. Састав масних киселина у плазми је огледало дијетарног уноса, али и ендогене синтезе која је у патолошким стањима измењена.

Профил масних киселина у фосфолипидима плазме испитиване групе оболелих од карцинома плућа значајно је различит у односу на контролну групу здравих. Код оболелих налазимо повишене вредности засићених масних киселина (палмитинске киселине 16:0, и укупних SFA), вакценске (18:1 n-7), арахидонске киселине (20:4 n-6) као и повишене вредности односа n-6/n-3 PUFA. Такође се код оболелих региструје значајно снижење у фосфолипидима плазме олеинске киселине, линолне киселине, DHA, MUFA, укупних PUFA, као и PUFA n-3 и n-6 серије. Све ове промене су у правцу неповољног профила масних киселина.

Пацијенти оболели од малигних болести најчешће имају ниже вредности n-3 PUFA у фосфолипидима плазме (58, 185, 186), што је случај и у нашој испитиваној групи. Њихова прогноза је лошија, а n-3 суплементација побољшава одговор на терапију и поспешује клинички одговор. Многе клиничке студије показују бољи одговор на хемиотерапију код оболелих од карцинома плућа, након примене n-3 PUFA

суплементације (111, 114, 115, 187). Механизам селективног деловања n-3 PUFA на хемотерапијски одговор малигног ткива изузимајући здраво ткиво, остаје да се испита.

Посебан значај у многим истраживањима заузима дуголанчана еикозапентаенска киселина (EPA 20:5 n-3). Популационе студије показују да састав серумских масних киселина, као и EPA, је различит у различитим регионима света, и да је корелација дијетарног уноса и серумских вредности посебно јака за ову масну киселину (188, 189). EPA статус је зато неопходно тумачити у корелацији са серумским вредностима здраве популације исте регије. Патолошке вредности EPA показане су код пацијената са карциномом панкреаса, NSCLC карцинома плућа и карцинома езофагуса (60), код карцинома грлића материце (190), као и код лимфома (58). У групи наших ново-дијагностикованих пацијената са карциномом плућа, вредности EPA у серуму биле су ниже него у групи здравих, али ова разлика није била статистички значајна иако је већина оболелих било у одмаклом стадијуму болести. Вредност EPA у плазми није се разликовала између две подгрупе оболелих од NSCLC и SCLC. Ипак, код свих болесника значајно је снижена концентрација DHA, 22:6 n-3, која као и EPA испољава антитуморска и антиинфламаторна дејства (64, 65, 87, 88).

У студији коју су објавили *Liu* и сар., утврђене су значајно повишене вредности арахидонске киселине (AA 20:4 n-6) и линолне киселине (LA 18:2 n-6), као и њихових метаболита, у серуму пацијената оболелих од карцинома плућа (191). Испитивана група оболелих од карцинома у нашој студији (SCLC+NSCLC), такође је имала значајно повишене серумске вредности AA у односу на контролну групу здравих, а значајност је била већа у групи оболелих од ситноћелијског карцинома плућа. Насупрот томе вредности LA у серуму наших пацијената биле су значајно ниже у односу на контролну групу здравих. AA је прекурсор бројних проинфламаторних еикозаноида, и њена концентрација је учестало повећана у плазми особа са карциномима (192, 193). Будући да је LA прекурсор за синтезу AA, смањене вредности LA су могућа последица повећаних потреба за AA. То објашњава и смањење укупних и n-6 PUFA, које су детектоване у групи пацијената са канцером плућа.

Једна од најизраженијих промена у профилу масних киселина у групи болесника је повећан однос n-6/n-3 PUFA. Новије студије показују да смањење односа n-6/n-3 PUFA редукује инвазиони потенцијал код ћелијских линија канцера плућа, вероватно негативном регулацијом гена за молекуле укључене у ћелијску адхезију (194). Ови

результати указују на потенцијалну улогу односа n-6/n-3 PUFA у превенцији и третману канцера. У прилог томе говоре и бројне епидемиолошке студије, које показују да се ризик од канцера значајно смањује са повећаним уносом n-3 PUFA и смањеним уносом n-6/n-3 PUFA. Докази постоје за неколико врста солидних тумора, као што су малигни меланом, колоректални и хепатоцелуларни карцином али и за хематоонколошка обољења (195-197).

За одређене врсте канцера, као што је канцер простате, епидемиолошке студије су показале контрадикторне резултате, од смањења ризика, преко тога да унос n-3 PUFA нема ефекта на ризик, до повећања ризика од настанка карцинома простате приликом повећаног уноса n-3 PUFA, тако да још увек нема конзистентног закључка. Експерименти на мишевима којима су инјектиране ћелије карцинома простате показали су да исхрана код које је однос n-6/n-3 PUFA 1:1 доводи до значајног смањења експресије туморске циклооксигеназе-2 и PGE<sub>2</sub> у односу на животиње храњене претежно n-6 МК (198). За ризик од настанка карцинома дојке, мета-анализом 11 независних проспективних студија којима је обухваћено укупно 274 135 одраслих жена, потврђен је протективни ефекат n-3 PUFA на развој карцинома дојке. Повећање дијетарног уноса n-3/n-6 PUFA за само 10% смањује ризик од настанка карцинома дојке за 6% (199). Колико је значајан однос PUFA у дијети, а не само количина конзумираних n-3 PUFA, показала је студија на пацијентима са колоректалним канцером: однос 2,5:1 n-6/n-3 PUFA зауставио је ћелијску пролиферацију, док однос 4:1 није имао ефекта, иако је количина n-3 у исхрани остала непромењена. Када је у питању карцином плућа, неколико интервентних студија са суплементацијом n-3 PUFA је показало значајно побољшање општег стања пацијената, смањење кахексије и побољшање ефеката терапије (112-115, 185, 186). Студије су углавном спровођене на пацијентима са NSCLC, код којих је статус масних киселина одређиван у крви, и на основу тих промена одређиван начин и врста суплементације.

Повећање нивоа палмитинске киселине се често налази код особа са различитим малигним обољењима, али му се дуго није придавао велики значај. Наиме, смањење релативног удела PUFA, услед повећане потрошње током синтезе еикозаноида, води у релативно повећање SFA и/или MUFA. Међутим, истраживања су показала да је код болесника са малигним болестима значајно повишена активност FAS - синтетазе масних киселина, што доводи до акумулације SFA у ћелијама, пре свега палмитинске киселине. Упоредо, запажена је инхибиција серин-палмитоил трансферазе, кључног ензима у

синтези сфингофосфолипида. Такође је повећана активност ензима карнитин–ацил трансферазе 1 који преноси SFA у митохондрије где оне потом подлежу процесу бета-оксидације и на тај начин се смањујује *de novo* синтеза церамида. Тим двоструким механизмом смањена је концентрација церамида, кључног молекула у процесу фосфолипидима посредоване апоптозе (200). Ипак, стеаринска киселина, која је такође засићена (18:0) има изражено антитуморско дејство (201). У овој студији није било разлике у нивоу стеаринске киселине фосфолипида плазме између здравих и оболелих особа.

## **5.4 Промене у активности система десатураза/елонгаза у плазми болесника са карциномом плућа**

С обзиром да се профил масних киселина у фосфолипидима плазме значајно разликовао код пацијената са канцером плућа у односу на здраву популацију, следећи корак био је поређење процењених активности десатураза. Статистички значајне разлике у плазми нађене су само код активности  $\Delta 6$  десатуразе, која је повишена код пацијената са карциномом. Подела оболелих на подгрупе SCLC и NSCLC показала је да је активност  $\Delta 6$  десатуразе значајно повишена само код NSCLC подгрупе.

Код здравих људи PUFA унете храном имају главну улогу у регулисању  $\Delta 6$  и  $\Delta 5$  десатуразе. У овај систем регулације укључени су транскрипциони фактори: пероксизом - пролифератор активирани рецептор  $\alpha$  (*peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$*  - PPAR  $\alpha$ ) и стерол регулаторни елемент-везујући протеин 1c (*sterol regulatory binding protein 1c* - SREBP-1c). Транскрипциони фактор SREBP-1c у јетри активира гене одговорне за синтезу PUFA, укључујући  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  и  $\Delta 9$  десатуразе. Готово све PUFA, и прекурсори и производи активности  $\Delta 5$  и  $\Delta 6$  десатуразе инхибирају активност SREBP-1c, а PUFA дугог ланца су у томе ефикасније од LA (202). Осим масних киселина, и инсулин овим механизмом остварује своје регулаторно дејство.



Што се тиче регулационих механизма PPAR  $\alpha$ , лиганди за овај рецептор су нађени у промоторским регионима гена за десатуразе  $\Delta 6$  и  $\Delta 5$ . PPAR  $\alpha$  учествује у индукцији гена укључених у оксидацију PUFA. Фибрати, на пример, припадају лигандима који активирају PPAR  $\alpha$  и показано је да лечење хиперлипидемија фибратном терапијом доводи до промене активности  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  и  $\Delta 9$  десатураза у фосфолипидима серума и еритроцита (84).

Иако нема довољно података о активности система десатураза у канцерима, неколико радова показало је већу активност  $\Delta 6$  десатуразе, и то код акутне лимфобластне леукемија, не-Хочкиновог лимфома и канцера езофагуса (58, 60, 203). Друге студије нису детектовале промене у активности десатураза, нпр. код акутне мијелобластне леукемије и канцера плућа (60, 203), што се разликује од наших резултата. Могуће је да промене у активности десатураза зависе од типа малигнитета, што је и у складу са разликама нађеним између SCLC и NSCLC пацијената, а даља истраживања требало би да расветле разлоге и механизме одговорне за ове промене.

## **5.5 Профил масних киселина у малигном и здравом ткиву пацијената са карциномом плућа**

Познато је да се ћелије канцера деле знатно брже од здравих ћелија, те зато имају повећане потребе за енергијом и макронутријентима. Да би задовољиле повећане потребе, малигне ћелије подлежу великим метаболичким модификацијама (204). Промене су посебно изражене у метаболизму липида. У досадашњем раду показали смо да су те промене системске, и да се одражавају на маснокиселински састав фосфолипида у циркулацији. Ипак, није познато да ли су те промене исте и у самом оболелом ткиву. Ткиво је мање доступан материјал од крви, па је и литература о метаболизму липида у канцерском ткиву знатно скромнија.

У овом раду поредили смо састав масних киселина у здравом и малигном плућном ткиву оболелих од карцинома плућа. Сваком болеснику узиман је узорак из оболелог ткива као и део здравог ткива, како би болесници сами себи били контрола. Резултати су статистички обрађени спареним т-тестом, односно Вилкоксоновим тестом

у случају непараметарске расподеле варијабли. Као што је очекивано, запажене су значајне разлике у саставу масних киселина фосфолипида здравог и оболелог ткива. У малигном ткиву налазе се снижене вредности SFA и палмитинске киселине, као и есенцијалних масних киселина линолне и  $\alpha$ -линоленске киселине. Више су вредности мононезасићених масних киселина (олеинске, вакценске и укупних MUFA), затим арахидонске и њеног метаболита докозатетраенске киселине, као и односа n-6/n-3 PUFA.

Једна од најважнијих карактеристика канцерског ткива је убрзана липогенеза. Пuteви *de novo* синтезе масних киселина се годинама интензивно проучавају, јер се сматрају основним механизмом којим се малигна ћелија снабдева масним киселинама (204). Међутим, новија истраживања показују да одређена канцерска ткива осим липогенезе користе и липолизу да би обезбедиле довољну количину масних киселина (204). У зависности од врсте тумора у ћелијама се синтетише до 95% засићених и мононезасићених масних киселина, упркос довољном дијетарном уносу масти (92, 205, 206). То је и разлог што се ензими укључени у метаболизам масти све више испитују као потенцијални таргети за нове антитуморске терапије. Насупрот томе, ткиво сисара има ограничену могућност за синтезу полинезасићених масних киселина услед недостатка  $\Delta 12$  десатуразе, кључног ензима за биосинтезу PUFA у нижим организмима. Ћелијску мембрану малигну ћелија зато углавном чине засићене и мононезасићене масне киселине, те је малигно ткиво отпорније на оксидативни стрес и програмирану ћелијску смрт (206).

У складу са овим је и налаз значајно већег садржаја мононезасићених масних киселина у малигном ткиву испитаника оболелих од карцинома у нашој студији. Повећан је ниво укупних MUFA, као и олеинске и вакценске киселине. Иако се очекује и повећање палмитинске киселине и укупних SFA, оне су у нашој студији снижене. Ако анализирамо одвојено пацијенте са NSCLC и SCLC, уочићемо да се промене у овим ткивима разликују. Код NSCLC ткива, палмитинска и SFA су такође снижене, али се ниво олеинске киселине не разликује у односу на здраво ткиво. У ткиву SCLC нема разлике у палмитинској киселини и SFA у поређењу са здравим ткивом, али су олеинска, вакценска киселина и MUFA значајно повишене. MUFA имају проканцерогено дејство – утицајем на флуидност ћелијске мембране, секрецију проинфламаторних цитокина, путем сигналне трансдукције (активирањем ензима протеин киназе Ц, фосфолипазе А2,

фосфатидилинозитол-3 киназе и др.), или генске експресије (нпр. индукција c-fos) (207, 208).

Већ је било речи о значају PUFA у малигним болестима, и да су оне по правилу снижене у циркулацији болесника са различитим канцерима. Резултати наше студије показују значајно смањење есенцијалних масних киселина – линолне, која је прекурсор n-6 PUFA, и  $\alpha$ -линоленске киселине, прекурсора n-3 PUFA. Разлог за редукцију нивоа ових масних киселина могла би да буде повећана синтеза цитокина. У прилог томе говори и висок ниво AA, која настаје конверзијом линолне киселине. Из AA се даље генеришу кључни проинфламаторни еикозаноиди: простагландини серије 2 (PDG2, PGE2, PGF2, PGI2) и леукотриени серије 4 (LTA4, LTB4, LTC4, LTD4 и LTE4) под дејствојм ензима циклооксигеназе (COX) и липооксигеназе (LOX) (64, 65). Повећање AA се иначе сматра маркером инфламације (87). Проинфламаторни ефекти се приписују у докозатетраенској киселини (22:4, n-6), која је такође повећана у малигнуом плућном ткиву. Са друге стране, ниво докозапентаенске киселине (22:5, n-3), која припада антиинфламаторним масним киселинама, у оболелом ткиву плућа је нижи у односу на здраво ткиво. Све ово резултира повећањем односа n-6/n-3 PUFA. Овај однос је релативно неповољан и у здравом ткиву, што је последица неадекватног уноса n-6/n-3 PUFA, што је типично за наше подручје. Међутим, додатно погоршање уочава се у оболелом плућном ткиву, што се пре свега може приписати променама у метаболизму масти у туморима.

### **5.5.1 ПОРЕЂЕЊЕ ПРОФИЛА МАСНИХ КИСЕЛИНА У МАЛИГНОМ ТКИВУ ПАЦИЈЕНАТА СА NSCLC И SCLC**

Све горе поменуте промене уочавају се код свих болесника (NSCLC + SCLC), као и у подгрупама NSCLC и SCLC. Код оболелих од SCLC, уочава се још и смањење DHA, (22:6, n-3), једне од најзначајних PUFA са снажним антитуморским и антиинфламаторним деловањем, као и дихомо- $\gamma$ -линоленске киселине (20:3, n-6), једине PUFA из n-6 фамилије са антиинфламаторним особинама (209). Такође, однос n-6/n-3 PUFA је већи код SCLC пацијената, и цео маснокиселински профил је код њих више промењен у

односу на здраво ткиво, што све заједно указује на знатно неповољнију слику код болесника са SCLC у односу на NSCLC пацијенте.

Треба имати у виду да се све наведене промене односе на поређење малигног ткива са здравим ткивом. Да бисмо испитали разлике у профилима масних киселина фосфолипида ткива према типу карцинома, поредили смо профиле SCLC и NSCLC ткива. У SCLC ткиву нађене су мање вредности линолне киселине, n-3 PUFA, n-6 PUFA и укупних PUFA. Виши је ниво стеаринске киселине и SFA.

Предуслов за ширење тумора и настанак метастаза је ангиогенеза - формирање нове мреже крвних судова, односно неоваскуларизација. За ангиогенезу су одговорни фактори раста – VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor), као и еикозаноиди пореклом из n-6 PUFA (210). Простагландини n-6 фамилије настали активношћу ензима COX-2 (PGE2, PGF2) индукују синтезу информационе РНК за VEGF, а у мањој мери и за bFGF, TGF $\beta$ , PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Леукотриени синтетисани из n-6 PUFA помоћу ензима липооксигеназе, повећавају адхезију ендотелних ћелија микроваскуларизације уз индукцију bFGF. Оксидативни производи n-3 PUFA имају супротно дејство, тј. инхибирају ангиогенезу и туморски раст као и канцерску кахексију за коју су одговорни проинфламаторни цитокини настали конверзијом n-6 PUFA (65, 211).

## **5.6 Промене у активности система десатураза/елонгаза у малижном ткиву плућа**

Слично као и у фосфолипидима плазме, активност  $\Delta 6$  десатуразе је статистички значајно повећана и у малижном ткиву плућа. Активност осталих десатураза и елонгазе је непромењена у односу на здраво ткиво.

Подела пацијената према типу карцинома на NSCLC и SCLC показује да је повећање активности  $\Delta 6$  десатуразе једина промена код NSCLC подгрупе, док се код SCLC пацијената запажа повећање све три десатуразе:  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  и  $\Delta 9$ .

О могућим разлозима за повећану активност  $\Delta 5$  и  $\Delta 6$  десатуразе већ је било речи. Десатураза  $\Delta 9$  (SCD) је највише проучавана од ових ензима и најбоље је описана у

литератури. До сада су идентификоване 4 изоформе десатураза  $\Delta 9$ , а најзаступљенија у хуманим ткивима је SCD-1. Експресија гена ове изоформе је регулисана исхраном, хормонским статусом и факторима спољашње средине. Генску експресију стимулише исхрана са високим садржајем угљених хидрата, холестерола, унос алкохола и липосолубилних витамина А и D, док се инхибира уносом n-3 и n-6 PUFA, и коњуговане транс LA. Улога SFA и MUFA у регулацији експресије SCD-1 није сасвим позната, иако овај ензим конвертује SFA у MUFA. Ипак, студије показују да исхрана са високим садржајем SFA и MUFA доводи до смањења активности SCD-1 у крви и скелетним мишићима здравих испитаника. Затим, код мишева храњених засићеном стеаринском киселином дошло је до повећања експресије SCD-1 у јетри, док је исхрана са мононезасићеном олеинском киселином довела до смањења експресије SCD-1 (212). Од хормонских фактора, важан регулатор транскрипције гена за SCD-1 је инсулин, који повећава ниво експресије, а са друге стране лептин и естрогени смањују синтезу SCD-1 (213). Такође, краткотрајно гладовање и физичка активност редукују експресију  $\Delta 9$  десатуразе, али хронично гладовање има супротан ефекат.

У неким малигним болестима забележене су повишене активности  $\Delta 9$  десатуразе: код карцинома дојке, панкреаса и не-Хочкиновог лимфома (58, 60, 214). Животне навике утичу на регулацију активности  $\Delta 9$  десатуразе, па се нове стратегије у превенцији хроничних незаразних болести, као што је карцином, између осталог базирају и на модулацији активности  $\Delta 9$  десатуразе.

## **5.7 Промене у саставу масних киселина фосфолипида плазме и малигног ткива пацијената са карциномом плућа**

Наши резултати су показали значајну алтерацију профила масних киселина и у плазми и у плућима болесника са NSCLC и SCLC. Код здравих људи састав масних киселина плазме одражава једним делом унос а другим делом ендегену синтезу, тј. маснокиселински састав у ткивима. Зато се поставља питање да ли су промене профила

масних киселина у ткиву болесника у вези са променама у циркулацији, као што је то случај код здравих особа.

Поређење маснокиселинских профила плазме и ткива показује значајне разлике код свих пацијената. У обе групе оболелих (NSCLC и SCLC) налазимо ниже вредности PUFA у ткиву у односу на плазму, док су у плазми ниже вредности засићених и мононезасићених масних киселина. То указује да су метаболички путеви и њихове промене различите у оболелом ткиву у односу на плазму и да се те промене не рефлектују системски, иако очигледне промене постоје и у самој крви.

## **5.8 Повезаност дијетарног уноса и профила масних киселина фосфолипида плазме**

Будући да састав масних киселина у фосфолипидима плазме пацијената са карциномом плућа не рефлектује слику из самог ткива, поставља се питање да ли он зависи од дијетарног уноса.

Студије показују да се унос масних киселина код здравих људи огледа у саставу липида плазме, при чему је корелација уноса и статуса најјача за фосфолипиде плазме (215-217). Другим речима, фосфолипиди серума/плазме су биомаркери уноса масти у здравој популацији. Утврђено је такође да на ову асоцијацију не утиче узимање лекова за снижење липида, унос алкохола нити време узимања крви (наште или након оброка), али може да утиче пушење, пол и индекс телесне масе (217).

Испитивање повезаности дијетарног уноса и састава масних киселина у фосфолипидима плазме вршено је применом Пирсонове и Спирманове корелације. Добијени резултати показали су да ни у једном случају не постоји статистички значајна повезаност уноса и статуса масних киселина. То говори да је метаболизам масних киселина пацијената са канцером плућа значајно измењен услед саме болести, и да те промене зависе од типа малигнитета.

Ипак, и ова студија као и многе друге, показује да је код већине пацијената са канцером снижен удео PUFA у плазми, посебно n-3 PUFA. Пошто су повољни ефекти n-3 PUFA код пацијената са канцером већ доказани, очекује се да би нутритивна

интервенција и/или суплементација са n-3 PUFA могла да побољша ефекат терапије, а прелиминарни резултати неколико студија су у складу са овим очекивањима. За потврду благотворних ефеката нутритивне интервенције потребна су даља истраживања (218).

## **6. ЗАКЉУЧАК**



Из наведених резултата произилазе следећи закључци:

1. Дијетарни унос пацијената са карциномом плућа значајно се разликује од уноса у здравој популацији.
2. У групи оболелих значајно је већи унос угљених хидрата а мањи унос свих врста масти, осим n-6 PUFA.
3. У групи оболелих значајно је нижи унос воћа, поврћа, млека и млечних производа, коштуњавог воћа и морских плодова, а виши унос брашна и пекарских производа.
4. У групи оболелих значајно је нижи унос јода и витамина Ц, Е и К, док се натријум, хром и пантенол значајно више налазе у исхрани пацијената, него у испитаника контролне групе.
5. Профил масних киселина у фосфолипидима плазме групе оболелих од карцинома плућа значајно је различит у односу на контролну групу здравих испитаника.
6. У групи оболелих значајно су повишене вредности масних киселина 16:0, 18:1n-7, 20:4 n-6, SFA и односа n-6/n-3 PUFA. Смањене су релативне концентрације следећих масних киселина: 18:1 n-9; 18:2 n-6; 22:6 n-3; укупних PUFA, као и PUFA n-3 и n-6 серије.
7. У групи оболелих од SCLC уочава се повећање 16:1 а смањење 20:3 n-6 у поређењу са NSCLC групом.
8. Активност Δ6 десатуразе у фосфолипидима плазме значајно је повећана код болесника са NSCLC, док се активност десатураза и елонгазе не разликује код болесника са SCLC од здраве популације.
9. У малигном ткиву пацијената снижене су вредности SFA, као и 16:0, 18:2 n-6, 18:3 n-3 и 22:5 n-3 масних киселина, а више су вредности следећих масних киселина: 18:1 n-9, 18:1 n-7, 20:4 n-6, 22:4 n-6, MUFA и односа n-6/n-3 PUFA.
10. У малигном ткиву значајно је повећана активност Δ6 десатуразе у односу на здраво ткиво истог пацијента.

11. У групи оболелих од NSCLC статистички значајно је већа присутност следећих масних киселина: 18:1 n-7, 20:3 n-6, 20:4 n-6, 22:4 n-6, PUFA и n-6 PUFA, а смањен удео 16:0, 18:3 n-3 (ALA) и SFA.
12. У NSCLC ткиву значајно је повећана активност  $\Delta 6$  десатуразе у односу на здраво ткиво истог пацијента.
13. У групи оболелих од SCLC статистички значајно је већа присутност следећих масних киселина: 18:1 n-9, 18:1 n-7, AA, 22:4n-6, MUFA и односа n-6/n-3 PUFA, а смањен удео 18:2 n-6, EPA, 22:5 n-3, 22:6 n-3 и n-3 PUFA.
14. У SCLC ткиву значајно је повећана активност десатуразе  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$  и  $\Delta 9$  у односу на здраво ткиво истог пацијента.
15. У SCLC ткиву значајно је виши удео 18:0 и SFA, а мања је присутност 18:2 n-6, PUFA, n-3 PUFA и n-6 PUFA у поређењу са ткивом NSCLC.
16. У SCLC ткиву значајно је већа активност десатуразе  $\Delta 6$  и елонгазе, док је активност  $\Delta 9$  десатураза виша у NSCLC ткиву.
17. Промене у маснокиселинском саставу фосфолипида плазме нису у вези са променама у маснокиселинском саставу фосфолипида ткива код пацијената са NSCLC нити са SCLC.
18. Не постоји статистички значајна повезаност дијетарног уноса и статуса масних киселина фосфолипида плазме код пацијената са карциномом плућа.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Dingemans A-MC, Reck M, Westeel V. Lung Cancer. Dingemans A-MC, Reck M, Westeel V, editors 2015. 285 p.
2. Peters S, Adjei A, Gridelli C, Reck M, Kerr K, Felip E, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2012;23(suppl\_7):vii56-vii64.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5).
5. Gibson J, Loddenkemper R, Sibille Y. Lung Cancer. Sheffield, editor: European Respiratory Society; 2013.
6. Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med*. 2011;365(5):395-409.
7. Bray FI, Weiderpass E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. *Int J Cancer*. 2010;126(6):1454-66.
8. Services UDoHaH. The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: a report of the Surgeon General. Atlanta, US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 2006.
9. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):778-90.
10. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005;330(7485):223.
11. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the

- European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol.* 2013;14(9):813-22.
12. Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels: the IARC international multicentre case-control study in Eastern/Central Europe and the United Kingdom. *Am J Epidemiol.* 2005;162(4):326-33.
  13. Albert RK, Spiro SG, Jett JR. Section 10: Lung Tumors. *Clinical Respiratory Medicine.* 2<sup>nd</sup> ed ed2004.
  14. Hemminki K. DNA adducts, mutations and cancer. *Carcinogenesis.* 1993;14(10):2007-12.
  15. Jha P, Peto R, Zatonski W, Boreham J, Jarvis MJ, Lopez AD. Social inequalities in male mortality, and in male mortality from smoking: indirect estimation from national death rates in England and Wales, Poland, and North America. *Lancet.* 2006;368(9533):367-70.
  16. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ.* 2000;321(7257):323-9.
  17. Commission E. Attitudes of Europeans towards tobacco. Special Eurobarometer 385/Wave EB77.1 - TNS Opinion & Social. . European Commission; 2012.
  18. Becker N, Motsch E, Gross ML, Eigentopf A, Heussel CP, Dienemann H, et al. Randomized study on early detection of lung cancer with MSCT in Germany: study design and results of the first screening round. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138(9):1475-86.
  19. Field JK, van Klaveren R, Pedersen JH, Pastorino U, Paci E, Becker N, et al. European randomized lung cancer screening trials: Post NLST. *J Surg Oncol.* 2013;108(5):280-6.
  20. Pedersen JH, Ashraf H, Dirksen A, Bach K, Hansen H, Toennesen P, et al. The Danish randomized lung cancer CT screening trial--overall design and results of the prevalence round. *J Thorac Oncol.* 2009;4(5):608-14.
  21. van Klaveren RJ, Oudkerk M, Prokop M, Scholten ET, Nackaerts K, Vernhout R, et al. Management of lung nodules detected by volume CT scanning. *N Engl J Med.* 2009;361(23):2221-9.
  22. Humphrey LL, Deffebach M, Pappas M, Baumann C, Artis K, Mitchell JP, et al. Screening for lung cancer with low-dose computed tomography: a systematic review to update the US Preventive services task force recommendation. *Ann Intern Med.* 2013;159(6):411-20.

23. Buccheri G, Ferrigno D. Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J.* 2004;24(6):898-904.
24. Sekulić S. *Plućne bolesti Beograd: Ed Elit Medica; 2000.*
25. Srbije Azazu. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje carcinoma pluća 2012.
26. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest.* 2003;123(1 Suppl):97S-104S.
27. Doms C, Muylle I, Yserbyt J, Ninane V. Endobronchial ultrasound in the management of nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev.* 2013;22(128):169-77.
28. Doms C, Tournoy KG, Schuurbiers O, Decaluwe H, De Ryck F, Verhagen A, et al. Endosonography for mediastinal nodal staging of clinical N1 non-small cell lung cancer: a prospective multicenter study. *Chest.* 2015;147(1):209-15.
29. Luketich JD, Friedman DM, Meltzer CC, Belani CP, Townsend DW, Christie NA, et al. The role of positron emission tomography in evaluating mediastinal lymph node metastases in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2001;2(3):229-33.
30. Vansteenkiste JF. PET scan in the staging of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2003;42 Suppl 1:S27-37.
31. Wang J, Welch K, Wang L, Kong FM. Negative predictive value of positron emission tomography and computed tomography for stage T1-2N0 non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Lung Cancer.* 2012;13(2):81-9.
32. Wang Memoli JS, El-Bayoumi E, Pastis NJ, Tanner NT, Gomez M, Huggins JT, et al. Using endobronchial ultrasound features to predict lymph node metastasis in patients with lung cancer. *Chest.* 2011;140(6):1550-6.
33. Chin T, Yano T, Akusawa K, Kadota A, Tanigawa S, Koya Y, et al. [Clinical evaluation of fiberoptic bronchoscopy for the diagnosis of solitary pulmonary nodules 2 cm or less in diameter of chest roentgenogram]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* 1996;34(3):266-9.
34. Du Rand IA, Blaikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S, et al. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by NICE. *Thorax.* 2013;68 Suppl 1:i1-i44.

35. Finkelstein SE, Summers RM, Nguyen DM, Stewart JHT, Tretler JA, Schrupp DS. Virtual bronchoscopy for evaluation of malignant tumors of the thorax. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123(5):967-72.
36. Zaric B, Stojic V, Carapic V, Kovacevic T, Stojanovic G, Panjkovic M, et al. Radial Endobronchial Ultrasound (EBUS) Guided Suction Catheter-Biopsy in Histological Diagnosis of Peripheral Pulmonary Lesions. *J Cancer.* 2016;7(1):7-13.
37. Zaric B, Stojic V, Sarcev T, Stojanovic G, Carapic V, Perin B, et al. Advanced bronchoscopic techniques in diagnosis and staging of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013;5 Suppl 4:S359-70.
38. Luke WP, Pearson FG, Todd TR, Patterson GA, Cooper JD. Prospective evaluation of mediastinoscopy for assessment of carcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986;91(1):53-6.
39. Popovac D. Bolesti pluca, VI dopunjeno I preradjeno izdanje 2004.
40. Wallace MB, Pascual JM, Raimondo M, Woodward TA, McComb BL, Crook JE, et al. Minimally invasive endoscopic staging of suspected lung cancer. *JAMA.* 2008;299(5):540-6.
41. Wei B, Bryant AS, Minnich DJ, Cerfolio RJ. The safety and efficacy of mediastinoscopy when performed by general thoracic surgeons. *Ann Thorac Surg.* 2014;97(6):1878-83; discussion 83-4.
42. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK. World Health Organisation Classification of Tumors. *Patology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.* Lyon: IARC press; 2004.
43. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(5):668-84.
44. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(2):244-85.
45. Eguchi T, Kadota K, Park BJ, Travis WD, Jones DR, Adusumilli PS. The new IASLC-ATS-ERS lung adenocarcinoma classification: what the surgeon should know. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;26(3):210-22.

46. Kerr KM. Clinical relevance of the new IASLC/ERS/ATS adenocarcinoma classification. *J Clin Pathol*. 2013;66(10):832-8.
47. Stenhouse G, Fyfe N, King G, Chapman A, Kerr KM. Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004;57(4):383-7.
48. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(6):767-73.
49. Brambilla C, Laffaire J, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, Mignotte H, Arbib F, et al. Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity. *Clin Cancer Res*. 2014;20(22):5777-86.
50. Thunnissen E, Noguchi M, Aisner S, Beasley MB, Brambilla E, Chirieac LR, et al. Reproducibility of histopathological diagnosis in poorly differentiated NSCLC: an international multiobserver study. *J Thorac Oncol*. 2014;9(9):1354-62.
51. AJCC. *AJCC Cancer staging manual*. ed. t, editor. New York: Springer; 2016.
52. Gospodarowicz MK, Brierley JD, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons; 2017.
53. De Ruyscher D, Nakagawa K, Asamura H. Surgical and nonsurgical approaches to small-size nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2014;44(2):483-94.
54. Jakovic R, Stanic V, Cemerikic- Martinovic V. *Tumori pluca, dijagnostika I hirusko lecenje*. : Jugoslovenska knjiga; 2000.
55. Vansteenkiste J, Crino L, Doooms C, Douillard JY, Faivre-Finn C, Lim E, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1462-74.
56. Vansteenkiste J, De Ruyscher D, Eberhardt WE, Lim E, Senan S, Felip E, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 6:vi89-98.
57. Robey RB, Weisz J, Kuemmerle NB, Salzberg AC, Berg A, Brown DG, et al. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis*. 2015;36 Suppl 1:S203-31.
58. Cvetkovic Z, Vucic V, Cvetkovic B, Petrovic M, Ristic-Medic D, Tepsic J, et al. Abnormal fatty acid distribution of the serum phospholipids of patients with non-Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol*. 2010;89(8):775-82.



59. Murphy RA, Bureyko TF, Mourtzakis M, Chu QS, Clandinin MT, Reiman T, et al. Aberrations in plasma phospholipid fatty acids in lung cancer patients. *Lipids*. 2012;47(4):363-9.
60. Zuijdgeest-van Leeuwen SD, van der Heijden MS, Rietveld T, van den Berg JW, Tilanus HW, Burgers JA, et al. Fatty acid composition of plasma lipids in patients with pancreatic, lung and oesophageal cancer in comparison with healthy subjects. *Clin Nutr*. 2002;21(3):225-30.
61. Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Reiman T, Mazurak VC. Skeletal muscle depletion is associated with reduced plasma (n-3) fatty acids in non-small cell lung cancer patients. *J Nutr*. 2010;140(9):1602-6.
62. Weisburger JH. Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J Am Diet Assoc*. 1997;97(7 Suppl):S16-23.
63. Tepsic J, Vucic V, Arsic A, Blazencic-Mladenovic V, Mazic S, Glibetic M. Plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid profile in professional basketball and football players. *European journal of applied physiology*. 2009;107(3):359-65.
64. Vučić V. The role of dietary polyunsaturated fatty acids in inflammation. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2013;14(3):93-9.
65. Vučić V, Ristić-Medić D. Eicosapentaenoic Acid: The Role in Malignant Diseases. *EICOSAPENTAENOIC ACID*. 2012:99.
66. Kim H, Min HK, Kong G, Moon MH. Quantitative analysis of phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines in urine of patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2009;393(6-7):1649-56.
67. Min HK, Kong G, Moon MH. Quantitative analysis of urinary phospholipids found in patients with breast cancer by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry: II. Negative ion mode analysis of four phospholipid classes. *Anal Bioanal Chem*. 2010;396(3):1273-80.
68. Min HK, Lim S, Chung BC, Moon MH. Shotgun lipidomics for candidate biomarkers of urinary phospholipids in prostate cancer. *Anal Bioanal Chem*. 2011;399(2):823-30.
69. Preetha A, Banerjee R, Huilgol N. Surface activity, lipid profiles and their implications in cervical cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2005;1(3):180.

70. Kuliszkiwicz-Janus M, Janus W, Baczynski S. Application of <sup>31</sup>P NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipids in leukemia, lymphoma and some other non-haematological cancers. *Anticancer Res.* 1996;16(3B):1587-94.
71. Raffelt K, Moka D, Sullentrop F, Dietlein M, Hahn J, Schicha H. Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an in-vitro (<sup>31</sup>P) high-resolution NMR study. *NMR Biomed.* 2000;13(1):8-13.
72. Sullentrop F, Moka D, Neubauer S, Haupt G, Engelmann U, Hahn J, et al. <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. *NMR Biomed.* 2002;15(1):60-8.
73. Taylor LA, Arends J, Hodina AK, Unger C, Massing U. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Health Dis.* 2007;6:17.
74. Cvetkovic Z, Cvetkovic B, Petrovic M, Ranic M, Debeljak-Martarcic J, Vucic V, et al. Lipid profile as a prognostic factor in cancer patients. *J BUON.* 2009;14(3):501-6.
75. Jackson RL, Gotto AM, Jr. Phospholipids in biology and medicine (first of two parts). *N Engl J Med.* 1974;290(1):24-9.
76. Morrisett JD, Jackson RL, Gotto Jr AM. Lipoproteins: structure and function. *Annual review of biochemistry.* 1975;44(1):183-207.
77. Jackson RL, Gotto AM, Jr. Phospholipids in biology and medicine (second of two parts). *N Engl J Med.* 1974;290(2):87-93.
78. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* 1985;26(9):1015-35.
79. van Meer G. Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol.* 1989;5:247-75.
80. Wright ME, Park Y, Subar AF, Freedman ND, Albanes D, Hollenbeck A, et al. Intakes of fruit, vegetables, and specific botanical groups in relation to lung cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Am J Epidemiol.* 2008;168(9):1024-34.
81. Wolf C, Quinn PJ. Lipidomics: practical aspects and applications. *Prog Lipid Res.* 2008;47(1):15-36.
82. Lepšanović L, Lj. L. Lipidi i lipoproteini. . In: L L, editor. *Klinicka lipidologija Beograd: Savremena administracija*; 2000. p. 9-58.
83. P K. Masti i metabolizam masti. U *Biokemija.* . In: P K, editor. *Biokemija. Zagreb: Školska knjiga*; 1988. p. 215-28.

84. Ristic-Medic D, Suzic S, Vucic V, Takic M, Tepsic J, Glibetic M. Serum and erythrocyte membrane phospholipids fatty acid composition in hyperlipidemia: effects of dietary intervention and combined diet and fibrate therapy. *Gen Physiol Biophys*. 2009;28 Spec No:190-9.
85. Vučić V, Arsić A, Petrović S, Milanović S, Gurinović M, Glibetić M. Trans fatty acid content in Serbian margarines: Urgent need for legislative changes and consumer information. *Food chemistry*. 2015;185:437-40.
86. Hamilton JA. Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res*. 1998;39(3):467-81.
87. Calder PC. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc*. 2013;72(3):326-36.
88. Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(3):645-62.
89. Vucic V, Tepsic J, Arsic A, Popovic T, Debeljak-Martacic J, Glibetic M. Fatty acid content of vegetable oils and assessment of their consumption in Serbia. *Acta alimentaria*. 2012;41(3):343-50.
90. Kris-Etherton PM, Innis S, Ammerican Dietetic A, Dietitians of C. Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: dietary fatty acids. *J Am Diet Assoc*. 2007;107(9):1599-611.
91. Ratnayake WM, Galli C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann Nutr Metab*. 2009;55(1-3):8-43.
92. Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, et al. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(29):10715-20.
93. Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Progress in lipid research*. 2006;45(3):237-49.
94. Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr*. 2004;23(4):281-302.
95. Marzo I, Alava MA, Pineiro A, Naval J. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in human cells: evidence that two different delta 6-desaturase activities may exist. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1301(3):263-72.

96. Guillou H, Zadavec D, Martin PG, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res.* 2010;49(2):186-99.
97. Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(1):E28-37.
98. Chajes V, Jenab M, Romieu I, Ferrari P, Dahm CC, Overvad K, et al. Plasma phospholipid fatty acid concentrations and risk of gastric adenocarcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Am J Clin Nutr.* 2011;94(5):1304-13.
99. Warensjo E, Rosell M, Hellenius ML, Vessby B, De Faire U, Riserus U. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis.* 2009;8:37.
100. Brown JM, Rudel LL. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 inhibition and the metabolic syndrome: considerations for future drug discovery. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(3):192-7.
101. Nakamura MT, Cheon Y, Li Y, Nara TY. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids.* 2004;39(11):1077-83.
102. Nakamura MT, Nara TY. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu Rev Nutr.* 2004;24:345-76.
103. Ristic Medic D, Ristic V, Arsic A, Postic M, Ristic G, Blazencic Mladenovic V, et al. Effects of soybean D-LeciVita product on serum lipids and fatty acid composition in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16(6):395-404.
104. Krachler B, Norberg M, Eriksson JW, Hallmans G, Johansson I, Vessby B, et al. Fatty acid profile of the erythrocyte membrane preceding development of Type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18(7):503-10.
105. Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem.* 1999;274(33):23577-83.
106. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of lipid research.* 1985;26(9):1015-35.
107. Cvetkovic B, Vucic V, Cvetkovic Z, Popovic T, Glibetic M. Systemic alterations in concentrations and distribution of plasma phospholipids in prostate cancer patients. *Med Oncol.* 2012;29(2):809-14.

108. Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc.* 2009;109(4):668-79.
109. Riediger ND, Othman R, Fitz E, Pierce GN, Suh M, Moghadasian MH. Low n-6: n-3 fatty acid ratio, with fish-or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. *European journal of nutrition.* 2008;47(3):153-60.
110. Arshad A, Al-Leswas D, Stephenson J, Metcalfe M, Dennison A. Potential applications of fish oils rich in n-3 fatty acids in the palliative treatment of advanced pancreatic cancer. *Br J Nutr.* 2011;106(6):795-800.
111. Cvetković Z, Vučić V, Cvetković B, Karadžić I, Ranić M, Glibetić M. Distribution of plasma fatty acids is associated with response to chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Medical Oncology.* 2013;30(4):741.
112. Murphy RA, Clandinin MT, Chu QS, Arends J, Mazurak VC. A fishy conclusion regarding n-3 fatty acid supplementation in cancer patients. *Clinical nutrition.* 2013;32(3):466-7.
113. Murphy RA, Mourtzakis M, Mazurak VC. n-3 polyunsaturated fatty acids: the potential role for supplementation in cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 2012;15(3):246-51.
114. Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Baracos VE, Reiman T, Mazurak VC. Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2011;117(16):3774-80.
115. Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Baracos VE, Reiman T, Mazurak VC. Nutritional intervention with fish oil provides a benefit over standard of care for weight and skeletal muscle mass in patients with nonsmall cell lung cancer receiving chemotherapy. *Cancer.* 2011;117(8):1775-82.
116. Schwingshackl L, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer.* 2014;135(8):1884-97.
117. Norat T, Scoccianti C, Boutron-Ruault MC, Anderson A, Berrino F, Cecchini M, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer. *Cancer Epidemiol.* 2015;39 Suppl 1:S56-66.
118. Vergnaud AC, Norat T, Mouw T, Romaguera D, May AM, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Macronutrient composition of the diet and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA study. *PLoS One.* 2013;8(3):e57300.

119. Vergnaud AC, Romaguera D, Peeters PH, van Gils CH, Chan DS, Romieu I, et al. Adherence to the World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research guidelines and risk of death in Europe: results from the European Prospective Investigation into Nutrition and Cancer cohort study<sup>1,4</sup>. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(5):1107-20.
120. Stojanović A, Zeković M, Rašić-Milutinović Z, Ristić-Medić D, Pokimica B, Debeljak-Martačić J, et al. Dietary intake in newly diagnosed lung cancer patients. 2017.
121. Anderson AS, Key TJ, Norat T, Scocciati C, Cecchini M, Berrino F, et al. European Code against Cancer 4th Edition: Obesity, body fatness and cancer. *Cancer Epidemiol*. 2015;39 Suppl 1:S34-45.
122. Hu FB. Resolved: there is sufficient scientific evidence that decreasing sugar-sweetened beverage consumption will reduce the prevalence of obesity and obesity-related diseases. *Obes Rev*. 2013;14(8):606-19.
123. Wang M, Qin S, Zhang T, Song X, Zhang S. The effect of fruit and vegetable intake on the development of lung cancer: a meta-analysis of 32 publications and 20,414 cases. *Eur J Clin Nutr*. 2015;69(11):1184-92.
124. Molendi-Coste O, Legry V, Leclercq IA. Why and how meet n-3 PUFA dietary recommendations? *Gastroenterology research and practice*. 2011;2011.
125. Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol*. 2002;3(8):461-9.
126. Buchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, Kampman E, Egevad L, Overvad K, et al. Variety in vegetable and fruit consumption and risk of bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2011;128(12):2971-9.
127. Takata Y, Xiang YB, Yang G, Li H, Gao J, Cai H, et al. Intakes of fruits, vegetables, and related vitamins and lung cancer risk: results from the Shanghai Men's Health Study (2002-2009). *Nutr Cancer*. 2013;65(1):51-61.
128. Epplein M, Franke AA, Cooney RV, Morris JS, Wilkens LR, Goodman MT, et al. Association of plasma micronutrient levels and urinary isoprostane with risk of lung cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(7):1962-70.
129. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502.

130. Djekic-Ivankovic M, Weiler HA, Nikolic M, Kadvan A, Gurinovic M, Mandic LM, et al. Validity of an FFQ assessing the vitamin D intake of young Serbian women living in a region without food fortification: the method of triads model. *Public Health Nutr.* 2016;19(3):437-45.
131. Pardini RS. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chem Biol Interact.* 2006;162(2):89-105.
132. Robinson LE, Clandinin MT, Field CJ. R3230AC rat mammary tumor and dietary long-chain (n-3) fatty acids change immune cell composition and function during mitogen activation. *J Nutr.* 2001;131(7):2021-7.
133. Gurinovic M, Milesevic J, Kadvan A, Djekic-Ivankovic M, Debeljak-Martacic J, Takic M, et al. Establishment and advances in the online Serbian food and recipe data base harmonized with EuroFIR standards. *Food Chem.* 2016;193:30-8.
134. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.
135. Zilversmit DB, Davis AK. Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation. *J Lab Clin Med.* 1950;35(1):155-60.
136. Popovic T, Borozan S, Arsic A, Martacic JD, Vucic V, Trbovic A, et al. Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male Wistar rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2012;96(6):1020-9.
137. Petrovic S, Takic M, Arsic A, Vucic V, Drakulic D, Milosevic M, et al. Effect of sex hormones on plasma phospholipid fatty acid composition in intact rats and rats with bilaterally occluded carotid arteries. *Physiol Res.* 2014;63(3):331-9.
138. Arsic A, Vucic V, Tepsic J, Mazic S, Djelic M, Glibetic M. Altered plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid profile in elite female water polo and football players. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012;37(1):40-7.
139. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2015;65(1):5-29.
140. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003;123(1):21S-49S.
141. Anderson JE, Jorenby DE, Scott WJ, Fiore MC. Treating tobacco use and dependence: an evidence-based clinical practice guideline for tobacco cessation. *Chest.* 2002;121(3):932-41.

142. Jha P, Ramasundarahettige C, Landsman V, Rostron B, Thun M, Anderson RN, et al. 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(4):341-50.
143. Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V, Collaborators MWS. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. *The Lancet*. 2013;381(9861):133-41.
144. Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, et al. American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(1):30-67.
145. Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish family-cancer database. *International Journal of Cancer*. 2002;99(2):260-6.
146. Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*. 2002;296(5568):695-8.
147. Agurs-Collins T, Rosenberg L, Makambi K, Palmer JR, Adams-Campbell L. Dietary patterns and breast cancer risk in women participating in the Black Women's Health Study. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(3):621-8.
148. Cerhan JR, Potter JD, Gilmore JM, Janney CA, Kushi LH, Lazovich D, et al. Adherence to the AICR cancer prevention recommendations and subsequent morbidity and mortality in the Iowa Women's Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(7):1114-20.
149. McCullough ML, Patel AV, Kushi LH, Patel R, Willett WC, Doyle C, et al. Following cancer prevention guidelines reduces risk of cancer, cardiovascular disease and all-cause mortality. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2011;20(11):1173-81.
150. Takezaki T, Inoue M, Kataoka H, Ikeda S, Yoshida M, Ohashi Y, et al. Diet and lung cancer risk from a 14-year population-based prospective study in Japan: with special reference to fish consumption. *Nutrition and cancer*. 2003;45(2):160-7.
151. Tepsic J, Vucic V, Arsic A, Mazic S, Djelic M, Glibetic M. Unfavourable plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid profile in elite amateur boxers. *Eur J Sport Sci*. 2013;13(4):414-21.
152. Fernandez E, Chatenoud L, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Fish consumption and cancer risk. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(1):85-90.



153. Grunfeld C, Feingold KR. Regulation of lipid metabolism by cytokines during host defense. *Nutrition*. 1996;12(1):S24-S6.
154. Kaizer L, Boyd NF, Kriukov V, Trichler D. Fish consumption and breast cancer risk: an ecological study. 1989.
155. Szymanski KM, Wheeler DC, Mucci LA. Fish consumption and prostate cancer risk: a review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;92(5):1223-33.
156. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(8):550.
157. Mouradian M, Kikawa K, Johnson E, Beck K, Pardini R. Key roles for GRB2-associated-binding protein 1, phosphatidylinositol-3-kinase, cyclooxygenase 2, prostaglandin E2 and transforming growth factor alpha in linoleic acid-induced upregulation of lung and breast cancer cell growth. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2014;90(4):105-15.
158. Zhang Y-F, Lu J, Yu F-F, Gao H-F, Zhou Y-H. Polyunsaturated fatty acid intake and risk of lung cancer: a meta-analysis of prospective studies. *PloS one*. 2014;9(6):e99637.
159. Yang Y, Wang X, Yao Q, Qin L, Xu C. Dairy product, calcium intake and lung cancer risk: a systematic review with meta-analysis. *Scientific reports*. 2016;6:20624.
160. Yu Y, Li H, Xu K, Li X, Hu C, Wei H, et al. Dairy consumption and lung cancer risk: a meta-analysis of prospective cohort studies. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:111.
161. Vieira AR, Abar L, Vingeliene S, Chan D, Aune D, Navarro-Rosenblatt D, et al. Fruits, vegetables and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*. 2015;27(1):81-96.
162. Klement RJ, Kämmerer U. Is there a role for carbohydrate restriction in the treatment and prevention of cancer? *Nutrition & metabolism*. 2011;8(1):75.
163. Melkonian SC, Daniel CR, Ye Y, Pierzynski JA, Roth JA, Wu X. Glycemic index, glycemic load, and lung cancer risk in non-hispanic whites. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2016;25(3):532-9.
164. Anic G, Park Y, Subar A, Schap T, Reedy J. Index-based dietary patterns and risk of lung cancer in the NIH–AARP diet and health study. *European journal of clinical nutrition*. 2016;70(1):123.
165. Sieri S, Krogh V. Dietary glycemic index, glycemic load and cancer: An overview of the literature. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2017;27(1):18-31.

166. De Stefani E, Brennan P, Boffetta P, Mendilaharsu Ma, Deneo-Pellegrini H, Ronco A, et al. Diet and adenocarcinoma of the lung: a case-control study in Uruguay. *Lung Cancer*. 2002;35(1):43-51.
167. Narita S, Saito E, Sawada N, Shimazu T, Yamaji T, Iwasaki M, et al. Dietary Consumption of Antioxidant Vitamins and Subsequent Lung Cancer Risk: The Japan Public Health Center-based Prospective Study. *International journal of cancer*. 2018.
168. Wright ME, Mayne ST, Swanson CA, Sinha R, Alavanja MC. Dietary carotenoids, vegetables, and lung cancer risk in women: the Missouri Women's Healthy Study (United States). *Cancer Causes & Control*. 2003;14(1):85-96.
169. Shareck M, Rousseau M-C, Koushik A, Siemiatycki J, Parent M-E. inverse association between Dietary intake of selected carotenoids and Vitamin c and risk of lung cancer. *Frontiers in oncology*. 2017;7:23.
170. Wu QJ, Xiang YB, Yang G, Li HL, Lan Q, Gao YT, et al. Vitamin E intake and the lung cancer risk among female nonsmokers: A report from the Shanghai Women's Health Study. *International journal of cancer*. 2015;136(3):610-7.
171. Luo J, Shen L, Zheng D. Association between vitamin C intake and lung cancer: a dose-response meta-analysis. *Scientific reports*. 2014;4:6161.
172. Group A-TBCCPS. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New England Journal of Medicine*. 1994;330(15):1029-35.
173. Hitomi M, Yokoyama F, Kita Y, Nonomura T, Masaki T, Yoshiji H, et al. Antitumor effects of vitamins K1, K2 and K3 on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *International journal of oncology*. 2005;26(3):713-20.
174. Jamison JM, Gilloteaux J, Taper HS, Summers JL. Evaluation of the in vitro and in vivo antitumor activities of vitamin C and K-3 combinations against human prostate cancer. *The Journal of nutrition*. 2001;131(1):S158.
175. Ogawa M, Nakai S, Deguchi A, Nonomura T, Masaki T, Uchida N, et al. Vitamins K2, K3 and K5 exert antitumor effects on established colorectal cancer in mice by inducing apoptotic death of tumor cells. *International journal of oncology*. 2007;31(2):323-31.
176. Tokita H, Tsuchida A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Katayanagi S, Sudo H, et al. Vitamin K2-induced antitumor effects via cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cell lines. *International journal of molecular medicine*. 2006;17(2):235-43.

177. Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Beaver SH, Etzel C, Forman MR. Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. *International journal of cancer*. 2007;120(5):1108-15.
178. Feldt-Rasmussen U. Iodine and cancer. *Thyroid*. 2001;11(5):483-6.
179. Schrauzer G, White D, Schneider C. Cancer mortality correlation studies-IV: Associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably se-antagonists. *Bioinorganic chemistry*. 1977;7(1):35-56.
180. Schrauzer G. Interactive effects of selenium and chromium on mammary tumor development and growth in MMTV-infected female mice and their relevance to human cancer. *Biological trace element research*. 2006;109(3):281-92.
181. Akbaraly NT, Arnaud J, Hininger-Favier I, Gourlet V, Roussel AM, Berr C. Selenium and mortality in the elderly: results from the EVA study. *Clin Chem*. 2005;51(11):2117-23.
182. Zec M, Srdic-Rajic T, Konic-Ristic A, Todorovic T, Andjelkovic K, Filipovic-Ljeskovic I, et al. Anti-metastatic and anti-angiogenic properties of potential new anti-cancer drugs based on metal complexes of selenosemicarbazones. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(9):1071-80.
183. Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow W-H, Gammon MD, Vaughan TL, et al. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2001;10(10):1055-62.
184. Tsugane S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. *Cancer science*. 2005;96(1):1-6.
185. Murphy RA, Bureyko TF, Mourtzakis M, Chu QS, Clandinin MT, Reiman T, et al. Aberrations in plasma phospholipid fatty acids in lung cancer patients. *Lipids*. 2012;47(4):363-9.
186. Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Reiman T, Mazurak VC. Skeletal Muscle Depletion Is Associated with Reduced Plasma (n-3) Fatty Acids in Non-Small Cell Lung Cancer Patients—3. *The Journal of nutrition*. 2010;140(9):1602-6.
187. Sanchez-Lara K, Turcott JG, Juarez-Hernandez E, Nunez-Valencia C, Villanueva G, Guevara P, et al. Effects of an oral nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid on nutritional and clinical outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer: randomised trial. *Clin Nutr*. 2014;33(6):1017-23.
188. Saadatian-Elahi M, Slimani N, Chajes V, Jenab M, Goudable J, Biessy C, et al. Plasma phospholipid fatty acid profiles and their association with food intakes: results from a cross-

sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(1):331-46.

189. Sun Q, Ma J, Campos H, Hu FB. Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(4):929-37.

190. Lisboa AQ, Rezende M, Muniz-Junqueira MI, Ito MK. Altered plasma phospholipid fatty acids and nutritional status in patients with uterine cervical cancer. *Clin Nutr.* 2008;27(3):371-7.

191. Liu J, Mazzone PJ, Cata JP, Kurz A, Bauer M, Mascha EJ, et al. Serum free fatty acid biomarkers of lung cancer. *Chest.* 2014;146(3):670-9.

192. Field CJ, Schley PD. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(6 Suppl):1190S-8S.

193. Whelan J, McEntee MF. Dietary (n-6) PUFA and intestinal tumorigenesis. *J Nutr.* 2004;134(12 Suppl):3421S-6S.

194. Xia SH, Wang J, Kang JX. Decreased n-6/n-3 fatty acid ratio reduces the invasive potential of human lung cancer cells by downregulation of cell adhesion/invasion-related genes. *Carcinogenesis.* 2005;26(4):779-84.

195. Cabre N, Camps J, Joven J. Inflammation, mitochondrial metabolism and nutrition: the multi-faceted progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2016;5(5):438-43.

196. Serini S, Fasano E, Celleno L, Cittadini A, Calviello G. Potential of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in melanoma prevention. *Nutr Rev.* 2014;72(4):255-66.

197. Smith RJ. Nutrition and metabolism in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2013;2(2):89-96.

198. Kobayashi N, Barnard RJ, Henning SM, Elashoff D, Reddy ST, Cohen P, et al. Effect of altering dietary omega-6/omega-3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. *Clin Cancer Res.* 2006;12(15):4662-70.

199. Yang B, Ren XL, Fu YQ, Gao JL, Li D. Ratio of n-3/n-6 PUFAs and risk of breast cancer: a meta-analysis of 274135 adult females from 11 independent prospective studies. *BMC Cancer.* 2014;14:105.

200. Pacilli A, Calienni M, Margarucci S, D'Apolito M, Petillo O, Rocchi L, et al. Carnitine-acyltransferase system inhibition, cancer cell death, and prevention of myc-induced lymphomagenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(7):489-98.
201. Evans LM, Cowey SL, Siegal GP, Hardy RW. Stearate preferentially induces apoptosis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer.* 2009;61(5):746-53.
202. Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J Biol Chem.* 1999;274(46):32725-32.
203. Agatha G, Hafer R, Zintl F. Fatty acid composition of lymphocyte membrane phospholipids in children with acute leukemia. *Cancer Lett.* 2001;173(2):139-44.
204. Zaidi N, Lupien L, Kuemmerle NB, Kinlaw WB, Swinnen JV, Smans K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2013;52(4):585-9.
205. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition.* 2000;16(3):202-8.
206. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3450-4.
207. Hardy S, Langelier Y, Prentki M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res.* 2000;60(22):6353-8.
208. Jones DR, Pettitt TR, Sanjuan MA, Merida I, Wakelam MJ. Interleukin-2 causes an increase in saturated/monounsaturated phosphatidic acid derived from 1,2-diacylglycerol and 1-O-alkyl-2-acylglycerol. *J Biol Chem.* 1999;274(24):16846-52.
209. Veselinovic M, Vasiljevic D, Vucic V, Arsic A, Petrovic S, Tomic-Lucic A, et al. Clinical Benefits of n-3 PUFA and  $\gamma$ -Linolenic Acid in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Nutrients.* 2017;9(4):325.
210. Rose DP, Connolly JM. Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. *Nutr Cancer.* 2000;37(2):119-27.
211. Szymczak M, Murray M, Petrovic N. Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood.* 2008;111(7):3514-21.

212. Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2483-93.
213. Hodson L, Fielding BA. Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? *Prog Lipid Res.* 2013;52(1):15-42.
214. Pala V, Krogh V, Muti P, Chajes V, Riboli E, Micheli A, et al. Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(14):1088-95.
215. Arab L. Biomarkers of fat and fatty acid intake. *The Journal of nutrition.* 2003;133(3):925S-325S.
216. Fekete K, Marosvölgyi T, Jakobik V, Decsi T. Methods of assessment of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid status in humans: a systematic review—. *The American journal of clinical nutrition.* 2009;89(6):2070S-84S.
217. Hodge AM, Simpson JA, Gibson RA, Sinclair AJ, Makrides M, O'Dea K, et al. Plasma phospholipid fatty acid composition as a biomarker of habitual dietary fat intake in an ethnically diverse cohort. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2007;17(6):415-26.
218. Fearon K, Von Meyenfeldt M, Moses A, Van Geenen R, Roy A, Gouma D, et al. Effect of a protein and energy dense N-3 fatty acid enriched oral supplement on loss of weight and lean tissue in cancer cachexia: a randomised double blind trial. *Gut.* 2003;52(10):1479-86.

## **Прилог 1.**

# **Анкетни упитник за исхрану - FFQ**

# ANKETNI UPITNIK ZA ISHRANU

Koliko puta NEDELJNO imate:

*Doručak je prvi obrok u danu (1-2 h nakon ustajanja), užina\* je međuobrok između doručka i ručka. Užina\*\* je međuobrok između ručka i večere.*

<u>doručak</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	
	<u>užinu*</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
<u>ručak</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	
	<u>užinu**</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
<u>večeru</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	

U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

Mlečni proizvodi:

1. mleko

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

2. sir (edamer, feta, i sl.)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

3. sir za rendanje (npr. parmezan, kackavalj)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

4. sveži kravlji sir

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

5. jaja

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno



## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

### Meso:

6. meso (svinjetina, govedina, jagnjetina i teletina)

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

7. piletina i ćuretina

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

8. džigerica

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

9. jetrena pašteta

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

10. viršle, parizer i sunka

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

11. čvarci

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

12. roštilj

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

13. kobasice i ostali suhomesnati proizvodi

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

14. pečenje

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

### Riba:

15. losos

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

16. sardine u konzervi

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

17. tunjevina u konzervi

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

18. morska riba (skuša, sardela, oslić)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

19. rečna riba (pastrmka, saran, som, smudj)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

20. morski plodovi (lignje, školjke, rakovi)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

21. riblja pašteta

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Ulja

22. ulje suncokreta ili uljane repice (za prženje, kvanje, salate)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

23. maslinovo ulje  za kvanje  u salatama

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

24. druga ulja (susama, lana, bundeve, kikirikija, kukuruznih klica, koštica groždja)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

Navedite koje ulje najčešće koristite \_\_\_\_\_

25. svinjska mast (za prženje, kuanje, u jelima)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## Povrće

26. pasulj

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

27. sočivo

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

28. grašak

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

29. brokoli, karfiol, kelj

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

30. cvekla

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

31. zelena salata:

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

32. svež kupus

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

33. zelena boranija

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

34. sveža paprika

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

35. svež paradajz

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

36. krompir

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

37. spanać, blitva

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

38. šargarepa

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

39. kukuruz

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

40. kiseli kupus, turšija

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

### Voće:

41. citrusi (pomorandža, mandarina, grejpfrut, limun)

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

42. banane

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

43. jabuke, kruške

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

44. jagode, grožđe, borovnice

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

45. trešnje, višnje, šljive

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

46. suve šljive, suve smokve, suve kajsije

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

47. orašasti plodovi(košunjavo voće) (bademi, orasi, lešnici)

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

48. lubenice, dinje

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

### Žitarice:

49. proja, kačamak

nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

50. testenina

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

51. pirinač

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

52. hleb:  beli  crni  integralni

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

53. kroasani, lisnata testa, biskviti

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

54. kolači i torte

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

55. žitarice (kukuruzne ili zobene pahuljice, musli i sl.)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

Koje žitarice NAJČEŠĆE konzumirate?

*(npr. obične kukuruzne pahuljice, obične zobene pahuljice ili nešto drugo)*

Molimo Vas za naziv proizvoda i ime proizvođača kao što je napisano na ambalaži!

### Ostalo:

56. kakao:  u prahu  Nesquik  \_\_\_\_\_

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

57.  Cedevita  Multivita  \_\_\_\_\_

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## U poslednjih tri MESECA koliko često ste konzumirali?

58. čips, grisine, smoki (grickalice)

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

59. kikiriki

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

60. čokolada

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

61. crna čokolada

- nikada  jednom mesečno  2-3/mesečno  
 jednom nedeljno  2-3/nedeljno  4-6/nedeljno  svakodnevno

## ODABERITE UOBIČAJENU VELIČINU SERVIRANJA ZA 1 OBROK

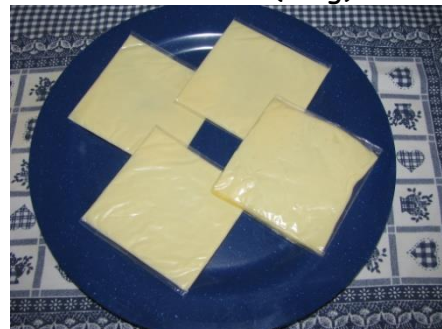
62. mleko  1 dL  2 dL  1 šolja (2,5 dL)   $\frac{1}{2}$  L  1L  \_\_\_ dL

63. sir

A (25 g)



B (50 g)



ili C \_\_\_ grama

64. parmezan  1 kafena kašičica  \_\_\_ kafenih kašičica

65. sveži kravljji sir A (25 g)



B (50 g)

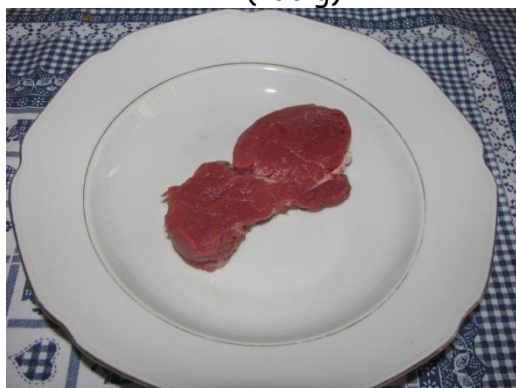


ili C \_\_\_\_ grama

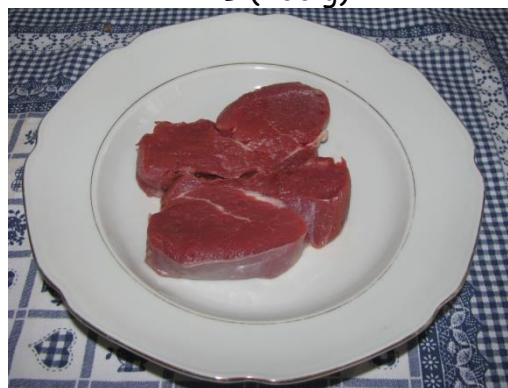
66. jaja  1 kom.  \_\_\_\_ komada

67. meso, živina, iznutrice, riba

A (100 g)



B (200 g)



ili C \_\_\_\_ grama



68. jetrena pašteta  1 kafena kašičica  2 kafene kašičice  \_\_\_\_ kafenih kašičica

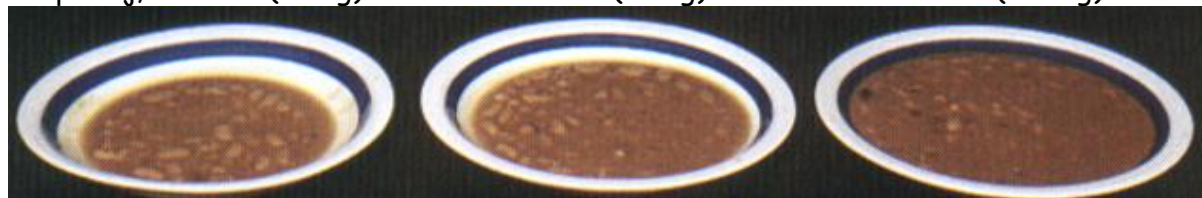
69. riblja pašteta  1 kafena kašičica  2 kafene kašičice  \_\_\_\_ kafenih kašičica

70. riba u konzervi   $\frac{1}{2}$  konzerve ( \_\_\_\_ gr)  1 konzerva  2 konzerve  \_\_\_\_ konzerve

71. pasulj, sočivo A (100 g)

B (180 g)

C ( 320 g)



ili D \_\_\_\_ grama

72. grašak

A (25 g)

B (125 g)

C ( 200 g)



ili D \_\_\_\_ grama

73. testenina A (100 g)

B (200 g)

C ( 350 g)



ili D \_\_\_\_ grama

74. pirinač A (150 g) B (200 g) C ( 350 g)



75. hleb

A (40 g)

B (80 g)

C ( 120 g)



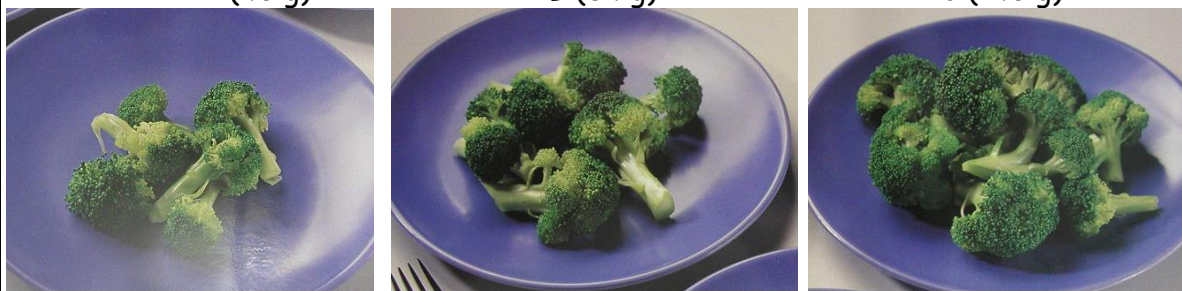
ili D \_\_\_\_ grama

76. brokoli, karfiol, kelj

A (46 g)

B (84 g)

C (146 g)



ili D \_\_\_\_ grama

77. cvekla A (100 g)

B (180 g)

C ( 230 g)



ili D \_\_\_\_ grama



78. zelena salata

A (15 g)



B (35 g)



g)

ili C \_\_\_\_ grama

79. kupus

A (75 g)



ili D \_\_\_\_ grama

B (130 g)



C ( 200 g)



ili D \_\_\_\_ grama

80. boranija A (60 g)



B (150 g)



C ( 235 g)



ili D \_\_\_\_ grama

81. paprika

A (55 g)



B (100 g)



ili C \_\_\_\_ grama

82. paradajz

A (80 g)



B (180 g)



ili C \_\_\_\_ grama

83. spanać, blitva

A (110 g)



B (190 g)



C (225 g)



ili D \_\_\_\_ grama



84. krompir

A (150 g)

B (300 g)

C (500 g)



ili D \_\_\_\_ grama

85. pomorandža, mandarina, grejpfrut, limun

1 kom.       2 kom.       \_\_\_\_ komada

86. banane

1 kom.       2 kom.       \_\_\_\_ komada

87. jabuke, kruške

1 kom.       2 kom.       \_\_\_\_ komada

88 a). jagode, maline, kupine (1 šolja = 2,5 dL)

$\frac{1}{2}$  šolje       1 šolja        $1\frac{1}{2}$  šolja       2 šolje       \_\_\_\_ šolje

89 b). grožđe, borovnice, ribizle (1 šolja = 2,5 dL)

$\frac{1}{2}$  šolje       1 šolja        $1\frac{1}{2}$  šolja       2 šolje       \_\_\_\_ šolje

90. trešnje, višnje, šljive (1 šolja = 2,5 dL)

$\frac{1}{2}$  šolje       1 šolja        $1\frac{1}{2}$  šolja       2 šolje       \_\_\_\_ šolje

91. suve šljive, suve smokve

2-3 kom.       10 kom.       \_\_\_\_ kom.

92. orašasti plodovi (koštunjavo voće) (bademi, orasi, lešnici i sl.)

2-3 kom.       10 kom.       \_\_\_\_ kom.

93. čokolada

cela čokolada (100 g)        $\frac{1}{2}$  čokolade (50 g)       \_\_\_\_ g

94. kakao

1 kafena kašičica  2 kafene kašičice  \_\_\_ kafenih kašičica

95. Cedevisa, Multivita i sl.

1 kafena kašičica  2 kafene kašičice  \_\_\_ kafenih kašičica

96. Koliko vode popijete DNEVNO? (vodovodne i flaširane)

1 dL  2 dL   $\frac{1}{2}$  L  1L  \_\_\_ dL

97. žitarice: kukuruzne pahuljice i sl.

A (35 g)

B (85 g)



ili C \_\_\_ grama

98. žitarice: ovsene pahuljice, musli i sl.

A (70 g)

B (145 g)



ili C \_\_\_ grama

99. koju količinu ulja koristite pri pripremi jela (prženje, kvanje)

1 dL     2 dL     1 šolja (2,5 dL)      $\frac{1}{2}$  L     1L     \_\_\_\_ dL

100. koju količinu ulja koristite u salatama

1 velika kašika     2 velike kašike     \_\_\_\_ velikih kašika