



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

КРИСТИНА РАДОМАН

**Утицај исхране обogaћене ОМЕГА-3 и ОМЕГА-6 масним
киселинама на функцију миокарда и оксидативно-
инфламацијске параметре код срца старих пацова**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Владимир Живковић, доцент

Крагујевац, 2018. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Кристина Радоман
Датум и место рођења: 30.08.1983. године, Подгорица
Садашње запослење: Наставник практичне наставе у средњој медицинској школи у Подгорици
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај исхране обogaћене ОМЕГА-3 и ОМЕГА-6 масним киселинама на функцију миокарда и оксидативно-инфламацијске параметре код срца старих пацова
Број страница: 185
Број слика: 20 табела, 55 графикона
Број библиографских података: 205
Установа и место где је рад израђен: Институт за физиологију, ФМН Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: доц. др Владимир Живковић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 02.03.2016. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-720/11; 13.07.2016. г.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Проф. др Нела Ђоновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Хигијена и екологија, председник;
2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научну област Физиологија, члан;
3. Др Весна Вучић, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, ужа научну област Физиологија и Биохемија, члан;
4. Проф. др Недељко Манојловић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научну област Фармацеутска анализа, члан;
5. Проф. др Нада Пејновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научну област Патолошка физиологија, члан;
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
1. Проф. др Нела Ђоновић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Хигијена и екологија, председник;
2. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научну област Физиологија, члан;
3. Др сци. Александра Арсић, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, ужа научну област Биохемија, члан;
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Увод: Резултати истраживања дају оригиналан и важан допринос сагледавању позитивних и негативних ефеката полинезасићених масних киселина заступљених у исхрани, као и могућностима и потребама измене њиховог односа у циљу постизања повољних ефеката на кардиоваскуларни систем. Резултати истраживања имају велики практични значај, пре свега имајући у виду да се ради о испитивању органског система чији поремећаји захватају далеко највећи постотак светске популације.

Циљ: Циљ овог истраживања је било испитивање хроничних ефеката примене исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда, коронарни проток и оксидо-инфламацијске параметре старих пацова.

Материјал и методе: Истраживање је дизајнирано као експериментална студија спроведена *ex vivo*. Након хроничног третмана од 6 недеља одговарајућом исхраном, животиње су се жртвовале како би се спровела истраживања на изолованом срцу и биохемијске анализе из узорака перфузата, плазме и лизата еритроцита. Биохемијске анализе су одређиване у узорцима коронарног венског ефлуента, који је сакупљан на крају контролног периода и на крају периода апликације испитиване супстанце. Сви реактивни молекули, који су били од интереса за наше истраживање су мерени спектрофотометријском методом. Поред тога, у узорцима плазме и лизату еритроцита мериле су се вредности про-оксидационих, антиоксидационих и инфламаторних параметара.

Резултати: Хронична примена суплементације алфа-линолеинском киселином има кардиопротективно дејство у односу на примену линолне киселине на моделу изолованог срца пацова. Исхрана обогаћена омега-6 масним киселинама утиче негативно на функцију миокарда изолованог срца пацова у односу на исхрану обогаћену омега-3 масним киселинама. Применом хроничне исхране са односом омега-3/омега-6 у нашем истраживању 1:3,3 (55%:17%) у корист омега-3 масних киселина у виду уља ланеног семена, као и примена масних киселина у односу омега-3/омега-6 1:9 (9%:73%) у виду уља ноћурка у корист омега-6 масних киселина, показали смо значајне разлике у погледу ефекта на функцију миокарда и редокс статус пацова, са нагласком на кардипротективно деловање односа 1:3,3. Механизми којима линолеинска киселина остварује кардипротективно дејство ослањају се на снижење индекса липидне пероксидације, водоник пероксида као повећање активности каталазе, супероксид дисмутазе из интактну коронарну циркулацију.

Закључак: Налази садашњег истраживања могу да помогну у бољем разумевању утицаја омега-3 и омега-6 масних киселина на одржавање кардиоваскуларне хомеостазе. ови резултати су од великог практичног значаја, с обзиром а широку примену суплемената који се састоје од ових једињења.

Кључне речи: омега-3 масне киселине, омега-6 масне киселине, оксидациони стрес, изоловано срце пацова.

ABSTRACT

Introduction: The results of the research give an original and important contribution to the examination of the positive and negative effects of polyunsaturated fatty acids present in the diet, as well as the possibilities and needs of changing their relationship in order to achieve favorable effects on the cardiovascular system. The results of the research have a great practical significance, predominantly having in mind that this disruptions of this organic system are by far the largest percentage of the world population.

Aim: The aim of this study was to examine the chronic effects of diet enriched with omega-3 and omega-6 fatty acids on myocardial function, coronary flow and oxidizing inflammatory parameters of old rats.

Material and methods: The study was designed as an *ex vivo* experimental study. After 6 weeks of chronic treatment with adequate nutrition, animals were sacrificed to perform isolated heart investigation and biochemical analysis from perfusate, plasma, and erythrocyte lysates. Biochemical analyzes were determined in samples of the coronary venous effluent, which was collected at the end of the control period and at the end of the period of application of the tested substance. All reactive molecules that were of interest to our research were measured by a spectrophotometric method. In addition, in the plasma and lysate erythrocyte samples, the values of pro-oxidation, antioxidant and inflammatory parameters were measured.

Results: The alpha-linoleic acid supplementation has a stronger cardioprotective effect than linoleic acid on the model of the isolated rat heart. Nutrition enriched with omega-6 fatty acids more affects the myocardial function of the isolated heart of the rat in relation to than diet enriched with omega-3 fatty acids. Using chronic nutrition with omega-3 / omega-6 ratio 1:3.3 (55%: 17%) in favor of omega-3 fatty acids in the form of flax seed oil, and the application of fatty acids in the ratio of omega-3 / omega-6 1:9 (95:73%) in the form of omega-6 fatty acid oil, we showed significant differences in the effect on myocardial function and rat's redox status, with an emphasis on cardioprotective ratio 1:3,3. Mechanisms through which linoleic acid achieves cardioprotective activity rely on the reduction of the lipid peroxidation index, hydrogen peroxide and increase in catalase activity and superoxide dismutase with intact coronary circulation.

Conclusions: Findings of present study may help in better understanding of the influence of omega-3 and omega-6 fatty acids on the maintenance of cardiovascular homeostasis. Taken into consideration wide usage of supplements consisting of these compounds, these results are of great practical significance.

Key words: omega-3 fatty acids, omega-6 fatty acids, oxidative stress, isolated rat heart.

САДРЖАЈ

1.	УВОД.....	8
1.1.	МАСНЕ КИСЕЛИНЕ	8
1.1.1.	Засићене масне киселине.....	8
1.1.2.	Незасићене масне киселине	9
1.1.3.	Есенцијалне масне киселине.....	12
1.1.4.	Трансмасне киселине	15
1.1.5.	Слободне масне киселине	15
1.2.	МЕТАБОЛИЧКИ ПУТ МАСНИХ КИСЕЛИНА	16
1.3.	ЗНАЧАЈ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИХ КИСЕЛИНА	20
1.4.	МАСНЕ КИСЕЛИНЕ И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ	24
1.5.	МАСНЕ КИСЕЛИНЕ И ОКСИДО-ИНФЛАМАЦИЈСКИ ОДГОВОР	28
2.	ЦИЉ СТУДИЈЕ	37
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	39
3.1.1.	Комплет реагенаса за припремање Krebs-Hensenleit-овог перфузионог раствора:	39
3.1.2.	Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS):.....	39
3.1.3.	Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита:	39
3.1.4.	Комплет реагенаса за детерминацију супероксид ањонског радикала (O_2^-):	39
3.1.5.	Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H_2O_2):	40
3.2.	Експериментални модел ретроградне перфузије изолованог срца.....	40
3.3.	Langendorff апарат LF-01 F-P	41
3.4.	Екпериментални протокол	43
3.5.	Изолација срца	45
3.6.	Биохемијске анализе	47
3.6.1.	Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	47
3.6.2.	Одређивање нитрита (NO_2^-)	48
3.6.3.	Одређивање супероксид анион радикала (O_2^-)	48
3.6.4.	Одређивање водоник пероксида (H_2O_2).....	49
3.6.5.	Одређивање каталазе (CAT).....	49
3.6.6.	Одређивање супероксид дисмутазе (SOD).....	50
3.6.7.	Одређивање редукованог глутатиона (GSH).....	50
3.6.8.	Одређивање проинфламаторних цитокина (IL-6, TNF- α)	50

3.7.	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	51
4.	РЕЗУЛТАТИ	53
4.1.	ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ (ПОРЕЂЕЊЕ У ГРУПИ)	53
4.2.	ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ (ПОРЕЂЕЊЕ ГРУПА)	66
4.2.1.	Ефекат омега-3 и омега-6 масних киселина на кардиодинамске параметре код пацова женског пола	66
4.2.2.	Ефекат омега-3 и омега-6 масних киселина на кардиодинамске параметре код пацова мушког пола	74
4.2.3.	Поређење кардиодинамских параметара између експерименталних група	83
4.3.	ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЕФЛЕНТУ (ПОРЕЂЕЊЕ У ГРУПИ)	89
4.4.	ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЕФЛЕНТУ (ПОРЕЂЕЊЕ ГРУПА)	99
4.5.	ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ПЛАЗМИ	103
4.6.	ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА АНТИОКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЛИЗАТУ ЕРИТРОЦИТА	109
4.7.	ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА АНТИОКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЛИЗАТУ ЕРИТРОЦИТА (ПОРЕЂЕЊЕ ГРУПА)	114
5.	ДИСКУСИЈА	119
5.1.	ЕФЕКАТ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 НА КОНТРАКТИЛНОСТ И ФУНКЦИЈУ МИОКАРДА	119
5.2.	ЕФЕКАТ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА РЕДОКС СТАТУС	126
6.	ЗАКЉУЧЦИ	135
7.	ЛИТЕРАТУРА	137

1.

УВОД

1. УВОД

1.1. МАСНЕ КИСЕЛИНЕ

Масне киселине су дуголанчане карбоксилне киселине које се међусобно разликују по броју угљеникових атома у угљоводоничном ланцу, броју и положају двоструких веза. Класификују се према степену засићења, па тако засићене масне киселине немају двоструке везе у свом ланцу док мононезасићене (*monounsaturated fatty acid, MUFA*) имају једну двоструку везу у свом ланцу. Полинезасићене масне киселине (*polyunsaturated fatty acid, PUFA*) имају две или више двоструких веза у свом ланцу. Угљеникови атоми у ланцу се означавају бројевима, а почетни (α -атом) је онај који чини карбоксилну групу (-COOH). Последњи угљеников атом у ланцу назива се омега (Ω) (1-5).

Физичке особине масних киселина зависе од дужине ланца, степена незасићености и разгранатости ланца. Киселине са кратким ланцем су течности оштрог мириса растворљиве у води. Повећањем дужине ланца, тачка топљења се повећава а растворљивост у води се смањује. Незасићене масне киселине су киселине са разгранатим ланцем и имају ниже тачке топљења. У литератури се описују различите врсте масних киселина, засићене и незасићене масне киселине, есенцијалне, трансмасне и слободне масне киселине (5, 6).

1.1.1. Засићене масне киселине

Засићене масне киселине не садрже двоструку ковалентну везу или друге функционалне групе дуж ланца. Термин "засићени" се односи на водоник, што је максимални број угљеникових атома припојене ланцем за водоник (осим карбоксилном групом -COOH). Другим речима, реч је о 4-валентном угљениковом ланцу, који на сваком угљениковом атому везује два друга атома угљеника и два атома водоника. Тако се формира засићени праволинијски ланац атома. Масно ткиво код људи и животиња садржи велике количине дугог ланца засићених масних киселина. Примери масних киселина су стеаринска киселина која садржи 18 атома угљеника и 0 двоструких веза између атома угљеника и C18:1 или олеинска киселина обухвата поред 18 атома угљеника и једну двоструку везу и то је незасићена масна киселина (7, 8).

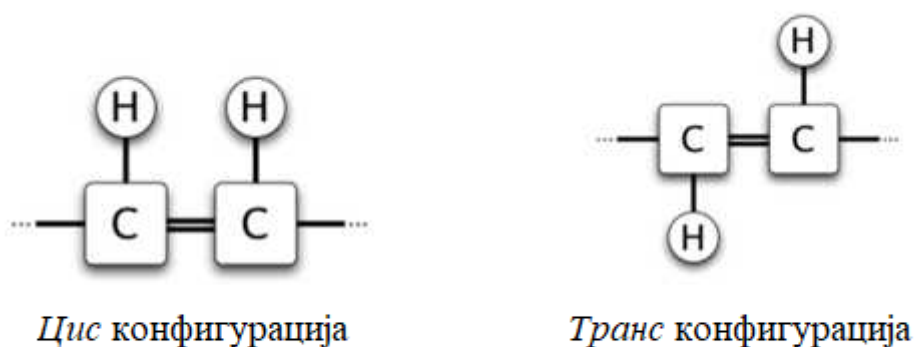
Табле 1. Примери засићених масних киселина

Име	Хемијска структура	C:D
Лауринска киселина (додекадска)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Миристинска киселина (тетрадекадска)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	14:0
Палмитинска киселина (хексадекадска)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Стеаринска киселина (октадекадска)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0
Арахидска киселина (еикозаноидна)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	20:0
Бехенијска киселина (докозаноидна)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	22:0
Лигноцеринска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	24:0
Керотинска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	26:0

1.1.2. Незасићене масне киселине

Незасићене масне киселине су масне киселине сличног облика засићеним масним киселинама осим што постоји једна или више алкенских функционалних група унутар ланца где сваки алкен замењује једноструку угљеникову везу " $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ " у делу ланца са двоструком везом " $-\text{CH}=\text{CH}-$ ". Такве двоструке везе могу бити формиране у *цис* или *транс* конфигурацији (Слика 1) (9, 10).

Слика 1. *Цис* и *транс* конфигурација незасићених масних киселина



Цис конфигурација има два атома водоника на истој страни двоструке везе а јачина двоструке везе замрзава њихову конформацију, а сама *цис* форма узрокује да се ланац не пресавија. Управо оваква структура ограничава конформациону слободу масне киселине. Што је више двоструких веза у *цис* облику, то је ланац мање савитљив. Када ланац има много *цис* веза, постаје изразито закривљен у свим конформерима. На пример олеинска киселина која има једну двоструку везу има мањи прегиб у ланцу од линолне киселине која има две двоструке везе. Са друге стране, линолеинска киселина која има три двоструке везе има облик куке због закривљености. Због овакве структуре, масне киселине као део фосфолипида у липидном двослоју мембране, имају ограничену способност да се уграде или ускладиште у мањем простору утичући на карактеристике мембране или масти чија су компонента (11, 12). *Транс* конфигурација, супротно од горе описане, има два суседна атома водоника везана на супротним странама двоструке везе. Као резултат тога настаје облик ланца који је сличан равном ланцу као што је у засићеним масним киселинама. У природи се незасићене масне киселине појављују само у *цис* форми. *Транс* облик искључиво настаје утицајем човека и његове намере за прерадом масти као што је процес хидрогенизације. Ове структуралне разлике у геометрији између *цис* и *транс* облика незасићених масних киселина играју врло важну улогу у биолошким процесима у организму човека али и у изградњи ћелијске мембране. Управо положај двоструке везе код незасићених масних киселина је битан за својства масне киселине. Због тога се говори о почетку у крају ланца масних киселина, при чему почетак представља место где се налази карбоксилна група $-\text{COOH}$, док је крај место где се налазе три везана атома водоника на атому угљеника (CH_3-). Крај се назива омега (ω), те се према месту прве двоструке везе од тог краја разликују омега-3, омега-6 и омега-9 масне киселине (Табела 2) (13, 14).

Табела 2. Примери незасићених масних киселина

Име	Хемијска структура	Δ^x	C:D	n-x
Миристолеинска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^9	14:1	n-5
Палмитолеинска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^9	16:1	n-7
Сапиенска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^6	16:1	n-10
Олеинска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^9	18:1	n-9
Линолна киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis,cis</i> - Δ^9,Δ^{12}	18:2	n-6
α -Линолеинска киселина	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis</i> - $\Delta^9,\Delta^{12},\Delta^{15}$	18:3	n-3
Арахидонска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}^{[3]}$	<i>cis,cis,cis,cis</i> - $\Delta^5,\Delta^8,\Delta^{11},\Delta^{14}$	20:4	n-6
Еикосапентаено инска киселина	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis,cis,cis</i> - $\Delta^5,\Delta^8,\Delta^{11},\Delta^{14},\Delta^{17}$	20:5	n-3
Ерукинска киселина	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	<i>cis</i> - Δ^{13}	22:1	n-9
Докозахексаенои нска киселина	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	<i>cis,cis,cis,cis,cis,cis</i> - $\Delta^4,\Delta^7,\Delta^{10},\Delta^{13},\Delta^{16},\Delta^{19}$	22:6	n-3

1.1.3. Есенцијалне масне киселине

Људско тело може синтетисати све масне киселине које су потребне за раст и развој осим две масне киселине, а то су линолна и линолеинска. Из тог разлога се називају есенцијалним јер су врло важне а морамо их уносити путем суплемената или хране. Широко су распрострањене у биљној и животињској храни, а у нашем организму оне учествују и помажу правилном раду ћелија и органа, од којих се стварају једињења слична хормонима који управљају широким спектром виталних функција, као што су крвни притисак, згрушавање крви, ниво липида у крви, имунолошко стање и инфламаторни одговор организма. Есенцијалне масне киселине су вишеструко незасићене масне киселине и од којих се у организму стварају низови омега-6 и омега-3 масних киселина (15, 16). Људски организам може произвести засићене масне киселине или једнократно незасићене масне киселине са двоструком везом на деветом атому угљеника, бројем од краја ланца (омега-9 киселине), али не може створити двоструку везу на шестом или трећем атому угљеника због непостојања ензима који би то омогућио. Ове масне киселине су прекурсори за производњу дугих, високонезасићених масних киселина важних за формирање ћелијских мембрана и стварању еикосаноида (17-19).

Када линолна (омега-6) масна киселина улази у ћелију, од ње се ствара арахидонска киселина, а од алфа-линоленске киселине (омега-3) ствара се еикозапентаеноична киселина (ЕРА). Од ње у метаболичким процесима настаје докозахексаеноична киселина (ДНА). Арахидонска киселина и ЕРА се даље метаболишу и стварају активне еикосаноиде са дејством сличном хормонима. Арахидонска киселина која потиче од омега-6 доводи до синтезе једне групе еикосаноида, а ЕРА и ДНА (омега-3) су одговорне за синтезу друге групе еикосаноида. У еикосаноиде укључујемо простагландине, тромбоксане, леукотриене и липоксине. (20-25). Тромбокساني се синтетишу у тромбоцитима и код отпуштања индукују вазоконстрикцију и агрегацију тромбоцита. Простагландини се синтетишу у зидовима крвних судова у систему циклооксигеназе и инхибирају агрегацију тромбоцита (Слика 1). Леукотриени и липоксини регулишу упалне одговоре и реакције хиперсензитивности (нпр. астме). Еикосаноиди делују као хормони на месту настанка и

не путују путем крви до места на којима делују, попут других хормона. Разлике у структури ове две групе еикосаноида одређују управо њихову функцију. Еикосаноиди који потичу од омега-6 масних киселина повећавају ћелијску пролиферацију ћелија и крвних судова али и делују проинфламаторно. Еикосаноиди који потичу од омега-3 имају супротно деловање (26-28).

Слика 1. Синтеза простагландина из линолне и линолеинске масне киселине

Омега 6 (Линолна киселина) → γ -линолеинска киселина → дихомо-линолеинска киселина → арахидонска киселина

Серија 1 простагландина

Серија 2 простагландина

(процеси агрегације,

''лоши простагландини'')

регулације крвног притиска,

смањење инфламације,

улога у метаболизму глукозе и

отпуштања арахидонске киселине)

Омега-3 (алфа-Линолеинска киселина) → Стеаринска киселина

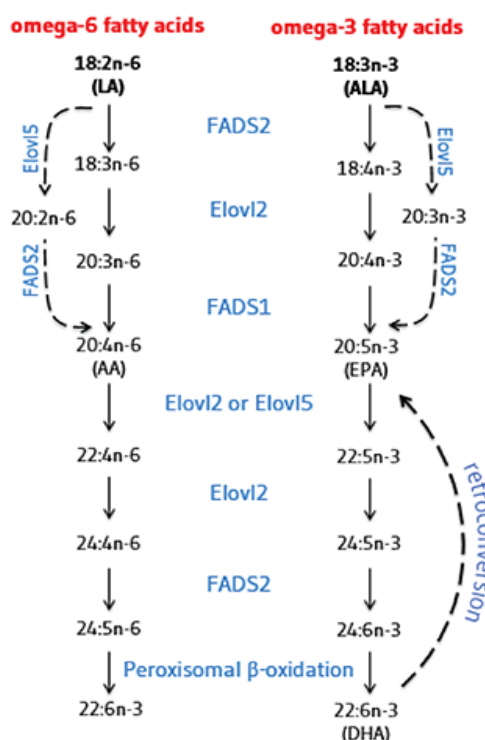
→ Еикозатетраеноинска киселина → Еикозапентаеноинска киселина → *Серија 3*

простагландина (веома снажни у превенцији отпуштања арахидонске киселине)

Даље, арахидонска киселина је у конкуренцији са ЕРА и ДНА за исте метаболичке путеве, тако што ако омега-6 масних киселина има у изобиљу, више арахидонске киселине се ствара. На слици бр. 2 схематски је приказана елонгација омега-3 и омега-6 масних киселина из есенцијалних масних киселина линолне и линолеинске масне киселине кроз серију реакција десатурације односно додавања двоструке везе и реакција елогације односно додавања два атома угљеника. Делта-6 десатураза

(FADS2) је важан ензим у овом метаболичком путу. Ретроконверзија ДНА у ЕРА у пероксизомима се одвија успорено и праћена је ДНА суплементацијом (Слика 2) (29-35).

Због свега поменутог, од изузетне важности је уравнотежени унос есенцијалних масних киселина. Ако у прехрани превладају омега-6 масне киселине, као што је случај у типично западњачком начину исхране, превладаће еикосаноиди који потичу из омега-6, па ће омега-3 синтеза масних киселина бити блокирана са последичном појачаним упалним процесима и ћелијском пролиферацијом. Дефицит есенцијалних масних киселина јако ретко настаје јер се омега-6 масне киселине налазе у многим биљним уљима, међутим, омега-3 масне киселине су мање заступљене у типичној западњачкој исхрани па може доћи до неравнотеже између те две групе масних киселина. Из тога разлога, јавља се потреба смањивања уноса омега-6 и повећања уноса омега-3 масних киселина (36-42).



Слика 2. –Елоганција и десатурација есенцијалних омега-3 и омега-6 масних киселина. LA-линолна масна киселина, ALA-алфа-линолеинска масна киселина, FADS2- Делта-6 десатураза, FADS1- Делта-5 десатураза, Elov12, Elov15 -елонгазе

1.1.4. Трансмасне киселине

Трансмасне киселине су незасићене масне киселине које садрже *транс* двоструку везу између атома угљеника која чини ланац киселине мање закривљеним у односу на масне киселине са *цис* двоструком везом. Таква '*транс*' структура настаје индустријском прерадом, поступком који се назива хидрогенизација биљних уља. Истраживања показују да трансмасне киселине у недостатку есенцијалних масних киселина заузимају место у виталним процесима и изазивају циркулацијске болести као што су атеросклероза и болести миокарда (43-46).

1.1.5. Слободне масне киселине

Масне киселине могу бити повезане или придружене другим молекулима, као што су триглицериди или фосфолипиди. Ако нису повезани, називамо их слободним масним киселинама. Слободне масне киселине настају разлагањем триглицерида на почетне компоненте, масним киселинама и глицеролом. Слободне масне киселине су важан извор енергије за многа ткива, јер могу доставити релативно велике количине АТФ-а. Гориво за ћелије може бити глукоза или масна киселина. Већи број типова ћелија даје предност масним киселинама (кардиомиоцити, миоцити). С друге стране, мозак не може да користи киселине, већ користи глукозу или кетонска тела која се стварају у јетри путем метаболизма масних киселина током гладовања или током слабог уношења угљених хидрата (47-55).

1.2. МЕТАБОЛИЧКИ ПУТ МАСНИХ КИСЕЛИНА

Масне киселине реагују као и све остале карбоксилне киселине, нпр. учествују у реакцијама естерификације и кисело-базним реакцијама. Редукцијом масних киселина добијају се масни алкохоли. Незасићене масне киселине могу бити изложене хидрогенизацији ради претварања биљних уља у маргарин (и тиме продужио рок трајања) (56-59). Делимичном хидрогенизацијом, незасићене масне киселине прелазе из *цис* у *транс* облик. Четири основне физиолошке карактеристике масних киселина су (60):

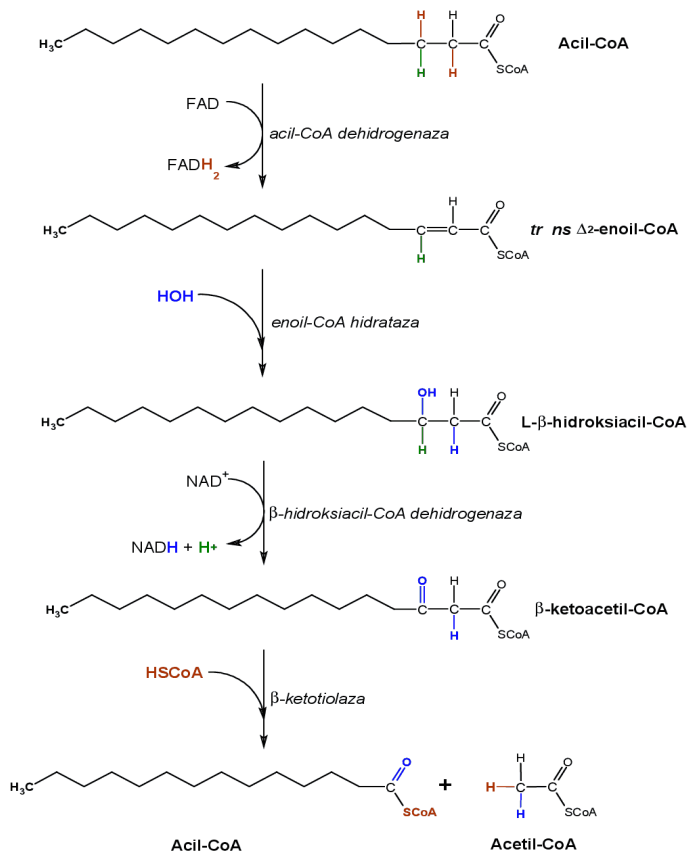
1. Масне киселине се користе за синтезу фосфолипида и гликолипида (важне компоненте биолошких мембрана);
2. Масне киселине су метаболичко гориво (током мировања или умерене физичке активности масне киселине су примарни извор енергије);
3. Масне киселине се користе за модификацију протеина (на тај начин протеини се везују за мембране);
4. Деривати масних киселина су хормони и интрацелуларни гласници.

У крвотоку, масне киселине везују се за серумски албумин, преносе се тако везане са албумином и дифузијом улазе у ћелије (ћелије мишића) а у овом транспорту учествују и транспортни протеини. У ћелијама мишића, масне киселине се везују за CoA при чему настаје ацил-CoA, који се у цитоплазми везује за карнитин и настаје ацил-карнитин, који се затим даље транспортује са транслоказом у митохондрију где се поново претвара у ацил-CoA, који се сада оксидује до ацетил-CoA. Пре него што уђу у митохондрију, где се оксидују, масне киселине се активирају у цитоплазми тако да стварају тиоестарску везу са CoA. Реакција се одвија на спољашности мембране митохондрије, а претварање катализује ацил-CoA синтетаза и пиродифосфатаза (61, 62).

Како би се омогућио улазак ацилног остатка у митохондрију, масне киселине као ацил-CoA, преносе се на карнитин, а реакцију у цитоплазми катализује карнитин ацил-трансфераза-1 који је ензим је везан за спољашњу митохондријску мембрану. Након што је настао ацил-карнитин, транслоказа преноси ацил-карнитин у митохондрију. У митохондрији, карнитин-ацил-трансфераза-2 преноси ацилни остатак са ацил-

карнитина поново на CoA и настао је ацил-CoA спреман за разградњу. Масне киселине активирају се на спољашњој површини митохондријске мембране у ацил-CoA, а бета-оксидација масних киселина одиграва се у матриксу митохондрије. За транспорт активираних ацил-CoA потребна је карнитин-ацил трансфераза. Различите болести настају ако масне киселине не могу ући у митохондрије. Масне киселине главна су храна за мишиће, бубреге и срце (63). Патолошка стања настају уколико су дефектне или недостају ацилтрансферазе или транслоказа. Дакле процесом који се назива бета оксидација масних киселина врши се раградња масних киселина кроз низ биохемијских процеса и реакција: 1) дуголанчана масна киселина се окидује у ацетилне остатке у облику ацетил-CoA; 2) ацетилне групе се оксидују до CO₂ у цитратном циклусу; 3) електрони ослобођени у процесима 1. и 2. преносе се на O₂ помоћу митохондријског респираторног чвора што ослобађа довољно енергије за синтезу ATP-а помоћу оксидативне фосфорилације. Ацетил-CoA, NADH и FADH₂ настају оксидацијом масних киселина. Разградња масних киселина, која се назива и β-оксидацијом, одвија се кроз поменута четири корака, дехидрогенизација, хидратација, оксидација NAD⁺ -ом и тиолиза, који се понављају (Слика 2) (64-66).

Слика 2. Основне реакције у β -оксидацији масних киселина



За оксидацију незасићених масних киселина потребни су још додатни ензими и то за разградњу мононезасићених масних киселина потребна је еноил-CoA изомераза а за разградњу полинезасићених масних киселина потребно је еноил-CoA изомераза и 2,4-диенил-CoA редуктаза. Већина масних киселина има двоструке везе у *цис* положају и на њима не делује ензим еноил-CoA хидратаза која у β -оксидацији катализује додавање воде на транс Δ^2 -еноил CoA (67-69). За провођење оксидације потребни су: еноил-CoA изомеразе и 2,4-диенил-CoA редуктаза за чије деловање потребан је додатни NADPH. Заједничким деловањем ова два ензима полинезасићених масних киселина успешно се оксидују. Масне киселине са непарним бројем угљикових атома оксидују до ацетил-CoA и пропионил-CoA који се претвара у сукинил-CoA. Пре него што се може користити као супстрат цитратног циклуса, сукцинил-CoA, пропионил-CoA се карбоксилије у метилмалонил-CoA помоћу пропионил карбоксилазе (биотин

коензим). Реакцију изомеризације метилмалонил-СоА у сукцинил-СоА катализују метилмалонил-СоА епимераза и мутаза. Метилмалонил-СоА мутаза као коензим, користи коензим В₁₂. Дуголанчане масне киселине са непарним бројем С атома разграђују се на исти начин као и масне киселине са парним бројем С атома. Крајњи корак у оксидацији је добијање ацетил-СоА и пропионил-СоА (70).

Оксидација масних киселина уклања из организма драгоцену метаболичку гориво, и мора се строго контролисати. У јетру ацил-СоА који настане у цитоплазми може ући у два различита метаболичка пута: (1) β-оксидацију помоћу митохондријских ензима или (2) претварањем у триацилглицероле и фосфолипиде помоћу ензима који су у цитоплазми. Који ће се пут одабрати зависи од брзине преноса дуголанчане масне киселине из цитоплазме у митохондрију. Претварање ацил-СоА у ацил-карнитин и његов пренос у митохондрију процес од којег зависи брзина оксидације масних киселина (71).

Оксидација масних киселина у пероксисомима служи за скраћивање дуголанчаних масних киселина како би постали бољи супстрати у процесу митохондријске β-оксидације. Код биљака пероксисоми су органеле где се одвија већина оксидација масних киселина. Процес оксидације масних киселина у пероксисомима сличан је процесу оксидације у митохондријима, али није идентичан (72).

Две су основне разлике између процеса у митохондријима и овим органелама: у првом оксидативном кораку у пероксисомима електрони директно прелазе на О₂ и настаје Н₂О₂ који каталаза одмах цепа на Н₂О и О₂. У пероксисомима енергија која се ослобађа из ове реакције ослобађа се у виду топлоте; NADH који настане у другом оксидативном кораку не може се оксидовати у пероксисомима и те се излучује у цитоплазму и вероватно улази и у митохондрије. СоА који настане у пероксисомима такође се излучује и оксидује у цитратном циклусу. Масне киселине од 12 до 18 С атома оксидује дуго-ланчана ацил-СоА дехидрогеназа, средње дуга ацил-СоА дехидрогеназа оксидује масне киселине од 14 до 4 С атома, кратколанчана ацил-СоА дехидрогеназа оксидује масне киселине од 4 и 6 угљеникових атома (74, 75).

1.3. ЗНАЧАЈ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИХ КИСЕЛИНА

Омега-3 масне киселине су део ћелијске мембране, па самим тим учествују у правилном функционисању нуклеарних рецептора. Такође, оне су "сировина" за синтезу хормона који регулишу згрушавање крви, контрактилност и релаксацију зидова артерија, као и инфламаторне процесе у људском организму (76). Омега-3 масне киселине учествују у процесу експресије гена, а имају и превентивни ефекат у кардиоваскуларни и цереброваскуларним болестима, и неким аутоимунским болестима. Поред тога, неке студије су показале да омега-3 масне киселине имају протективну улогу када је реч о малигним болестима. Дакле, за правилан раст и развој и нормално функционисање организма потребне су масти. Изузетно корисне масти укључују есенцијалне масне киселине, а учествују у одржавању нормалног крвног притиска, здраве коже, за правилно функционисање јетре, бубрега, плућа и срца, дајући простагландине који регулишу многе функције у телу, укључујући синтезу хормона и имунски одговор (77, 79).

Већина људи уноси превише омега-6 а нема довољно омега-3 масних киселина. Нека истраживања показују да превише омега-6 може довести до повећаног ризика од кардиоваскуларних болести, инфламаторних и аутоимунских болести. Омега-3 масне киселине присутне у масним рибама (туна, лосос, харинга, сардина, бакалар, скуша), и нутриционисти препоручују унос ових намирница два пута недељно због природног богатства есенцијалним масним киселинама које људско тело не може да синтетиче (78). Потрошња морске рибе два пута недељно смањује ризик од срчаног и možданог удара за 50 одсто, и препорука нутрициониста је да се уноси оваква храна и у зимским месецима. Ескимима, који једу пуно рибе богате омега-3 масна киселина, имају смањене нивое LDL холестерола и високе нивое HDL холестерола, а клиничка истраживања су показала да 3 г дневно рибљег уља у облику дијететских суплемената су утицали у великој мери на смањење крвног притиска. Кохортна клиничка студија спроведена на 80,000 жена за 14 година, показала је да жене које су узимале омега-3 масне киселине имају 72 % мањи ризик од појаве срчаног удара, а 67 % од развоја тромбозе (80).

Резултати новијих истраживања упућују на могуће деловање омега-3 масних киселина на имунолошке функције и позитиван утицај на појаву алергије у дечјем добу, а смањење имунолошких реакција у синовијалном ткиву код реуматоидног артритиса током суплементације рибљим уљем (79-81). У новијим истраживањима примећена је и јасна веза између нижих нивоа омега-3 масних киселина и менталног здравља. Студије

су показале да се код људи који не једу рибу и плодове мора чешће јављају депресија, биполарни поремећај и постпорођајна депресија. Схизофренија и деменција такође су повезани са ниским нивоима омега-3 масних киселина, а депресија и биполарни поремећај могу се ефикасно лечити суплементацијом омега-3 масних киселина. У неким студијама утврђен је утицај омега-3 масних киселина на трудноћу и позитивна веза између уношења рибе и трајања трудноће и порођајне тежине. Такође су обећавајући резултати добијени и у студијама које су проучавале утицај омега-3 масних киселина на појаву спонтаних абортуса. Дефинитивно је доказана важност ДНА у когнитивном развоју деце (развој мозга и вида), јер се ДНА у великој концентрацији налази у мозгу и ретини. Из свега наведеног можемо закључити како је суплементација омега-3 масним киселинама од изузетне важности током трудноће и дојења, како за мајку тако и за дете (82).

Показано је да омега-3 масна киселина утиче на смањење упале зглобова (реуматоидни артритис), смањење бола и јутарње укочености. Поред тога, позитиван ефекат омега-3 масних киселина се описује и у смањењу менструалних тегоба, инфламаторних болести црева, али и многим другим болестима као што су астма, псоријаза и различите болести коже, биполарни поремећај, шизофренија, булимија, анорексија. Омега-3 масне киселине су важне за развој функција мозга и мозга. Неке студије показују да смањује учесталост деменције и других неуролошких обољења, као и напредовање мултипле склерозе (83).

Омега-6 масне киселине, заједно са омега-3 масних киселина су важне за развој мозга, за здраву косу, кожу, репродуктивни систем. Омега-6 масне киселине се препоручују у регулисању промене расположења код жена (ПМС) и као природну помоћ у случају депресивних стања, код екцема и псоријазе. Омега-6 масне киселине узимају се орално (уље, додатке на бази уља) или се примењују у облику крема на проблематичне регионе коже, због израженог умирујућег ефекта.

Намирнице које највише садрже омега-3 масних киселина јесу рибе хладних мора као што су лосос, харинга, туна и скуша, потом у алгама, као и биљна уља семенке лана и ораха, затим коштуњаво воће, бадем, лешник, пистаћи, индијски орах, кикирики. Лан је једногодишња, или двогодишња биљка, једна од најкориснијих биљака, која се употребљава у више од тридесетак земаља широм света. Заправо, његово латинско име, *Linum usitatissimum*, у преводу на српски језик значи "најкориснији". Иако се у почетку, пре око три хиљаде година, гајио углавном у медицинске сврхе и због влакана од којих су рађена ланена платна, данас се најчешће

користи ланено уље, било у прехранбеној, или хемијској индустрији. Семе лана је јајастог облика, спљоштено и тамне боје и представља богат извор масти, јер га на просечном нивоу садржи око 40%, у чијем саставу чак и преко 70% незасићене масне киселине и то пре свега алфа-линолеинску. Поменути висок садржај незасићених масних киселина чини ланено уље погодном сировином за производњу широког спектра, а осим велике количине уља, садржи још око 7 - 9% воде, 2,50 - 4% сировог пепела, око 20 - 30% сирових протеина и 12 - 20% сирових влакана. Маснокиселински састав уља у ланеном семену зависи од услова у којима је биљка узгојена, што нарочито односи на састојак незасићених масних киселина. Уколико је зрно незасићено и оштећено мразом, имаће значајно нижу количину уља, тамније боје. Оштећена зрна показују већу садржину палмитинске, линолне и алфа-линолеинске, мање садрже олеинске киселине, од здравих и целих зрна (84, 85).

Омега-6 масним киселинама изузетно је богато сунцокретоно, сојино, кукурузно и уље ноћурка, памука али и прерађена биљна уља и маргарини. Праву корист од њих може имати организам само ако се оне унесу у правој размери, што у супротном доприноси развоју опасних инфекција и болести. За људски организам најделотворнији је однос омега-3: омега-6 је 1: 1 до 1: 4.

Препоручени дневни унос масти је око 20-35% укупног калоријског уноса, а вишеструко незасићене масне киселине требају чинити око 10% укупних калорија. Да би се постигла оптималан ниво есенцијалних масних киселина, америчка асоцијација за заштиту од кардиоваскуларних болести (АНА, 2002.) препоручује два obroка масне рибе недељно за особе које не болују од срчаних обољења. Особе са кардиоваскуларним болестима требају уносити 1 g ЕРА и ДНА дневно у облику суплемената, а за смањење плазматских триглицерида 2-4 g омега-3 масних киселина дневно у облику суплемената под медицинским надзором. Национални институти за здравље наглашавају важност ограничавања уноса омега-6 и повећања уноса омега-3 масних киселина (86).

У последњих неколико деценија велика пажња посвећена је истраживању ефеката есенцијалних масних киселина (ω -3 и ω -6) на здравље људи и превенцију (превенцију) различитих болести. Недостатак ових масних киселина у исхрани може проузроковати појаву суве и грубе коже, екцема и осипа, слабе косе и ноктију. Ове масне киселине су неопходне за правилно функционисање мозга и нервног система, као и за нормалан раст и развој деце. У недостатку есенцијалних масних киселина у исхрани, ране спорије зарастају, дијареја, анемија и стопа инфекције такође се

повећавају (87). Поред тога што је есенцијална, сматра се да линолна киселина делује и на смањење LDL холестерола у крви. Линолна киселина такође делује на смањење холестерола, а показано је да линолна киселина има заштитни ефекат на срце и кардиоваскуларни систем. Тако позитивно утиче на срчане аритмије, тромбозу и упале, што је повезано са његовом конверзијом у докосахексаеноичну (DHA) киселину у организму (87).

Јасно је да омега-3 масне киселине имају благотворне превентивне и терапеутске ефекте, међутим још много истраживања је потребно да би се утврдили прецизни механизми њиховог деловања и направиле јасне препоруке за суплементацију, зависно од животног доба и пратећих болести пацијента.

1.4. МАСНЕ КИСЕЛИНЕ И КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ

Кардиоваскуларне болести представљају водећи узрок смрти у већини земаља света. Подаци из клиничких и експерименталних студија подржавају хипотезу да коришћење ω -3 масних киселина смањује ризик од развоја кардиоваскуларних болести и настанка изненадне срчане смрти. За разлику од ω -3, употреба ω -6 масних киселина може бити повезана са поремећајем функције срчаног мишића и реактивности коронарне циркулације. Поред тога, показано је да поремећаји кардиодинамских параметара и коронарног протока могу бити посредовани оксидативним оштећењем срчаног мишића. С обзиром да су подаци о утицају ω -3 и ω -6 масних киселина на срце и крвне судове још увек неусаглашени, у новије време се све већа пажња посвећује проучавању биљних препарата који садрже неку од ових киселина (89-91).

Линолна и линолеинска киселина се *ин vivo* конвертују у масне киселине са дужим угљениковим ланцем, који у телу имају специфичну биолошку функцију. Линолеинска киселина се конвертује у арахидонску масне киселине (20: 4n-6), од које даље се формирају сигнални молекула- еикосаноиди (простагландини, простациклин, тромбоксан и леукотриени), а који делују као локални регулатори и, за разлику од хормона не синтетишу се у жлездама и не преносе се крвљу на место деловања. Они посредују при осетљивости на бол, инфламацију, отоцима и агрегацији тромбоцита. Линолна киселина се конвертује у еикозапентаеноинску (ЕРА) (20:5n-3) и даље у докозахексаеноинску (ДНА) (22: 6n-3). Од ЕРА се даље синтетишу простаноиди и леукотриени, које имају анти-инфламаторно и анти-агрегативно дејство и могу да обезбеде уравнотежују ефекте еикосаноида. ДНА је повезан са многим позитивним ефектима на здравље, укључујући смањење ризика од срчаних обољења, рака, хипертензије и аутоимуних болести. Такође је показано да однос ω -6 и ω -3 масне киселине треба да буде што мањи, јер се на тај начин смањује ризик од појаве неких болести (90, 91).

Употреба ланеног уља и његових компоненти је повезана са превенцијом или смањењем настанка кардиовакуларних болести. Уље лана садржи смешу масних киселина, првенствено полинезасићених, од којих је најзаступљенија ω -3 α -линоленска киселина (51.9-55.2%), а затим олеинска (18.5-22.6%), линолна (14.2-17%), палмитинска (око 7%) и стеаринска киселина (3.4-4.6%). Укупан проценат свих масних киселина у семену лана износи 35-45%, док су поред тога заступљени и протеини (20-30%), влакна (28%), различити витамини (А, В₁₋₃, В₅, В₆, В₉, С) и минерали (Mg²⁺, P⁵⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, K⁺,

Fe²⁺). Ипак, сматра се да позитивни ефекти уља ланеног семена на кардиоваскуларни систем пре свега потичу од ω -3 α -линоленске киселине (91).

Главни састојак уља ноћурка су ω -6 полинезасићене масне киселине (82%) и то линолна (73%) и γ -линоленска (9%), док у његов састав улазе и протеини (15%) и угљени хидрати (3%). Овај препарат се последњих година се често користи у превентиви и помоћној терапији различитих кардиоваскуларних болести. Његови ефекти су, међутим, још увек недовољно познати.

Подаци из клиничких и епидемиолошких студија говоре о превентивном ефекту омега-3 масних киселина на развој атеросклеротске болести. Под атеросклеротским болестима се подразумева периферна артеријска болест, коронарна артеријска болест, срчане и мождане анеуризме и удари. Као рана манифестација ове болести издаваја се ендотелна дисфункција, која се карактерише губитком вазодилаторних и антиинфламаторних фактора и прогресијом вазоконтриктије посредоване проинфламаторним факторима. Фактори ризика за ендотелну дисфункцију укључују и класичне факторе ризика за настанак атеросклерозе, као што је хиперхолестеролемија, хипертриглицеридемија, дијабетес, хипертензија и пушење, па употреба омега-3 масних киселина представља примарну превенцију кардиоваскуларних болести од када се зна да могу утицати на нивое липида у крви. Подаци из експерименталних, епидемиолошких и клиничких студија сугерирају да употреба омега-3 полинезасићених масних киселина смањују ризик за настанак кардиоваскуларних болести побољшањем васкуларне функције, и наглашава се вазопротективна улога ЕРА и ДНА из риблигет уља, АЛА (алфа-линолеинска) биљног порекла. Механизам којима ове протективне масне киселине остварују своје ефекте су успорење развоја плака, повећање антиинфламаторног дејства, побољшање ендотел-зависне вазодилатације, смањење крвног притиска и повећање антиоксидативног капацитета (91-93).

У студијама се описују хиполипемички ефекти омега-3 масних киселина. Америчко друштво за кардиоваскуларне болести предлаже употребу омега-3 масних киселина код пацијената са веома високим нивоима триглицерида (≥ 500 mg/dL) у дози од 2-4 g/дан ЕРА+ДНА која може остварити ефекте снижавања триглицерида. У једној претходно спроведеној студији, испитиван је ефекат 4 g/дан омега-3 суплементације на вредности холестерола код пацијената са хиперхолестеролемијом (холестерол > 575 mg/dL). Након третмана од 17 недеља, омега-3 масне киселине су значајно снизиле триглицериде у крви у поређењу са плацебом. И остале рандомизирани интервентне

студије потврђују хиполипемичко дејство омега-3 масних киселина, делујући на снижавање укупног холестерола и триглицерида у крви (94).

У студији спроведеној од стране Khaledi и сарадника, испитиван је утицај суплементације уљем лана на вредности крвног притиска код људи. Уље лана као богат извор алфа-линолеинске киселине и влакана дало је бенефитне ефекте на притисак код ових пацијената, његовим снижавањем у случају суплементације која траје дуже од 12 недеља (95).

Студија дизајна серије случајева, на узорку од 3638 мушкараца и жена у Коста Рики известила је о јакој негативној повезаности нивоа алфа-линолеинске киселине са количином адипозног ткива код испитаника и степеном учесталости негативних кардиоваскуларних догађаја. Слична студија спроведена у Немачкој, нагласила је потребу узимања >1 g ALA/дан у циљу смањења ризика за настанак срчаног удара за 35-50%. У литератури су описани различити ефекти омега-3 масних киселина на кардиоваскуларни систем и здравље уопште (Табела 3).

Табела 3. Утицај ω -3 полинезасићених масних киселина (n-3; PUFA) на здравље

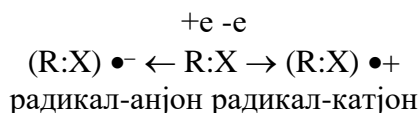
Позитивни ефекти	Механизам дејства
Ниска инциденца кардиоваскуларних болести; Снижење стопе морталитета пацијената са претходним инфарктом миокарда; смањење аритмија срца; редукација хроничне срчане болести и превенција КВС	Снижење холестерола и триглицерида, снижење LDL-а и VLDL-а; повећање антитромбина-3 и хепарин кофактора
Анти-инфламаторни ефекти	Ензимског компетицијом у синтези еикосаноида; редукација експресије ћелијски адхезивних молекула; супресија про-инфламаторних цитокина
Утицај на гојазност	Редукација адипогенезе и липогенезе код одраслих
Побољшање ендотелне функције	Побољшање ендотелне вазомоторне функције путем побољшане вазодилатације и системске артеријске комплијансе
Снижавање крвног притиска	Побољшање ендотелне функције
Снижавање токсичних ефеката хемиотерапеутика	ЕРА и/или ДНА мењају токсичност хемиотерапије
Канцери коже и усне дупље	Селективна инхибиција раста и индукција

Са друге стране, у исто време са повећањем употребе омега-3 масних киселина, повећава се употреба омега-6 масних киселина у људској популацији широм света. Познато је да, омега-6 масне киселине а нарочито арахидонска киселина су неопходне за развој феталне мождане циркулације. Још увек, док неки аутори наводе да одређени нивои омега-6 масних киселина су неопходни за нормалан метаболизам и здравље човека, други наводе потенцијалне различите негативне ефекте ових масних киселина. Омега-6 масне киселине су проинфламаторног дејства, па играју важну улогу у имунском систему. Инфламаторне ћелије човека имају висок ниво омега-6 арахидонске киселине и ниске нивое омега-3, и значај ове разлике је у томе што арахидонска киселина је прекурсор две врсте простагландина и четири врсте леукотриена, који су високо рекативни медијатори инфламације. Неки негативни ефекти омега-6 масних киселина описаних у литератури, повезују се са врло високим нивоима ових киселина код гојазних особа, али још увек није јасан механизам којима је посредована ова повезаност (90-95).

1.5. МАСНЕ КИСЕЛИНЕ И ОКСИДО-ИНФЛАМАЦИЈСКИ ОДГОВОР

Оксидативни стрес је стање у организму које се јавља када прооксиданси (слободни радикали) надвладају механизме антиоксидативне заштите организма. Најчешће настаје у условима када у организму постоји повећана продукција слободних радикала и смањена способност организма за њихову неутрализацију. Иако је оксидациони стрес укључен у патогенезу многих акутних и хроничних болести, са аспекта кардиоваскуларних истраживања, има још доста неусаглашених података и пуно потенцијалних (пато)физиолошких механизма за које се сумња да укључују оксидациони стрес (96-105).

Слободни радикали (СР) настају у низу биолошких реакција, те су у организму присутни у ниским концентрацијама ($10^{-5} - 10^{-9}$ mol). Настају у: оксидативној фосфорилацији у митохондријама, фагоцитози, биотрансформацијама егзогених и ендогених супстанци на мембранама ендоплазминог ретикулума – у процесима аутооксидације и у редокс циклусима, метаболизму етанола, ензимским реакцијама у којима учествују оксигеназе, синтези еикосаноида – биосинтези простагландина, леукотриена, оксидо – редукцијама метала са променљивом валенцом, липидној пероксидацији (96-105). Слободни радикали могу бити неутрални, али и позитивно (радикал-катјон) или негативно наелектрисани (радикал-анјон) (96-105):



У физиолошким процесима, СР учествују у производњи енергије, важни су за антимикуробну активност фагоцитних ћелија, учествују у процесима преношења сигнала и регулацији ћелијског циклуса, неопходни су за механизам деловања неких ензима (106, 107). Поред тога, СР су и мутагени, убрзавају старење и стимулишу раст ћелија. Кисеонични слободни радикали настају у процесу фагоцитне активности неутрофила, моноцита, макрофага и еозинофила и део су каскадних догађаја у антимикуробној активности фагоцитних ћелија. Фагоцитоване честице у овим ћелијама изложене су великој количини створеног супероксид анјон радикала у процесу тзв. респираторне експлозије која настаје након активације мембранске NADPH оксидазе (108).

За бактерицидну активност су највероватније одговорни хидропероксил радикал (109) (HO_2^\bullet), и водоник пероксид који настаје дисмутацијом супероксид ањон радикала у присуству SOD. Према теорији слободних радикала о развоју организма, метаболички оксиданси (ROS и CP) утичу на развој тако што мењају антиоксидациони капацитет ћелије мењањем продукције глутатиона (GSH) (110-112). Наиме, GSH и кисеоник утичу на активност ензима одговорних за иницирање и одржавање епигенетске контроле у експресији гена.

Реактивне кисеоничне врсте не представљају само реактивне кисеоничне врсте и деле у 2 групе: слободни радикали кисеоника и нерадикалски облици кисеоника (Таабела 4). Слободни радикали кисеоника су супероксид ањон радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), хидроксил радикал ($\bullet\text{OH}$), хидропероксил радикал (HO_2^\bullet), алкоксил радикал (RO^\bullet) и пероксил радикал (RO_2^\bullet) а нерадикалски облици кисеоника су водоник пероксид (H_2O_2), хипохлорна киселина (HOCl), озон (O_3), синглет кисеоник ($^1\text{O}_2$) органски хидропероксид (ROOH) (113-115).

Табела 4. Најважније реактивне слободнорадикалске и нерадикалске врсте кисеоника

Слободни радикали	Нерадикалски облици
Реактивне кисеоничне врсте (РОС)	
Супероксид ањон радикал, $\text{O}_2^{\bullet-}$	Водоник пероксид, H_2O_2
Хидроксил радикал, OH^\bullet	Хипобромна киселина, HOBr
Хидропероксил радикал, HO_2^\bullet	Хипрохромна киселина, HOCl
Пероксил радикал, $\text{LOO}^\bullet/\text{ROO}^\bullet$	Озон, O_3
Алкоксил радикал, $\text{LO}^\bullet/\text{RO}^\bullet$	Синглетни кисеоник, $\text{O}_2^1\Delta g$
Карбонантни радикал, $\text{CO}_3^{\bullet-}$	Органски пероксиди, ROOH
Угљендиоксидни радикал, $\text{CO}_2^{\bullet-}$	Пероксинитрит, ONOO^-
Угљенмоноксидни радикал, CO^\bullet	Пероксинитритна киселина, ONOOH

Ако су слободни радикали и остали РОС присутни у вишку може доћи до оштећења конституената ћелија као што су липидне мембране, протеини, ДНК и РНК. Пошто су реактивне кисеоничне врсте хемијски нестабилне врсте, РОС одузимају електроне са стабилним молекулима и тако даље претварају и ове молекуле у РОС.

Оштећење плазма мембране доводи до промене биофизичких карактеристика мембрана, што се консеквентно одражава на ензимске процесе, транспортне функције, свеукупну ћелијску сигнализацију и функцију ћелије. У зависности од тога на којим субћелијским мембранама (оргanelе, срж) се одвија липидна пероксидација, зависиће и збиљност ћелијског оштећења (115). Имајући у виду да ћелија структурно и функционално није хомогена, место генерисања слободних радикала, физичко-хемијске карактеристике слободних радикала, афинитети за одређивање биомолекула, детерминисаће циљно места напада и последицу испољеног штетног ефекта. Независно од начина индукције, липидна пероксидација се одвија кроз три фазе: иницијалну, пропaгациону и терминалну фазу. У првој, иницијалној фази, долази до формирања алкилног слободног радикала из незасићене масне киселине, уклањањем водоника. Потом, кисеоник из ваздуха реагује са алкил радикалом, при чему се пероксидни радикал формира. Пероксидни радикали имају способност да реагују са водоником из других једињења, стварајући хидопероксиде, који се затим распадају на пероксидне радикале. Ова фаза реакције назива се пропaгационом фазом. Последња фаза аутооксидације липида, терминална, подразумева повезивање два слободна радикала, који затим формирају не-радикалско једињење (116-118).

Да би спречио штетне реакције слободних радикала на конституенте ћелије, људски организам је развио комплексан антиоксидативни одбрамбени механизам. Људски организам поседује ендogene антиоксидативне системе који га штите од штетног утицаја слободних радикала, али важан сегмент антиоксидативне одбране чине и антиоксиданти које свакодневно треба уносити храном у адекватним дозама. Посматрано на ћелијском нивоу, антиоксидативни систем се састоји од ензимских и неензимских антиоксиданаса који одржавају баланс између прооксиданаса и антиоксиданаса у ћелији (Табела 5). Ензимски антиоксиданси су супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPx). У табели 2 дате су реакције које каталишу ова три ендогена антиоксиданса. У првој реакцији SOD претвара супероксидне анијоне радикале у водоник пероксид који улази у другу реакцију где се посредством CAT разграђује до воде и молекулског кисеоника. GPx такође детоксикује пероксиде (119-120).

Табела 5. Реакције катализоване од стране SOD, CAT и GPx

Ензим	Реакција коју катализује дати ензим
<i>Супероксид дисмутаза</i>	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightleftharpoons 2H_2O_2 + O_2$
<i>Каталаза</i>	$2 H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + 2 H_2O$
<i>Глутатион пероксидаза</i>	$2 GSH + PUFA-OOH (H_2O_2) \rightleftharpoons GSSH + 2 H_2O$

Липидна пероксидација је означена као главни механизам оштећења ћелија у многим биолошким системима биљног и животињског порекла. Овом процесу подлежу како липиди у биосистемима, тако и липидима у храни. Механизам ове ланчане реакције укључује стварање процеса липидних пероксида нападом слободних радикала на липиде. Основни супстрат за оксидативно оштећење липида представљају полинезасићене масне киселине (*Polyunsaturated Fatty Acids -PUFA*) у фосфолипидима и гликолипидима, као и холестерол у биолошким мембранама. PUFA садрже најмање две двоструке угљеник-угљеник везе између којих налази метиленска група која садржи посебно реактивне водоникове атоме. Липидна пероксидација се у биолошким системима може одиграти ензимским (под дејством липооксигеназе) и неензимским путем. Уколико се оксидација одвија у присуству атмосферског кисеоника назива се аутооксидација. Незасићене масне киселине као што су олеинска, линолна (линолеинска) и линоленска су липиди који учествују у механизму оксидације (120-122-124).

Липидна пероксидација се може спречити, или на неки начин успорити додатком једињења познатих под именом антиоксиданси. Антиоксиданси имају способност да спрече деловање слободних радикала и спрече њихову негативну оксидативну активност у реаговању са њима, што онемогућава активацију оксида и оксидативне реакције са састојцима ћелија живог организма, или компонентама хране. Да би били погодни за употребу, морају бити лако доступни, стабилни и селективни, реагујући само са слободним радикалима. Многбројне студије показале су да су егзогени антиоксиданси, нарочито они унети путем хране, су есенцијални за супротстављање организма оксидативном стресу. Ефекат антиоксиданаса се врши на два начина. Први подразумева заштиту липида од иницијатора оксидативних реакција, а други убрзава ширење. У првом случају, антиоксиданси спречавају стварање

реактивних оксидативних формација ($O_2^{\bullet-}$, 1O_2 итд.) или их везују за себе, спречавајући фазу иницијације оксидације липида. У другом случају, антиоксиданси прекидају ланчану реакцију у фази пропације или индиректно заустављају. Треба имати у виду да су ови механизми природно испреплетани и да није могуће јасно дефинисати границе између начина на који антиоксиданси остварују своје ефекте. У последњих неколико година, бројне студије које се баве изолацијом биоактивних супстанци из биљака, за које је познато да имају антиоксидантно, антимикубно, али и друге повољне ефекте (123).

У литератури, масне киселине се описују као снажни модулатори оксидативног стреса и редокс статуса живих организама. Иницијација аутооксидације масне киселине почиње одузимањем водониковог атома из биомолекула. Механизам комплексне ланчане реакције липидне пероксидације масне киселине одвија се у три фазе које су приказане на Табела 6. Масна киселина (МК) се у фази иницијације преради у радикал масних киселина (L^{\bullet}). Иницијатори су РОС, на пример хидроксил радикал ($\cdot OH$), пероксил радикал (ROO^{\bullet}) и алкоксил радикал (RO^{\bullet}) који имају способност да оксидишу полинезасићене масне киселине. Радикал масне киселине није стабилна молекула, тако да аутоматски реагује са молекулским кисеоником, на тај начин стварајући пероксил радикал масне киселине (LOO^{\bullet}). Овај радикал реагује са другом молекулом масних киселина и наступа поново радикал масне киселине и липидни хидропероксид ($LOOH$), један од главних почетних производа липидне пероксидације којом се распадају и формирају једињења која су одговорна за пропадање намирница. Такви секундарни производи укључују хексанал, пентанал и малондиалдехид (118-122).

Табела 6. Фазе липидне пероксидације на примеру линолне масне киселине

1. Фаза: Иницијација	$\text{LH} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{L}\cdot + \text{RH}$
2. Фаза: Пропагација	$\begin{aligned} \text{L}\cdot + \text{O}_2 &\rightarrow \text{LOO}\cdot \\ \text{LOO}\cdot + \text{LH} &\rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot \end{aligned}$
3. Фаза: Терминација	$\begin{aligned} \text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot &\rightarrow \text{LOOL} + \text{O}_2 \\ \text{L}\cdot + \text{LOO}\cdot &\rightarrow \text{LOOL} \\ \text{L}\cdot + \text{L}\cdot &\rightarrow \text{L-L} \end{aligned}$

Ендотел има неколико виталних функција, као што је регулација васкуларног тонуса и анти/про-инфламаторне равнотеже. Васкуларна дилатација у одговору на shear stress протока крви зависи управо од ендотелног-фактора релаксације крвног суда, азот монооксида (NO). Азот моноксид се већим делом синтетише путем ендотелне изоформе NO синтетазе (NOS-III) у одговору на вазодилаторни стимулус. Ендотелни азот моноксид дифузно пролази кроз васкуларне глатке мишићне ћелије где активира цитоплазматску гуанилилциклазу (GC), повећавајући производњу цикличног гуанозин-монофосфата (GMP), што доводи до релаксације глатких мишићних ћелија крвног суда. Из тог разлога, губитак ендотелом-посредоване вазодилаторне способности која се карактерише променом васкуларне равнотеже на рачун нефизиолошког инфламаторног и протромботичног одговора, је најранија манифестација кардиоваскуларног оштећења и претходи формирању атеросклеротских плакова (122, 123). Екстензивне екперименталне *ин vitro* и *ин vivo* студије, указују на чињенице да високи нивои омега-6 масних киселина значајно нарушавају ендотел-зависну вазодилатацију што последично доводи до смањења доступности азот монооксида у одговору на дилаторни стимулус као што је ацетилхолин. Поред тога, атеросклеротске промене код пацијената се доводе у везу са активацијом процеса коагулације и агрегације тромбоцита, нарушеном фибринолизом и хроничном инфламацијом, па је од изузетне важности испитати којим механизмима и путевима полинезасићене масне киселине утичу синтезу азот монооксида и ендотел-зависну релаксацију (120-124).

Са друге стране, масне киселине су познати модулатори инфламаторног одговора организма, са познатом чињеницом да су омега-3 масне киселине познате као антиинфламаторни агенси, а омега-6 проинфламаторни чиниоци. Метаболизмом масних киселина као што је већ претходно описано, настају еикосаноиди са различитим биолошким функцијама, због чега су ове киселине од изузетног значаја (125-128).

Еикосаноиди су паракрини хормони са бројним функцијама као што су улога у пермеабилност крвних судова, крварење, стварање крвних плочица и упални процеси у организму. Упални процеси су подлога многих хроничних болести. У еикосаноиде спадају простагландини, тромбосани, леукотриени, липоксини, хидроксиеикозатетраенска киселина, хидропероксиеикозатетраенска киселина и новооткривена група липидних медијатора названих ресолвини и докозаноиди. Еикосаноиди који настају од омега-6 масних киселина и омега-3 масних киселина битни су за регулацију упалног одговора, као и регулацију вазоконстрикције, односно дилатације (125, 126). Метаболизмом омега-6 масних киселина настају снажни упални и проагрегацијски еикосаноиди, док омега-3 масне киселине имају управо супротно, противупално дејство. У омега-6 еикосаноиде спадају арахидонска масна киселина, простагландини серије 2 који имају низ проинфламаторних ефеката (повећање васкуларне пропустљивости и вазодилатација, увећање бола и едема), тромбосани серије 2 коју су снажани вазоконстриктори, и изазивају нагомилавање тромбоцита и долази до коагулације крви и леукотриени серије 4 који имају снажно деловање у изазивању упалне реакције и производњи цитокина. У омега-3 еикосаноиде спадају простагландини серије 3 који имају важну улогу у заштити од срчаног удара као и у заштити од одређених упалних болести попут реуматоидног артритиса, лупуса и астме, тромбосани серије 3 који су тромбогено активни и леукотриени серије 5 који имају слабо противупално деловање. На пример, омега-3 масне киселине могу смањити упалу и побољшати функцију плућа код одраслих са астмом а омега-6 масне киселине имају супротан учинак, повећавају упалу и погоршавају рад плућа узрокујући бронхоконстрикцију. Упални еикосаноиди (леукотриени) који настају из арахидонских масних киселина имају важну улогу у патологији астме, па повећани унос омега-3 масних киселина смањује настанак леукотриена из АА (125, 126). Затим примећена је корисна употреба омега-3 масних киселина код оболелих од инфламаторних болести црева као што су Крнова болест и улцерозни колитис, па тако омега-3 масне киселине појачавају упални одговор лучењем цитокина, а омега-3 смањују инфламацију након дуже примене. Повољан учинак омега-3 масних киселина описан је на реуматске

болести. Студије на животињама показале су да унос омега-3 масних киселина, односно ЕПА и ДХА масних киселина, може одложити појаву симптома артритиса, смањити њихов интензитет и побољшати покретљивост зглобова. Омега-3 фосфолипиди смањују ниво медијатора упале (еикозаноида и цитокина) (127, 128). Резултати студија упућују на побољшање неколико параметара: краћег трајања јутарње укочености, смањења болова у зглобовима и смањења употребе нестероидних антиинфламаторних лекова. Описана минимална доза за испољавање антиинфламаторног учинка износи 2 г омега-3 дневно у виду намирница богатим омега-3 масним киселинама као што је рибље месо или суплемената (124-128).

Међутим, иако је инфламаторна активност масних киселина у великој мери позната и описана, још увек није тачно познато у којем степену хронична суплементација омега-3 и омега-6 масних киселина у виду биљних уља али и у виду чисте супстанце, утиче на промену оксидо-инфламацијских параметара *ин vivo* и како се то одражава на функцију миокарда.

2.

ЦИЉЕВИ

2. ЦИЉ СТУДИЈЕ

2.1. Општи циљ

Испитати хроничне ефекте примене исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда, коронарни проток и оксидо-инфламацијске параметре старих пацова.

2.2. Специфични циљеви:

1. Евалуација хроничних ефеката примене исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда изолованог срца пацова.
2. Компарација хроничних ефеката примене исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда изолованог срца пацова
3. Испитивање утицаја хроничних ефеката примене исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на коронарну циркулацију изолованог срца пацова
4. Испитивање хроничних ефеката примене исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на различите параметре оксидационог стреса (липидне пероксиде (TBARS), азот моноксид (NO), супероксид анјон радикал (O_2^-), и водоник пероксид (H_2O_2))
5. Испитивање улоге различитих параметара антиоксидативног система заштите (редуковани глутатион (GSH), супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT)) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију у условима хроничне примене исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама
6. Испитивање потенцијалних механизма путем којих омега-3 и омега-6 масне киселине самостално или у виду исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама учествују у хомеостази срчаног рада

3.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

За припрему пуфера и перфузионих раствора коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка):

3.1.1. Комплет реагенаса за припремање Krebs-Hensenleit-овог перфузионог раствора:

Натријум хлорид (NaCl, 27.216 g/4L), калијум хлорид (KCl, 1.4 g/4L), магнезијум сулфат (MgSO₄×7H₂O, 1.636 g/4L), калијум дихидроген фосфат (KH₂PO₄×2H₂O, 0.0644 g/4L), натријум бикарбонат (NaHCO₃, 8.36g/4L), глюкоза (C₆H₁₂O₆×H₂O, 8.8g/4L) и калцијум хлорид (CaCl_{2(anh.)}, 1.117 g/4L).

За аналитичко одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси *pro analysis* квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка):

3.1.2. Комплет реагенаса за детерминацију индекса липидне пероксидације (TBARS):

2-тиобарбитурна киселина (ТВА, C₄H₄N₂O₂S), Mr 144.15; натријум хидроксид (NaOH) Mr 40.00.

3.1.3. Комплет реагенаса за детерминацију азот монооксида (NO) у облику нитрита:

Сулфанилна киселина (4-амино бензенсулфонска киселина, C₆H₇NO₃S), Mr 173.19; N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохидрат (NEDA, C₁₂H₁₅C₁₂N), Mr 259.18; амонијум хлорид (NH₄Cl), Mr 53.49; Боракс (Na₂B₄O₇×10H₂O), Mr 381.4; 85% орто-фосфорна киселина (H₃PO₄), ρ=1,685 gcm⁻³; натријум нитрит (NaNO₂), Mr 69.00.

3.1.4. Комплет реагенаса за детерминацију супероксид ањонског радикала (O₂⁻):

TRIS (Трис (хидроксиметил) аминокетан, C₄H₁₁NO₃), Mr 121.14; 37% хлороводонична киселина (HCl), ρ=1,19 gcm⁻³, Mr 36.5; Na₂EDTA, Mr 372.24; Нитро-тетразолијум плаво хлорид (NBT, C₄₀H₃₀ClN₁₀O₆), Mr 817.6; Желатин (C₁₅H₁₁N₂ NaO₂), Mr 61.5 kDa.

3.1.5. Комплет реагенаса за детерминацију водоник пероксида (H₂O₂):

Калијум хидрогенфосфат дихидрат (K₂HPO₄ x 2H₂O) Mr 214.23; калијум дихидрогенфосфат дихидрат (KH₂PO₄ x 2H₂O) Mr 164.09; натријум хлорид (NaCl) Mr 58.44; водоник пероксид (H₂O₂), Mr 34.01; D(+)-глукоза монохидрат (декстроза), Mr 198.17; фенол црвено (phenol red, C₁₉H₁₄O₅S), Mr 354.4; пероксидаза из коњске ротквице (peroxidase from horse radish – HRPO EC 1.11.1.7), Mr 44 kDa.

3.2. Експериментални модел ретроградне перфузије изолованог срца

Родоначелник експерименталне технике испитивања кардиоваскуларне функције изолованог срца пацова, коју смо користили у овој студији је био чувени немачки физиолог Оскар Лангендорф (*Oskar Langendorff* 1853-1908). Ипак, пре детаљног описа овог конкретног експерименталног модела, дужни смо да се на кратко осврнемо на импресивну научну биографију утемељивача овог техничког изума.

За изучавање функције миокарда и коронарне циркулације определили смо се за модификовани *Langendorff*-ов модел изолованог срца, применљив на изолованом срцу сисара (пас, мачка, зец, заморчић).

Две класичне варијанте *Langendorff*-ове технике које се примењују у експерименталним истраживањима су:

- Перфузија изолованог срца при константном протоку кроз коронарно васкуларно корито;
- Перфузија изолованог срца при константном притиску кроз коронарно васкуларно корито;

при чему је други параметар променљива варијабла. У првој варијанти експерименталног модела променљива варијабла је притисак, који се региструје на писачу посебним системом преносника (трансдјусера), док је у другој варијанти експерименталног модела то проток, који се региструје „*flowmetrijски*“, тј. скупљањем венског ефлуента у одређеном временском интервалу или помоћу „*flow-metra*“, који се апликује директно у коронарно артеријско корито.

У оба експериментална модела ради се о средњој вредности променљивог параметра, обзиром да се апсолутне вредности не могу третирати као поуздане. Узрок томе су специфичности самог срчаног рада: понављање срчаних циклуса, чије радне компоненте (систола и дијастола) не трају исто, фреквенца срца која се сваког тренутка мења, минималне разлике у температури комплексног физиолошког раствора којим се

срце перфундује итд. У циљу поузданости се, због тога, одређивање променљивог параметра у функцији задатог параметра регистује у трајању од 5 минута.

Ми смо се определили за прву варијанту модификованог *Langendorff*-овог модела, који као променљиву величину има притисак (40-120 cmH₂O), док је проток променљива компонента.

3.3. Langendorff апарат LF-01 F-P

Експериментална истраживања у нашој студији су спровођена на *Langendorff* апарату марке **LF-01 F-P** произвођача Experimetria Ltd, Budapest, (Мађарска).

Основне компоненте овог апарата су следеће:

1. Две вертикалне стаклене цеви, исте висине, од којих се цев мањег калибра налази у цеви већег калибра. Између површине ове две цеви циркулише вода, која се убацује у цев већег калибра путем бочних цеви и система цева, а претходно се у воденом купатилу загрева до одређене температуре. У цев мањег калибра се, методом негативног притиска убацује комплексан физиолошки раствор (у нашем случају Krebs-Henseleit-ов раствор), који има сличне перформансе као екстрацелуларна течност. Циркулишућа вода у цеви већег калибра се загрева тако да раствор у цеви мањег калибра на излазу из система има температуру 37 °C тј. оптималну телесну температуру. Цев мањег калибра се завршава излазом, на који се поставља препарат изолованог срца;
2. Резервоара у коме се налази комплексни Krebs-Henseleit-ов раствор, чија је запремина 4 литра, који је спојен са једне стране са унутрашњом цеви мањег калибра, а са друге стране са боцом у којој се налази смеша гасова O₂/CO₂;
3. Боце са смешом гасова у односу O₂:CO₂=95%:5%, а која је спојена са резервоаром у коме се налази Krebs-Henseleit-ов раствор. Боца са смешом гасова има двоструки задатак: 1) да постигне физиолошки парцијални притисак кисеоника и угљен диоксида какав егзистира у артеријској крви и 2) да негативним притиском који ствара у резервоару убацује раствор у унутрашњу цев система цеви;
4. Каниле, која спаја изводну цев система цеви и асцедентну аорту изолованог срца пацова;

5. Воденог купатила које загрева воду у спољашњој цеви и на тај начин индиректно постиже температуру физиолошког раствора од 37 °C (изотермичност);
6. Инфузионе пумпе, којом се жељени агенс адекватном брзином (у зависности од базалног коронарног протока) администрира непосредно на споју каниле и асцедентне аорте,
7. Рачунара са одговарајућим софтвером (*Spel Advanced HaemoSys v3.24*) преко кога се континуирано прате кардиодинамски параметри срчаног рада (Слика 15). Рачунар је повезан са сензорима преко којих добија податке о раду срца.
8. Сензора - трансдјусера који су са једне стране повезани са различитим структурама изолованог срца, а са друге стране са рачунаром. Улога сензора је у континуираном регистровању функције миокарда - леве коморе (промена притисака, систолног и дијастолног притиска, срчане фреквенце, притисака у аорти). На нашем моделу *Langendorff* апарата постоје три врсте сензора: 1) Први сензор (transducer BS4 73-0184) је повезан са лучно савијеном, танком металном цеви на чијем крају се налази балончић (пречника 5mm, latex/ најлон фолија) испуњен дестилованом водом. Овај балончић се након пресецања митралне валвуле убацује у леву комору, надува, и омогућава сензору директно регистровање притисака и срчане фреквенце из ове шупљине срца. На овај начин се региструју следећи параметри функције леве коморе: dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори, (mmHg/s), dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори, (mmHg/s), SLVP – систолни притисак у левој комори, (mmHg), DLVP – дијастолни притисак у левој комори, (mmHg), и HR – фреквенца рада срца, (bpm).

Обзиром на морфолошку и функционалну доминантност леве коморе, праћењем ових параметара се може објективно и прецизно испитати функција читавог срца. Чињеница да се сви наведени подаци добијају директно из саме срчане шупљине, доноси овом инвазивном поступку неопходну оригиналност и веродостојност.

2) Други сензор (perfusion pressure transducer) је фиксне позиције и смештен је непосредно уз канилу, односно аорту, чиме омогућава регистровање притисака у аорти. У садашњем истраживању смо преко овог сензора били у могућности да пратимо средњи (‘артеријски’) притисак раствора (крви) у аорти – MBP, (mmHg).

3) Трећи сензор (temperature transducer) је такође фиксне локализације, уз стаклену комору која окружује изоловано срце, и региструје температуру срца.

Комплексни **Krebs Hensenleit**-ов раствор је по свом саставу врло сличан екстрацелуларној течности. Он се састоји из: NaCl – 118mmol/L, KCl - 4,7 mmol/L, MgSO₄ - 1,66 mmol/L, NaHCO₃ - 24,88 mmol/L, KH₂PO₄ - 1,18 mmol/L, глукоза (C₆H₁₂O₆) - 5,55 mmol/L, и CaCl₂ - 2,52 mmol/L. pH раствора износи 7,4. Улога овог раствора је да, захваљујући свом саставу, обезбеди одговарајућу исхрану срца и тиме му омогући несметан рад.

Овакав експериментални модел омогућава регистровање и анализу следећих кардиодиманских параметара:

- dp/dt max – максимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s,
- dp/dt min – минимална стопа промене притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s,
- SLVP – систолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg,
- DLVP – дијастолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, и
- HR – фреквенца рада срца, изражава се као број откуцаја срца у минути (bpm)

dp/dt max је параметар помоћу кога смо индиректно процењивали контрактилну, а dp/dt min, релаксантну способност миокарда. Коронарни проток (CF) је мерен флоуметријски (flowmetrically), и изражен је у ml коронарног венског ефлуента у минути.

3.4. Експериментални протокол

При експерименталном раду су поштоване одредбе прописаних аката (*EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC*) и принципа етичности. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета Медицинских Наука Универзитета у Крагујевцу.

Све експерименталне процедуре су се спроводиле у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Факултета Медицинских Наука у Крагујевцу. У нашем истраживању смо користили модел изолованог срца пацова Wistar albino соја старости

24 недеље, мушког и женског пола, а телесне масе 550 ± 50 г грама. Животиње су чуване у стандардним лабораторијским условима (температура ваздуха $23 \pm 1^\circ\text{C}$, релативна влажност ваздуха 50%, 12:12 часова циклус светлост:тама, (са почетком светлог периода у 9:00 ч часова) и са слободним приступом води и храни (ad libitum). Животиње су биле подељене у две контролне (2) и осам експерименталних (8) експерименталних група (12 животиња у групи) у зависности од врсте третмана којем су биле изложене у трајању од 6 недеља:

- (1) прва контролна група ($n=10$, мушког пола) која ће бити храњена уобичајеном лабораторијском храном за пацове и биће јој апликован физиолошки раствор гаважом у количини еквивалентној примењеним препаратима;
- (2) прва експериментална група ($n=10$, мушког пола) којој ће се α -линоленска киселина апликовати гаважом у дози од 165 mg/kg/тт дневно током периода од 6 недеља;
- (3) друга експериментална група ($n=10$, мушког пола) којој ће се уље ланеног семена апликовати гаважом у дози од 300 mg/kg/тт дневно током периода од 6 недеља;
- (4) трећа експериментална група ($n=10$, мушког пола), којој ће се линолна киселина апликовати гаважом у дози од $7,3 \text{ mg/kg/тт}$ дневно, током периода од 6 недеља;
- (5) четврта експериментална група ($n=10$, мушког пола), којој ће се уље ноћурка апликовати гаважом у дози од 10 mg/kg/тт дневно, током периода од 6 недеља;
- (6) друга контролна група ($n=10$, женског пола) која ће бити храњена уобичајеном лабораторијском храном за пацове и биће јој апликован физиолошки раствор гаважом у количини еквивалентној примењеним препаратима;
- (7) пета експериментална група ($n=10$, женског пола) којој ће се α -линоленска киселина апликовати гаважом у дози од 165 mg/kg/тт током периода од 6 недеља;
- (8) шеста експериментална група ($n=10$, женског пола) којој ће се уље ланеног семена апликовати гаважом у дози од 300 mg/kg/тт дневно током периода од 6 недеља;

- (9) седма експериментална група (n=10, женског пола), којој ће се линолна киселина апликовати гаважом у дози од 7,3 mg/kg/тг дневно, током периода од 6 недеља;
- (10) осма експериментална група (n=10, женског пола) којој ће се уље ноћурка апликовати гаважом у дози од 10 mg/kg/тг дневно, током периода од 6 недеља.

Након хроничног третмана од 6 недеља одговарајућом исхраном, животиње би се жртвовале како би се спровела истраживања на изолованом срцу и биохемијске анализе из узорака перфузата, плазме и лизата еритроцита.

3.5. Изолација срца

Животиње се жртвују након краткотрајне етарске наркозе (дуготрајна би изазвала срчану инсуфицијенцију, што би за наша истраживања било контраиндиковано) цервикалном дислокацијом (*Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK*). Након тога, уследило је хируршко отварање абдомена, дијафрагма је пресечена лучно, с лева на десно, а затим је грудни кош отворан, брзо, бочно, дуж мамиларне линије.

Да би се одржало у релативној хомеостази, током ових процедура, срце је преливано физиолошким раствором (+4°C). По отварању грудног коша, пресечен је перикард на врху срца и на тај начин срце је било спремно за изоловање. Након пресецања перикарда, крвни судови на бази срца се ресецирају, орган се вади из грудног коша и одмах се ставља у леден физиолошки раствор ((-4) – (-10) °C), чиме се импровизује тзв. „физиолошка клешта“ и метаболички процеси у миокарду се свде на минимум.

По стављању органа на лед, спроводи се тупа препарација базе срца, са отклањањем свих елемената, изузев асцендентне аорте, јер се кроз њу одвија ретроградна перфузија. Препарисана аорта се, потом, концем причвршћује (везује) за канилу за ретроградну перфузију чиме експеримент почиње. У циљу што поузданијих резултата, односно одржања виталности препарата, потребно је да ова хируршка процедура траје свега 2-3 минута.

Након постављања изолованог срца на апарат по *Langendorff*-у, у пределу леве аурикуле, се пресеца лева преткомора, чиме се приступа митралној валвули. Потом се,

пинцетом разарају митрални залистци, што у нашем експерименталном моделу има двоструки значај: 1) на овај начин притисак у левој преткомори је сведен на нулу, чиме се искључује сваки утицај на коронарну циркулацију, који не зависи од функције леве коморе. То омогућава постизање оптималних услова за ретроградну перфузију изолованог срца, јер ток раствора за перфузију има следећи смер: аорта - лева преткомора - лева комора - коронарни синус - коронарне артерије - коронарне вене, што фокусира и простор нашег истраживања на срце и коронарну циркулацију. 2) Прокидањем митралне валвуле се обезбеђује улазак и постављање претходно поменутог сензора у леву комору преко кога се прати функција срчаног мишића (региструју се притисци у левој комори срца: $dp/dt \max$ – максимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, $dp/dt \min$ – минимална стопа развоја притиска у левој комори, изражава се у mmHg/s, SLVP – систолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, DLVP – дијастолни притисак у левој комори, изражава се у mmHg, и HR – фреквенца рада срца, изражава се као број откуцаја срца у минути). Сви параметри функције леве коморе су повезани са софтверском јединицом и све време трајања експеримента се прате и снимају на монитору рачунара. Проток крви кроз коронарне крвне судове (CF) се изражава у ml/min и мери се флуорометријском методом.

После успостављања стабилног (правилног) срчаног рада (коронарни проток након неколико серија мерења као и сви параметри срчане функције се не мењају значајно), за шта је потребно око пола сата, створени су услови за испитивање функције изолованог срца.

3.6. Биохемијске анализе

Биохемијске анализе су одређиване у узорцима коронарног венског ефлуента, који је сакупљан на крају контролног периода и на крају периода апликације испитиване супстанце. Сви реактивни молекули, који су били од интереса за наше истраживање су мерени спектрофотометријском методом на апарату марке Specord S-600 Analytik Jena, Велика Британија. Поред тога, у узорцима плазме и лизату еритроцита мериле су се вредности про-оксидационих, антиоксидационих и инфламаторних параметара.

3.6.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидационог стреса, је одређиван индиректно преко продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). У нашим истраживањима ниво TBARS-а у коронарном венском ефлуенту смо одређивали спектрофотометријски. Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете (12x100) пипетирано је 800 μ l коронарног венског ефлуента или плазме и 200 μ l 1% ТВА у 0.05 М NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је еквивалентна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора или дестиловане воде ако је узорак плазма. Након пипетирања, узорци су инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације, узорци су прилагођени собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS у коронарни венски ефлуент спектрофотометријски на таласној дужини од $\lambda=530\text{nm}$.

1. Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине. Количина ослобођених TBARS по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин и изражава се у μM :

$$\text{nmol TBARS/ml ефлуента} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25,$$

$$\text{nmol TBARS/минути/g wt} = \Delta A / 1.56 \times 1.25 \times CF / m_{\text{срца}}$$

при чему је A_u апсорбанца узорка, док је A_{sp} апсорбанца следеће пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактор за овај есеј.

3.6.2. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје љубичасту боју. Griess-ов реагенс се припрема *ex tempore*, непосредно пре аналитичког одређивања, мешањем једнаких запремина (v/v) 1 % сулфанилне киселине, растворене у 5 % орто-фосфорној киселини (може се чувати на собној температури) и 0.1 % воденог раствора: N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорида (NEDA), који се чува у тамној бочици на 4 °C, због своје високе фотохемијске реактивности.

У епрувете (12 x 100) је пипетирано 1 ml коронарног венског ефлуента или плазме, 250 μl свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера (pH=9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH_4Cl) и натријум тетраборат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). Амонијачни пуфер, који се у току припеме мора загревати, због изузетно слабе растворљивост натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћено је 1 ml Krebs-Hensenleitov-ог раствора или дестиловане воде у случају плазма узорка.

3.6.3. Одређивање супероксид анион радикала (O_2^-)

Одређивање количине супероксид анион радикала (O_2^-) у коронарном венском ефлуенту или плазми заснива се на реакцији O_2^- са нитро тетразолијум плавим (**Nitro Blue Tetrazolium - NBT**) до нитроформазан плавог (446). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}}=550\text{nm}$. Есејна смеша (“assay mixture”) садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH=8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

1. У епрувете (12x100) је пипетирано 50 μl коронарног венског ефлуента или плазме и 950 μl есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора или дестиловане воде. На самом почетку реакције

измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција E_1 . Сваких 60 секунди се врши мешање пластичним штапићем и нотира екстинкција након мешања до своје стабилизације, што подразумева две узастопне приближн о исте екстинкције. Последња екстинксија се означава као E_2 . Исти поступак се примењује и за слепу пробу. Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина а количина ослобођеног O_2^- по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

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

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

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

$$\text{nmol } O_2^-/\text{ml ефлуента} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05$$

$$\text{nmol } O_2^-/\text{минут/g} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \times CF/m_{\text{срца}}$$

3.6.4. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Детерминација количине водоник пероксида (H_2O_2) заснива се на оксидацији фенол црвеног помоћу водоник пероксид реакције која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (*Horseshoe Radish Peroxidase* - HRPO). У епрувете (12x100) пипетирано је 200 μ l коронарног венског ефлуента или плазме и 800 μ l свеже направљеног раствора фенол црвеног (*Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера ($pH = 7$), 5,5 mM D(+)-глукозе и 0,28 mM фенол црвеног. Узорцима се затим дода 10 μ l (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су отављани на собној температури 10 минута, а затим се подеси $pH \approx 12$, помоћу 1 M NaOH. Као слепа проба уместо коронарног венског ефлуента коришћена је адекватна количина Krebs-Hensenleitov-ог раствора или дестиловане воде. Концентрација ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), одређиваног за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве, користи се стандардни (Stock) раствор H_2O_2 , уз претходну проверу концентрације (A_{230} за 10 mM H_2O_2 износи 0,810). Мерење апсорбанце (A) спровођене су на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$, у стакленим киветама, запремина 1 ml на спектрофотометру LKB Biochrom. модел: Ultrospec 4050. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепа

пробе (В), чиме се добија коначна апсорбанца (ΔA). Концентрација, а затим и количина ослобођеног H_2O_2 у коронарном венском ефлуенту израчунавана је на основу формуле а количина ослобођеног H_2O_2 по граму срчаног ткива се одређивала на следећи начин:

$$\text{nmol } H_2O_2/\text{ml ефлуента} = \Delta A / F$$
$$\text{nmol } H_2O_2/\text{ml /минут/g wt} = \Delta A / F \times CF/m_{\text{срца}}$$

3.6.5. Одређивање каталазе (CAT)

У лизату крви је одређивана концентрација каталазе. Након дилуције лизата дестилованом водом у односу 1:7 и додавања етанола у односу 0,6:1 приступило се даљој процедури. 50 μl CAT буфера, 100 μl узорка и 1 ml 10 mM H_2O_2 су стављени у епрувету и приступило се мерењу узорака на таласној дужини од 360 nm (129).

3.6.6. Одређивање супероксид дисмутазе (SOD)

Супероксид дисмутаза је одређивана по епинефрин-методом по *Beutler-a.* Мешањем 100 μl лизата и 1 ml карбонатног буфера се започиње процес, након чега се додаје 100 μl епинефрина. Мерење се врши спектрофотометријски на таласној дужини од 470nm (130).

3.6.7. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Активност антиоксидативног молекула редукованог глутатиона је одређиван у лизату а мерен спектрофотометријском методом. Ова метода се базира на реакцији оксидације глутатиона са 5,5- dithio-bis-6,2-nitrobenzoic киселином, методом по *Beutler-y* (131).

3.6.8. Одређивање проинфламаторних цитокина (IL-6, TNF- α)

Користили смо комерцијални ELISA сет (R&D Systems, Minneapolis, MN) за мерење концентрације одабраних цитокина (IFN, IL-1 β , IL-17, IL-27, IL-6, TNF.) према инструкцијама произвођача. Цитокини су анализирани са мултиплекс сендвич имуноесејом са електрохемилуминисценцијом. Укратко, плоче се прекривају са

хватајућим антителима за специфичне цитокина, затим се инкубирју са узорцима плазме. Потом се антитела за детекцију додатају и плоче се поново инкубирају. После испирања, одреди се ниво детекције (132, 133).

3.7. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, користила се: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. За испитивање нормалности расподеле употребљени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk*, и графици: хистограм и *normal QQ plot*. За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, користио се Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе. Приликом тестирања разлика између параметара, у случају постојања више подгрупа, употребљавао се *Kruskal-Wallis* тест. Статистичка обрада података је рађена у статистичком пакету *SPSS 22 for Windows*.

4.

РЕЗУЛТАТИ

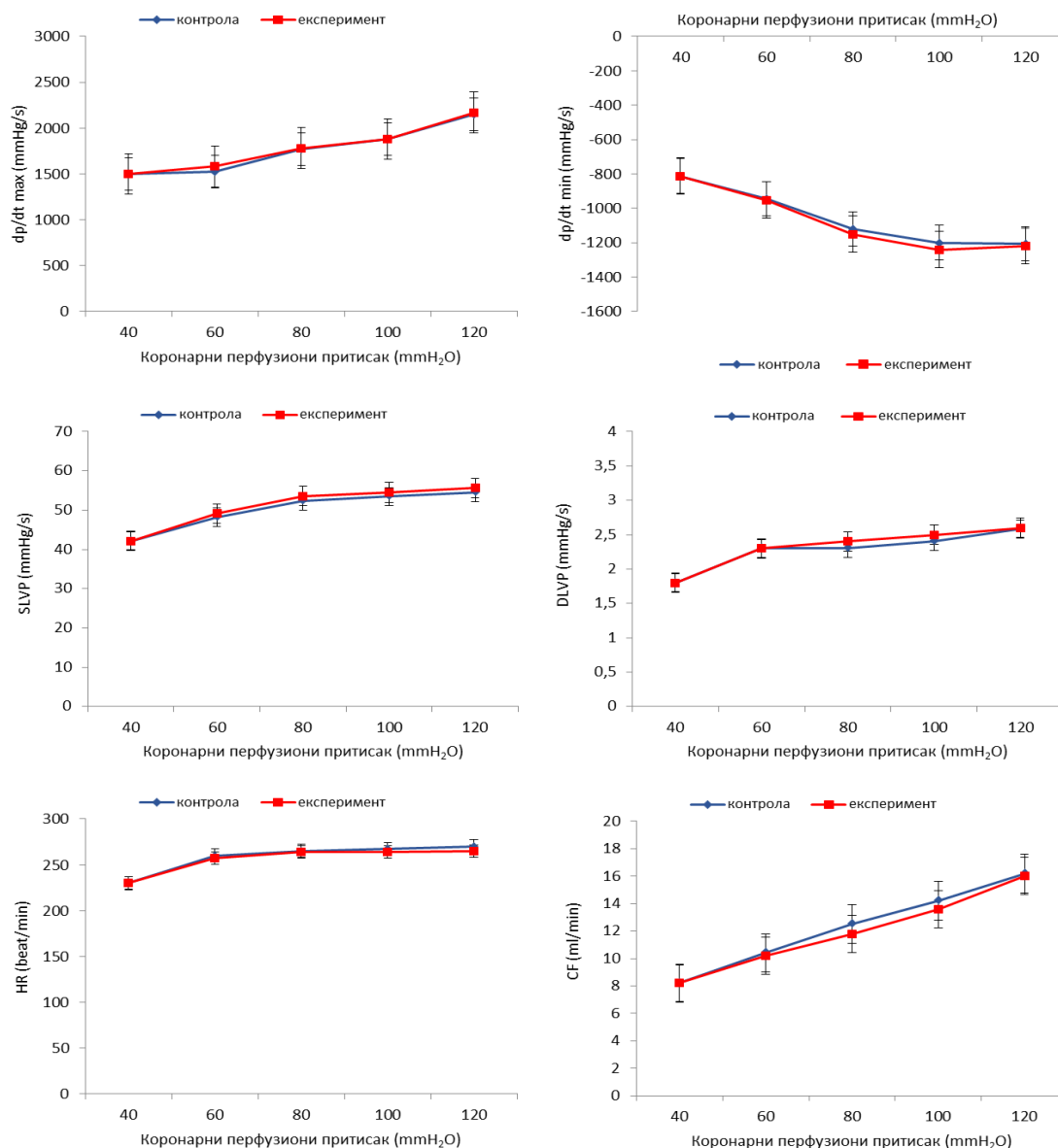
4. РЕЗУЛТАТИ

Циљ овог истраживања био је испитати хроничне ефекте примене омега-3 и омега-6 масних киселина или суплемената који их садрже (уља лана и ноћурка) на функцију миокарда, коронарни проток и оксидо-инфламацијске параметре старих пацова.

4.1. ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА КАРДИДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ (ПОРЕЂЕЊЕ У ГРУПИ)

Контролна група (мужјаци)

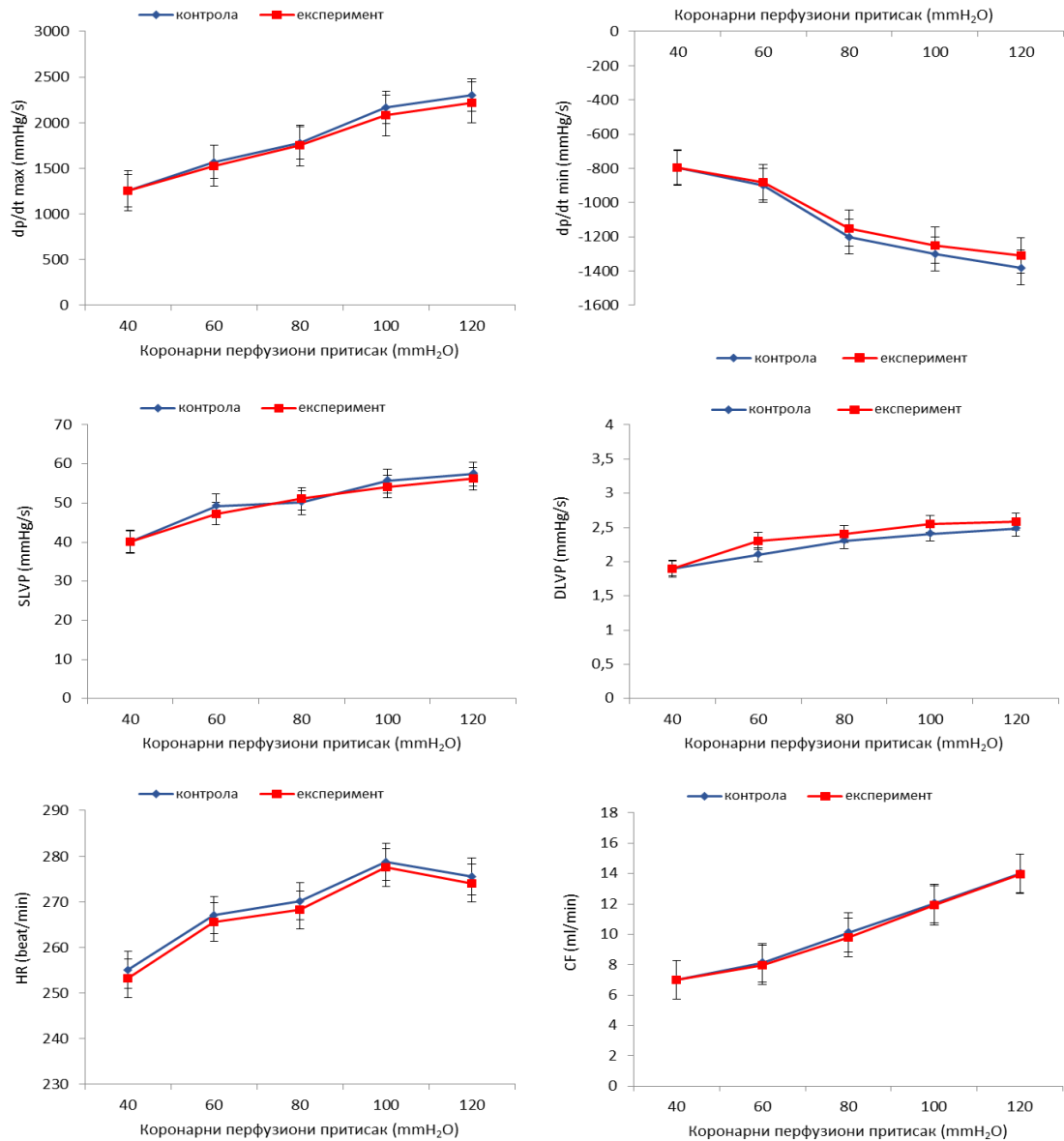
На Графикону бр. 1 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у контролног групи пацова мушког пола. Није било статистички значајних разлика у контролном и експерименталном периоду при промени коронарног перфузионог притиска у опсегу од 40 до 120 cmH₂O.



Графикон бр. 1- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у контролној групи мужјака

Контролна група (женке)

На Графикону бр. 2 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у контролног групи пацова женског пола. Није било статистчки значајних разлика у контролном и експерименталном периоду при промени коронарног перфузионог притиска у опсегу од 40 до 120 cmH₂O.

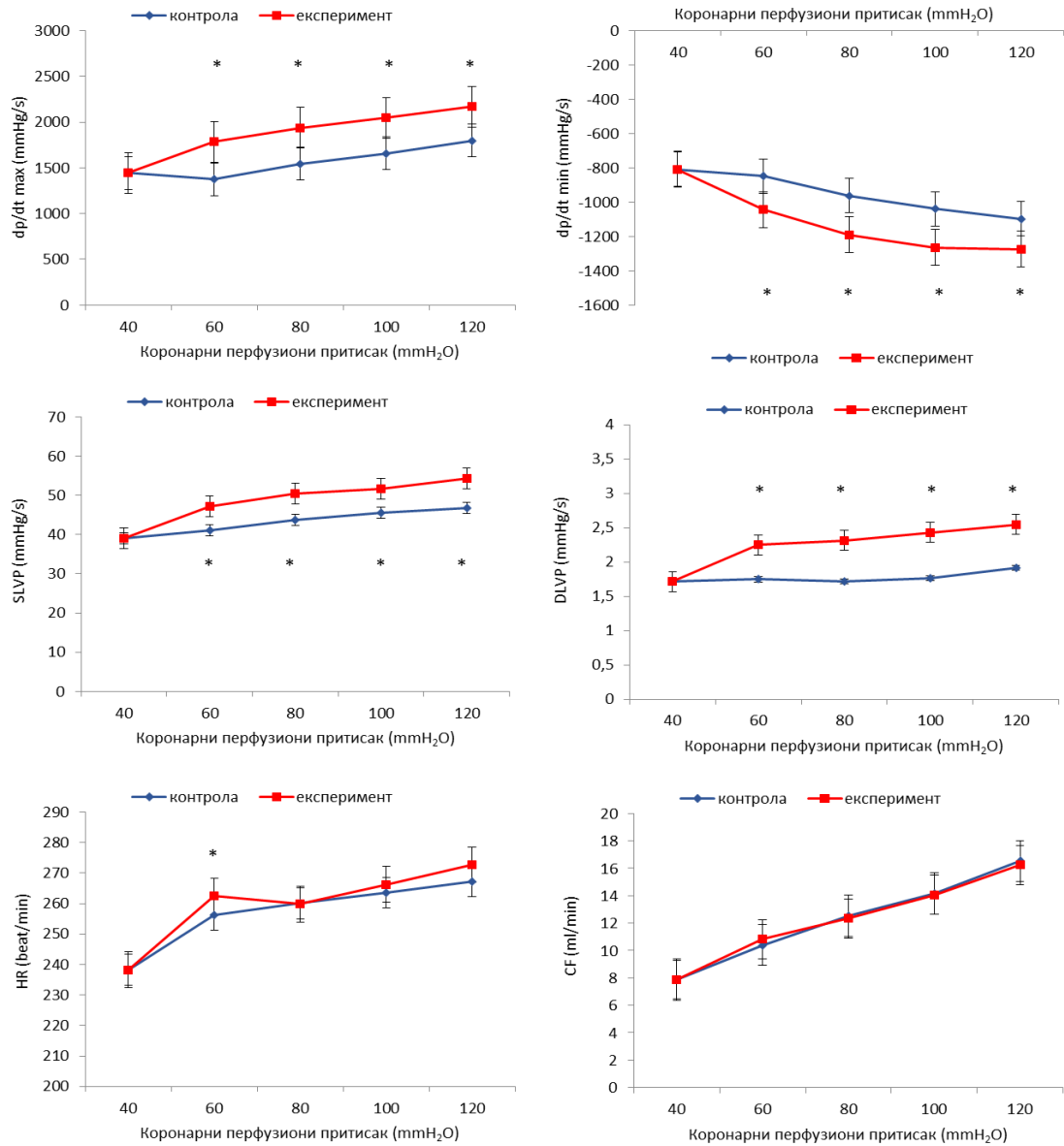


Графикон бр. 2- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у контролној групи женки

Ланено уље група (мужјаци)

На Графикону бр. 3 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова мушког пола третираној ланеним уљем. Примећена је статистички значајно повећање $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP и DLVP у експерименталном периоду у односу на контролни период при вишим коронарним перфузионим притисцима у опсегу од 60 до 120 cmH₂O. Вредности HR-а су значајно

повишене само при притиску од 60 cmH₂O док се коронарни проток није значајно променио у експерименталном периоду у овој групи.

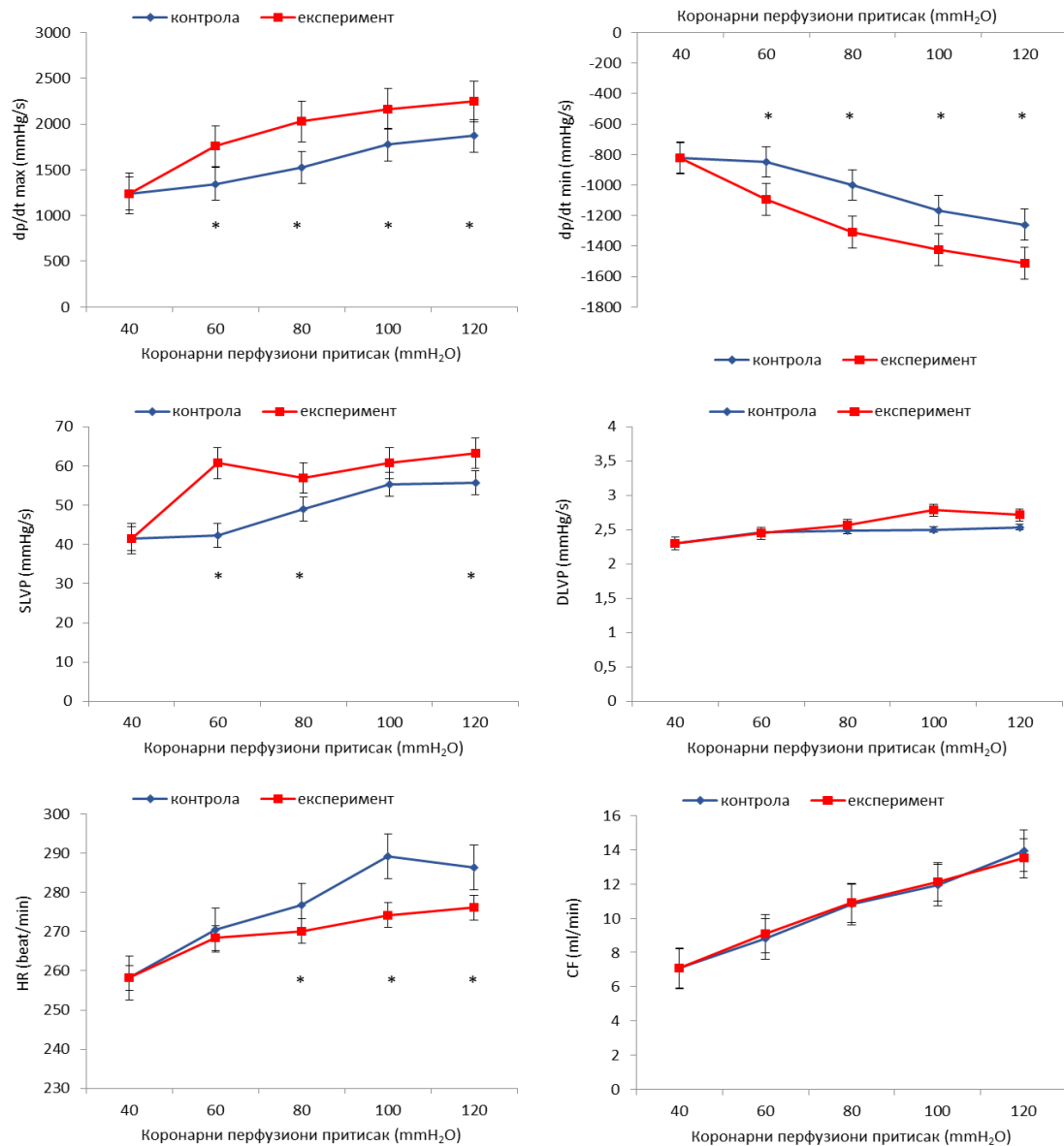


Графикон бр. 3- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи мужјака након суплементације ланеним уљем

Ланено уље група (женке)

На Графикону бр. 4 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова женског пола третираној ланеним уљем.

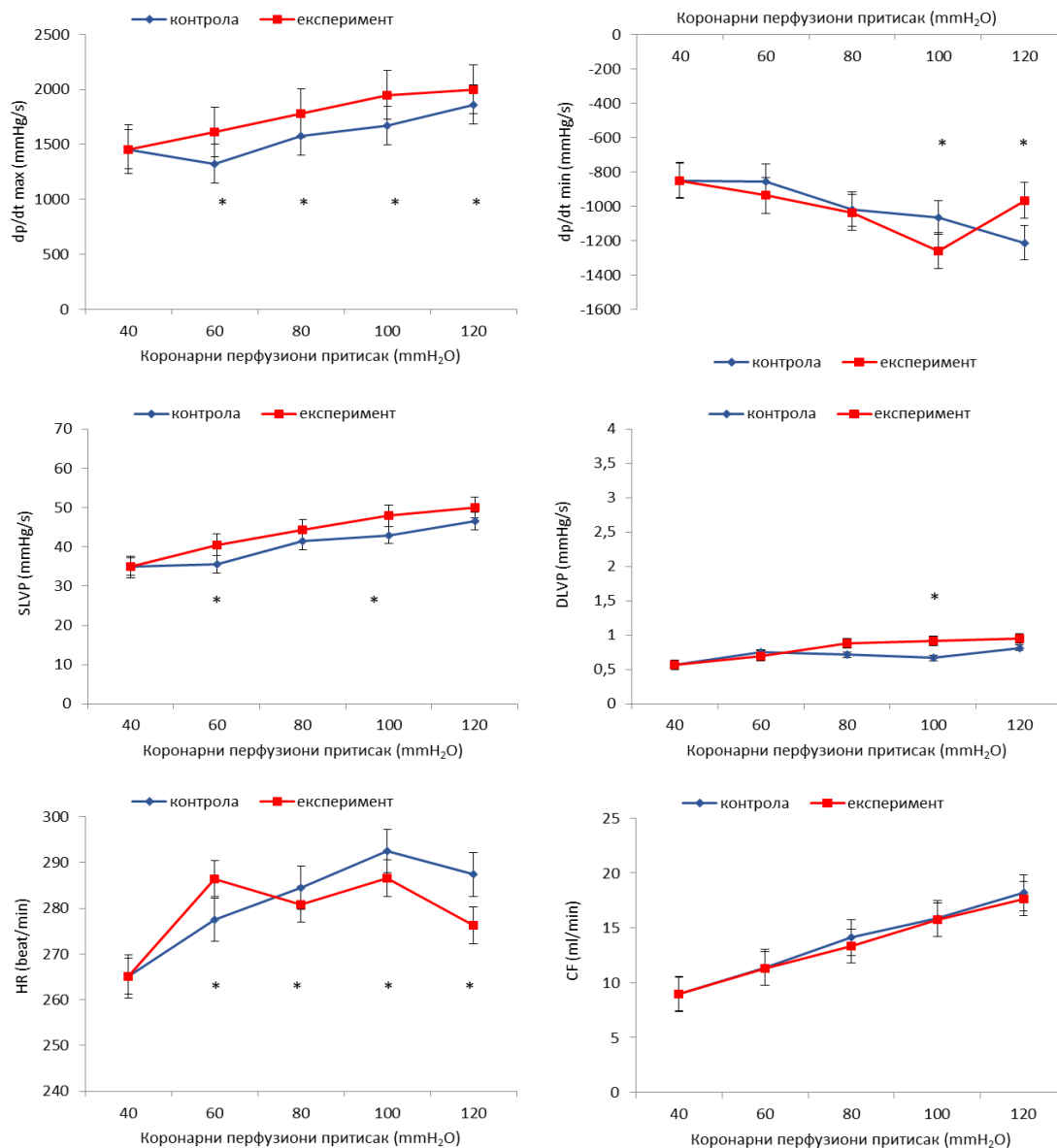
Примећена је статистички значајно повећање dp/dt max, dp/dt min, SLVP у експерименталном периоду у односу на контролни период при вишим коронарним перфузионим притисцима у опсегу од 60 до 120 cmH_2O . Вредности HR-а су значајно снижене при притиску од 80-120 cmH_2O док се параметри DLVP и коронарни проток нису значајно променили у експерименталном периоду у овој групи.



Графикон бр. 4- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи женки након суплементације ланеним уљем

Линолеинска масна киселина- група (мужјаци)

На Графикону бр. 5 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова мушког пола третираној линолеинском масном киселином. Примећена је статистички значајно повећање $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP у експерименталном периоду у односу на контролни период при вишим коронарним перфузионим притисцима у опсегу од 60 до 120 cmH_2O . Вредности SLVP су биле статистички значајно повишене при притисцима 60 и 80 cmH_2O , док је параметар DLVP био значајно повишен само при притиску од 100 cmH_2O . Вредности HR-а су значајно повишене при притиску од 60 cmH_2O и снижене при притиску од 80-120 cmH_2O док се коронарни проток није значајно променио у експерименталном периоду у овој групи.

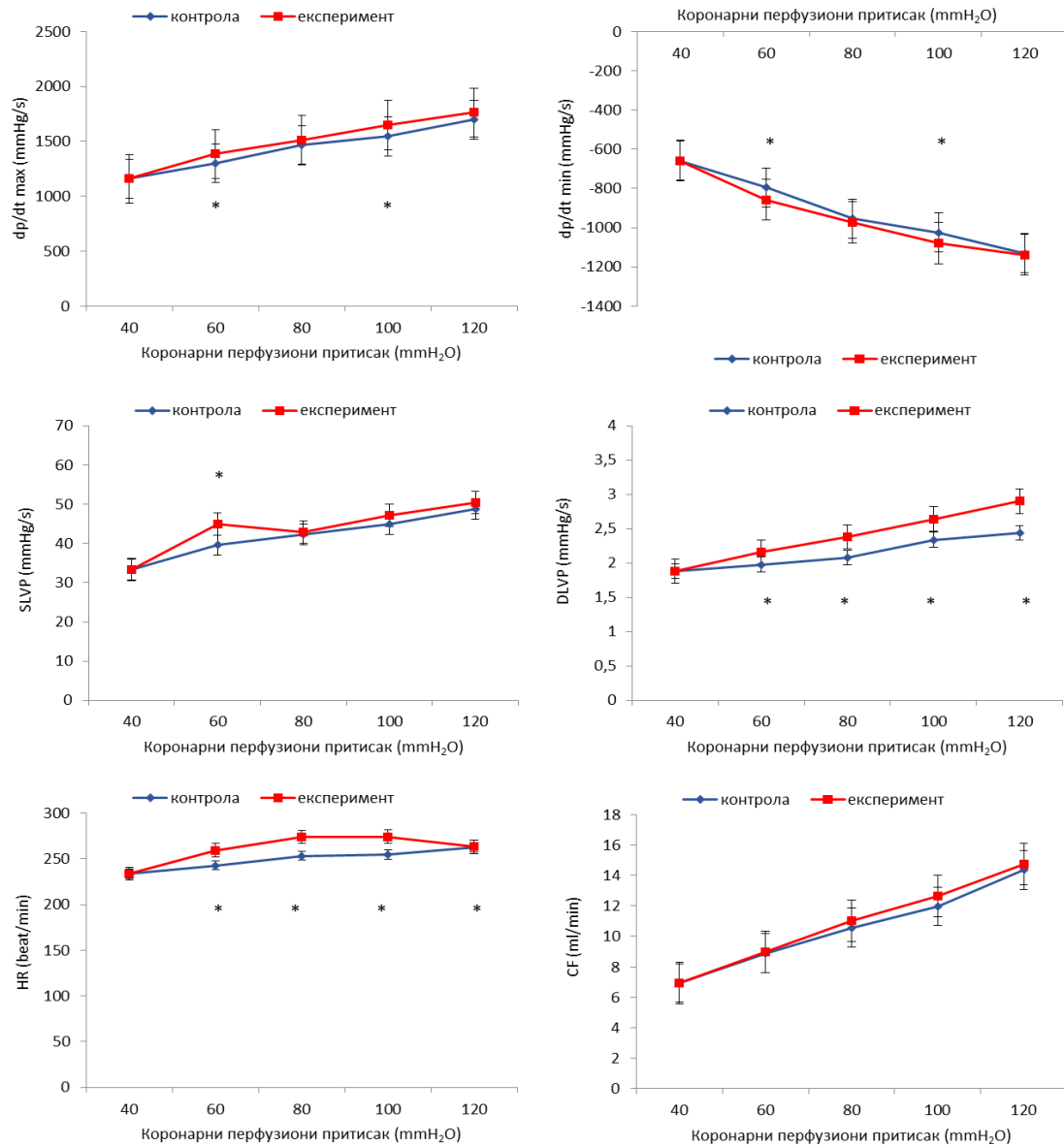


Графикон бр. 5- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи мужјака након суплементације линолеинском масном киселином

Линолеинска масна киселина- група (женке)

На Графикону бр. 6 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова женског пола третираној линолеинском масном киселином. Примећена је статистички значајно повећање dp/dt max, dp/dt min при притиску од 60 и 100 cmH₂O, и значајно повећање SLVP у експерименталном

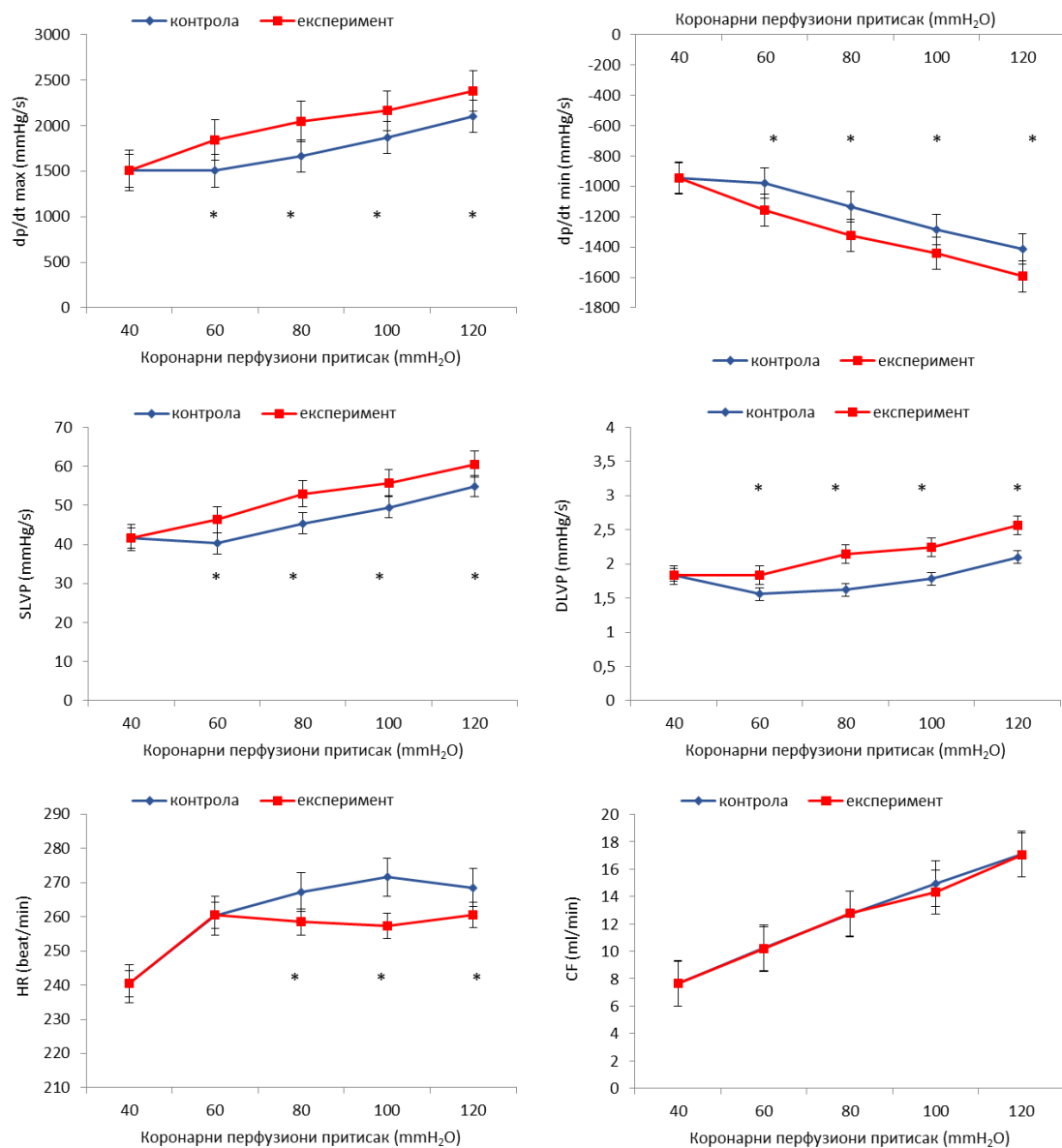
периоду у односу на контролни период само при коронарном перфузионом притиску од 60 cmH₂O. Вредности DLVP и HR-а су значајно повишене скоро при свим притисцима, од 80-120 cmH₂O, док се коронарни проток није значајно променио у експерименталном периоду у овој групи.



Графикон бр. 6- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи женки након суплементације линолеинском масном КИСЕЛИНОМ

Линолна масна киселина- група (мужјаци)

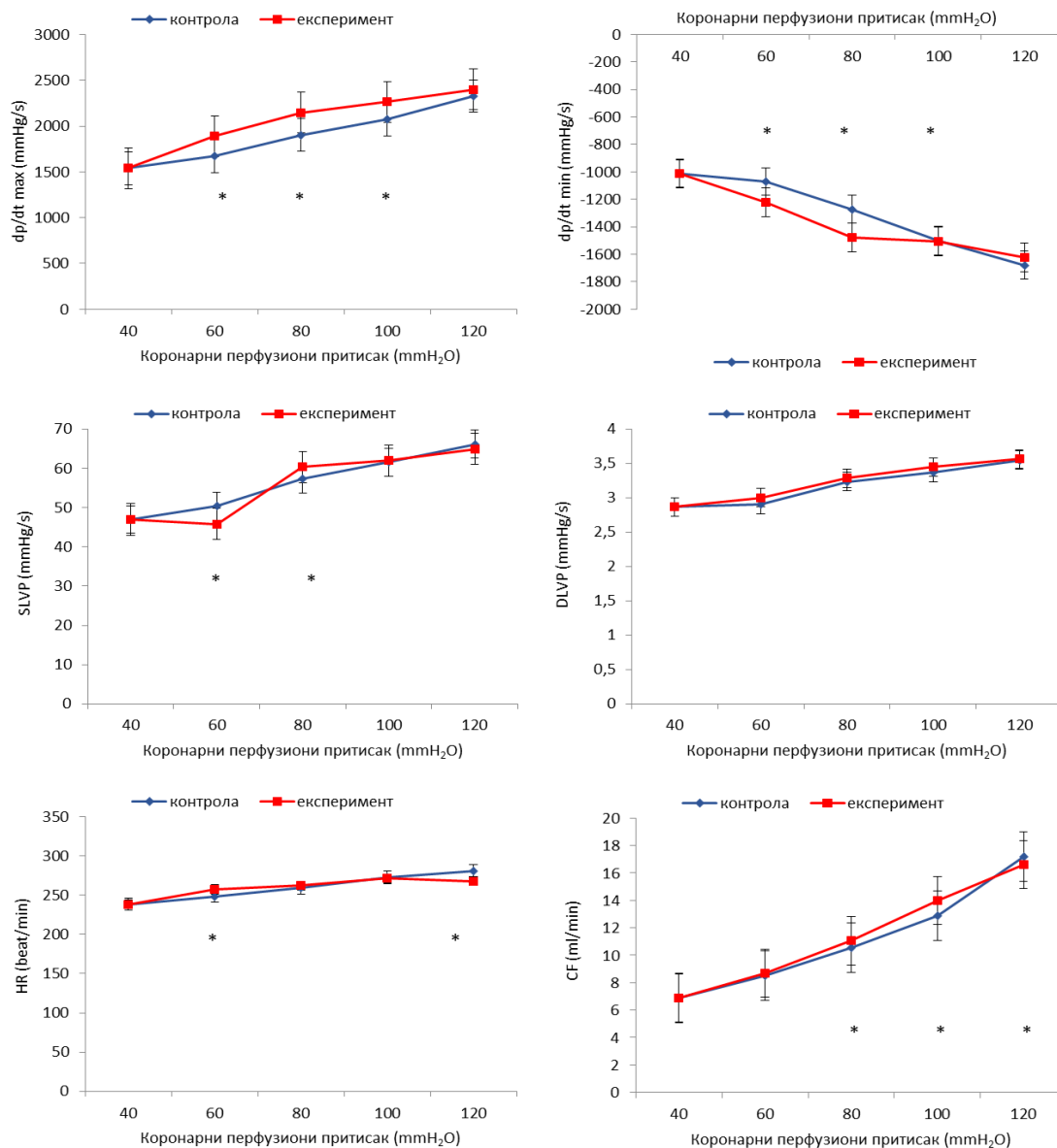
На Графикону бр. 7 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова мушког пола третираној линолном масном киселином. Примећена је статистички значајно повећање dp/dt max, dp/dt min, SLVP и DLVP скоро при свим притисцима (60-120 cmH_2O) у експерименталном периоду у односу на контролни период. Вредности и HR-а су значајно повишене при свим притисцима од 80-120 cmH_2O , док се коронарни проток није значајно променио у експерименталном периоду у овој групи.



Графикон бр. 7- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи мужјака након суплементације линолном масном киселином

Линолна масна киселина- група (женке)

На Графикону бр. 8 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова женског пола третираној линолном масном киселином. Примећена је статистички значајно повећање $dp/dt \max$, $dp/dt \min$ при притисцима од 60 до 100 cmH_2O у експерименталном периоду у односу на контролни период. SLVP је значајно снижен на притиску од 60 cmH_2O и повишен при притиску од 80 cmH_2O у експерименталном периоду у односу на контролни период, док је DLVP непромењен. Вредности и HR-а су значајно повишене на нижем притиску (60 cmH_2O) и повишен на вишем (120 cmH_2O), док је коронарни проток статистички значајно промењен при вишим свим притисцима, од 80-120 cmH_2O у овој групи.

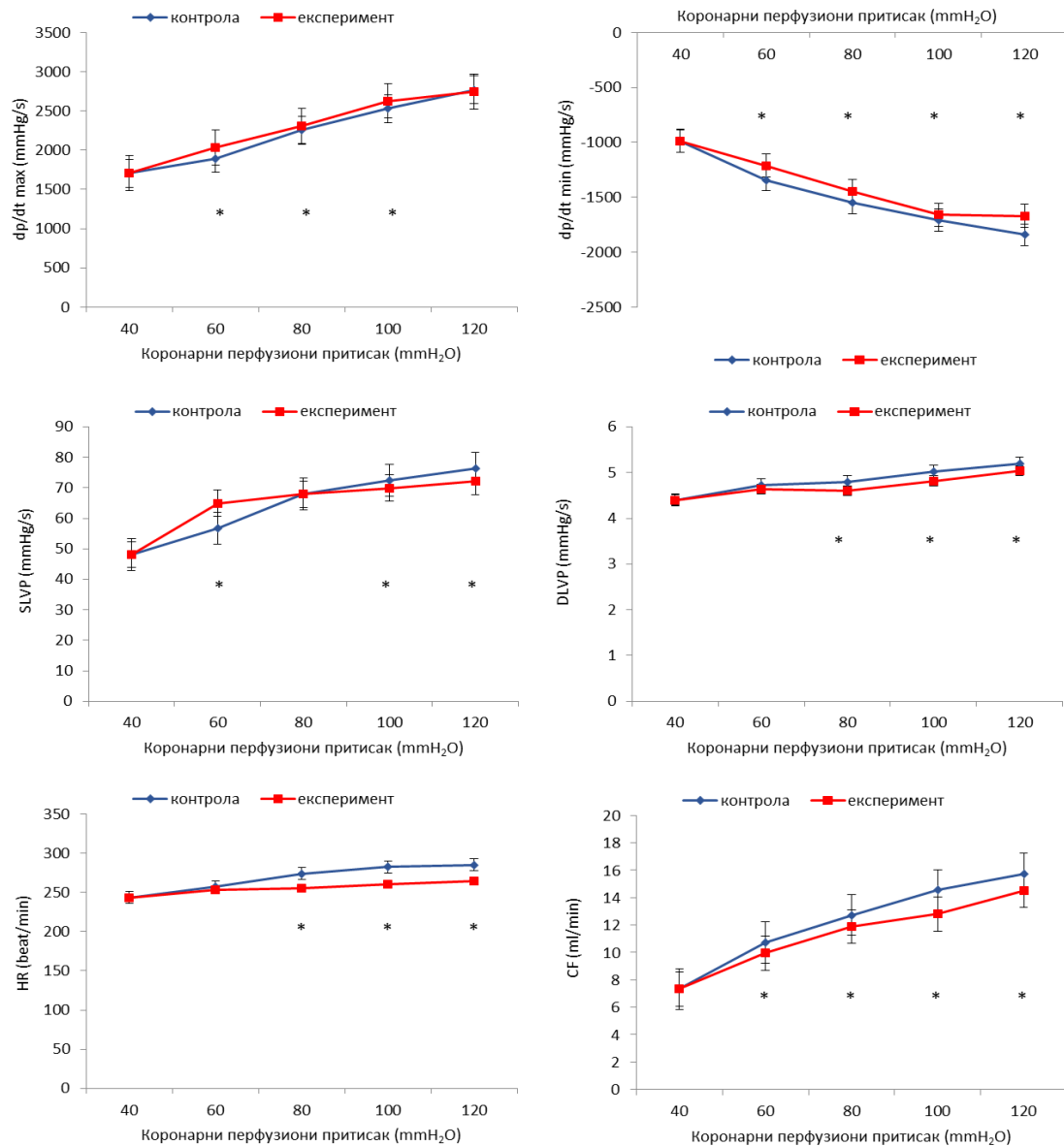


Графикон бр. 8- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи женки након суплементације линолном масном КИСЕЛИНОМ

Уље ноћурка- група (мужјаци)

На Графикону бр. 9 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова мушког пола третираној уљем ноћурка. Примећена је статистички значајно повећање $dp/dt \max$ при притиску од 60 до 100 cmH_2O , и повећање $dp/dt \min$ при притиску од 60 до 120 cmH_2O у експерименталном периоду у односу на контролни период. SLVP је био значајно снижен у

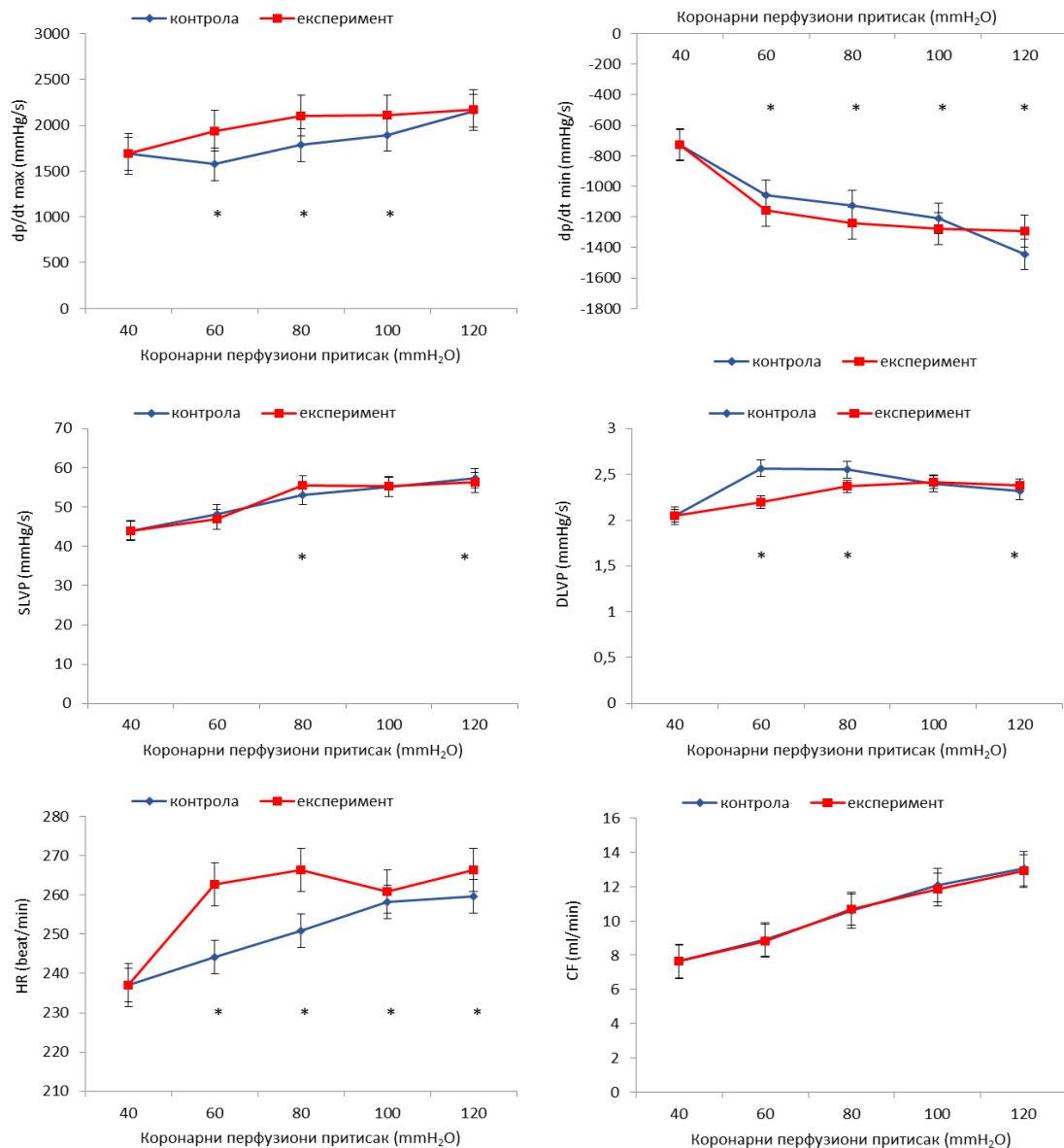
експерименталном периоду при притиску од 60 cmH₂O и снижен при притиску од 100 и 120 cmH₂O. DLVP је био значајно снижен при вишим притисцима од 80-120 cmH₂O, као и срчана фреквенца у овој групи животиња. Вредности коронарног протока су значајно снижене скоро при свим притисцима, од 60-120 cmH₂O у експерименталном периоду у овој групи.



Графикон бр. 9- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи мужјака након суплементације уљем ноћурка

Уље ноћурка- група (женке)

На Графикону бр. 10 приказане су средње вредности испитиваних кардиодинамских параметара у групи пацова женског пола третираној уљем ноћурка. Примећена је статистички значајно повећање dp/dt max при притиску од 60 до 100 cmH_2O , и dp/dt min при притиску од 60 до 120 cmH_2O . Значајно повећање SLVP-а примећено је само при притисцима од 80 и 120 cmH_2O у експерименталном периоду у односу на контролни период, а DLVP-а при коронарном перфузионом притиску од 60, 80 и 120 cmH_2O . Вредности и HR-а су значајно доминантно повишене скоро при свим притисцима, од 80-120 cmH_2O , док се коронарни проток није значајно променио у експерименталном периоду у овој групи.

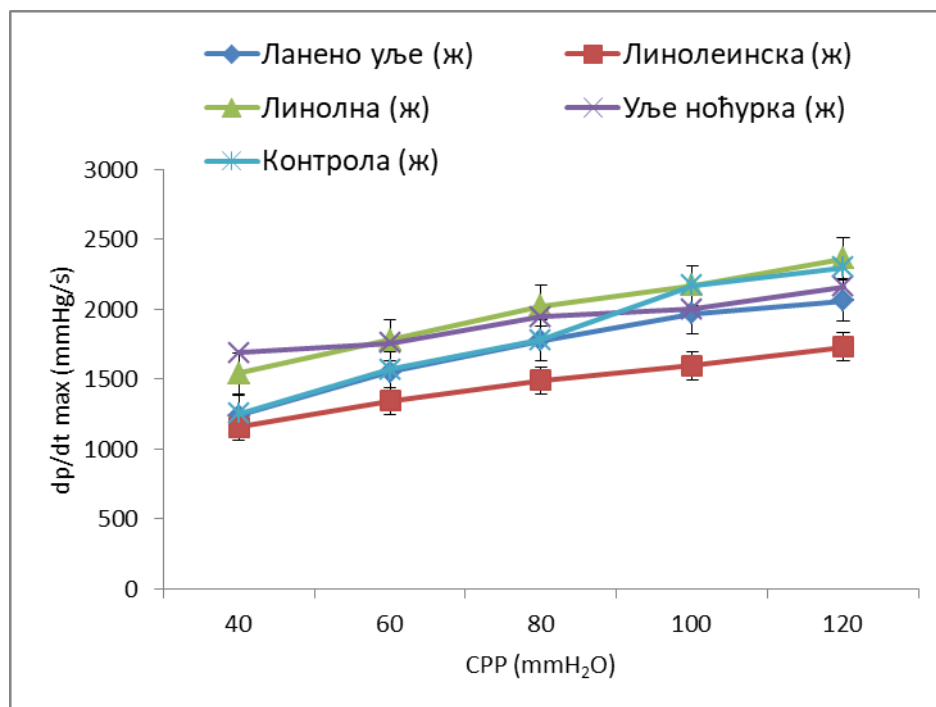


Графикон бр. 10- Промене кардиодинамских параметара изолованог срца пацова методом по Лангендорфу у групи женки након суплементације уљем ноћурка

4.2. ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА КАРДИОДИНАМСКЕ ПАРАМЕТРЕ (ПОРЕЂЕЊЕ ГРУПА)

У овом делу истраживања посебан акценат смо ставили на испитивање утицаја омега 3 и омега-6 масних киселина на функционалне параметре миокарда у односу на пол. Параметре кардиодинамике као што су $dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP, HR, CF посматрали смо одвојено и поређењем експерименталних група са контролним групама, као и поређењем ефеката различите суплементације на кардиодинамске параметре добили смо следеће резултате.

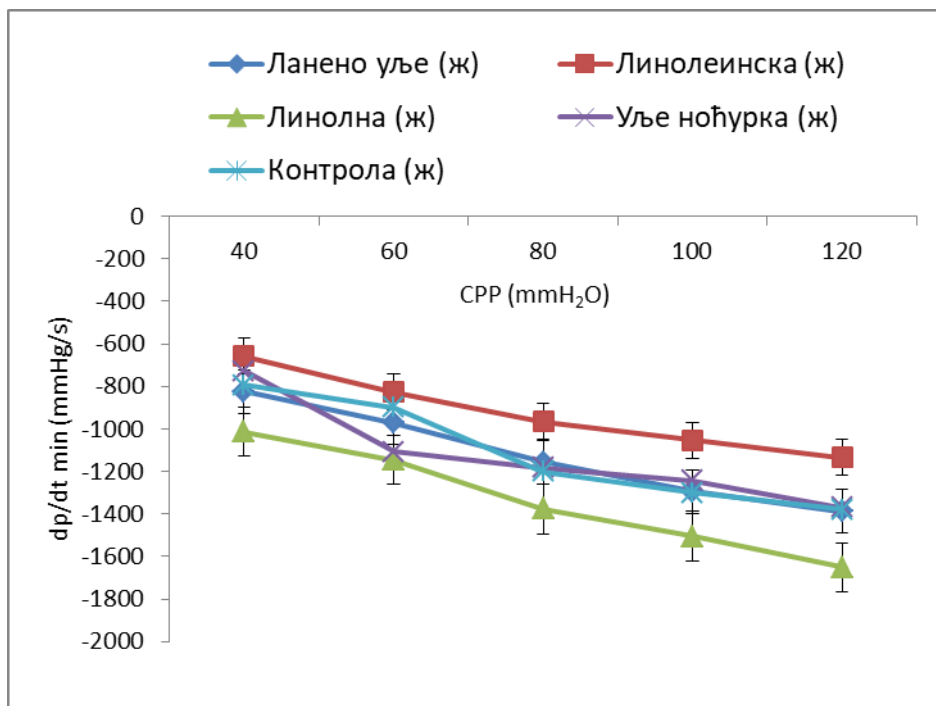
4.2.1. Ефекат омега-3 и омега-6 масних киселина на кардиодинамске параметре код пацова женског пола



Графикон бр. 11. Максимална стопа раста притиска у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова женског пола

Dp/dt max (mmHg)					
СРР	40	60	80	100	120
Контрола (ж)	1255,23±100,23	1571,21±151,23	1780,25±125,65	2170,21±200,23	2300,14±187,96
Ланено уље (ж)*	1240,10±129,23	1551±291,71	1776,33±356,90	1967,80±274,85	2059,64±265,78
Линолеинска киселина (ж)*	1158,14± 61,01	1342,74±32,61	1489,34±72,72	1596,92±46,64	1729,84±45,64
Линолна киселина (ж)§	1539,78±123,87	1778,50±154,88	2023,49±170,99	2167,97±134,21	2362,35±50,79
Уље ноћурка (ж)§	1687,20±155,58	1755,84±225,67	1944,99±151,78	2001,74±9,84	2162,51±255,70

Табела бр. 7. Приказ вредности максималне стопе раста притиска у левој комори у контролној групи пацова женског пола и експерименталним групама женског пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

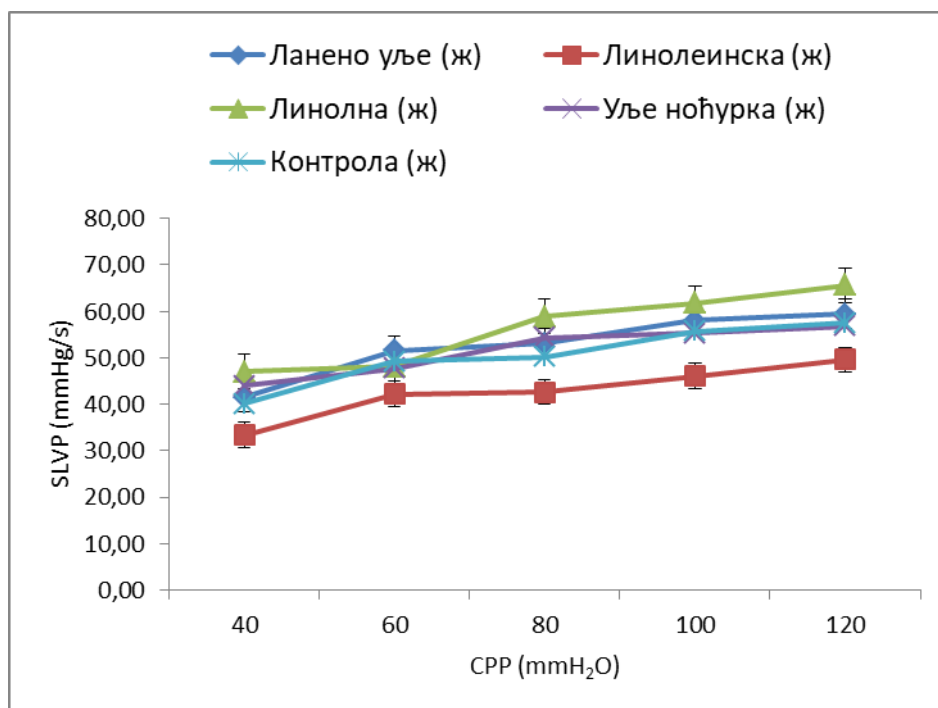


Графикон бр. 12. Минимална стопа раста притиска у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова женског пола

Dp/dt min (mmHg)					
CPP	40	60	80	100	120
Контрола (ж)	-795,25±65,23	-900,23±14,25	-1200,25±56,85	-1300,28±75,69	-1380,47±55,45
Ланено уље (ж)§	-823,35±74,51	-972,37±18,25	-1155,54±35,25	-1295,65±54,55	-1387,03±35,28
Линоеинска киселина (ж)*	-658,18±25,32	-826,38±78,98	-964,32±25,65	-1051,74±49,78	-1135,27±25,65
Лиолна киселина (ж)§	-1012,82±25,87	-1145,44±52,74	-1376,46±25,65	-1503,97±24,87	-1651,39±24,63
Уље ноћурка (ж)	-726,17±18,21	-1107,15±32,98	-1183,28±64,12	-1244,43±59,99	-1370,16±46,50

Табела бр. 8. Приказ вредности минималне стопе раста притиска у левој комори у контролној групи пацова женског пола и експерименталним групама женског пола.

Резултати су приказани у виду средњих вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

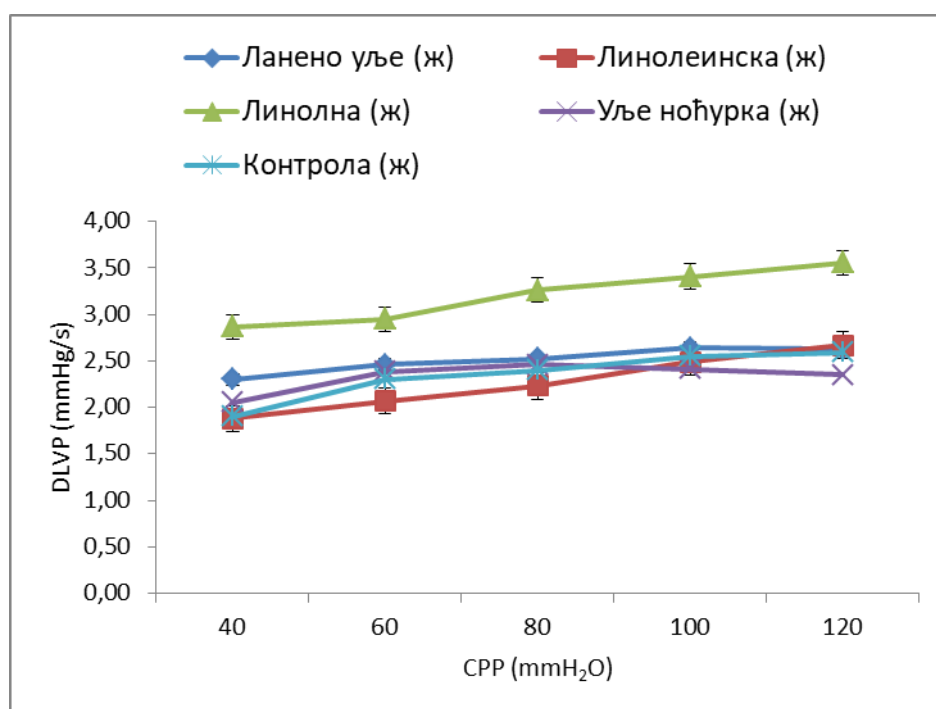


Графикон бр. 13. Систолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова женског пола

SLVP (mmHg)					
CPP	40	60	80	100	120
Контрола (ж)	40,12±6,23	49,25±3,21	50,12±4,52	55,62±3,56	57,42±7,23
Ланено уље (ж)	41,48±5,59	51,53±3,71	53,03±5,26	58,05±2,36	59,48±2,54
Линоеинска киселина (ж)*	33,34±2,56	42,23±2,56	42,62±4,23	46,03±2,56	49,58±3,96
Лиолна	46,98±3,65	48,07±5,25	58,83±2,56	61,75±2,65	65,58±2,54

киселина (ж)§					
Уље ноћурка (ж)§	44,00±4,21	47,63±4,21	54,26±1,28	55,23±2,89	56,85±2,22

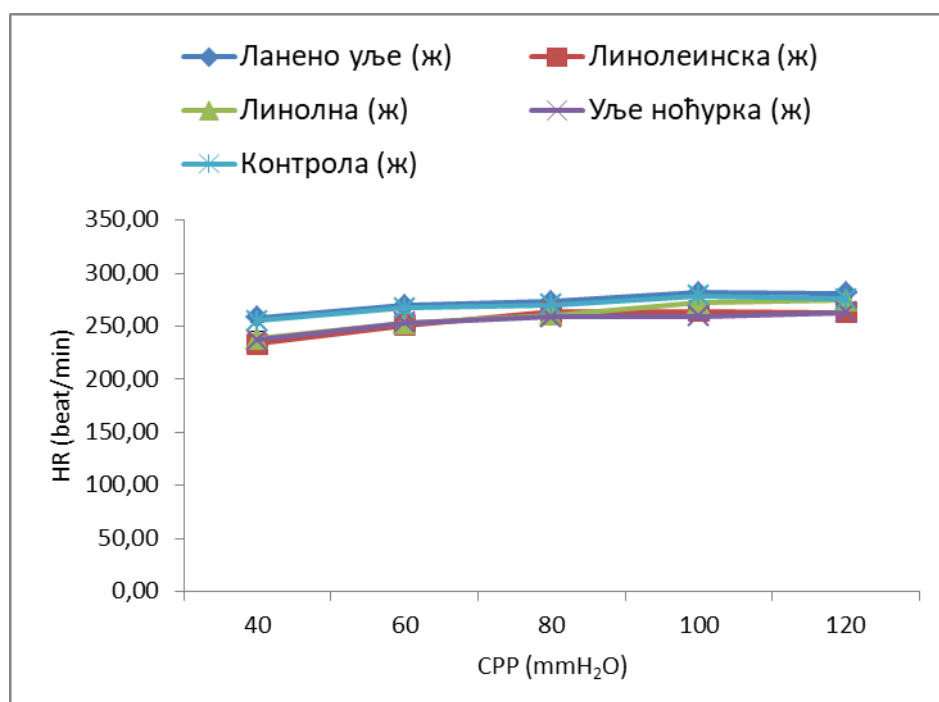
Табела бр. 9. Приказ вредности систолног притиска у левој комори у контролној групи пацова женског пола и експерименталним групама женског пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу



Графикон бр. 14. Дијастолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова женског пола

DLVP (mmHg)					
СРР	40	60	80	100	120
Контрола (ж)	1,91±0,02	2,32±0,04	2,41±0,01	2,55±0,03	2,59±0,04
Ланено уље (ж)§	2,30±0,01	2,46±0,04	2,53±0,02	2,64±0,04	2,63±0,04
Линолеинска киселина (ж)	1,88±0,03	2,07±0,01	2,23±0,01	2,49±0,01	2,67±0,05
Линолна киселина (ж)§	2,87±0,07	2,95±0,01	3,26±0,01	3,41±0,01	3,56±0,01
Уље ноћурка (ж)§	2,05±0,05	2,38±0,02	2,46±0,03	2,41±0,02	2,35±0,01

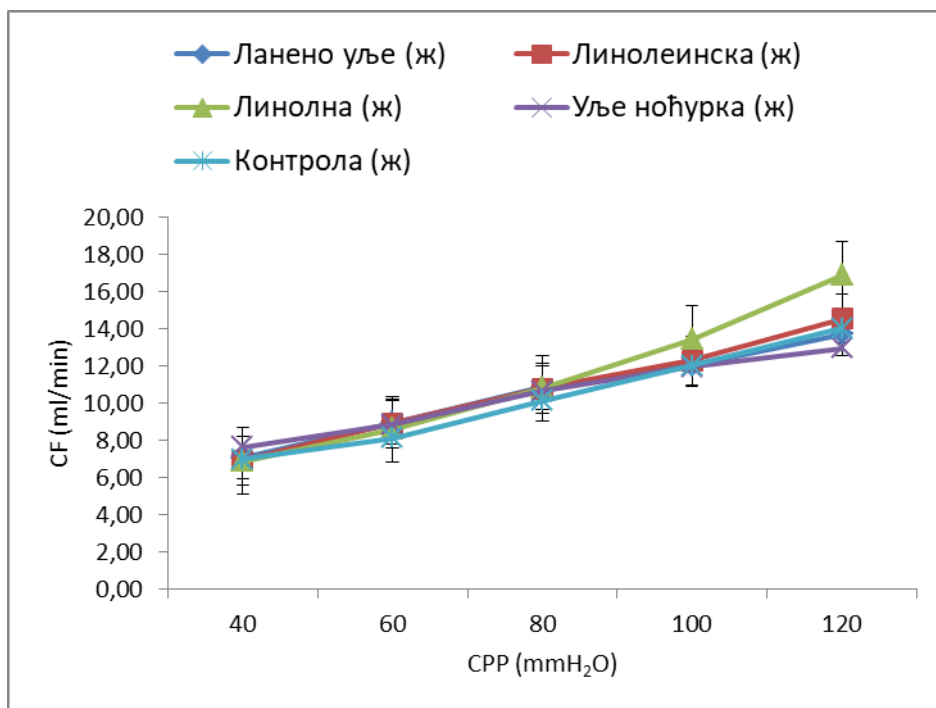
Табела бр. 10. Приказ вредности дијастолног притиска у левој комори у контролној групи пацова женског пола и експерименталним групама женског пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу



Графикон бр. 15. Фреквенца срца у контролним и експерименталним групама пацова женског пола

HR (beat/min)					
СРР	40	60	80	100	120
Контрола (ж)	255,12±12,23	267,12±14,25	270,12±14,26	278,81±25,25	275,51±14,57
Ланено уље (ж)	258,17±13,23	269,39±13,25	273,41±13,12	281,68±21,12	281,23±11,78
Линолеинска киселина (ж)*	233,64±14,25	250,83±25,24	263,41±11,23	264,26±12,23	262,76±12,25
Линолна киселина (ж)*	238,30±15,21	252,83±21,14	260,55±11,58	271,85±25,11	274,38±36,55
Уље ноћурка (ж)*	237,08±22,01	253,46±14,12	258,64±11,25	259,60±11,09	262,98±10,04

Табела бр. 11. Приказ вредности фреквенце срца у контролној групи пацова женског пола и експерименталним групама женског пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

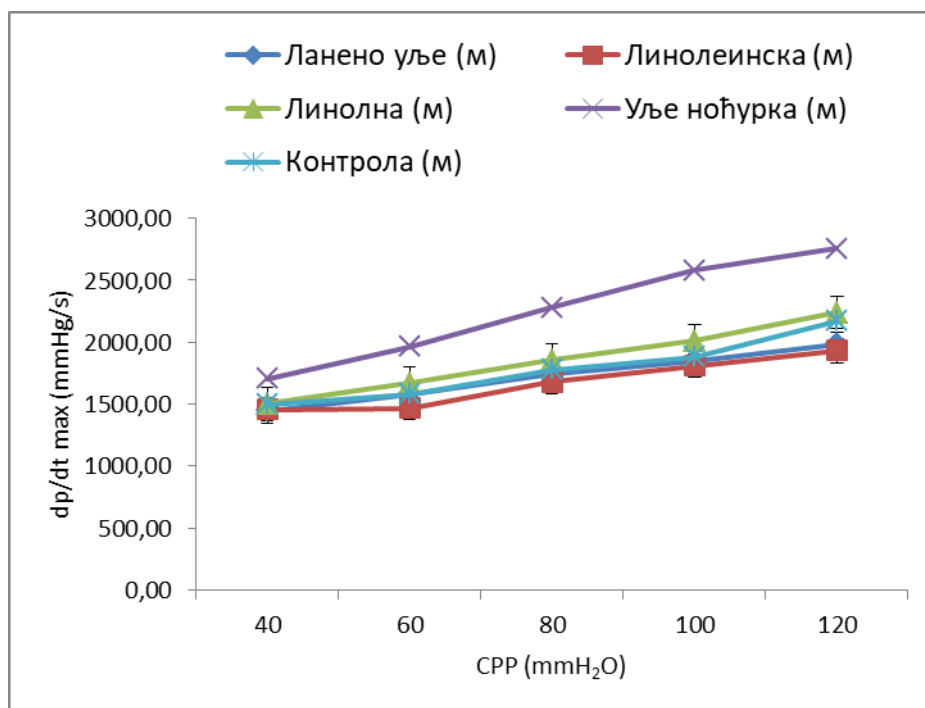


Графикон бр. 16. Фреквенца срца у контролним и експерименталним групама пацова женског пола

CF (ml/min)					
CPP	40	60	80	100	120
Контрола (ж)	6,98±0,01	8,12±0,02	10,12±0,03	12,03±0,04	14,02±0,04
Ланено уље (ж)	7,07±0,04	8,95±0,03	10,85±0,01	12,03±0,01	13,72±0,01
Лиолеинска киселина (ж)	6,92±0,01	8,93±0,04	10,79±0,02	12,30±0,01	14,54±0,01
Лиолна киселина (ж)	6,90±0,01	8,60±0,01	10,81±0,04	13,45±0,02	16,90±0,02
Уље ноћурка (ж)§	7,63±0,02	8,86±0,01	10,63±0,01	11,95±0,04	12,97±0,04

Табела бр. 12. Приказ вредности коронарног протока у контролној групи пацова женског пола и експерименталним групама женског пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

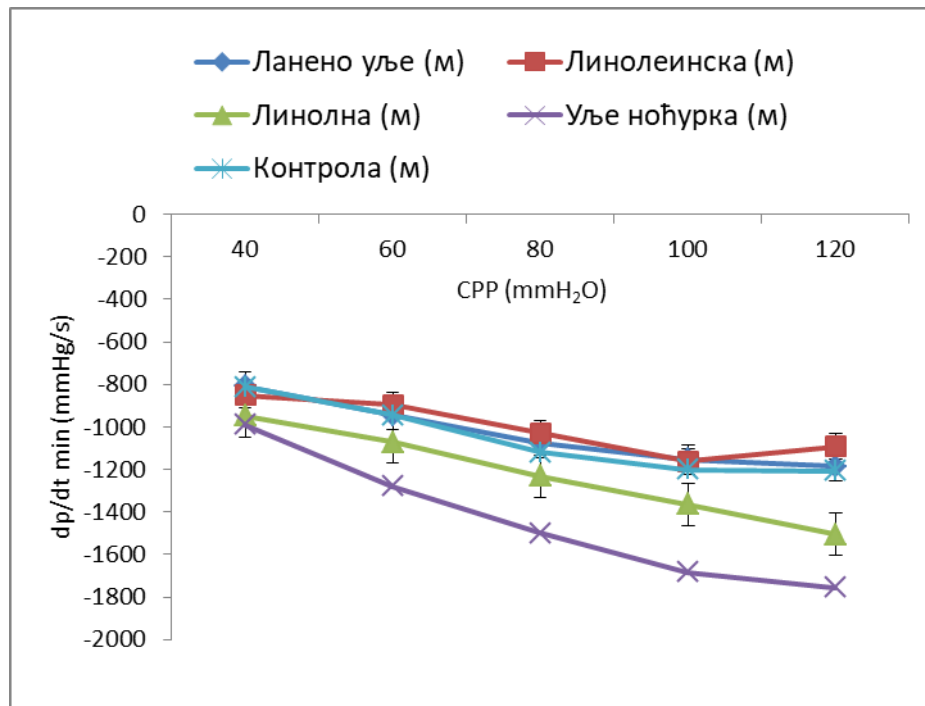
4.2.2. Ефекат омега-3 и омега-6 масних киселина на кардиодинамске параметре код пацова мушког пола



Графикон бр. 17. Максимална стопа раста притиска у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова мушког пола

Dp/dt max (mmHg)					
СРР	40	60	80	100	120
Контрола (м)	1500,12±165,25	1580,91±154,12	1780,51±123,65	1880,52±248,98	2170,21±225,69
Ланено уље (м)*	1445,23±291,85	1578,98±276,41	1741,33±274,00	1850,83±260,47	1982,40±275,85
Линолеинска киселина (м)*	1455,10±195,25	1467,83±204,48	1681,00±143,94	1809,13±196,25	1930,46±99,55
Линолна киселина (м)§	1502,90±124,45	1670,36±235,95	1855,19±266,40	2013,00±208,26	2238,20±192,87
Уље ноћурка (м)§	1707,30±98,84	1962,67±40,22	2280,96±40,22	2578,58±69,72	2755,32±17,42

Табела бр. 13. Приказ вредности максималне стопе раста притиска у левој комори у контролној групи пацова мушког пола и експерименталним групама мушког пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

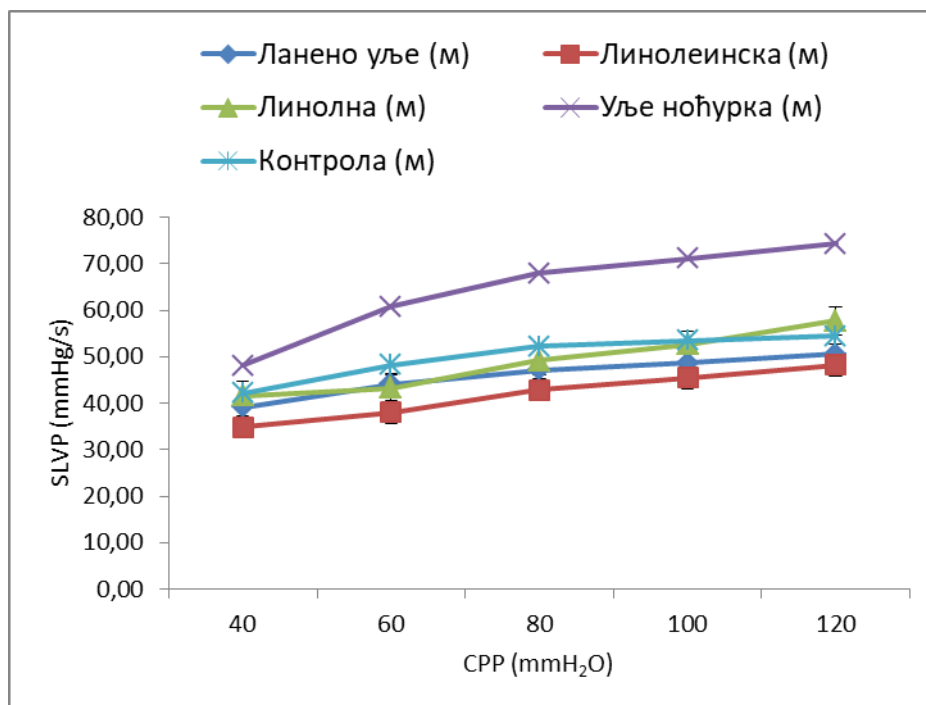


Графикон бр. 18. Минимална стопа раста притиска у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова мушког пола

Dp/dt min (mmHg)					
CPP	40	60	80	100	120
Контрола (м)	-812,21±26,96	-945,52±25,69	-1120,21±65,87	-1200,21±55,69	-1205,52±85,98
Ланено уље (м)	-809,65±27,32	-945,48±35,65	-1076,10±25,36	-1151,78±25,36	-1185,93±65,45
Лиолеинска киселина (м)	-851,38±25,89	-895,28±27,23	-1027,92±24,32	-1162,84±74,36	-1090,87±25,63
Лиолна киселина (м)§	-946,74±31,25	-1070,16±27,98	-1231,29±57,98	-1363,32±25,65	-1504,98±65,89
Уље ноћурка (м)§	-988,94±24,20	-1279,08±12,25	-1498,31±75,26	-1684,23±54,69	-1756,51±78,96

Табела бр. 14. Приказ вредности минималне стопе раста притиска у левој комори у контролној групи пацова мушког пола и експерименталним групама мушког пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација (X±SD), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу

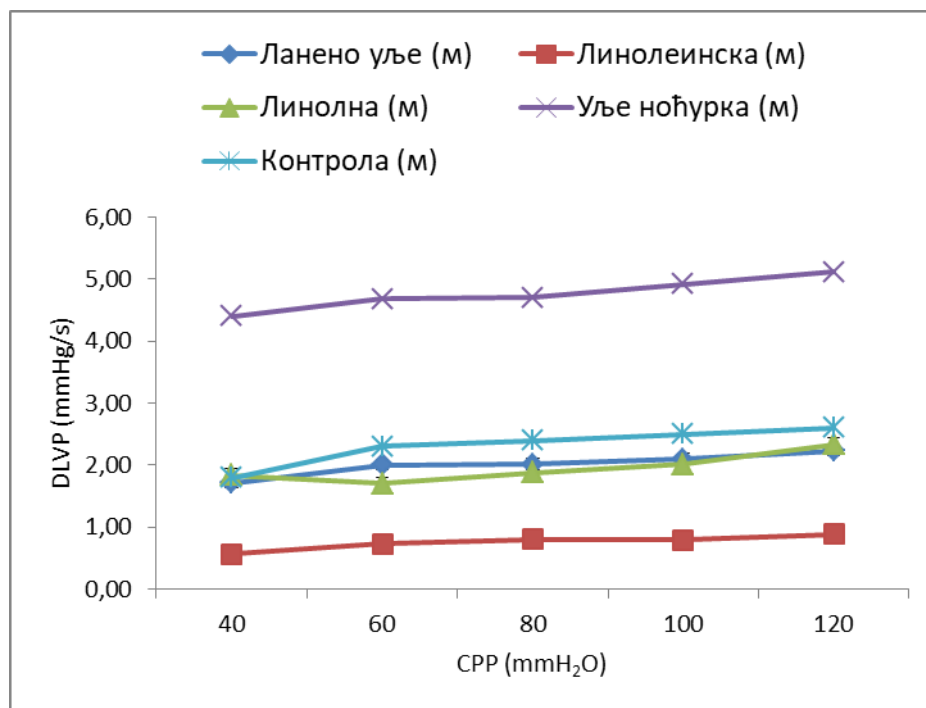
на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу



Графикон бр. 19. Систолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова мушког пола

SLVP (mmHg)					
CPP	40	60	80	100	120
Контрола (м)	42,11±2,31	48,22±2,65	52,31±3,65	53,51±5,24	54,50±6,21
Ланено уље (м)	39,10±2,25	44,08±2,25	47,13±2,65	48,64±6,24	50,59±5,25
Лиолеинска киселина (м)*	34,88±1,26	38,04±2,22	42,90±2,56	45,46±4,26	48,29±4,26
Лиолна киселина (м)	41,66±4,15	43,28±2,89	49,16±6,87	52,63±5,21	57,74±6,25
Уље ноћурка (м)§	48,12±3,75	60,77±4,18	67,91±5,23	71,19±3,87	74,26±4,23

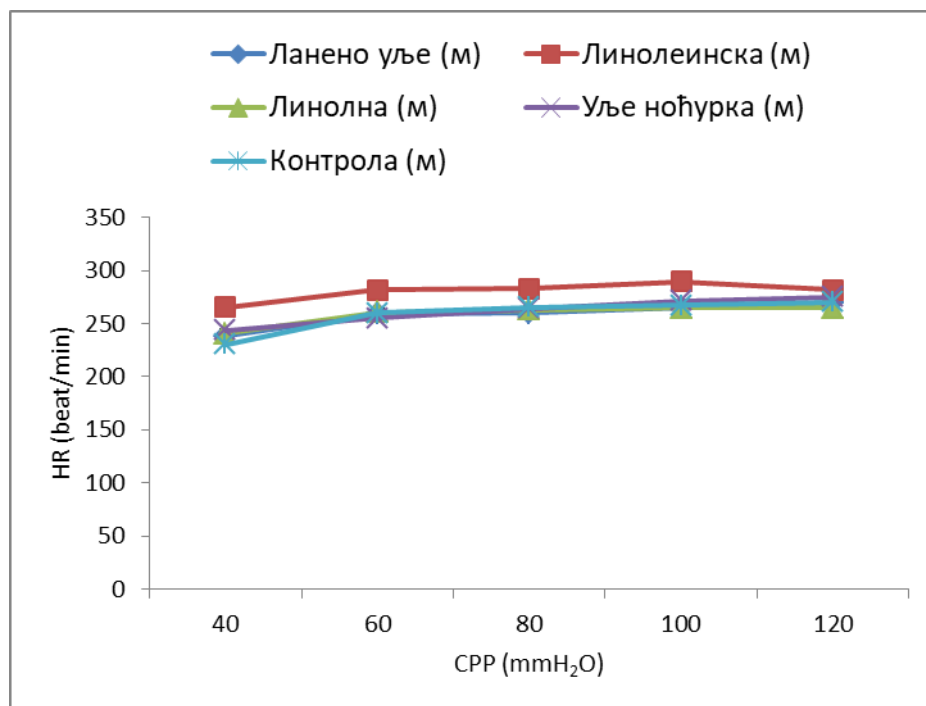
Табела бр. 15. Приказ вредности систолног притиска у левој комори у контролној групи пацова мушког пола и експерименталним групама мушког пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу



Графикон бр. 20. Дијастолни притисак у левој комори у контролним и експерименталним групама пацова мушког пола

DLVP (mmHg)					
СРР	40	60	80	100	120
Контрола (м)	1,81±0,03	2,33±0,04	2,41±0,01	2,51±0,01	2,62±0,04
Ланено уље (м)*	1,72±0,01	2,00±0,02	2,02±0,01	2,10±0,01	2,23±0,03
Линолеинска киселина (м)*	0,57±0,01	0,73±0,02	0,80±0,02	0,79±0,01	0,88±0,04
Линолна киселина (м)§	1,84±0,04	1,7±0,01	1,88±0,03	2,01±0,02	2,33±0,05
Уље ноћурка (м)§	4,4±0,02	4,68±0,01	4,7±0,01	4,92±0,03	5,12±0,06

Табела бр. 16. Приказ вредности дијастолног притиска у левој комори у контролној групи пацова мушког пола и експерименталним групама мушког пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

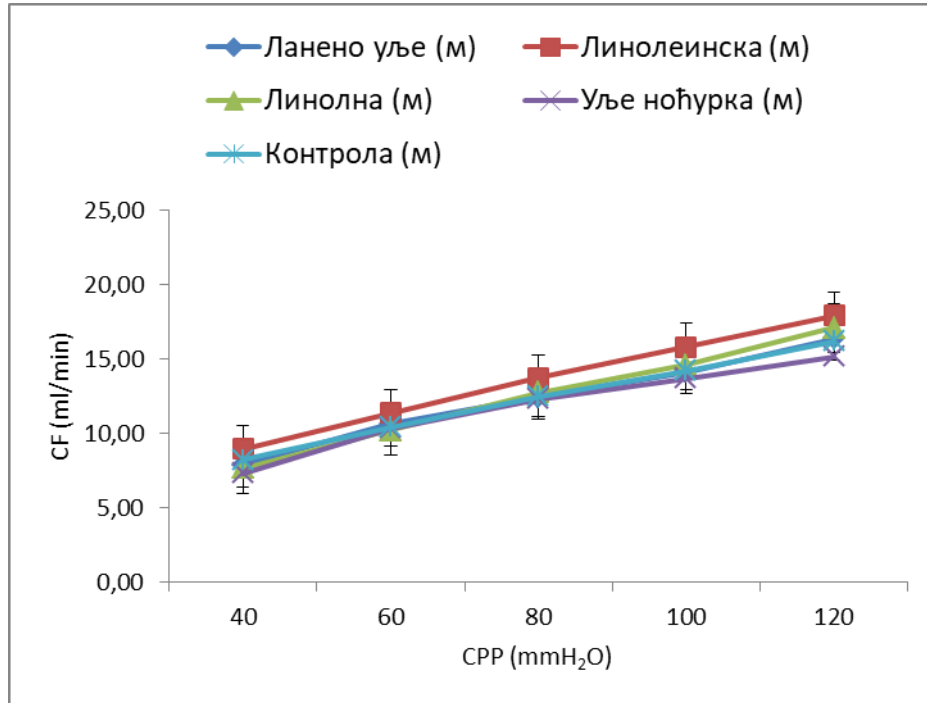


Графикон бр. 21. Фреквенца срца у контролним и експерименталним групама пацова мушког пола

HR (beat/min)					
CPP	40	60	80	100	120
Контрола (м)	230,10±12,14	260,20±9,25	265,20±14,57	267,20±14,23	270,20±11,23
Ланено уље (м)§	238,25±14,25	259,30±10,14	259,90±11,25	264,91±15,61	269,88±14,25
Линоеинска киселина (м)§	265,15±11,02	281,93±11,25	282,67±17,12	289,53±11,44	281,78±13,25
Лиолна киселина (м)§	240,42±14,21	260,41±11,26	262,83±21,03	264,48±12,96	264,53±14,25
Уље ноћурка (м)§	243,44±15,14	254,80±10,17	264,45±11,07	271,54±14,25	274,76±18,12

Табела бр. 17. Приказ вредности фреквенце срца у контролној групи пацова мушког пола и експерименталним групама мушког пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља

статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу



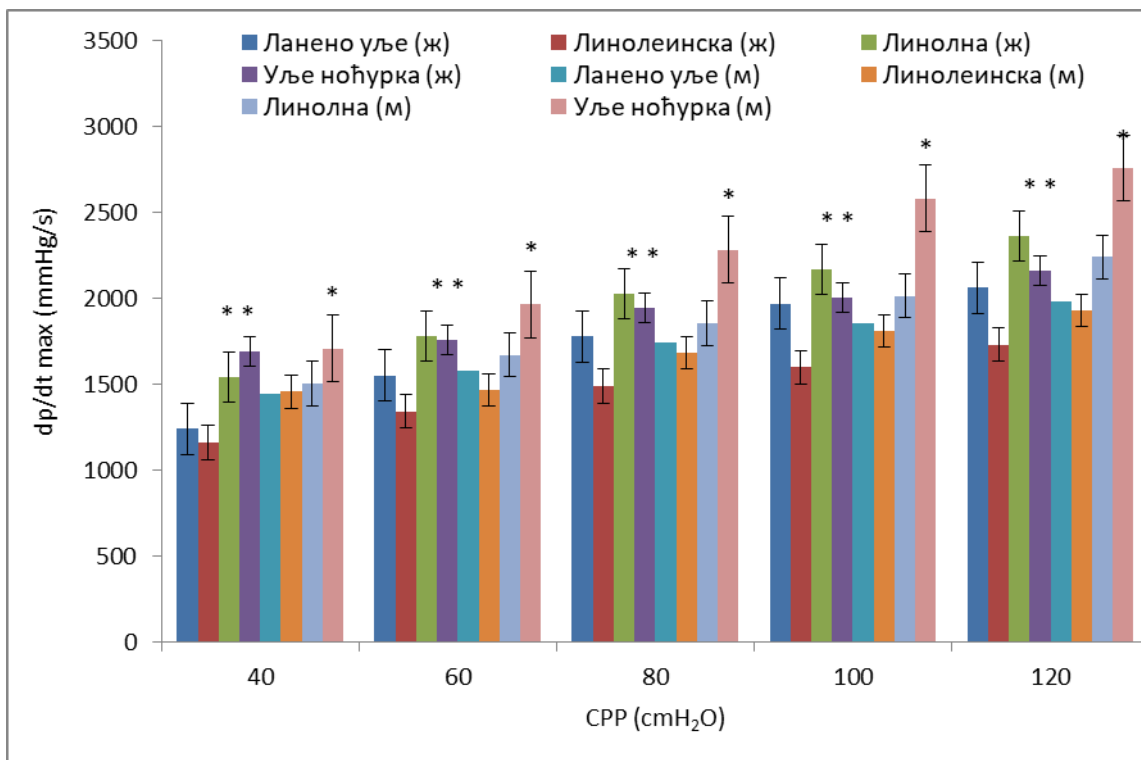
Графикон бр. 22. Коронарни проток у контролним и експерименталним групама пацова мушког пола

CF (ml/min)					
СРР	40	60	80	100	120
Контрола (м)	8,21±0,01	10,42±0,04	12,55±0,04	14,21±0,07	16,21±0,04
Ланено уље (м)*	7,87±0,03	10,61±0,02	12,44±0,01	14,12±0,01	16,38±0,01
Линолеинска киселина (м)§	8,97±0,01	11,35±0,02	13,73±0,04	15,80±0,02	17,93±0,02
Линолна киселина (м)*	7,64±0,01	10,21±0,04	12,75±0,01	14,62±0,01	17,08±0,02
Уље ноћурка (м)*	7,32±0,04	10,33±0,04	12,30±0,04	13,68±0,01	15,14±0,03

Табела бр. 18. Приказ вредности коронарног протока у контролној групи пацова мушког пола и експерименталним групама мушког пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

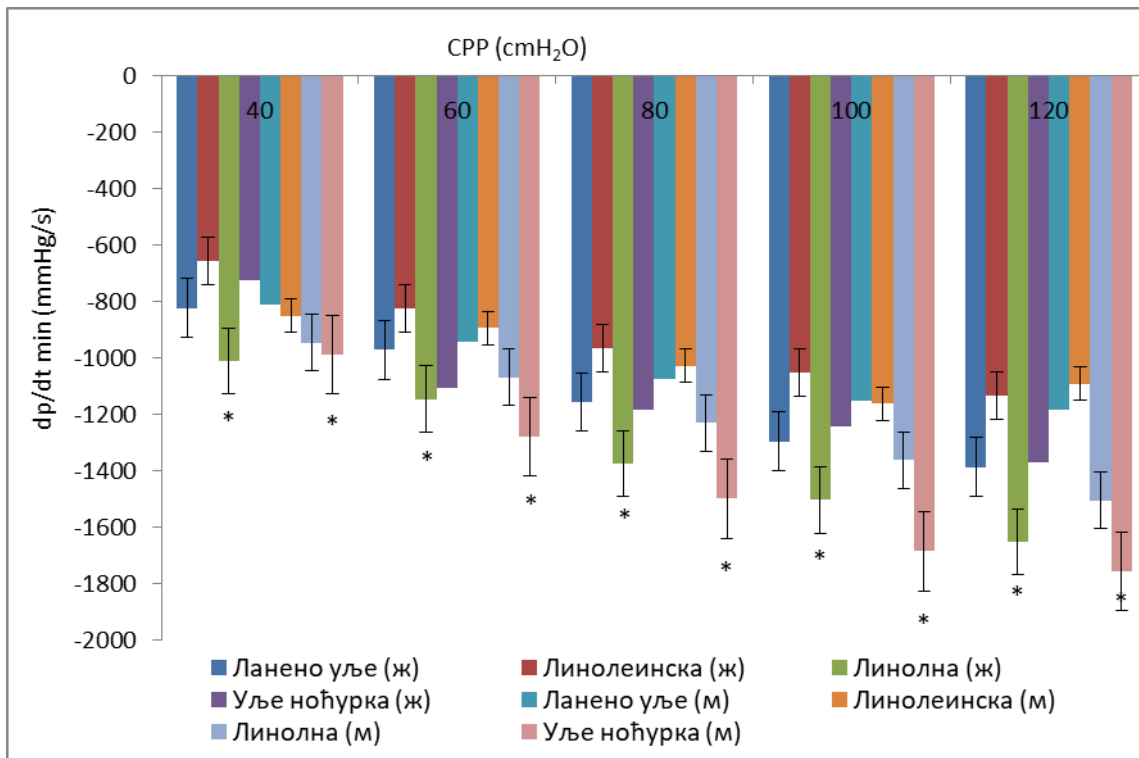
4.2.3. Поређење кардиодинамских параметара између експерименталних група

На Графикону бр 23. приказане су вредности параметра максималне стопе раста притиска у левој комори изолованог срца пацова. Примећено је статистички значајно повећање овог параметра у групи мужјака пацова након суплементације уљем ноћурка у односу остале групе на свим перфузионим притисцима, као мање али значајно повећање у групама женки пацова након суплементације уљем ноћурка и линолне масне киселине на свим перфузионим притисцима.



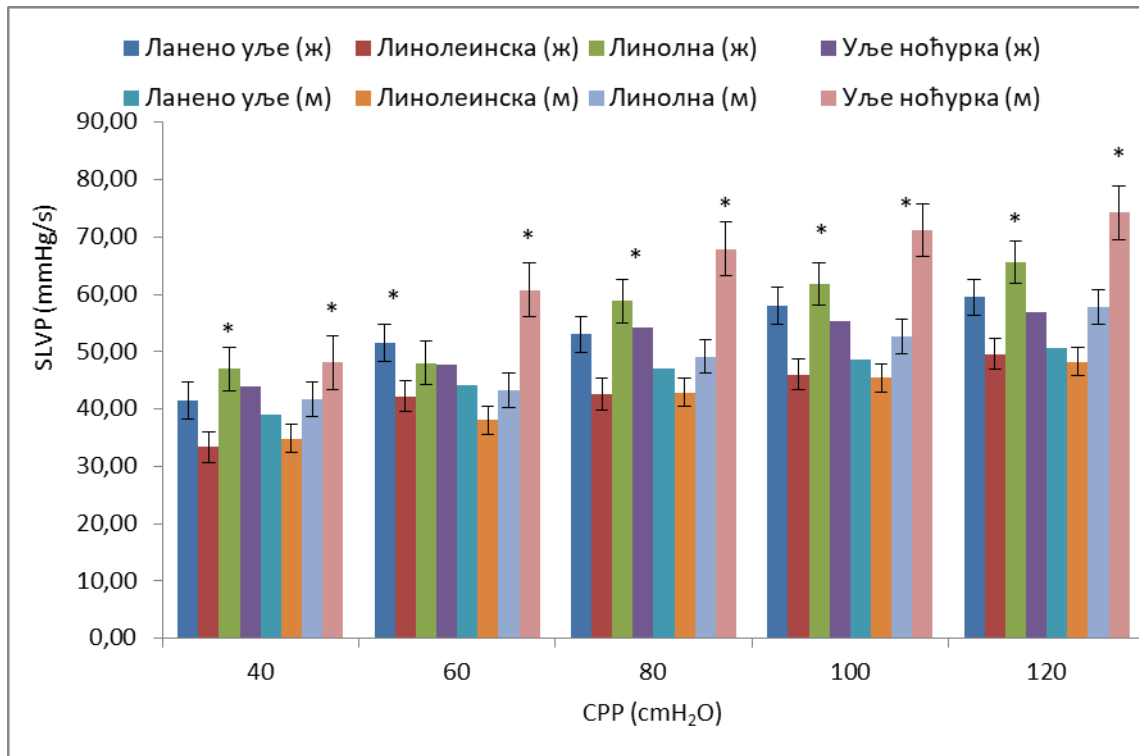
Графикон бр. 23. Dp/dt max у експерименталним групама пацова женског и мушког пола. Знак * представља статистички значајну разлику ($p < 0,05$) у односу на остале групе

На Графикону бр 24. приказане су вредности параметра минималне стопе раста притиска у левој комори изолованог срца пацова. Примећено је статистички значајно повећање овог параметра у групи мужјака пацова након суплементације уљем ноћурка и линолне масне киселине у групи женски у односу остале групе на свим перфузионим притисцима.



Графикон бр. 24. $dp/dt \min$ у експерименталним групама пацова женског и мушког пола. Знак * представља статистички значајну разлику ($p < 0,05$) у односу на остале групе

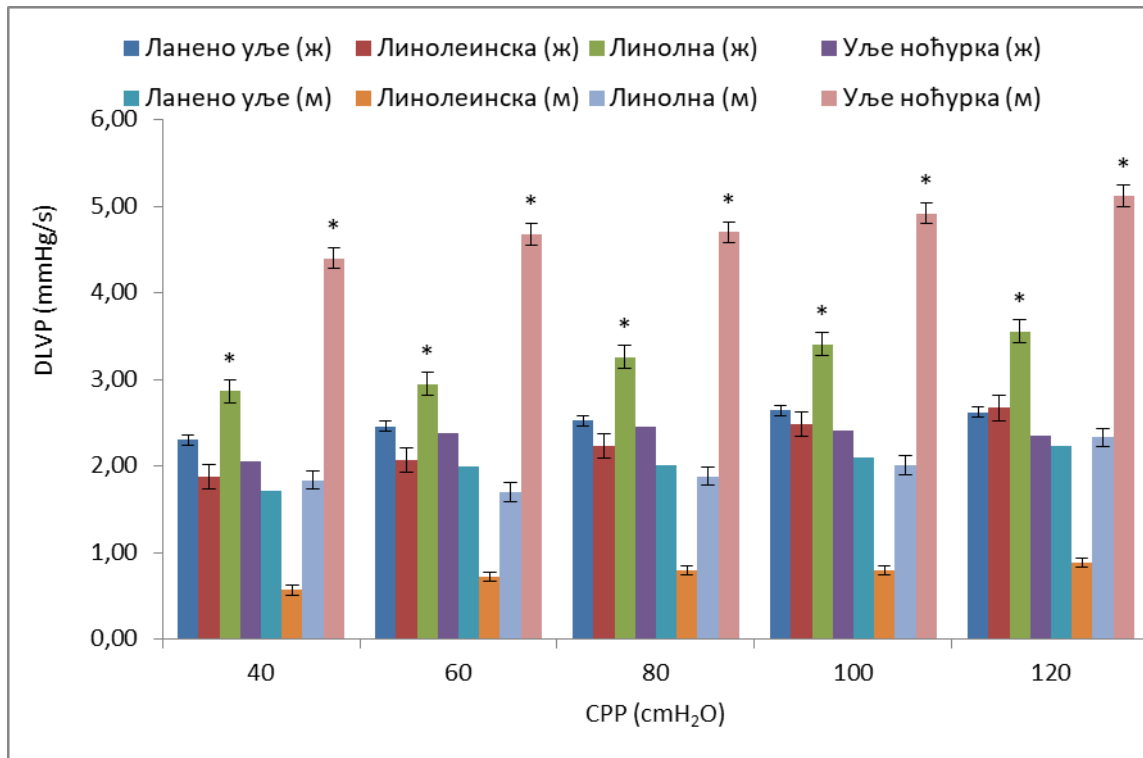
На Графикону бр 25. приказане су вредности параметра систолног притиска у левој комори изолованог срца пацова. Примећено је статистички значајно повећање овог параметра у групи мужјака пацова након суплементације уљем ноћурка и линолне масне киселине у групи женски у односу остале групе скоро на свим перфузионим притисцима, осим на притиску од 60 cmH₂O где је примећено значајно повећање овог параметра у групи женки након суплементације ланеним уљем и групи мужјака након суплементације уљем ноћурка.



Графикон бр. 25. SLVP у експерименталним групама пацова женског и мушког пола.

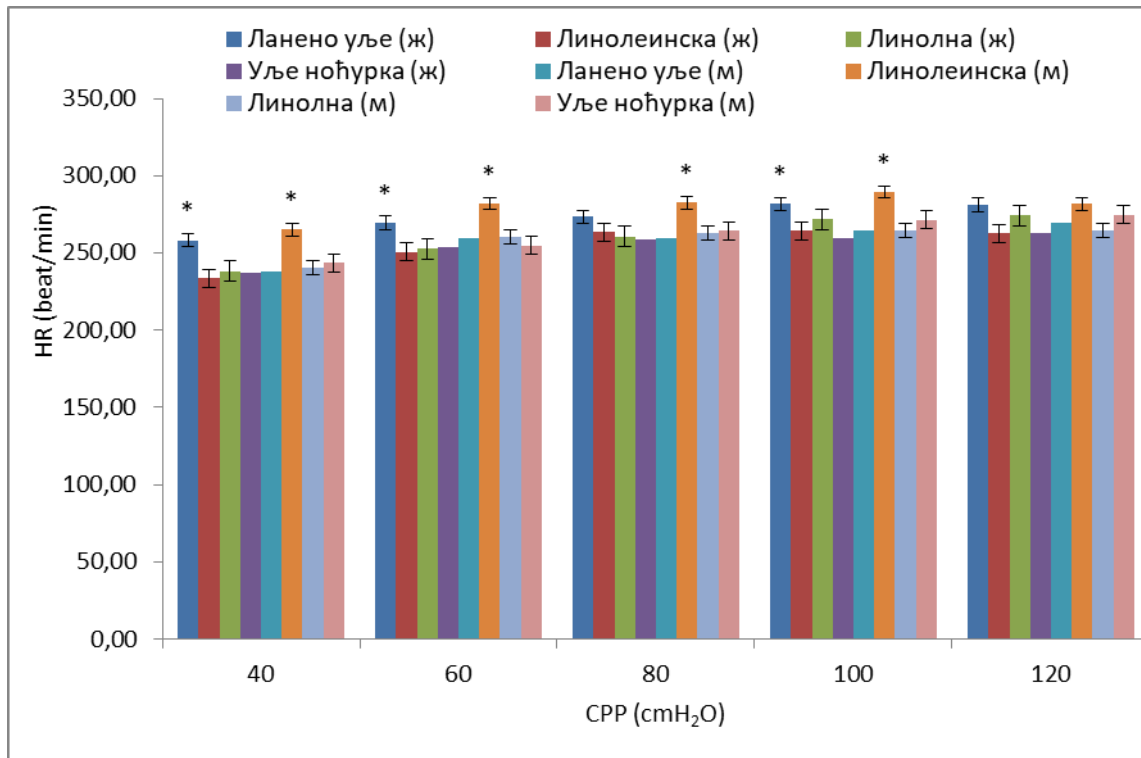
Знак * представља статистички значајну разлику ($p < 0,05$) у односу на остале групе

На Графикону бр 26. приказане су вредности параметра дијастолног притиска у левој комори изолованог срца пацова. Примећено је статистички значајно доминантно повећање овог параметра у групи мужјака пацова након суплементације уљем ноћурка и линолне масне киселине у групи женки у односу остале групе на свим перфузионим притисцима.



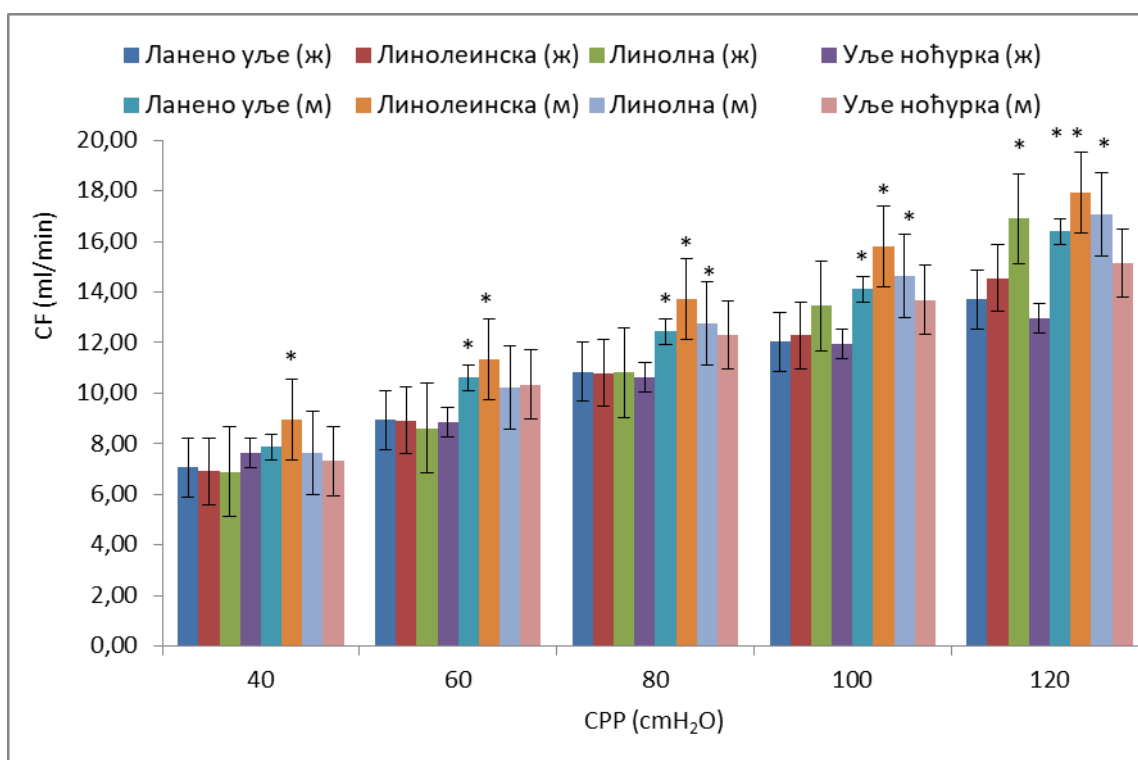
Графикон бр. 26. DLVP у експерименталним групама пацова женског и мушког пола. Знак * представља статистички значајну разлику ($p < 0,05$) у односу на остале групе

На Графикону бр 27. приказане су вредности срчане фреквенце изолованог срца пацова. Примећено је статистички значајно повећање овог параметра у групи мужјака пацова након суплементације линолеинском масном киселином у групи мужјака и након суплементације уљем ланеног семена у групи женки у односу остале групе на перфузионим притисцима од 40 до 100 cmH₂O.



Графикон бр. 27. HR у експерименталним групама пацова женског и мушког пола. Знак * представља статистички значајну разлику ($p < 0,05$) у односу на остале групе

На Графикону бр 28. приказане су вредности коронарног протока изолованог срца пацова. Примећено је статистички значајно повећање овог параметра у групи мужјака пацова након суплементације линолеинском масном киселином у групи мужјака и након суплементације уљем ланеног семена у групи женки у односу остале групе на перфузионим притисцима од 40 до 100 cmH₂O. На највишем перфузионим притиску, постоји више разлика у овом параметру поређењем група, па је тако приметно статистички значајно повећање у поменутим групама али и у групи женки и мужјака након суплементације линолне масне киселине.



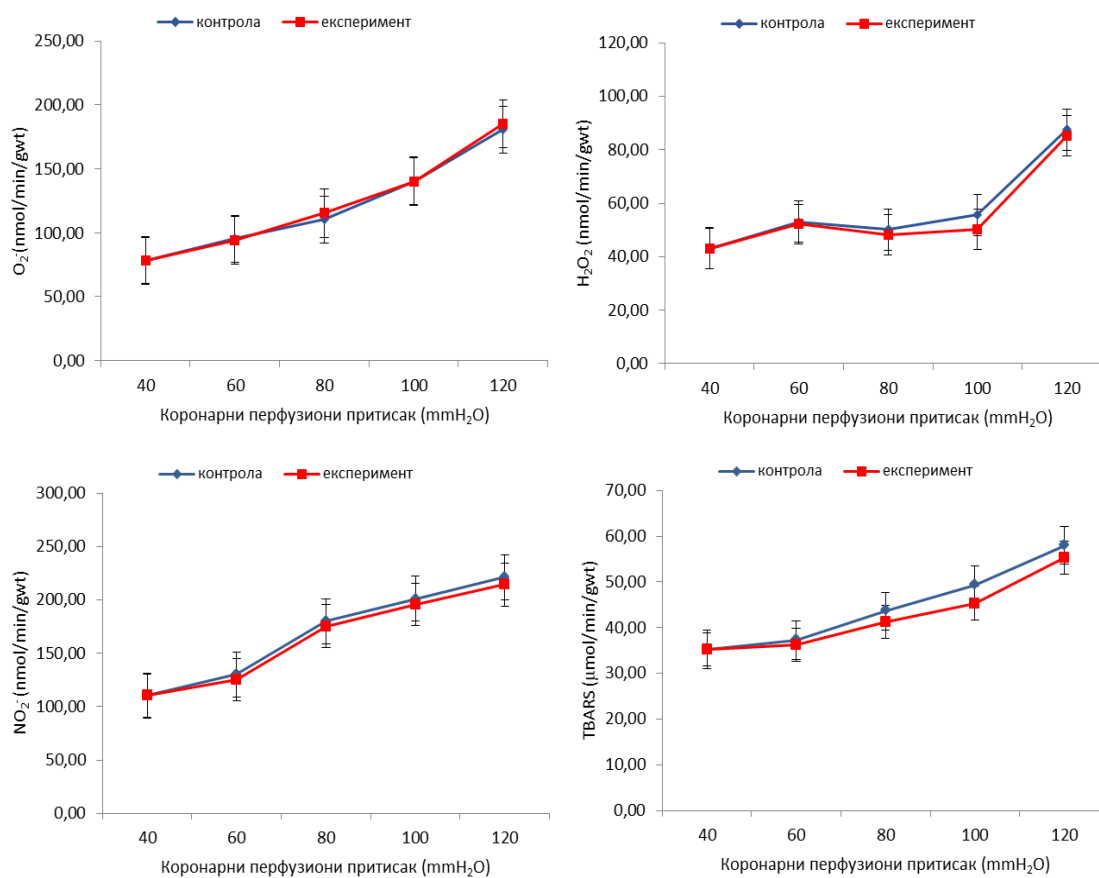
Графикон бр. 28. CF у експерименталним групама пацова женског и мушког пола. Знак * представља статистички значајну разлику ($p < 0,05$) у односу на остале групе

4.3. ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЕФЛЕНТУ (ПОРЕЂЕЊЕ У ГРУПИ)

У другом делу истраживања испитивали смо ефекте омега-3 и омега-6 масних киселина на прооксидационе маркере (супероксид анион радикал, водоник пероксид, нитрити, индекс липидне пероксидације) које смо мерили у перфузату током функционалног испитивања на изолованом срцу.

Контролна група (мужјаци)

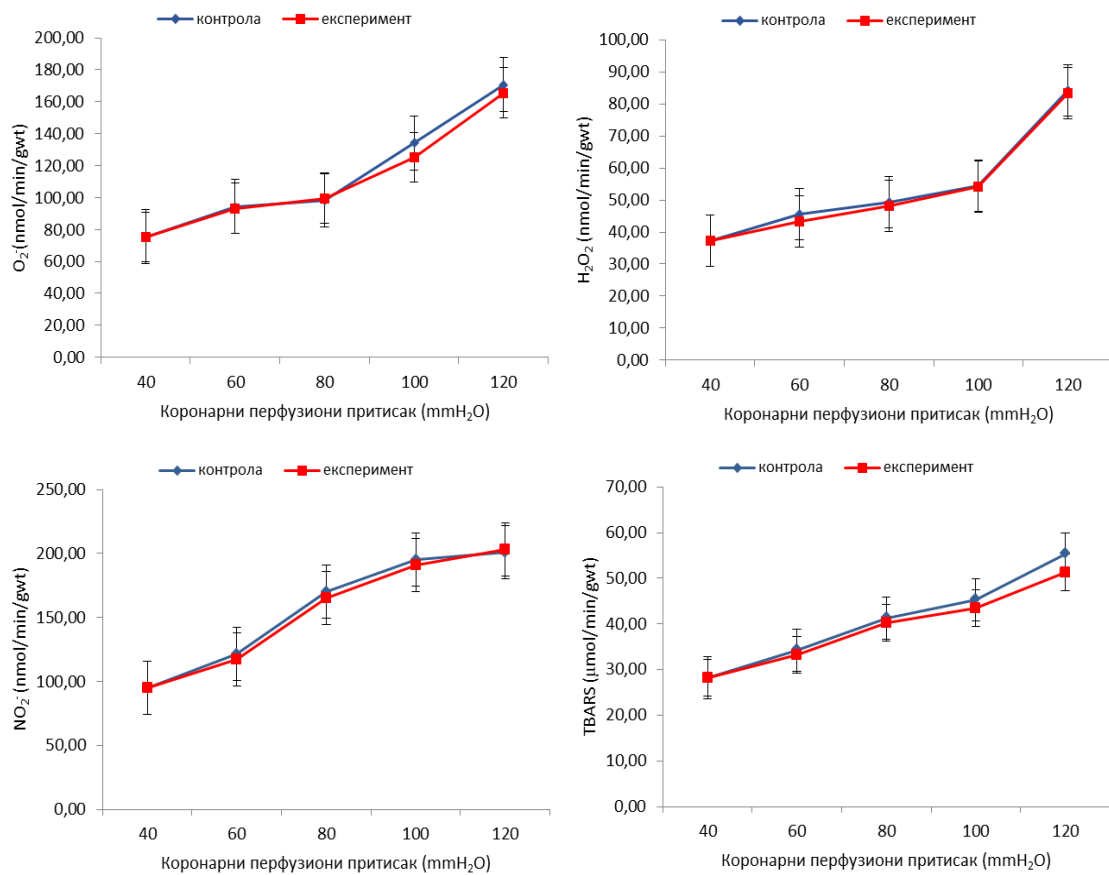
На Графикону бр. 29 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у контролној групи пацова мушког пола. Није било статистички значајних разлика у контролном и експерименталном периоду при промени коронарног перфузионог притиска у опсегу од 40 до 120 cmH_2O .



Графикон бр. 29. Промене прооксидационих маркера у контролној групи мушког пола.

Контролна група (женке)

На Графикону бр. 30 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у контролног групи пацова женског пола. Није било статистички значајних разлика у контролном и експерименталном периоду при промени коронарног перфузионог притиска у опсегу од 40 до 120 cmH_2O .

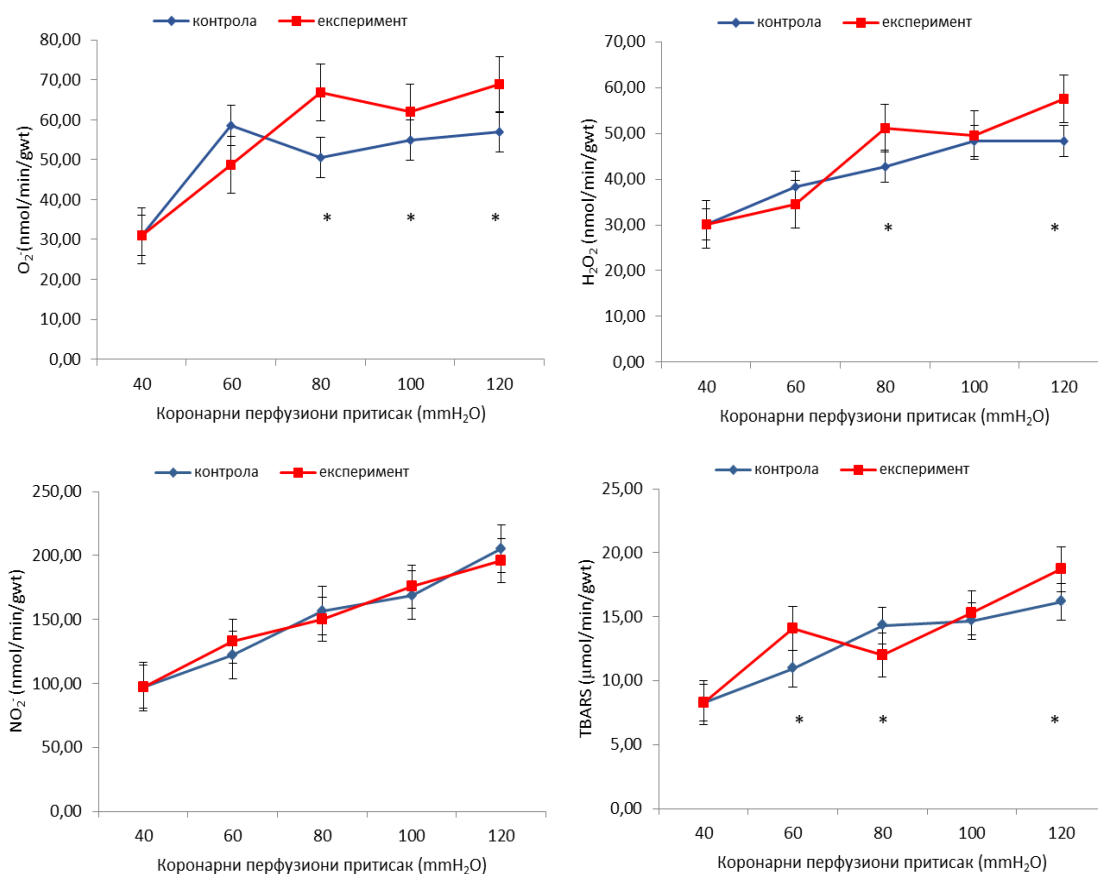


Графикон бр. 30. Промене прооксидационих маркера у контролној групи женског пола.

Ланено уље група (мушјаци)

На Графикону бр. 31 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групи пацова мушког пола након суплементације ланеним уљем. Статистички значајно промењен је супероксид ањјон радикал у експерименталном периоду у односу на контролни при вишим перфузионим притисцима у опсегу од 80 до 120 cmH_2O , водоник пероксид при

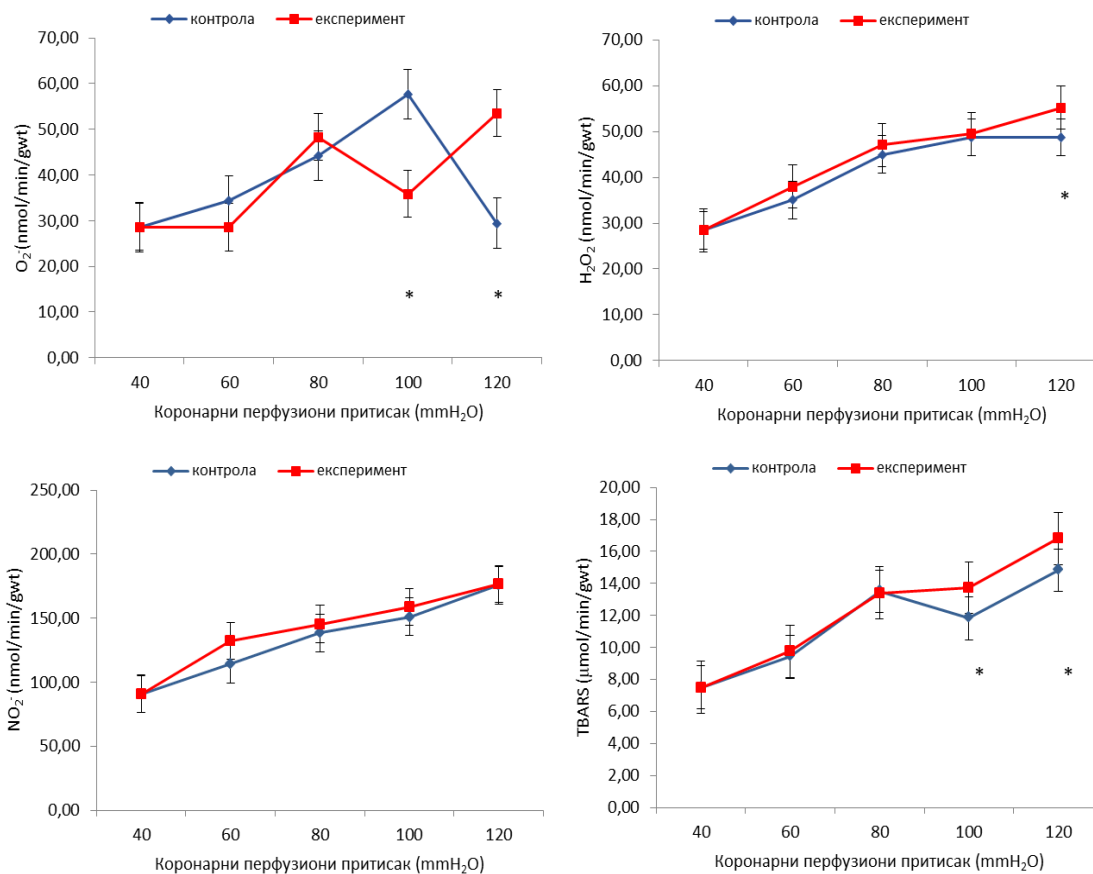
притисцима од 80 и 120 cmH₂O и индекс липидне пероксидације мерен као ТБАРС при притисцима од 60, 80 и 120 cmH₂O у експерименталном периоду. Вредности нитрита нису биле значајно промењене у овој групи.



Графикон бр. 31. Промене прооксидационих маркера у групи мушког пола након суплементације ланеним уљем

Ланено уље група (женке)

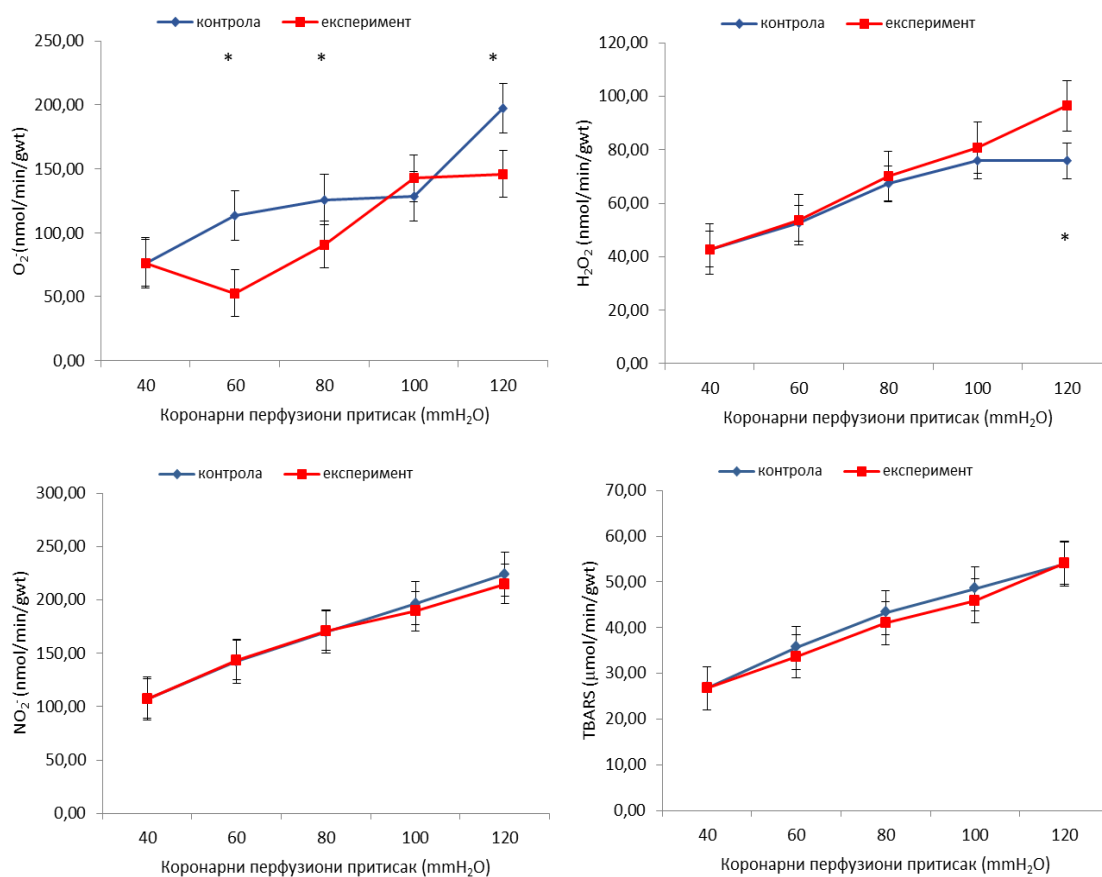
На Графикону бр. 32 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O₂⁻, H₂O₂, NO₂⁻, TBARS) у групи пацова женског пола након суплементације ланеним уљем. Статистички значајно промењен је супероксид анјон радикал и индекс липидне пероксидације мерен као TBARS у експерименталном периоду у односу на контролни при вишим перфузионим притисцима од 100 и 120 cmH₂O, водоник пероксид при притиску од 120 cmH₂O у експерименталном периоду. Вредности нитрита нису биле значајно промењене у овој групи.



Графикон бр. 32. Промене прооксидационих маркера у групи мушког пола након суплементације ланеним уљем

Линолеинска масна киселина- група (мужјаци)

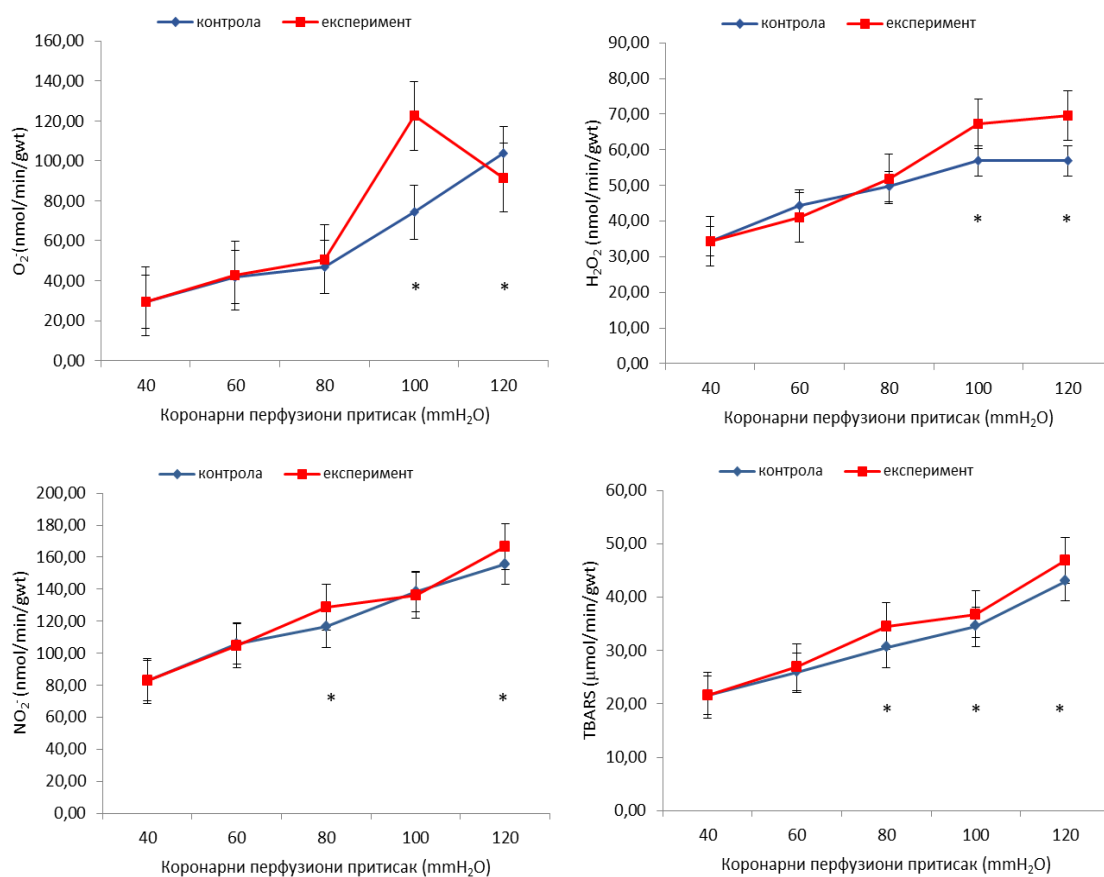
На Графикону бр. 33 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групи пацова мушког пола након суплементације линолеинском масном киселином. Статистички значајно промењен је супероксид ањон радикал у експерименталном периоду у односу на контролни при перфузионим притисцима од 60, 80 и 120 cmH₂O и водоник пероксид при притиску од 120 cmH₂O у експерименталном периоду. Вредности нитрита и индекса липидне пероксидације мерен као ТБАРС нису биле значајно промењене у овој групи.



Графикон бр. 33. Промене прооксидационих маркера у групи мушког пола након суплементације линолеинском масном киселином

Линолеинска масна киселина- група (женке)

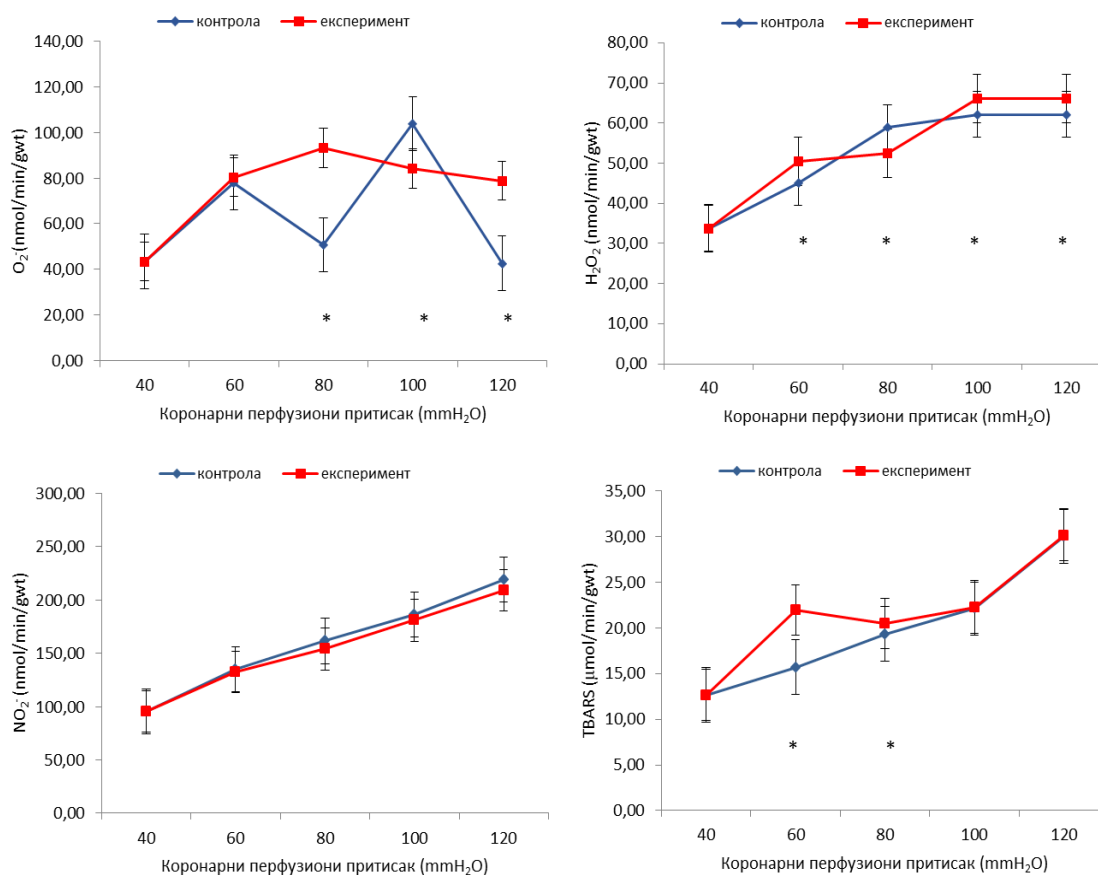
На Графикону бр. 34 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O₂⁻, H₂O₂, NO₂⁻, TBARS) у групи пацова женског пола након суплементације линолеинском масном киселином. Статистички значајно промењен је супероксид анјон радикал и водоник пероксид у експерименталном периоду у односу на контролни при вишим перфузионим притисцима од 100 и 120 cmH₂O. Вредности нитрита су биле значајно промењене у овој групи при притиску од 80 и 120 cmH₂O у експерименталном периоду, док је индекс липидне пероксидације мерен као ТБАРС статистички значајно промењен такође при вишим притисцима (80-120 cmH₂O) у експерименталном периоду.



Графикон бр. 34. Промене прооксидационих маркера у групи женског пола након суплементације линолеинском масном киселином

Линолна масна киселина- група (мужјаци)

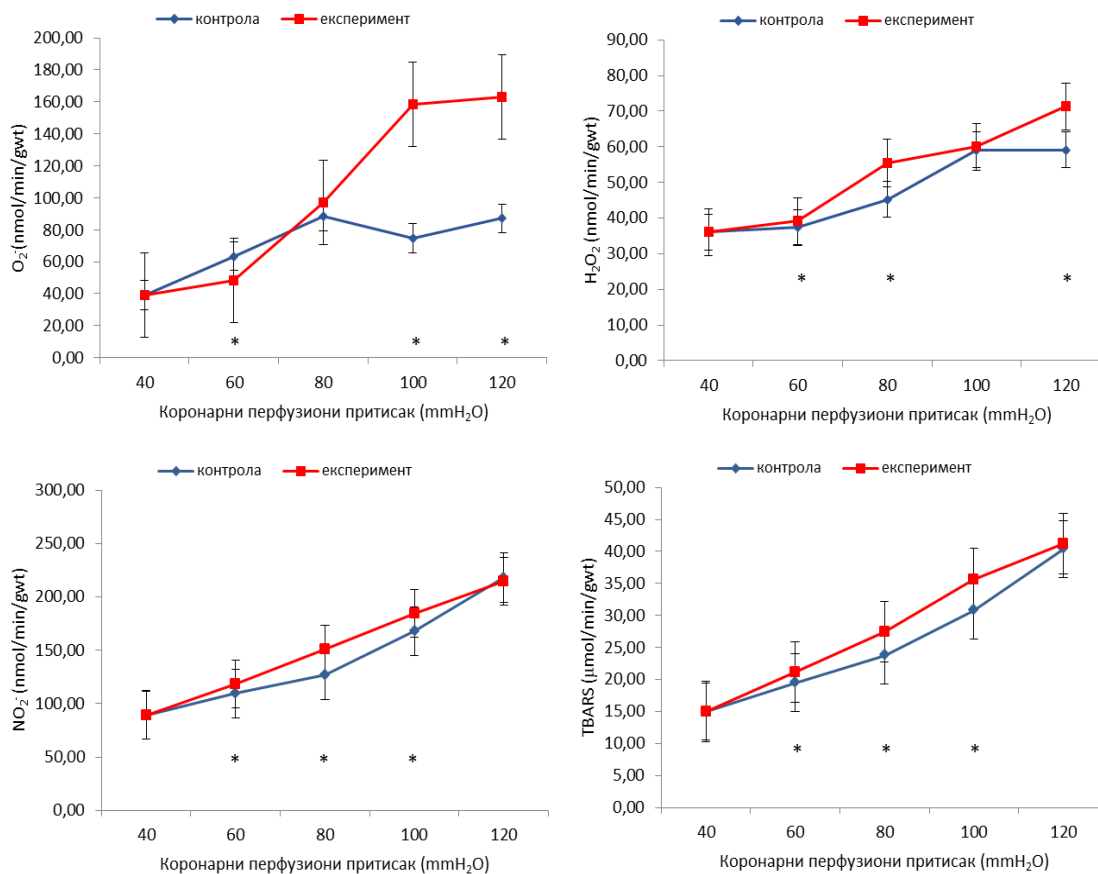
На Графикону бр. 35 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групи пацова мушког пола након суплементације линолном масном киселином. Статистички значајно промењен је супероксид анјон радикал при вишим перфузионим притисцима од 80-120 cmH₂O и водоник пероксид у експерименталном периоду у односу на контролни при скоро свим перфузионим притисцима од 60-120 cmH₂O. Вредности нитрита нису биле значајно промењене у овој групи, док је индекс липидне пероксидације мерен као ТБАРС статистички значајно промењен при нижим притисцима (60 и 80 cmH₂O) у експерименталном периоду.



Графикон бр. 35. Промене прооксидационих маркера у групи мушког пола након суплементације линолном масном киселином

Линолна масна киселина- група (женке)

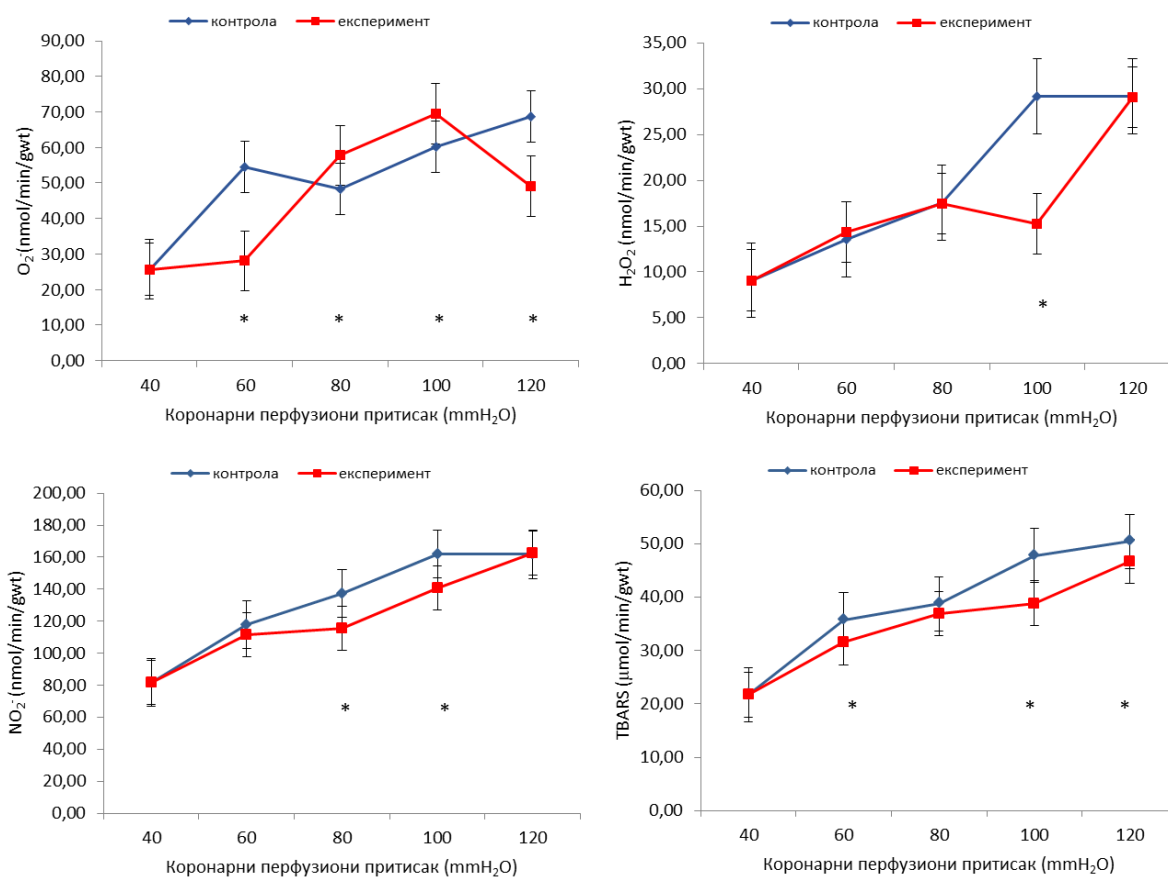
На Графикону бр. 36 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групи пацова женског пола након суплементације линолном масном киселином. Статистички значајно промењен је супероксид анјон радикал при вишим перфузионим притисцима од 60, 100 и 120 cmH₂O и водоник пероксид при перфузионим притисцима од 60, 80 и 120 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни. Вредности нитрита и индекса липидне пероксидације мерен као ТБАРС су биле значајно повишене у овој групи при притисцима од 60-100 cmH₂O у експерименталном периоду у овој групи.



Графикон бр. 36. Промене прооксидационих маркера у групи женског пола након суплементације линолном масном киселином

Уље ноћурка- група (мужјаци)

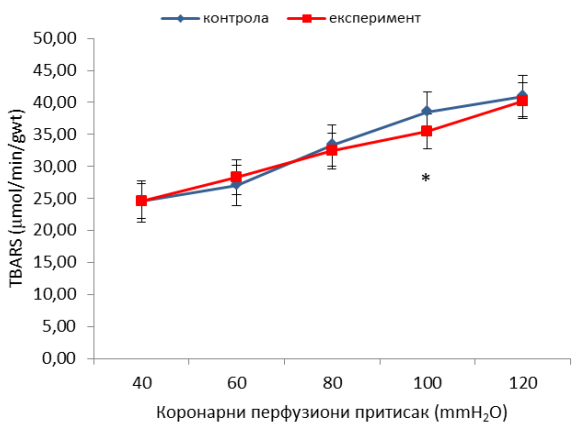
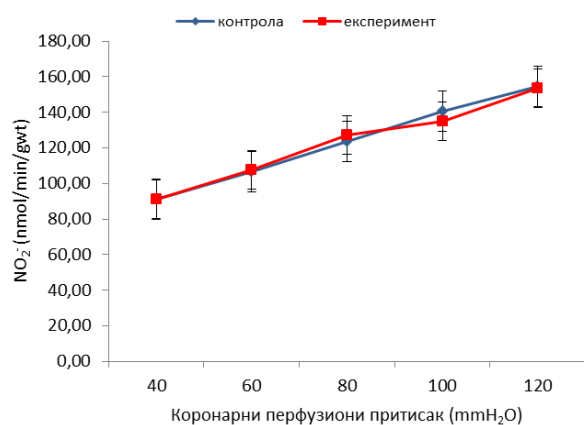
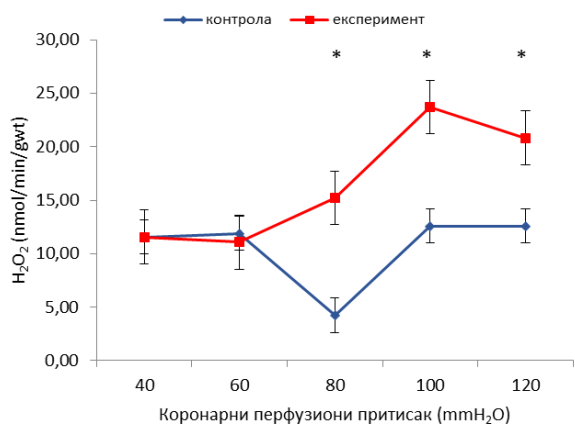
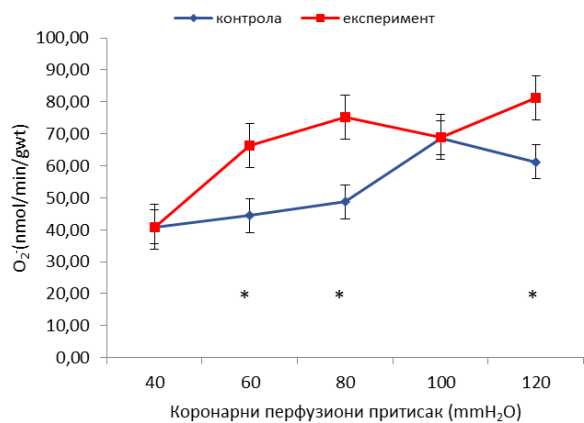
На Графикону бр. 37 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групи пацова мушког пола након суплементације уљем ноћурка. Статистички значајно промењен је супероксид анјон радикал при скоро свим перфузионим притисцима од 60-120 cmH₂O и водоник пероксид при перфузионом притиску од 100 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни. Вредности нитрита и индекса липидне пероксидације мерен као ТБАРС су биле значајно повишене у овој групи при притисцима од 60 и 80 cmH₂O за нитрите, и на притисцима од 60, 100 и 120 cmH₂O за TBARS у експерименталном периоду у овој групи.



Графикон бр. 37. Промене прооксидационих маркера у групи мушког пола након суплементације уљем ноћурка

Уље ноћурка- група (женке)

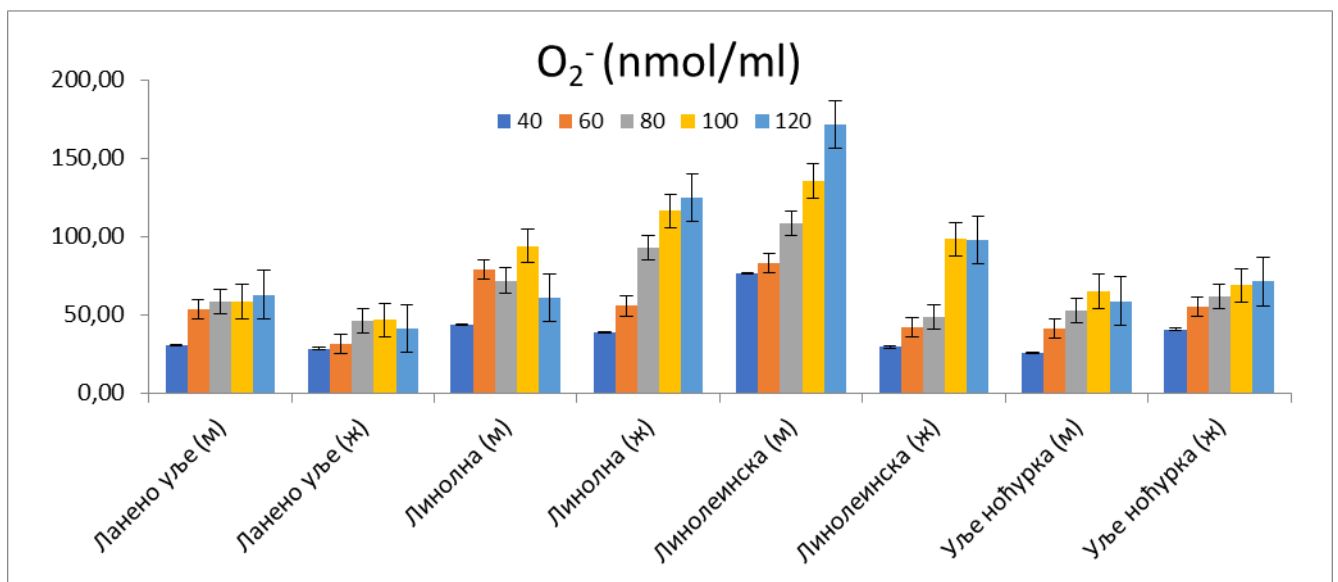
На Графикону бр. 38 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групи пацова женског пола након суплементације уљем ноћурка. Статистички значајно промењен је супероксид анјон радикал при вишим перфузионим притисцима од 60, 80 и 120 cmH₂O и водоник пероксид при перфузионим притисцима од 80-120 cmH₂O у експерименталном периоду у односу на контролни. Вредности нитрита нису биле значајно промењене док су вредности индекса липидне пероксидације мерен као ТБАРС су биле значајно снижене у овој групи при притиску од 80 cmH₂O у експерименталном периоду.



Графикон бр. 38. Промене прооксидационих маркера у групи женског пола након суплементације уљем ноћурка

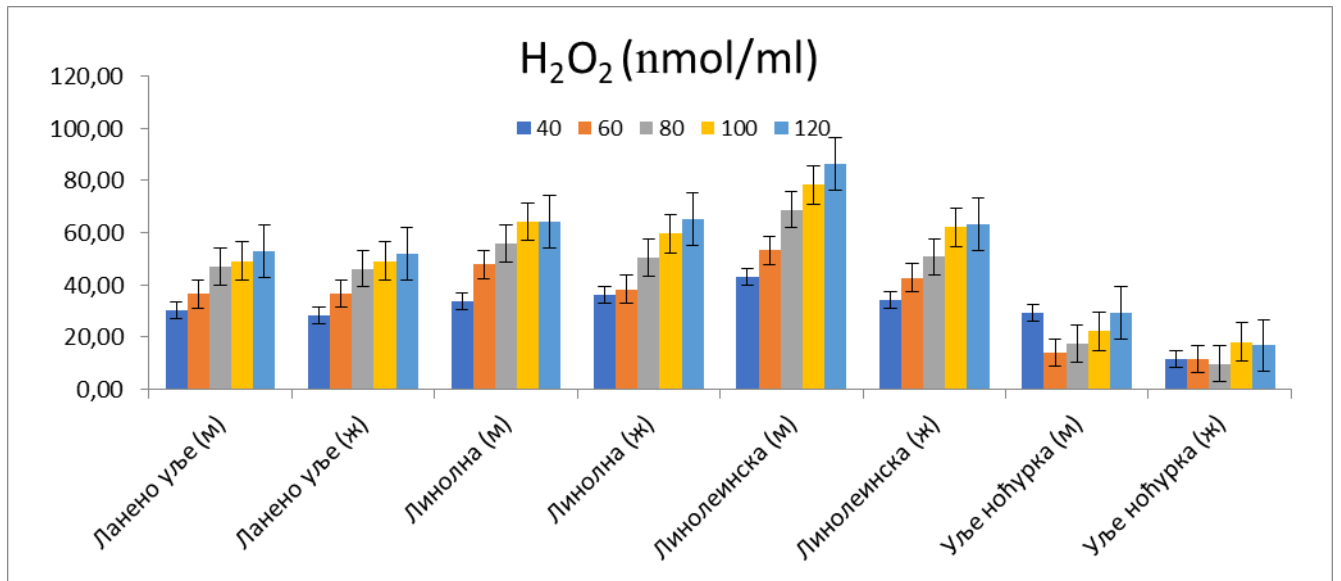
4.4. ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЕФЛЕНТУ (ПОРЕЂЕЊЕ ГРУПА)

На Графикону бр. 39 приказане су средње вредности супероксид анјон радикала у свим испитиваним групама. Примећено је доминантно повећање овог маркера у групи које су третиране линолеинском и линолном киселином и у односу на друге експерименталне и две контролне групе нарочито изражене при врло високим перфиззионим притисцима.



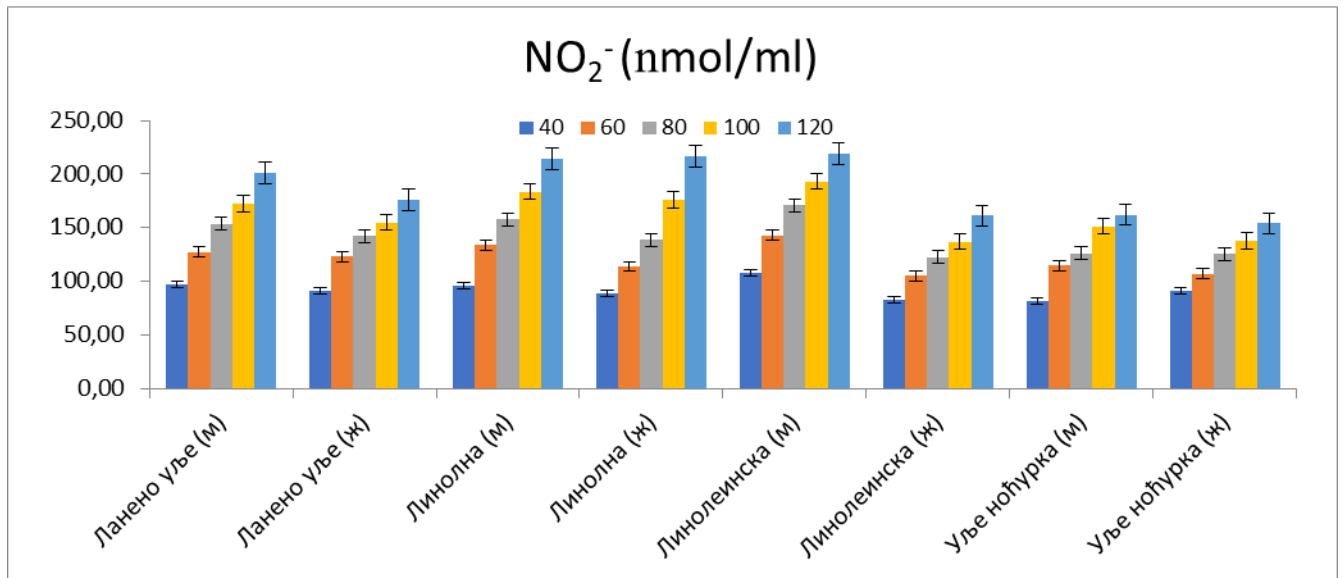
Графикон бр. 39. Промене супероксид анјон радикала у експерименталним групама након суплементације и при промени коронарног перфузионог притиска (CPR=40-120 cmH₂O)

На Графикону бр. 40 приказане су средње вредности водоник пероксида у свим испитиваним групама. Примећено је доминантно повећање овог маркера у групи које су третиране линолеинском и линолном киселином и у односу на друге експерименталне и две контролне групе, и доминантно ниже вредности у групама третиране уљем ноћурка.



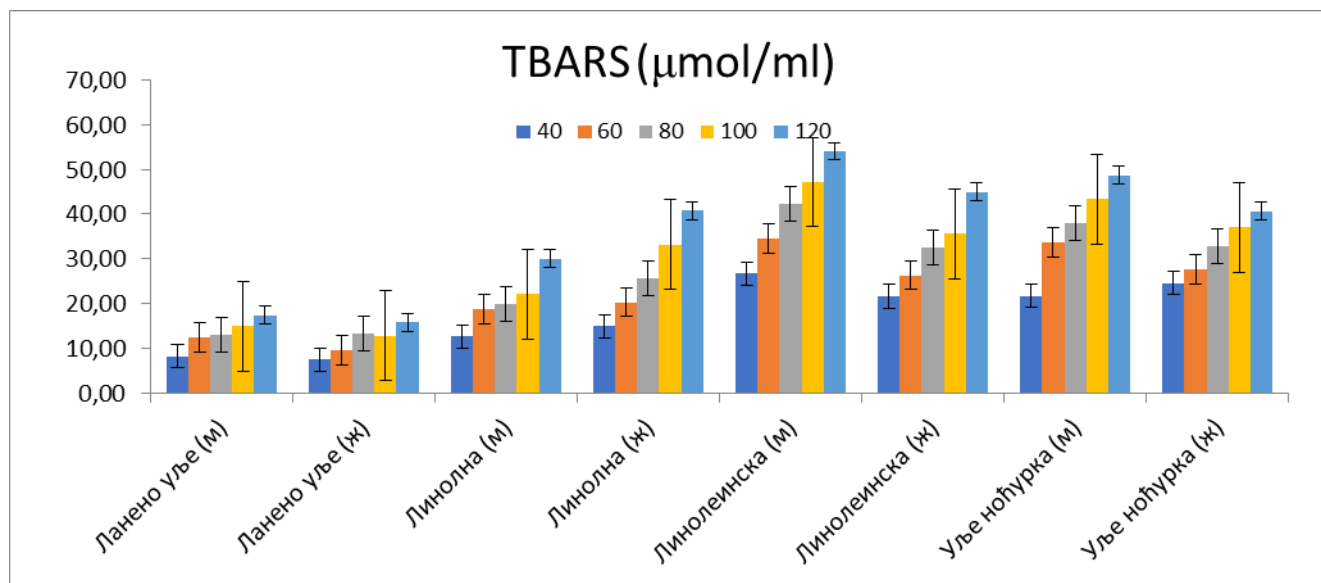
Графикон бр. 40. Промене водоник пероксида у експерименталним групама након суплементације и при промени коронарног перфузионог притиска (CPP=40-120 cmH₂O)

На Графикону бр. 41 приказане су средње вредности нитрита у свим испитиваним групама. Није било значајних разлика у вредностима овог маркера поређењем ових група, али су примењене нешто ниже вредности нитрита у групама третиране уљем ноћурка.



Графикон бр. 41. Промене нитрита у експерименталним групама након суплементације и при промени коронарног перфузионог притиска (CPP=40-120 cmH₂O)

На Графикону бр. 42 приказане су средње вредности TBARS-а у свим испитиваним групама. Поређењем експерименталних група, статистички значајно повећање овог маркера примећено је у групама које су третиране линолеинском киселином, уљем ноћурка и линолном и то само у групи пацова женског пола, које прати линеаран раст коронарног перфузионог притиска.



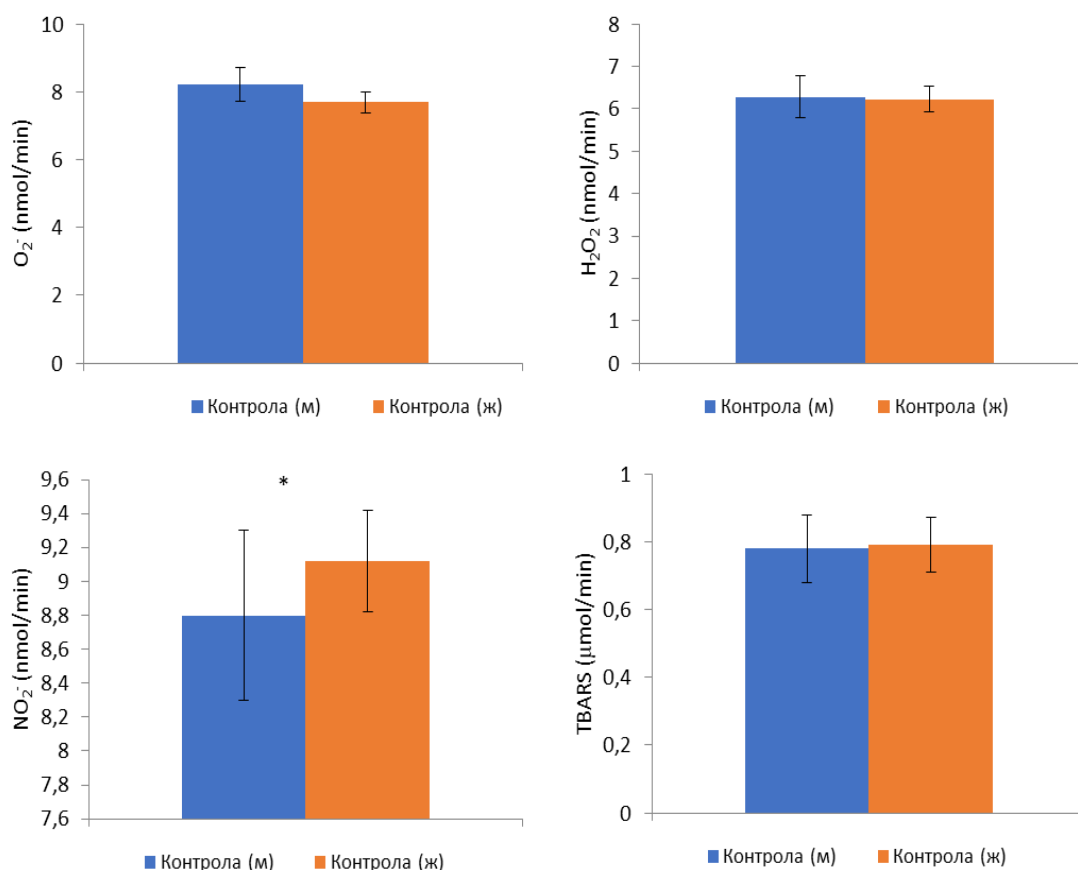
Графикон бр. 42. Промене индекса липидне пероксидације (TBARS-а) у експерименталним групама након суплементације и при промени коронарног перфузионог притиска (CPP=40-120 cmH₂O)

4.5. ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА ПРООКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ПЛАЗМИ

У последњем делу истраживања пратили смо ефекте суплементације омега-3 и омега-6 масних киселина на редокс статус пацова мушког и женског пола након шестонедељне супленетације различитим есенцијалним масним киселинама праћењем прооксидационих и антиоксидационих маркера у крви животиње.

Контролна група пацова (мужјаци и женке)

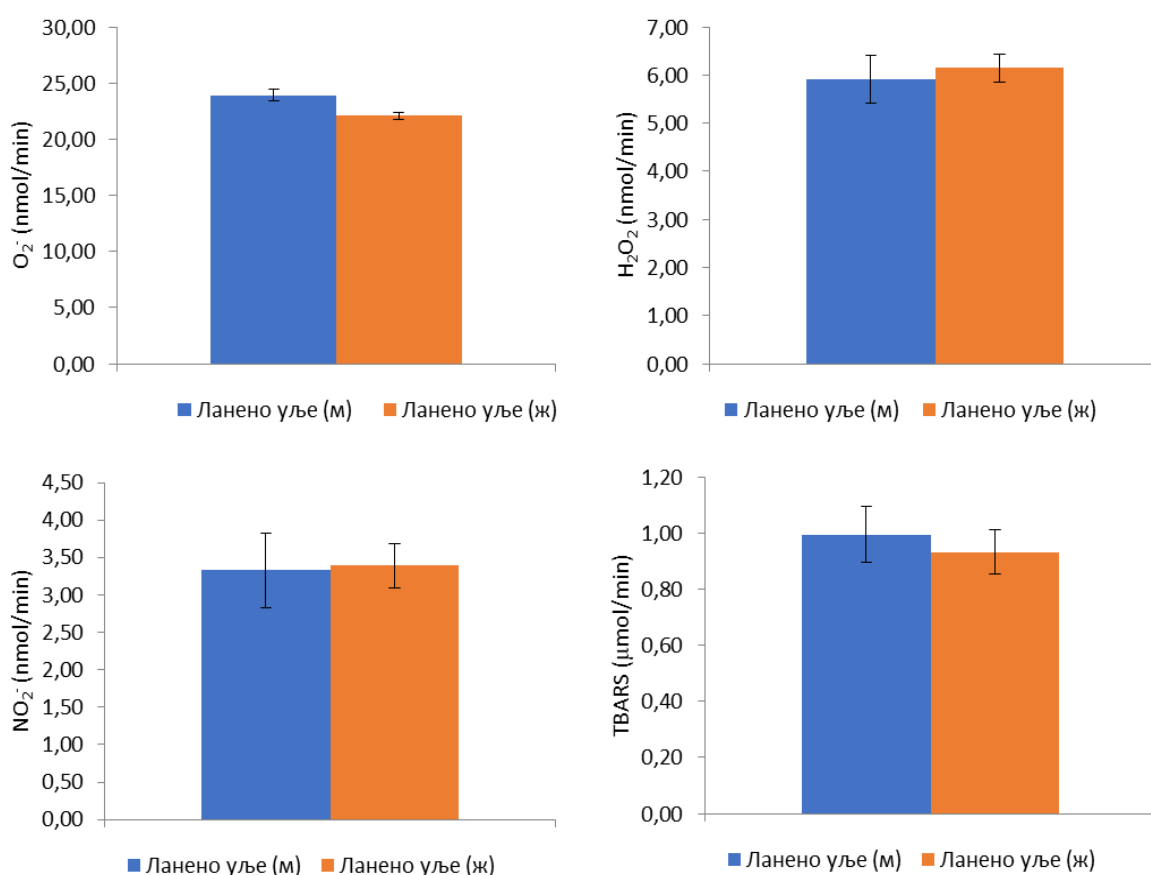
На Графикону бр. 43 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у контролним групама пацова женског и мушког пола. Поређењем контролних група оба пола, статистички се значајно разликовао само маркер нитрити, са значајно вишим вредностима у групи женског пола. Остали прооксидациони маркери нису се значајно разликовали поређењем ове две групе.



Графикон бр. 43. Промене прооксидационих маркера у плазми у контролним групама мушког и женског пола

Ланено уље -група (мужјаци и женке)

На Графикону бр. 44 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације ланеним уљем. Поређењем група оба пола, статистички се нису значајно разликовали прооксидациони маркери.

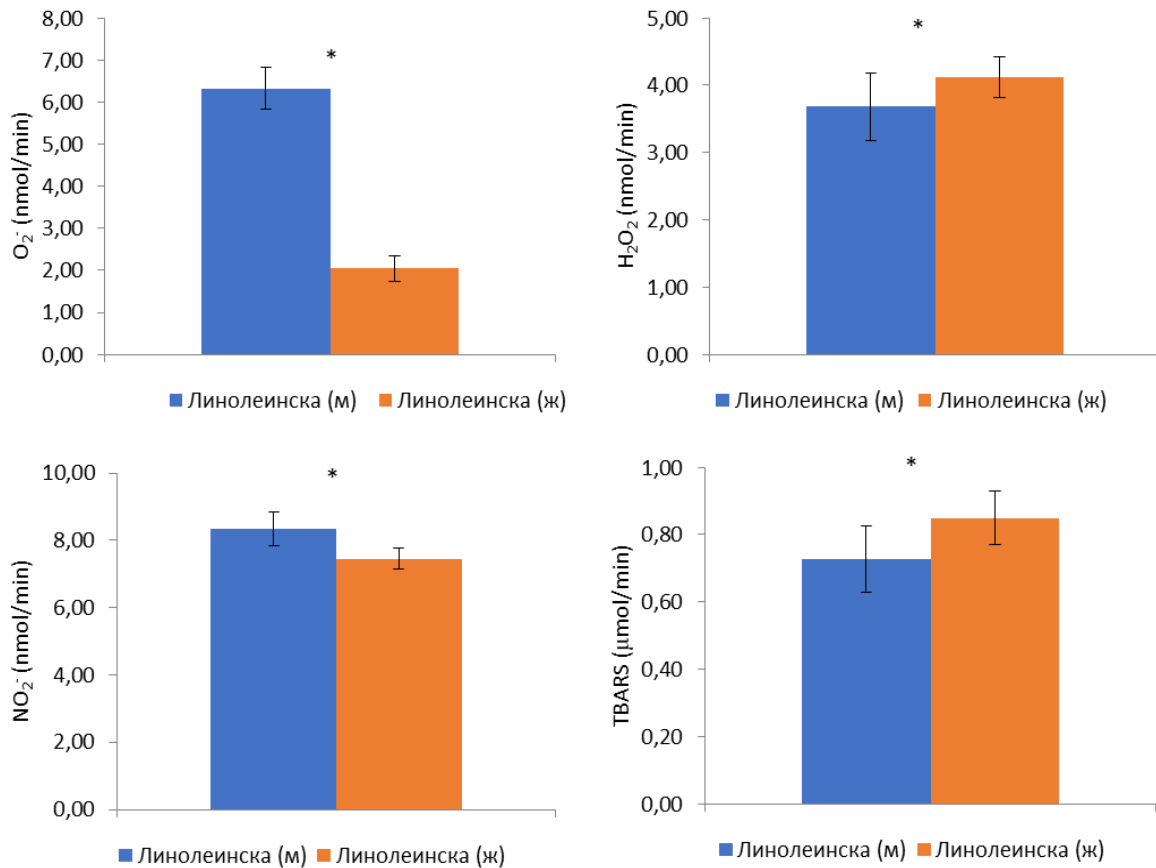


Графикон бр. 44. Промене прооксидационих маркера у плазми у групама мушког и женског пола након суплементације ланеним уљем

Линолеинска масна киселина -група (мужјаци и женке)

На Графикону бр. 45 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације линолеинском киселином. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовали сви прооксидациони маркери, са

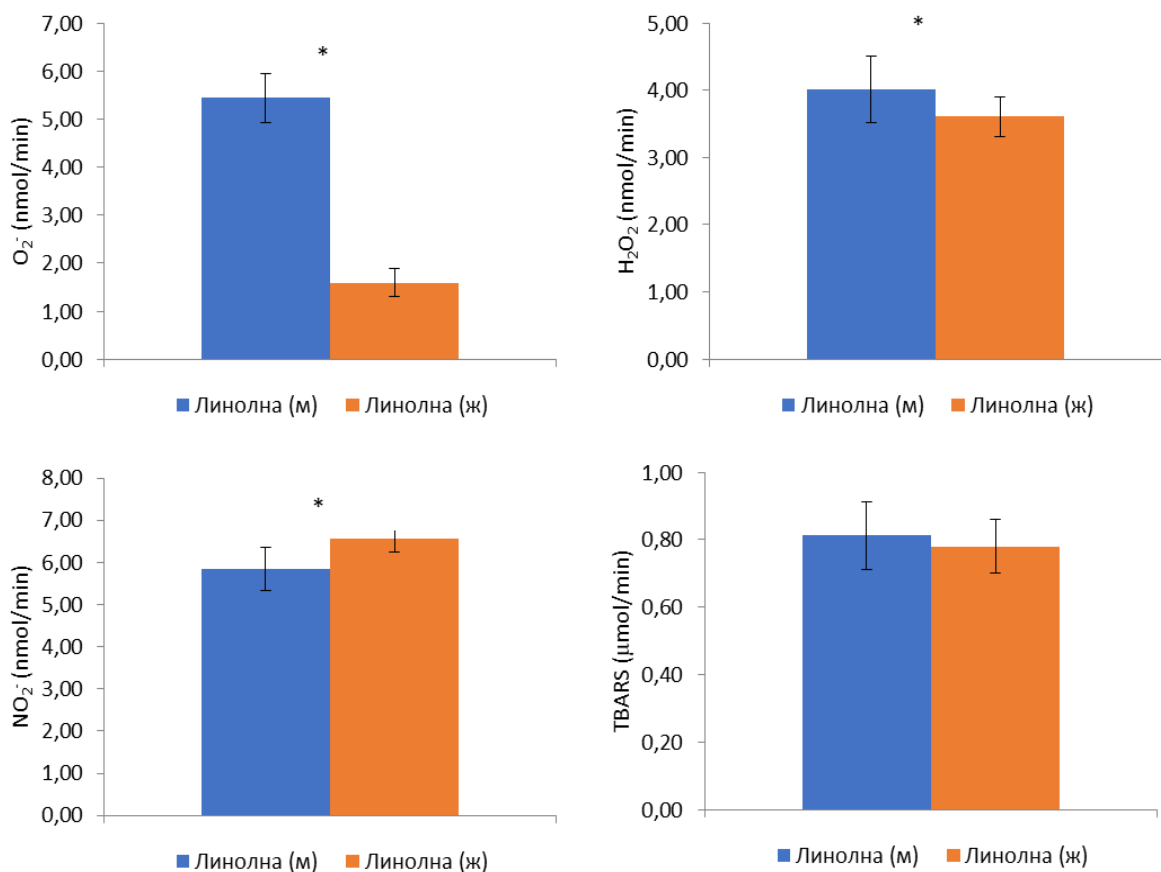
доминантно вишим вредностима супероксид анјон радикала и нитрита у групи пацова мушког пола, и нижим вредностима водоник пероксида и индекса липидне пероксидације у истој групи.



Графикон бр. 45. Промене прооксидационих маркера у плазми у групама мушког и женског пола након суплементације лиолеинском киселином

Лиолна масна киселина -група (мужјаци и женке)

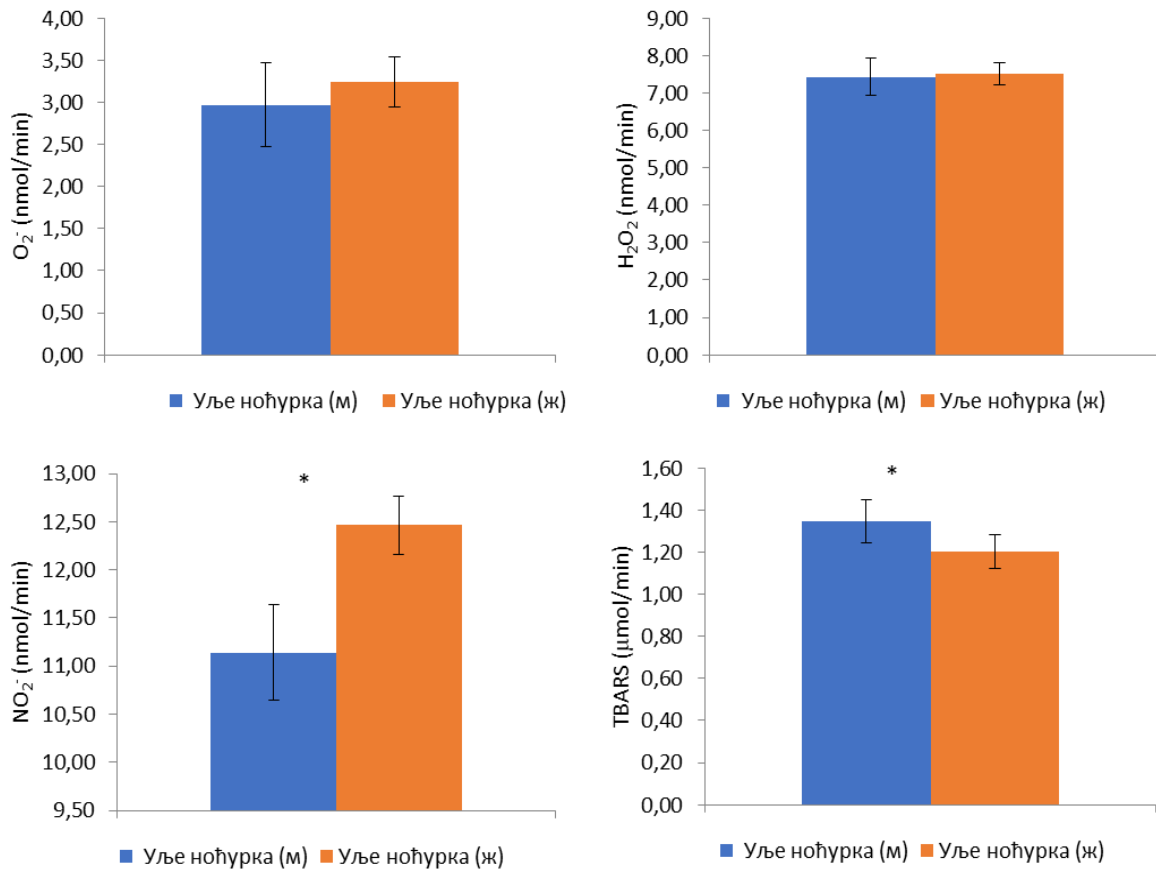
На Графикону бр. 46 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , NO_2^{\cdot} , TBARS) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације лиолном киселином. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовали скоро сви прооксидациони маркери, са вишим вредностима супероксид анјон радикала и водоник пероксида у групи пацова мушког пола, и нижим вредностима нитрита у истој групи. Вредности индекса липидне пероксидације нису биле значајно промењене поређењем ове две групе.



Графикон бр. 46. Промене прооксидационих маркера у плазми у групама мушког и женског пола након суплементације линолном киселином

Уље ноћурка -група (мужјаци и женке)

На Графикону бр. 47 приказане су средње вредности свих испитиваних прооксидационих параметара (O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- , TBARS) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације уљем ноћурка. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовале вредности нитрита, са вишим вредностима у групи пацова женског пола, и нижим вредностима индекса липидне пероксидације у истој групи. Вредности супероксид анјон радикала и водоник пероксида нису биле значајно промењене поређењем ове две групе.



Графикон бр. 47. Промене прооксидационих маркера у плазми у групама мушког и женског пола након суплементације уљем ноћурка

На Табели бр. 18 приказане су статистички значајне разлике између испитиваних маркера оксидационог стреса у поређењу са контролним групама.

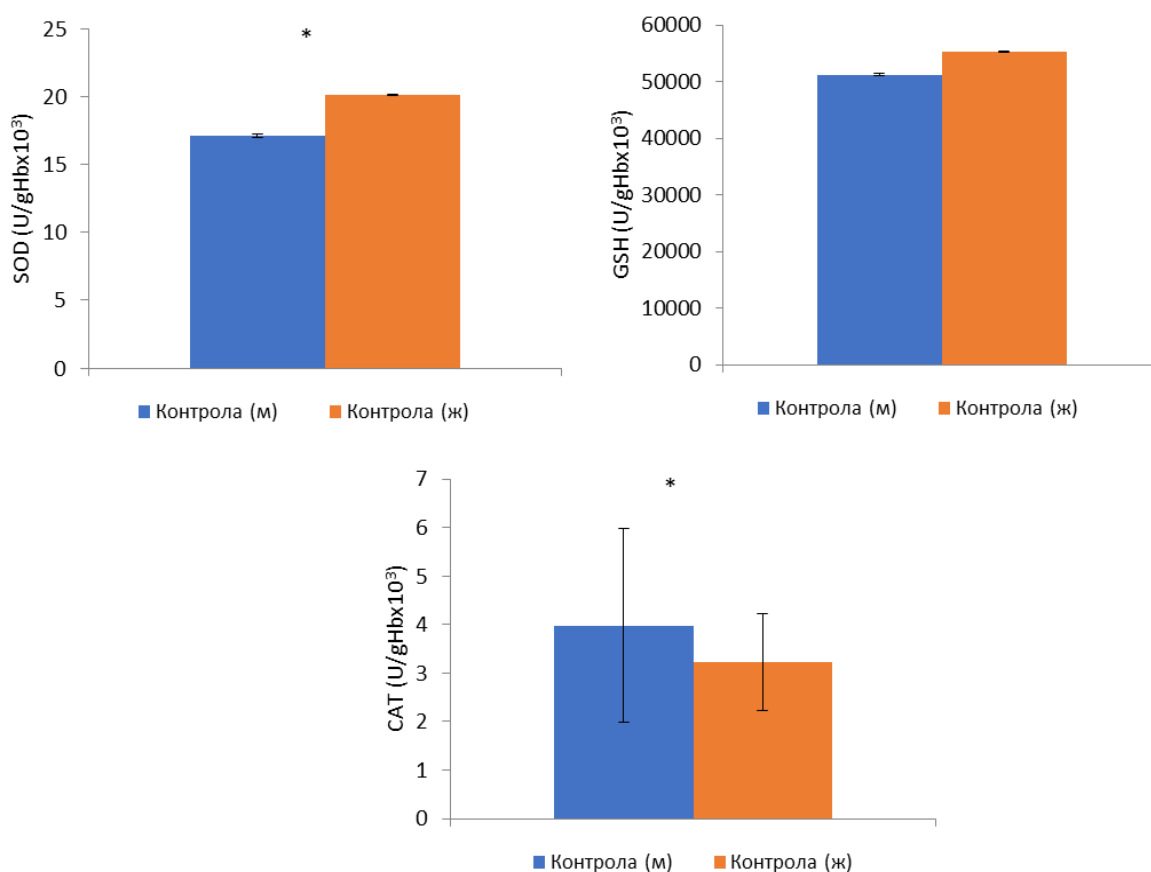
Група	O_2^- (nmol/ml)		H_2O_2 (nmol/ml)		NO_2^- (nmol/ml)		TBARS (μ mol/ml)	
	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Контрола (м)	8,23	1,03	6,28	0,1	8,88	0,01	0,78	0,03
Контрола (ж)	7,69	0,98	6,23	0,3	9,12	0,02	0,79	0,01
Ланено уље (м)	23,92 [§]	1,22	5,91	0,2	3,33*	0,01	0,99 [§]	0,01
Ланено уље (ж)	22,08 [§]	1,28	6,14	0,4	3,39*	0,02	0,93 [§]	0,01
Линолна (м)	5,44	2,12	4,01*	0,2	5,85*	0,03	0,81	0,01
Линолна (ж)	1,59*	0,17	3,61*	0,2	6,56*	0,01	0,78	0,01
Линолеинска (м)	6,33	0,89	3,68*	0,3	8,35	0,04	0,73*	0,02
Линолеинска (ж)	2,04*	0,01	4,12*	0,1	7,46	0,03	0,85 [§]	0,01
Уље ноћурка (м)	2,97*	0,30	7,42 [§]	0,5	11,14 [§]	0,05	1,35 [§]	0,02
Уље ноћурка (ж)	3,24*	0,20	7,51 [§]	0,8	12,46 [§]	0,02	1,20 [§]	0,03

Табела бр. 18. Приказ вредности прооксидационих параметара у контролним и експерименталним групама оба пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности \pm стандардна девијација ($X \pm SD$), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

4.6. ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА АНТИОКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЛИЗАТУ ЕРИТРОЦИТА

Контролна група пацова (мужјаци и женке)

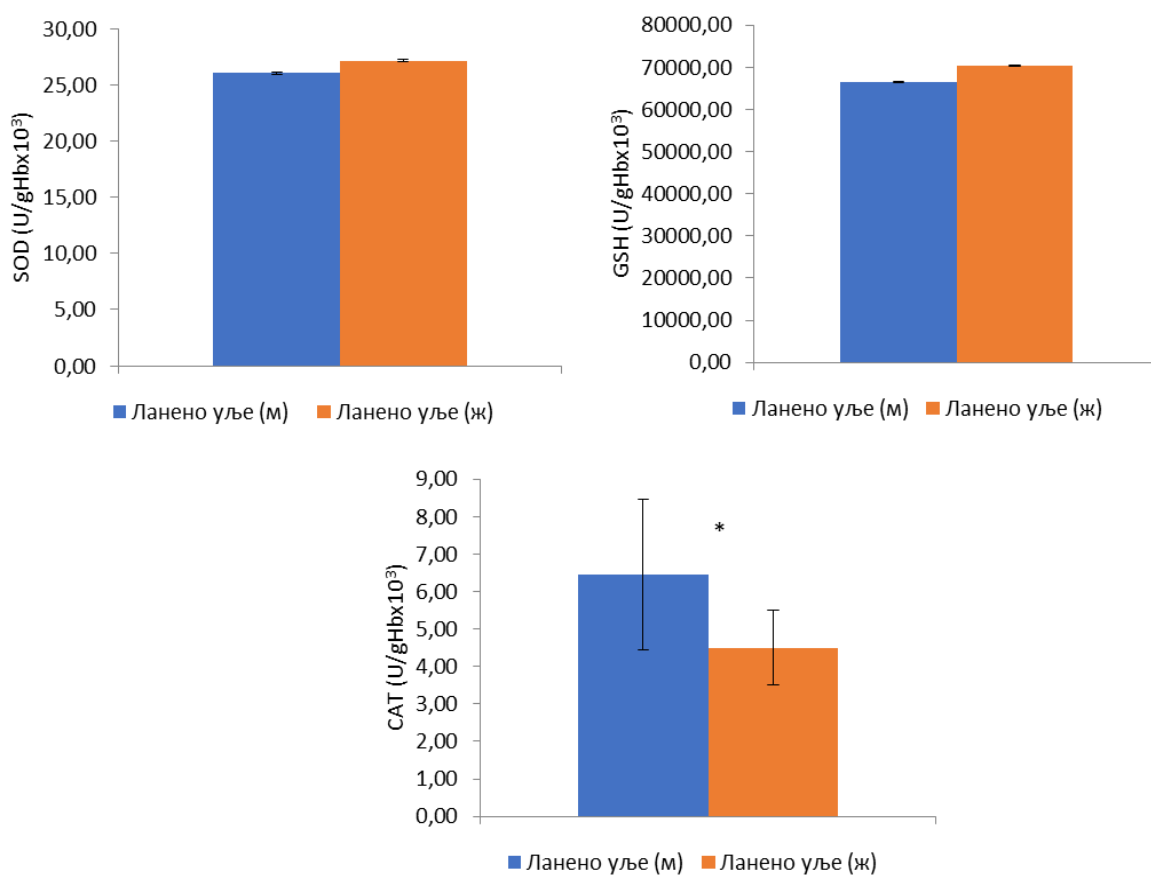
На Графикону бр. 48 приказане су средње вредности свих испитиваних антиоксидационих параметара (SOD, GSH, CAT) у контролним групама пацова женског и мушког пола. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовале вредности SOD-а, са вишим вредностима у групи пацова женског пола, и нижим вредностима CAT у истој групи. Вредности GSH-а нису биле значајно промењене поређењем ове две групе.



Графикон бр. 48. Промене антиоксидационих маркера (SOD, GSH, CAT) у лизату еритроцита у контролним групама мушког и женског пола

Ланено уље -група (мужјаци и женке)

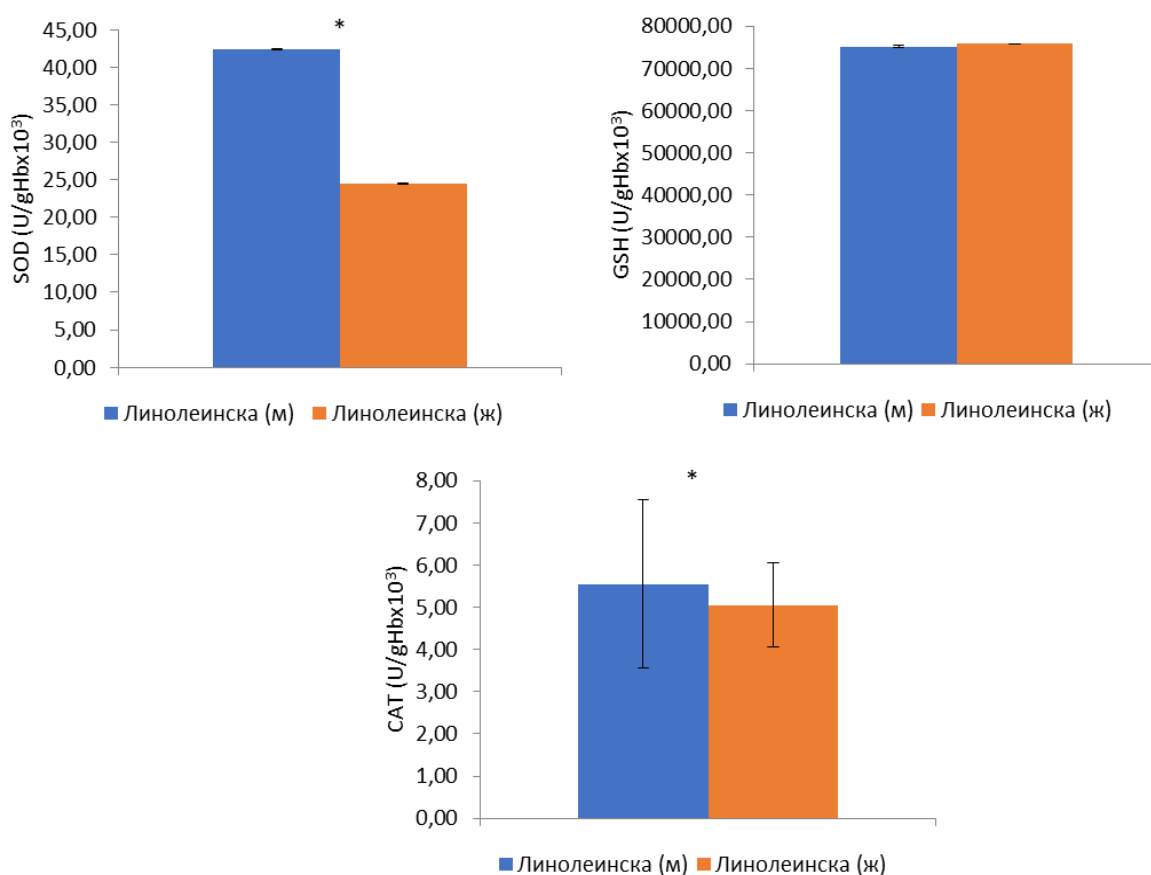
На Графикону бр. 49 приказане су средње вредности свих испитиваних антиоксидационих параметара (SOD, GSH, CAT) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације ланеним уљем. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовале само вредности CAT са вишим вредностима у групи пацова мушког пола. Вредности GSH-а и SOD-а нису биле значајно промењене поређењем ове две групе.



Графикон бр. 49. Промене антиоксидационих маркера (SOD, GSH, CAT) у лизату еритроцита у групама мушког и женског пола суплементације ланеног уља

Линолеинска масна киселина -група (мужјаци и женке)

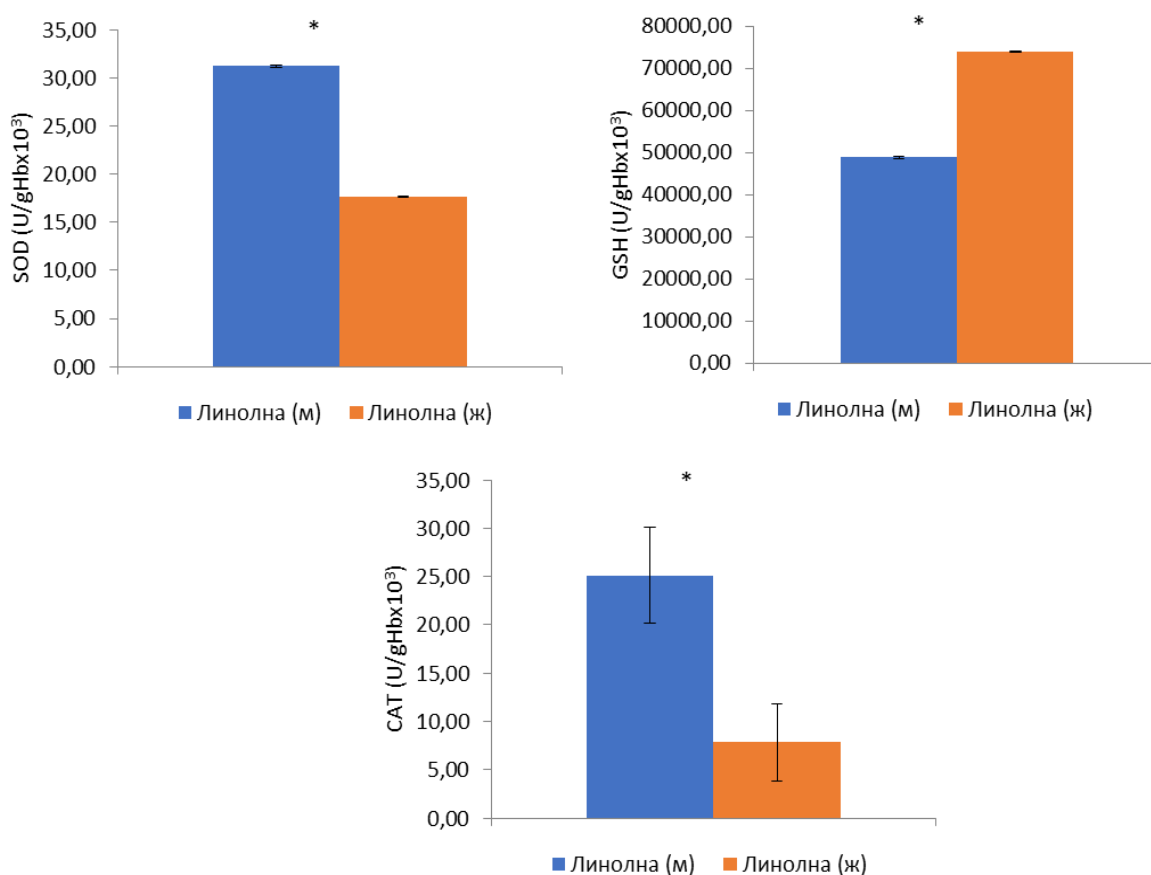
На Графикону бр. 50 приказане су средње вредности свих испитиваних антиоксидационих параметара (SOD, GSH, CAT) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације линолеинском киселином. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовале вредности SOD-а и CAT са вишим вредностима у групи пацова мушког пола у односу на група пацова женског пола. Вредности GSH-а нису биле значајно промењене поређењем ове две групе.



Графикон бр. 50. Промене антиоксидационих маркера (SOD, GSH, CAT) у лизату еритроцита у групама мушког и женског пола суплементације линолеинске киселине

Линолна масна киселина -група (мужјаци и женке)

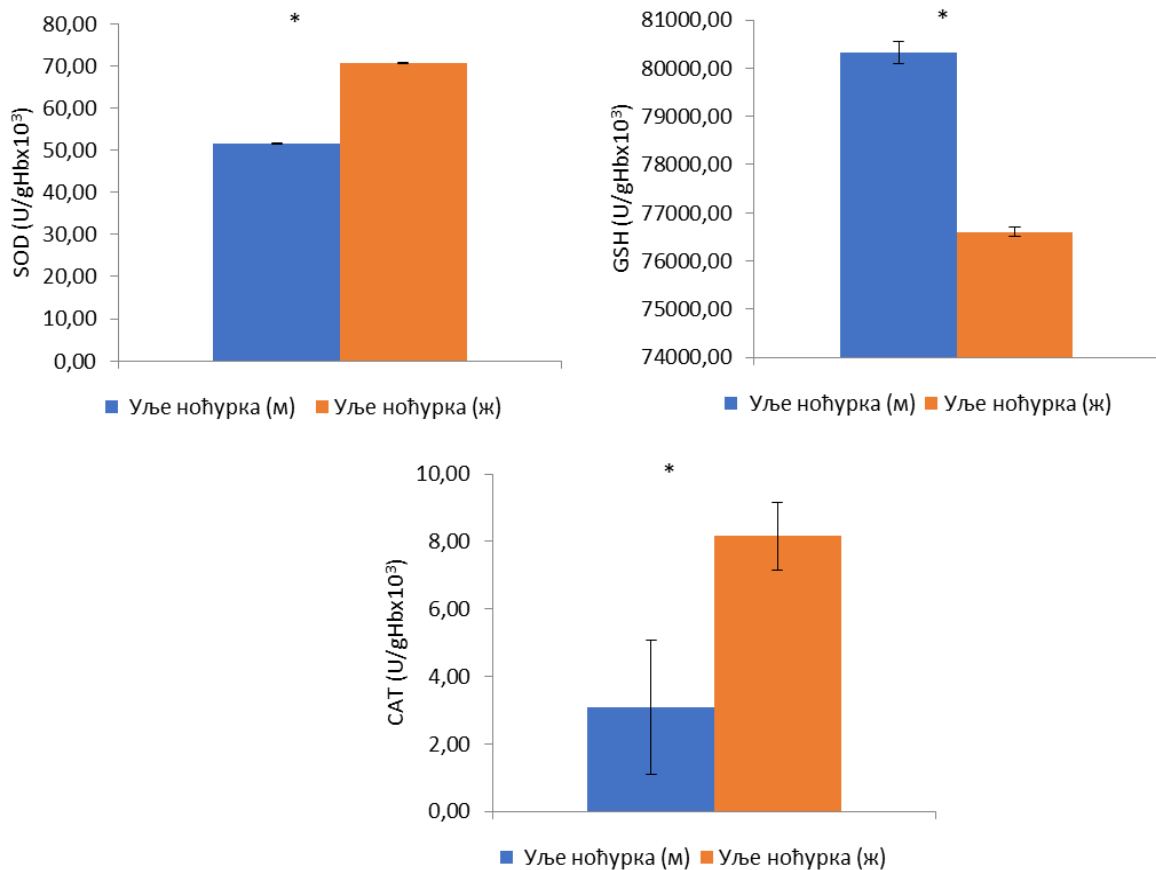
На Графикону бр. 51 приказане су средње вредности свих испитиваних антиоксидационих параметара (SOD, GSH, CAT) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације линолном киселином. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовале вредности SOD-а и CAT са вишим вредностима у групи пацова мушког пола у односу на група пацова женског пола. Поред тога, вредности GSH-а су биле значајно повишене у групи женки поређењем ове две групе.



Графикон бр. 51. Промене антиоксидационих маркера (SOD, GSH, CAT) у лизату еритроцита у групама мушког и женског пола суплементације линолне киселине

Уље ноћурка -група (мужјаци и женке)

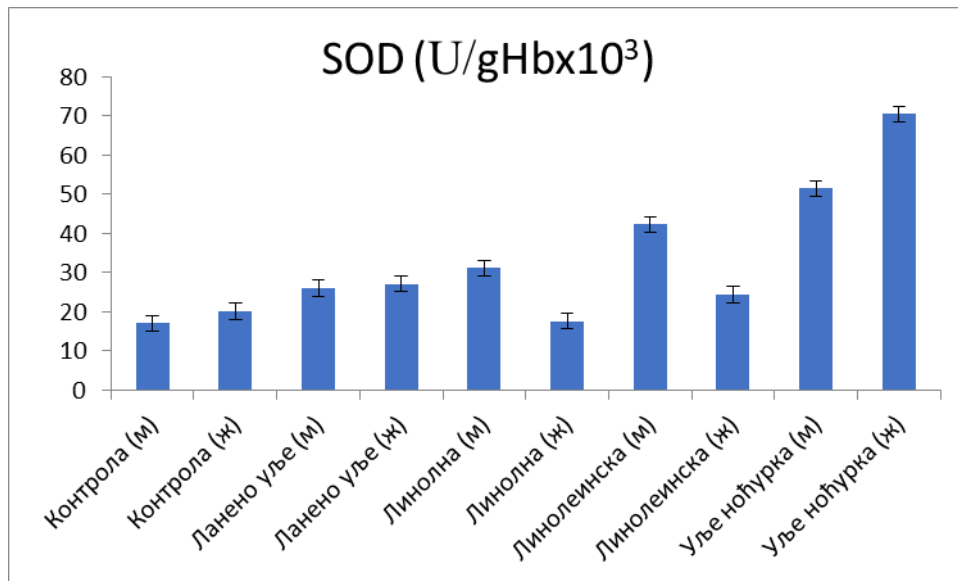
На Графикону бр. 51 приказане су средње вредности свих испитиваних антиоксидационих параметара (SOD, GSH, CAT) у групама пацова женског и мушког пола након суплементације уљем ноћурка. Поређењем група оба пола, статистички су се значајно разликовале вредности SOD-а и CAT са нижим вредностима у групи пацова мушког пола у односу на група пацова женског пола. Поред тога, вредности GSH-а су биле значајно повишене у групи мужјака поређењем ове две групе.



Графикон бр. 52. Промене антиоксидационих маркера (SOD, GSH, CAT) у лизату еритроцита у групама мушког и женског пола суплементације уљем ноћурка

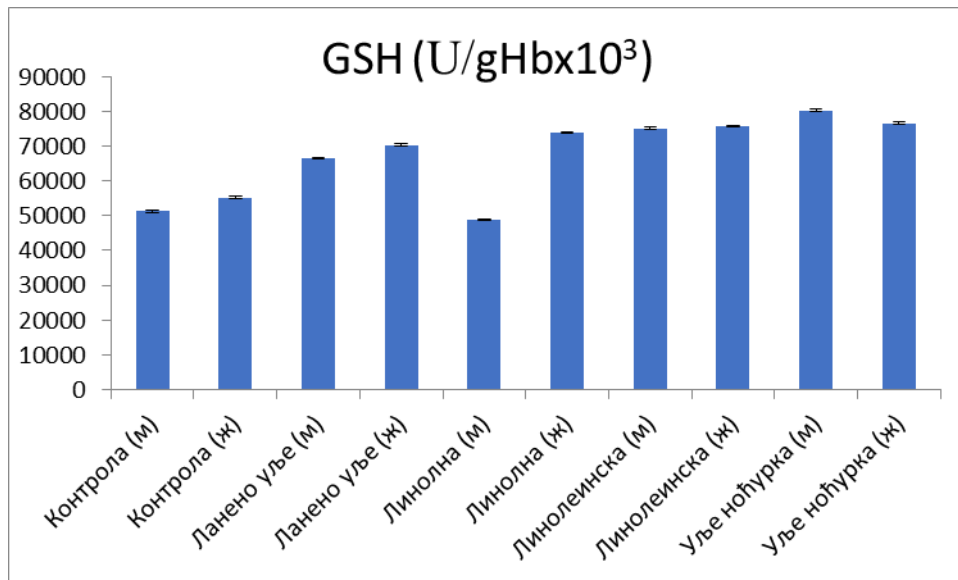
4.7. ЕФЕКТИ ИСХРАНЕ ОБОГАЂЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА АНТИОКСИДАЦИОНЕ ПАРАМЕТРЕ У ЛИЗАТУ ЕРИТРОЦИТА (ПОРЕЂЕЊЕ ГРУПА)

На Графикону бр. 53 приказане су средње вредности супероксид дисмутазе у свим испитиваним групама. Примећено је доминантно повећање овог маркера у групи које су третиране уљем ноћурка и линолеинском киселином.



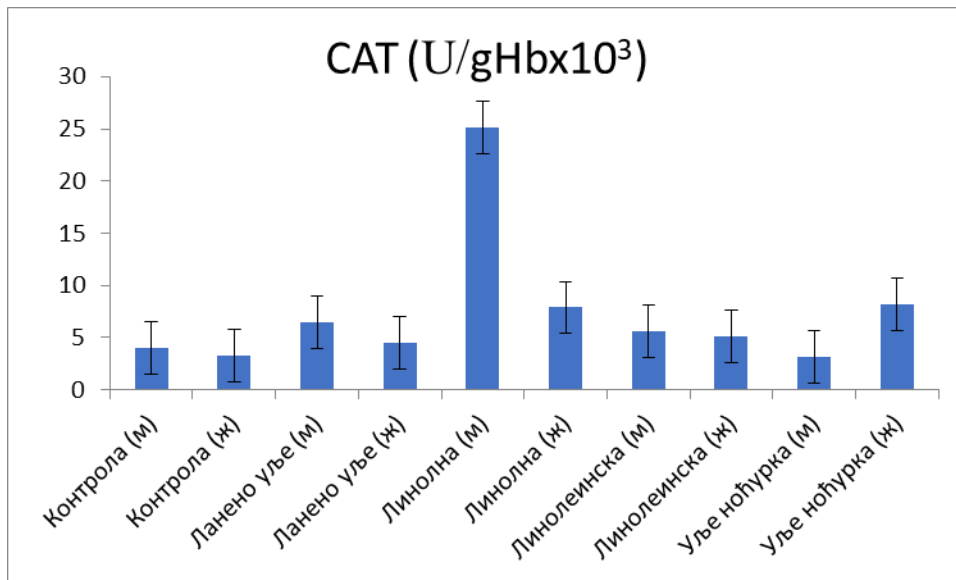
Графикон бр. 53. Приказ вредности SOD-а у лизату еритроцита у односу на групу

На Графикону бр. 54 приказане су средње вредности редукованог глутатиона у свим испитиваним групама. Примећено је доминантно повећање овог маркера у групи које су третиране уљем ноћурка и линолеинском киселином у односу на контролне групе.



Графикон бр. 54. Приказ вредности GSH-а у лизату еритроцита у односу на групу

На Графикону бр. 55 приказане су средње вредности каталазе у свим испитиваним групама. Примећено је доминантно повећање овог маркера у групи које су третиране уљем линолном киселином у односу на друге експерименталне и друге контролне групе.



Графикон бр. 55. Приказ вредности CAT у лизату еритроцита у односу на групу

На Табели бр. 19 приказане су статистички значајне разлике између испитиваних маркера система антиоксидационе заштите у поређењу са контролним групама.

Група	SOD (U/gHb x 10 ³)		GSH (U/gHb x 10 ³)		CAT (U/gHb x 10 ³)	
	X	SD	X	SD	X	SD
Контрола (м)	17,12	1,46	51236,97	225,89	3,98	0,41
Контрола (ж)	20,12	1,87	55263,12	302,56	3,23	0,32
Ланено уље (м)	26,05 [§]	1,22	66498,25 [§]	223,5	6,45 [§]	0,59 [§]
Ланено уље (ж)	27,13 [§]	1,11	70336,06 [§]	224,6	4,50	0,78 [§]
Линолна (м)	31,20 [§]	3,12	48854,01*	198,7	25,13 [§]	0,99 [§]
Линолна (ж)	17,64*	2,58	73868,61 [§]	156,7	7,88 [§]	1,01 [§]
Линолеинска (м)	42,33 [§]	1,25	75144,53 [§]	221,3	5,55 [§]	0,75 [§]
Линолеинска (ж)	24,42 [§]	1,23	75748,91 [§]	298,6	5,05 [§]	0,36
Уље ноћурка (м)	51,55 [§]	2,56	80317,46 [§]	221,7	3,08*	0,54 [§]
Уље ноћурка (ж)	70,55 [§]	1,23	76605,82 [§]	236,9	8,17 [§]	0,95 [§]

Табела бр. 19. Приказ вредности антиоксидационих параметара у контролним и експерименталним групама оба пола. Резултати су приказани у виду средњих вредности ± стандардна девијација (X±SD), при чему знак * представља статистички значајно смањење вредности параметра у односу на контролну групу, док знак § представља статистички значајно повећање у односу на контролну групу

5.

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

Циљ овог истраживања био је испитати хроничне ефекте примене исхране обogaћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда, коронарни проток и оксидо-инфламацијске параметре старих пацова.

5.1. ЕФЕКАТ ИСХРАНЕ ОБОГАЋЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 НА КОНТРАКТИЛНОСТ И ФУНКЦИЈУ МИОКАРДА

У првом делу истраживања испитивали смо хроничне ефекте примене исхране обogaћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда изолованог срца пацова. Поред тога, посебан акценат у овом истраживању стављен је на компарацију хроничних ефеката примене исхране обogaћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда изолованог срца пацова, као и испитивање утицаја на коронарну циркулацију изолованог срца пацова. Подсећања ради, испитивање је спроведено на старим животињама које биле повдргнуте исхрани и суплементацији омега-3 или омега-6 масним киселинама (алфа-линоленска илин линолна масна киселина) у трајању од 6 недеља након чега су се спровела истраживања на изолованом срцу. Мењањем коронарног перфузионог притиска ($CPP=40-120 \text{ cmH}_2\text{O}$) у току експеримента на изолованом срцу, имитирали смо физиолошке услове али и патолошке, односно стања хипероксије и хипоксије. При таквим променама притиска и у односу на претходну хроничну суплементацију, пратили смо промене функције миокарда код сваке групе одвојено али и поређењем свих група које су биле изложене некој суплементацији са групама без суплементације (контролне групе). Још један важан аспект студије је испитивање потенцијалних разлика у одговору на омега-3 или омега-6 масне киселине у односу на пол, о којима се врло мало зна.

У нашем истраживању функција срца је процењена на основу праћења и анализе кардиодинамике леве коморе као морфолошки и функционално доминантне срчане шупљине, директним мерењем кардиодинамских параметара, показатеља функције миокарда: максималну ($dp/dt \text{ max}$) и минималну ($dp/dt \text{ min}$) стопу промене притиска у левој комори, систолни (SLVP) и дијатолни притисак (DLVP) леве коморе, и срчану фреквенцу (HR). $dp/dt \text{ max}$ и $dp/dt \text{ min}$ су параметри који означавају величину (стопу) промене притиска (mmHg) у левој комори у функцији времена (током једне секунде). У

зависности од фазе срчаног циклуса, ове варијације притисака су на нашем апарату представљене као максималне ($dp/dt \max$), током систоле, и минималне ($dp/dt \min$).

Посматрајући сваку групу одвојено и анализирањем процеса ауторегулације у свим групама појединачно, приметили смо интересантне резултате. Исхрана обogaћена ланеним уљем у трајању од шест недеља индуковала је значајно повишење вредности кардиодинамских параметара ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP и HR) код мужјака у експерименталном периоду, са израженијим повећањем у групи женки. Коронарни проток није био значајно промењен. Хронична суплементација линолеинском киселином довела до сличних промена кардиодинамских параметара у експерименталном периоду (Графикони 3-6).

Линолна масна киселина након суплементације у трајању од 6 недеља узроковала је високо статистички значајна повећања кардиодинамских параметара ($dp/dt \max$, $dp/dt \min$, SLVP, DLVP и HR) у експерименталном периоду у групи мужјака, док су повећања била мање изражена у групи женки (Графикони 7 и 8). Посматрано унутар групе мужјака која је била изложена исхрани обogaћеној уљм ноћурка, примећена су значајна повећања свих кардиодинамских параметара као и коронарног протока, за разлику од осталих група, док се у групи женки доминантно издвојило повећање срчане фреквенце након суплементације уљем ноћурка (Графикони 9 и 10). Дакле, до поремећаја ауторегулације и до изражених иррегуларних промена довела је примена омега-6 масних киселина са поремећајем коронарне циркулације, док омега-3 масне киселине су довеле до промена кардиодинамике али без оштећења коронарне циркулације.

До данас, постоји мали је број *in vitro* студија које су на сличан начин испитивале ефекте масних киселина на функционалност миокарда. Студије су се углавном бавиле испитивањем појединачних ефеката масних киселина односно врло је мало студија које су упоређивале ефекте различитих масних киселина на моделу изолваног срца. *Kikoba* и сарадници (134) су у својој експерименталној студији испитивали ефекте омега-3 полинезасићених киселина (алфа-линолеинску масну киселину) на миокардну дисфункцију путем примене биљног уља у трајању од 4 недеље. *Wistar* албино пацови су били изложени хроничном третману PUFAs након чега су на моделу исхемије/реперфузије пратили кардиопротективни ефекат поменуте киселине. Алфа-линолеинска масна киселина као прекурсор еикозапентаеноинске киселине је

примењивана као дијететски суплемент у дози од 0.1 mg/kg/дан. Резултати су показали скраћење периода до функционалног опоравка након реперфузије, бржи опоравак миокардна у реперфузији, као и смањење учесталости аритмија након суплементације алфа-линолеинске киселине. У овој студији, наглашена је у улога леукотриена C4 и тромбоксана B2 чија је продукција била три пута редукована, као улога реактивних кисеоничних врста и липидне пероксидације која била такође редукована а активност супероксид дисмутазе и каталазе повишена. Folino и сарадници (134) су испитивали ефекат алфа-линолеинске киселине на протекцију након повреде узроковане бета-адренергичком претераном стимулацијом. Тачније, на моделу изопротеренолом-индуковане миокардне повреде тестирана на протективна улога поменуте киселине *ин витро* на кардиомиоцитима. Путем исхране обогаћене алфа-линолеинском киселином у трајању од 60 дана пратили су хемодинамске и хистолошке промене срца. Алфа-линолеинска киселина је смањила оштећење настало изопротеренолом и спречило настанак фиброзе ткива, и овим потврдили кардиопротективно дејство ове омега-3 киселине.

Kang (136) наглашава способност омега-3 масних киселина у редукацији поремећаја ритма у појаве аритмија које могу бити и фаталне. Испитивали су ефекте различитих дуголанчаних плинезасићених масних киселина на контрактилност кардиомиоцита, ЕРА, ДНА, линолне и линолеинске, у дози од 2-10 μM . Доказали су да омега-3 масне киселине значајно редукују контрактилност и стопу контракције, док линолна је дала супротан ефекат. Интересантно је да је ефекат омега-3 масних киселина у овој студији био сличан ефекту лидокаина, иначе снажног антиаритмика, па је закључено да омега-3 масне киселине могу значајно смањити учесталост тахиаримија и других леталних аритмија вероватно посредством регулације концентрације екстрацелуларног калцијума.

Са друге стране, број студија које су испитивале ефекат омега-6 масних киселина искључиво на контрактилност у *ин витро* условима су лимитиран. Једна од ретких студија је студија спроведена од стране *Mitchell*-а (137). На основу претходних студија које су потврдиле да високе дозе линолне киселине на псима у *ин vivo* условима доводе до токсичних кардиоваскуларних ефеката је спроведена и ова студија. Дакле, ова студија је тестирала хипотезу да линолна киселина има директе негативне ефекте на изоловано срце методом по Лангендорфу. Срца су била изложена линолној киселини у дози од 30 μM у трајању од 60 минута, након чега је уследио период опоравка у

трајању од 30 минута. Закључено је да једнократна примена линолне киселине чак и у високим дозама нема токсичан нити негативан ефекат на функционалне и хемодинамске промене срца. Са друге стране, друге студије наводе на другачије закључке. *Saddik* у својој студији је потврдио негативне ефекте линолне киселине на контрактилност миокарда у поређењу са арахидносом киселином.

Дакле, сви резултати наведених студија су у сагласности са нашим резултатима, и недвосмислено је јасно да омега-3 и омега-6 масне киселине при хроничној употреби дају ефекте, и то супротне, док при акутној примени вероватно немају ефекат на контрактилност миокарда.

Посматрајући сваки кардиодинамски параметар изолованог срца одвојено, упоредили смо ефекте исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масних киселина на функционалне параметре изолованог срца. На овај начин смо прецизније установили ефекте испитиваних киселина и јасније упоредили њихове појединачне ефекте на функцију миокарда.

$dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ су значајно били снижени након суплементације алфа-линолеинском киселином у односу на контролну групу али у односу на све остале групе, док је суплементација линолном и уљем ноћурка довела до повишења ових параметера у односу на контролну групу али и у односу на суплементацију омега-3 масним киселинама (Графикони 11 и 12). Вредности SLVP и DLVP имају сличну динамику промена као и претходно поменути параметри контрактилности миокарда, са доминантним повећањем систолног и дијастолног притиска леве коморе након суплементације линолне (омега-6) масне киселине (Графикони 13 и 14). Вредности HR и CF се не разликују значајно поређењем група, али је важно приметити повећање коронарног протока при највишим коронарним перфузионим притисцима након примене линолне киселине (Графикони 15 и 16). У групи мужјака, поређењем ефеката омега-3 и омега-6 масних киселина на кардиодинамске параметре изолованог срца приметили смо значајна повећања $dp/dt \max$ и $dp/dt \min$ под утицајем уља ноћурка (омега-6) у односу на контролну групу али и све остале групе, а значајни смањење ових параметара под утицајем омега-3 масних киселина (Графикони 17 и 18). Затим, сличан тренд прати и следеће параметре функције леве коморе, SLVP и DLVP, који су значајно повишени под утицајем суплементације уља ноћурка (омега-6) а смањени по утицајем линолеинске (омега-3) масне киселине у односу на контролну и остале групе

(Графикони 19 и 20). На крају, параметри HR и CF, нису значајно промењени, сем коронарног протока под утицајем омега-6 масних киселина које смо применили у виду суплементације уља ноћурка (Графикони 21 и 22). Генерално посматрано, омега-3 масне киселине узроковале су смањење контрактилности смањењем скоро свих кардиодинамских параметара без утицаја на коронарни проток и коронарну циркулацију, док су омега-6 масне киселине узроковале повећање контрактилности и поремећај коронарног протока и коронарне циркулације код пацова мушког и женског пола (Графикони 23-28).

Дакле, наши резултати су показали значајне резултате врло прецизно и јасно. Претходне студије описују сличне резултате у погледу разлике и утицаја на функцију миокарда како у *in vitro* тако и у *in vivo* условима.

Patten и сарадници су потврдили значајну разлику у ефектима омега-3 и омега-6 на контрактилност изолованог органа (139). Поређењем ефеката линолне и алфа-линолеинске масне киселине на контрактилност илеума, закључили су да линолна масна киселина значајно редукује контрактилност и тиме остварује протективне ефекте не изоловани орган и његову функцију. *Demaison* и сарадници су истраживали ефекте омега-3 и омега-6 киселина на хемодинамске параметре утренираних и седентарних пацова, како би се установиле потенцијалне промене функције леве коморе срца под утицајем масних киселина, и тиме оправдала примена полинезасећених масних киселина као суплементација код спортиста али и примена есенцијалних масних киселина у снижавању укупног кардиоваскуларног ризика. Трениране животиње су биле подвргнуте умереном физичком тренингу у виду трчања у трајању од 60 минута током три недеље. Након тога, животиње би се жртвовале и спровела испитивања на изолованом срцу. Код седентарних животиња омега-3 масне киселине су довеле до снижења срчане фреквенце, док код утренираних није било промена. Закључили су да су омега-3 масне киселине али и омега-6 истовремено, неопходне за правилну адаптацију срца умереном физичком тренингу. Контрактилност срца није била значајно нарушена, али васкуларна адаптација јесте нарочито при примени омега-6 масне киселине. Комбинација омега-3 масне киселине уз умерену физичку активност је закључак који су ставили у први план и та комбинација може бити ефикасна у превенцији хипертензије и кардиоваскуларних болести.

Pietri и сарадници су испитивали ефекте егзогених омега-3 и омега-6 масних киселина на хемодинаске промене и перфузију срца (141). Циљ је био испитати ефекат различитих дуголанчаних киселина као што су олеинска, линолеинска, алфа и гама-линолеинска) на функцију изолованог срца пацова у условима аноксије и реоксигенације. Изолована срца су перфундована различитим испитиваним масним киселинама при чему је константно праћена вентрикуларна функција срца. Срца перфундована олеинском киселином показала су депресивну вентрикуларну функцију, а кардиопротективно су деловале алфа-линолеинска и линолна киселина. Заправо ова студија је нагласила различитост у хемијској структури масних киселина и њиховој могућности да побољшају или погоршају миокардну функцију, а свака промена се објашњава метаболичким одговором на примењену масну киселину.

Дакле, несумњиво је јасно да хронична примена линолне и алфа-линолеинске киселине имају ефекат на контрактилност изолованог срца пацова, и да се такви ефекти на функцију миокарда помињу и у другим студијама и објашњавају и кроз друге експерименталне моделе. Јасно је и да су омега-3 масне киселине кардиопротективне и да смањују котрактилност миокарда, а да омега-6 масне киселине повећавају параметре контрактилности срца што некада може имати негативне ефекте на функцију срца.

Међутим, од суштинског је значаја открити потенцијалан механизам којим се остварују овакви ефекти егзогених есенцијалних масних киселина на кардиоваскуларни систем, и конкретно на контрактилност миокарда. Механизми који се у литератури описују су поремећај концентрације калцијума у ванћелијском простору, претерана адренергичка стимулација рецептора у срцу али и последично вазодилататроно дејство неких масних киселина којима је посредован неки ефекат на функцију леве коморе. Поред тога, постоје различите теорија да омега-6 масне киселине у поређењу са омега-3 масним киселинама повећавају производњу простагландина серије 2, и леукотриена серије 4. Како ови наведени медијатори имају више изражено про-инфламаторно дејство, омега-6 масне киселине се теоретски сврставају у агенсе који повећавају кардиоваскуларни ризик. Међутим, кохортна клиничка истраживања ипак описују и говоре о мањем штетном ефекту омега-6 масних киселина и заступају концепт правилног односа уноса омега-3 и омега-6 масних киселина који може бити од пресудног значаја. Омега-3 масне киселине из рибљег уља инхибирају формирање цитокина и еикосаноида, конкуренцијом са n-6 масним киселинама за уградњу у ћелијске фосфолипиде и за везивно место циклооксигеназе и липоксигенезе. Како

омега-3 масне киселине и омега-6 масне киселине конкуришу истим метаболичким путевима, то јест користе исти ензим $\Delta 6$ -дехидрогеназу, тако претерани унос омега-6 у организам доводи до недостатка омега-3 и “добрих” еикосаноида, па се тако нормални инфламаторни процеси којима управљају “лоши” еикосаноиди претварају у хроничне инфламаторне процесе (67-79).

Правилан однос између омега-3 масне киселине и омега-6 масних киселина није важан само за здраво срце и крвоток, него и за опште телесно и психичко здравље и имунитет. Чак је важан и за постизање и одржавање нормалне телесне тежине, јер смањује сигнале у телу који стварају масне залихе, а побољшава и осетљивост према инсулину чиме се смањује ризик од настанка дијабетеса (98-101).

5.2. ЕФЕКАТ ИСХРАНЕ ОБОГАЋЕНЕ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 МАСНИМ КИСЕЛИНАМА НА РЕДОКС СТАТУС

Како би смо прецизније испитали механизме којима је посредована промена контрактности и коронарне циркулације на изолованом срцу пацова под утицајем омега-3 и омега-6 масних киселина (линолеинска и линолна масна киселина), испитивали смо активност про-оксидационих и антиоксидационих маркера. Циљ је дакле био испитивање хроничних ефеката примене исхране обogaћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на различите параметре оксидационог стреса (липидне пероксиде (TBARS), азот моноксид (NO), супероксид анјон радикал (O_2^-), и водоник пероксид (H_2O_2)). Затим циљ је био и испитивање улоге различитих параметара антиоксидативног система заштите (редуковани глутатион (GSH), супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT)) на кардиодинамске параметре срчаног рада и коронарну циркулацију у условима хроничне примене исхране обogaћене омега-3 и омега-6 масним киселинама, као и испитивање потенцијалних механизма путем којих омега-3 и омега-6 масне киселине самостално или у виду исхране обogaћене омега-3 и омега-6 масним киселинама учествују у хомеостази срчаног рада.

Као што је објашњено у уводном делу докторске дисертације, оксидативни стрес је дефинисан као неравнотежа између производње реактивних врста и одбране од стране антиоксиданата. Он може бити резултат повећане производње реактивних врста и смањеног нивоа антиоксиданаса. Различите студије показују да редокс реакције могу бити кључни фактор за настанак атеросклерозе, васкуларне хипертрофије и тромбозе под утицајем масних киселина (100-120).

Одређивањем нивоа про-оксидантних молекула (азот монооксида у форми нитрита (NO_2^-), супероксид анјон радикала (O_2^-), и водоник пероксида (H_2O_2)) и маркера оксидационих оштећења (индекса липидне пероксидације мереног као (TBARS)) у коронарном венском ефлуенту и у плазми, смо желели да утврдимо да ли примена омега-3 и омега-6 изазива негативна дејства на срце путем повећане продукције слободних радикала или је реч о неким другим механизмима? Поред тога, циљ је испитати да ли примена ових есенцијалних масних киселина утичу на смањење оксидативним-стресом индукованог оштећења функције срца и у којој мери, што смо проверили и мерењем маркера АОС (CAT, SOD и GSH).

У нашем истраживању, пратили смо динамику прооксидационих маркера унутар сваке групе појединачно, а затим упоредили ефекте различитих масних киселина на исте параметре.

Генерално посматрано, алфа-линолеинска киселина је утицала на промену прооксидационих параметара у ефуенту повећањем нивоа O_2^- , H_2O_2 и TBARS-а у експерименталном периоду код мужјака и женки (Графикон 33 и 34), као и суплементација ланеним уљем (Графикони 31 и 32), док је примена линолне киселине узроковала такође повећане вредности O_2^- , H_2O_2 и TBARS-а у експерименталном периоду али у знатно већем обиму (Графикони 35 и 36). Најизраженије промене узроковала је примена исхране обogaћене уљем ноћурка, где је примећена промена свих прооксидационих маркера O_2^- , H_2O_2 , TBARS-а и NO_2^- (Графикони 37 и 38). Дакле, мерењем концентрација наведених маркера у перфузату, ефекти уља ноћурка као уља богатог омега-6 масним киселинама је испољило најизражнији негативан ефекат.

Поређењем група, највише вредности O_2^- , H_2O_2 и TBARS-а узроковала је суплементација линолном и линолеинском киселином, док вредности азот монооксида нису значајно различите, поређењем група (Графикони 39-42).

Посматрајући вредности оксидационих маркера у крви и анализирањем редокс статуса, приметили смо мало другачије резултате у односу на вредности ових маркера из перфузата. Дакле, исхрана обogaћена уљем ноћурка након 6 недеља примене је довела до значајног повишења H_2O_2 , TBARS-а и NO_2^- у односу на све остале групе, док је суплементација линолеинском и линолном допринела статистички значајном смањењу ових маркера у односу на контролне и све остале експерименталне групе. Значајних разлика у односу на пол није било (Табела 18).

Ефекти n-3 полинезасићених масних киселина на радикале кисеоника и антиоксидансе су пријављени као главни фактори ових дијететских суплемената (65-90). Масне киселине у мембранским липидима су подложне оксидацији слободним радикалима који могу бити генерисани било ксенобиотицима било нормалним аеробним ћелијским метаболизмом, што доводи до формирања липидних пероксида. Сматра се да неконтролисано формирање липидних пероксида представља један од водећих механизма ћелијског оштећења, као и да води до настајања патолошких стања попут инфламације и кардиоваскуларних болести (110). Додатно, слободни радикали интеракцијом са липидима мењају њихову структуру, паковање и дистрибуцију у ћелијској мембрани, што доводи до смањења мембранске флуидности, која се доводи у везу са развојем хипертензије и кардиоваскуларних болести.

Утврђено је и да висок однос n-6 и n-3 масних киселина у мембрани еритроцита промовише инфламацију и развој хроничних болести, као и да његово смањење делује супресивно на патогенезу кардиоваскуларних и других болести.

Студије које су такође испитивале ову проблематику, потврђују наше резултате.

Једна од последњих студија која се бавила овом темом и изнела најновија сазнања је студија спроведена од стране *Zanetti* –а (142). Мерењем нитротирозина у ткиву аорте након суплементације омега-3 масних киселина, закључено да је примена ових масних киселина смањују ендотелну дисфункцију посредство различитих механизма. Први је инкорпорирање у мембране чиме се подстиче низ каскадних реакција и активација сигналних путева. Активација ових путева доводи повећане биорасположивости азот монооксида као снажног вазодилататора којим се остварује кардиопротективна улога омега-3 масних киселина. Оваква сазнања потврђују епидемиолошке студије које наглашавају смањењу стопу морбидитета и mortalитета од кардиоваскуларних болести код особа које узимају суплементацију есенцијалним омега-3 масним киселинама (143-145). Супротно, у нашем истраживању вредности азот монооксида нису биле значајно промењене под утицајем линолениске у ланеног уља (омега-3) што нас наводи на размишљање. Један од потенцијалних разлога за различитост и некозистентност наших резултата са резултатима поменуте студије је тај, што смо истраживање спровели у ин витро условима, за разлику од поменуте студије која је спроведена ин vivo, што може бити разлог нижих концентрација азот монооксида које смо ми добили, јер је познато да овај маркер има кратко време разградње. Други разлог је, мерење вредности азот монооксида индиректно мерењем нитротирозина и то у хомогенату аортног ткива, што наводи на објашњење ове разлике у добијеним резултатима.

Оно што је за нас доказ прооксидационе активности испитиваних масних киселина у нашој студији је свакако мерен индекс липидне пероксидације у виду TBARS-а. Липидна пероксидација је означена као главни механизам оштећења ћелија у многим биолошким системима биљног и животињског порекла. Овом процесу подлежу како липиди у биосистемима, тако и липидима у храни. Механизам ове ланчане реакције укључује стварање процеса липидних пероксида нападом слободних радикала на липиде (150-155) Основни супстрат за оксидативно оштећење липида представљају полинезасићене масне киселине (Polyunsaturated Fatty Acids -PUFA) у фосфолипидима и гликолипидима, као и холестерол у биолошким мембранама. PUFA садрже најмање

две двоструке угљеник-угљеник везе између којих налази метиленска група која садржи посебно реактивне водоникове атоме. Липидна пероксидација се у биолошким системима може одиграти ензимским (под дејством липооксигеназе) и неензимским путем (156-162). Уколико се оксидација одвија у присуству атмосферског кисеоника назива се аутооксидација. Незасићене масне киселине као што су олеинска, линолна (линолеинска) и линоленска су липиди који учествују у механизму оксидације (146-150).

Ramaiyan и сарадници су испитивали ефекте омега-3 и омега -6 на оксидативни статус пацова различите старости (163). Пацови Вистар албино женског пола били су изложени различитим масним киселинама у трајању од 60 дана након чега су мерени оксидативни маркери, липидна пероксидација, азот моноксид, али и каталаза, супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза. Резултати су показали смањење оксидативним маркера а повећање антиоксидативних под утицајем омега-3 масних киселина у поређењу са контролном групом. Главни адут масних киселина био је повећање антиоксидативне способности са циљем смањења слободних радикала.

Yang у низу својих истраживања описао је ефекат масних киселина на оксидативни стрес (164-166). Метаболизам липида, инфламација и оксидативни стрес и ендотелна дисфункција су важни чиниоци у патогенези кардиоваскуларних болести, а који може бити поремећен неуравнотеженим односом и уносом омега-6/омега-3 полинезасићених масних киселина (164). Ова студија је испитивала 1:1, 5:1 и 20:1 однос омега-6/омега-3 на факторе кардиоваскуларног ризика на пацовима. Примећено је да однос 20:1 значајно повећава серумске нивое е-селектина, von Willebrand фактора (vWF) као и вредности свих параметара оксидативног стреса у поређењу са осталим групама. Са друге стране, однос PUFA 1:1 значајно је снизио ниво липидне пероксидације (малонилдиладеhid) као и вредности vWF-а. Дакле и ова студија је показала бенеитне ефекте омега-3 и делом омега-6, али само у тачно одређеном односу, односно да односи 1:1 и 5:1 имају бенефитан ефекат а 20:1 има супротан ефекат на факторе ризика за кардиоваскуларне болести и снижавање оксидативног стреса.

Yadav је на моделу стрептозотоцином-индукованог дијабетеса испитивао ефекте примене омега-3 и омега-6 масних киселина на оксидативни стрес (167). Познато је да је дијабетес мелитус снажан генератор слободних радикала и да је у таквим стањима индиковано средство које ће неутралисати генерисани оксидациони стрес. Обзиром је да ова болест позната по својим озбиљним компликацијама које треба спречити онда је јасно колика је важност антиоксидативне суплементације. Вистар албино пацови

мушког пола, са индукованим дијабетесом тип-1, су били изложени третману рибљим уљем у трајању од 30 дана у дози од 0.5 g/kg/дан, након чега су се пратили параметри липидне пероксидације и антиоксидативног система заштите. Закључено је да омега-3 масне киселине којих има у високом проценту у рибљем уљу утичу на смањење липидне пероксидације па се из тога разлога могу користити као адјувантна терапија код пацијената са хроничним болестима као што је шећерна болест.

И клиничке студије потврђују бенефитан ефекат омега-3 масних киселина, али и делимично омега-6, наглашавајући значајност идеалног односа истовременог уноса омега-3/омега-6 полинезасићених масних киселина оралним путем (167-175). Клиничке студије наглашавају значајност употребе суплемената на бази есенцијалним+х полинезасићених масних киселина у превенцији хронични болести али и превенцији компликација већ насталих болести као што су гојазност, хроничне болести бубрега, неуропатије и деменције, хронична неуролошка обољења, метаболичке болести, инфламаторне болести гастроинтестиналног и респираторног тракта (167-175).

Како би се спречила, оштећења која настају услед деловања слободних радикала кисеоника ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2), развио се антиоксидациони заштитни систем, који представља заштиту биолошких система. Ензимска антиоксидативна заштита укључује ензиме супероксиддисмутазу (SOD), каталазу (CAT) и глутатион-пероксидазу (GPx). Наведени антиоксиданси делују тако што блокирају започињање ланчане реакције слободних радикала и, самим тим, онемогућавају пратећу пероксидацију липида (99), јер сваки од њих детоксикује неког припадника ROS.

У нашој студији, ефекти исхране обогаћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на антиоксидационе параметре су били различити. Примећене су разлике у неким вредностима ових маркера у односу на пол, међутим такве разлике не можемо са сигурношћу приписати ефектима масних киселина, већ природним карактеристикама и предиспозицијама мужјака и женки (Графикони 48-52). Међутим, поређењем међусобних ефеката масних киселина, примећено је значајно одступање ефеката линолне киселине (омега-6) и суплемента уља ноћурка (омега-6 преобладајуће) у односу на ефекте осталих масних киселина. Дакле, приметно је значајно смањење GSH, SOD-а и повећање CAT под утицајем линолне киселине, и значајно повећање под утицајем ноћурка свих антиоксидационих параметара (Графикони 53-55). Међутим, занимљиво је да уколико ефекте свих масних киселина код оба пола упоредимо са контролним групама односно групама које нису биле изложене суплементацији,

приметно је повећање свих антиоксидационих маркера под утицајем и омега-3 и омега-6 масних киселина и то по неколико пута (Табела 19). Дакле, уз доминантан ефекат омега-6 масних киселина, не можемо занемарити ни антиоксидациони ефекат омега-3 масних киселина који је итекако статистички значајан.

Антиоксидативна активност омега-3 масних киселина се помиње и у уводном делу ове докторске дисертације као податак који је познат од раније. Дакле, n-3 PUFA су познате као агенски који утичу на експресију и активност NADPH-a па тиме позивно мењају антиоксидативни потенцијал ћелије и организма, редукујући настали оксидативни стрес. Како је оксидативни стрес и посредовано оштећење крвних судова саставни део патофизиологије кардиоваскуларних болести а пре свега исхемијске болести миокарда, онда је несумњив значај омега-3 масних киселина (176-189). Затим антиинфламаторна активност омега-3 и проинфламаторна активност омега-6 масних киселина има важну улогу у оксидо-инфламацијским реакцијама и описује се као један сложени механизам путем којег линолна и линолеинска масна киселина су остварили своје ефекте. Дакле, полинезасићене масне киселине су важни састојци фосфолипида свих ћелијских мембрана. Повећан дијететски унос n-3 полинезасићених масних киселина повећава концентрацију у сложеним липидима (триглицеридима, фосфолипидама и естрима холестерола) унутар крвотока и у фосфолипидама у мембрани ћелија и ткива. Тако, након повећаног уноса на пример еикозапентаенске киселине и докозахексаенске киселине, ћелије које су укључене у инфламацију и њихово екстрацелуларно окружење (нпр. крвна плазма) су обogaћене тим масним киселинама које модулирају оксидо-инфламацијски одговор ћелије (190-196).

Са друге стране, у литератури се описују и други фактори који могу утицају на оксидо-инфламацијски одговор организма на суплементацију полинезасићеним масним киселинама. Дакле, у зависности о природних складишта масних киселина у организму разликоваће се и метаболизам есенцијалних масних киселина, чије промене свакако доводе до промене и у њиховој расположивости па и самим ефектима на организам.

У претходним истраживањима се то детаљно описује. Тако, лабораторијске животиње које се хране стандардном храном имају висок садржај арахидонске киселине (20:4n-6) и низак садржај еикозапентаенске киселине (20:5n-3) и докозахексаенске киселине (22:6n-3) у фосфолипидама лимфоцита и макрофага (нпр. перитонеалне, алвеоларне и Купферове ћелије). Међутим, животиње на дијети чија храна садржи рибље уље, које садржи еикозапентаенску и докозахексаенску киселину резултира већим садржајем ових масних киселина у свим ови типовима ћелија са

пратећим смањењем у садржају арахидонске киселине (197). Слично томе људи који конзумирају типичну западну дијету која садржи око 10-20% масних киселина као што су арахидонска киселина, и око 0,5-1% еикозапентаенске киселине и око 2-4% докозахексаенске киселине другачије реагују на унос такве исхране (196-199). Ова различита дистрибуција масних киселина у организмима и ткивима одражава чињеницу да је садашњи унос n-3 незасићених масних киселина низак код већине појединаца који живе у западним земљама. Састав масних киселина ових ћелија може бити модификован повећањем уноса n-3 масних киселина (200) при чему долази до дозно зависног одговора у року од неколико дана до неколико недеља. У оквиру око 8 недеља добија се ново равнотежно стање састава ћелија, док промене у серуму могу бити забележене 4 недеље пре тога. Повећање садржаја n-3 полинезасићених масних киселина ћелијске мембране јавља се на рачун n-6 полинезасићених масних киселина, посебно арахидонске киселине. Недавна студија је показала да уље добијено кроз исхрану из лососа доводи до већег пораста еикозапентаенске киселине/ докозахексенске киселине у поређењу са уљем бакалара (201). Додатно, ове масне киселине се лако доствљају из капсула рибљег уља у транспортни систем (липиди крви), функционалне јединице (ћелија и ткива) и складишта (масно ткиво) у телу. Међутим, док додатак исхрани са различитим врстама незасићених масних киселина доводи до промена у ћелијским мембранама, ефекти ових промене на формирање еикосаноида и других анти-инфламаторних функција ћелија не корелира рутински са променом у укупним масним киселинама мембране. Недавни извештај сугерише да овај резултат може бити повезан са поделом полинезасићених масних киселина у органелама и унутар ћелијских мембрана (202, 203).

Антиинфламаторни ефекат омега-3 масних киселина је повезан са инхибицијом активности Т лимфоцита и инхибицијом катаболичких ензима (202, 203). У вези са антиинфламаторним ефектом је и антиоксидативна активност есенцијалних масних киселина, линолне и линолеинске, чија дозирања употреба у правилној размери може имати бенефитни ефекат на кардиоваскуларни систем, смањујући продукцију слободних радикала и повећавајући активност антиоксидативних ензима заштите.

Оно што треба нагласити је то да смо у нашем истраживању користили уље лана које садржи смешу масних киселина, првенствено полинезасићених, од којих је најзаступљенија ω -3 α -линоленска киселина (51.9-55.2%), а затим олеинска (18.5-22.6%), линолна (14.2-17%), палмитинска (око 7%) и стеаринска киселина (3.4-4.6%).

Према томе, однос омега-3 према омега-6 у нашем истраживању 1:3,3 (55%:17%) у корист омега-3 масних киселина. Са друге стране, главни састојак уља ноћурка су ω -6 полинезасићене масне киселине (82%) и то линолна (73%) и алфа-линоленска (9%), док у његов састав улазе и протеини (15%) и угљени хидрати (3%), пи чему је однос омега-3 према омега-6 1:9 (9:73%) у корист омега-6 масних киселина. У складу са тим су и наши резултати, који несумњиво тврде бенефитан ефекат омега-3 масних киселина али делимично и омега-6, при чему је од суштинске важности тачан однос ових антагонистичких масних киселина у суплементи и исхрани. Такође, изузетно је важно нагласити да уз наведене већински заступљене омега-3 и омега-6, присутне су у извесној количини и омега-9 масне киселине, као и неки минерали и витамини, што свакако може утицати на исход у нашим резултатима након суплементације овим биљним уљима, чиме објашњавамо делимичну неусаглашеност наших резултата са резултатима других аутора.

6.

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата нашег истраживања можемо закључити следеће:

1. Хронична примена суплементације алфа-линолеинском киселином остварила је кардиопротективно дејство у односу на примену линолне киселине на моделу изолованог срца пацова.
2. Исхране обogaћена омега-6 масним киселинама утиче негативно на функцију миокарда изолованог срца пацова у односу на исхрану обogaћену омега-3 масним киселинама.
3. Применом хроничне исхране са односом омега-3/омега-6 у нашем истраживању 1:3,3 (55%:17%) у корист омега-3 масних киселина у виду уља ланеног семена, као и примена масних киселина у односу омега—3/омега-6 1:9 (9:73%) у виду уља ноћурка у корист омега-6 масних киселина, показали смо значајне разлике у погледу ефекта на функцију миокарда и редокс статус пацова, са нагласком на кардиопротективно деловање односа 1:3,3.
4. Хронична исхрана обogaћена омега-3 масним киселинама утиче позитивно на редокс статус снижавањем индекса липидне пероксидације и повећавањем свих антиоксидативних параметара.
5. Хронична исхрана обogaћена омега-6 масним киселинама утиче благо негативно уколико се примени самостално (линолна масна киселина), нема негативан ефекат уколико се примени у правилној сразмери са омега-3 масним киселинама (уље лана, 1:3,3) и има изражен негативан ефекат уколико је доминантно заступљена (уље ноћурка, 1:9) на редокс статус пацова.
6. Механизми којима линолеинска киселина остварује кардиопротективно дејство ослањају се на снижење индекса липидне пероксидације, водоник пероксида као повећање активности каталазе, супероксид дисмутазе из интактну коронарну циркулацију
7. Механизми којима линолна киселина остварује кардионегативно дејство ослањају се на повећање супероксид анјон раикала, индекса липидне пероксидације, водоник пероксида као и благо смањење активности каталазе, супероксид дисмутазе уз нарушену коронарну циркулацију.

7.

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Ferlay A, Bernard L, Meynadier A, Malpuech-Brugère C. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie.* 2017; S0300-9084(17)30203-1. doi: 10.1016/j.biochi.2017.08.006.
2. Murakami S. The physiological and pathophysiological roles of taurine in adipose tissue in relation to obesity. *Life Sci.* 2017; pii: S0024-3205(17)30392-2. doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.008.
3. Indelicato S, Bongiorno D, Pitonzo R, Di Stefano V, Calabrese V, Indelicato S, Avellone G. Triacylglycerols (TAGs) in edible oils: Determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. *J Chromatogr A.* 2017 Aug 2. pii: S0021-9673(17)31144-5. doi: 10.1016/j.chroma.2017.08.002.
4. Balk EM, Lichtenstein AH. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Summary of the 2016 Agency of Healthcare Research and Quality Evidence Review. *Nutrients.* 2017 Aug 11;9(8). pii: E865. doi: 10.3390/nu9080865.
5. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes. Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids; National Academy of Sciences: Washington, DC, USA, 2005.
6. Dietary Guidelines for Americans, 2010. Health. gov. Available online: <https://health.gov/dietaryguidelines/dga2010/DietaryGuidelines2010.pdf> (посећено 7. августа 2017).
7. Nordestgaard, B.G. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: New Insights from Epidemiology, Genetics, and Biology. *Circ. Res.* 2016, 118, 547–563.
8. National Institute for Health and Care Excellence. Cardiovascular Disease: Risk Assessment and Reduction, Including Lipid Modification, 2014. National Institute for Health and Care Excellence. Available online: <https://www.nice.org.uk/guidance/CG181> (посећено 27. јула 2017.)

9. Wanders AJ, Zock PL, Brouwer IA. Trans Fat Intake and Its Dietary Sources in General Populations Worldwide: A Systematic Review. *Nutrients*. 2017;9(8). pii: E840. doi: 10.3390/nu9080840..
10. Oscarsson J, Hurt-Camejo E. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: a review. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):149. doi: 10.1186/s12944-017-0541-3.
11. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123:2292–2333.
12. Olano-Martin E, Anil E, Caslake MJ, Packard CJ, Bedford D, Stewart G, et al. Contribution of apolipoprotein E genotype and docosahexaenoic acid to the LDL-cholesterol response to fish oil. *Atherosclerosis*. 2010;209:104–110.
13. Maki KC, Orloff DG, Nicholls SJ, Dunbar RL, Roth EM, Curcio D, et al. A highly bioavailable omega-3 free fatty acid formulation improves the cardiovascular risk profile in high-risk, statin-treated patients with residual hypertriglyceridemia (the ESPRIT trial) *Clin Ther*. 2013;35:1400–1411.
14. Maki KC, Bays HE, Dicklin MR, Johnson SL, Shabbout M. Effects of prescription omega-3-acid ethyl esters, coadministered with atorvastatin, on circulating levels of lipoprotein particles, apolipoprotein CIII, and lipoprotein-associated phospholipase A2 mass in men and women with mixed dyslipidemia. *J Clin Lipidol*. 2011;5:483–492. doi: 10.1016/j.jacl.2011.09.001.
15. Siscovick DS, Barringer TA, Fretts AM, Wu JH, Lichtenstein AH, Costello RB, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135:e867–ee84.
16. Patel AA, Budoff MJ. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on lipoproteins in hypertriglyceridemia. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2016;23:145–149. doi: 10.1097/MED.0000000000000233.

17. Davidson MH, Benes LB. The future of n-3 polyunsaturated fatty acid therapy. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27:570–578. doi: 10.1097/MOL.0000000000000353.
18. de Roos B, Mavrommatis Y, Brouwer IA. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. *Br J Pharmacol.* 2009;158:413–428. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00189.x.
19. Wei MY, Jacobson TA. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Curr Atheroscler Rep.* 2011;13:474–483. doi: 10.1007/s11883-011-0210-3.
20. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol.* 2006;17:387–393. doi: 10.1097/01.mol.0000236363.63840.16.
21. Davidson MH. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* 2006;98:27i–33i. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.12.024.
22. Sanders TA, Sullivan DR, Reeve J, Thompson GR. Triglyceride-lowering effect of marine polyunsaturates in patients with hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis.* 1985;5:459–465. doi: 10.1161/01.ATV.5.5.459.
23. Vidgren HM, Agren JJ, Schwab U, Rissanen T, Hanninen O, Uusitupa MI. Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. *Lipids.* 1997;32:697–705.
24. Plourde M, Chouinard-Watkins R, Rioux-Perreault C, Fortier M, Dang MT, Allard MJ, et al. Kinetics of ¹³C-DHA before and during fish-oil supplementation in healthy older individuals. *Am J Clin Nutr.* 2014;100:105–112.
25. Egert S, Kannenberg F, Somoza V, Erbersdobler HF, Wahrburg U. Dietary alpha-linolenic acid, EPA, and DHA have differential effects on LDL fatty acid composition but similar effects on serum lipid profiles in normolipidemic humans. *J Nutr.* 2009;139:861–868. doi: 10.3945/jn.108.103861.
26. Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood

pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1007–1015.

27. Rambjor GS, Walen AI, Windsor SL, Harris WS. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipids.* 1996;31(Suppl):S45–S49. doi: 10.1007/BF02637050.
28. Hansen JB, Grimsgaard S, Nilsen H, Nordoy A, Bonna KH. Effects of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on fatty acid absorption, incorporation into serum phospholipids and postprandial triglyceridemia. *Lipids.* 1998;33:131–138. doi: 10.1007/s11745-998-0188-8.
29. Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN, Best JD, et al. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1085–1094.
30. Buckley R, Shewring B, Turner R, Yaqoob P, Minihane AM. Circulating triacylglycerol and apoE levels in response to EPA and docosahexaenoic acid supplementation in adult human subjects. *Br J Nutr.* 2004;92:477–483.
31. Tatsuno I, Saito Y, Kudou K, Ootake J. Efficacy and safety of TAK-085 compared with eicosapentaenoic acid in Japanese subjects with hypertriglyceridemia undergoing lifestyle modification: the omega-3 fatty acids randomized double-blind (ORD) study. *J Clin Lipidol.* 2013;7:199–207. doi: 10.1016/j.jacl.2013.01.006.
32. Schwellenbach LJ, Olson KL, McConnell KJ, Stolcpart RS, Nash JD, Merenich JA, et al. The triglyceride-lowering effects of a modest dose of docosahexaenoic acid alone versus in combination with low dose eicosapentaenoic acid in patients with coronary artery disease and elevated triglycerides. *J Am Coll Nutr.* 2006;25:480–485. doi: 10.1080/07315724.2006.10719562.
33. Grimsgaard S, Bonna KH, Hansen JB, Nordoy A. Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:649–659.

34. Agren JJ, Hanninen O, Julkunen A, Fogelholm L, Vidgren H, Schwab U, et al. Fish diet, fish oil and docosahexaenoic acid rich oil lower fasting and postprandial plasma lipid levels. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50:765–771.
35. Nestel PJ, Connor WE, Reardon MF, Connor S, Wong S, Boston R. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J Clin Invest.* 1984;74:82–89. doi: 10.1172/JCI111422.
36. Chan DC, Watts GF, Mori TA, Barrett PH, Redgrave TG, Beilin LJ. Randomized controlled trial of the effect of n-3 fatty acid supplementation on the metabolism of apolipoprotein B-100 and chylomicron remnants in men with visceral obesity. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:300–307.
37. Ouguerram K, Maugeais C, Gardette J, Magot T, Krempf M. Effect of n-3 fatty acids on metabolism of apoB100-containing lipoprotein in type 2 diabetic subjects. *Br J Nutr.* 2006;96:100–106. doi: 10.1079/BJN20061806.
38. Lalia AZ, Johnson ML, Jensen MD, Hames KC, Port JD, Lanza IR. Effects of dietary n-3 fatty acids on hepatic and peripheral insulin sensitivity in insulin-resistant humans. *Diabetes Care.* 2015;38:1228–1237. doi: 10.2337/dc14-3101.
39. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, et al. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia.* 2006;49:755–765. doi: 10.1007/s00125-005-0125-z.
40. 33. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2012;56:944–951. doi: 10.1016/j.jhep.2011.08.018.
41. Scorletti E, West AL, Bhatia L, Hoile SP, McCormick KG, Burdge GC, et al. Treating liver fat and serum triglyceride levels in NAFLD, effects of PNPLA3 and TM6SF2 genotypes: Results from the WELCOME trial. *J Hepatol.* 2015;63:1476–1483. doi: 10.1016/j.jhep.2015.07.036.
42. Couet C, Delarue J, Ritz P, Antoine JM, Lamisse F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997;21:637–643. doi: 10.1038/sj.ijo.0800451.

43. Mostad IL, Bjerve KS, Bjorgaas MR, Lydersen S, Grill V. Effects of n-3 fatty acids in subjects with type 2 diabetes: reduction of insulin sensitivity and time-dependent alteration from carbohydrate to fat oxidation. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:540–550.
44. Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary polyunsaturated fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoprotein levels. Chronic and acute effects of fat saturation on postprandial lipoprotein metabolism. *J Clin Invest.* 1988;82:1884–1893. doi: 10.1172/JCI113806. [PMC free article]
45. Park Y, Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res.* 2003;44:455–463. doi: 10.1194/jlr.M200282-JLR200.
46. Park Y, Jones PG, Harris WS. Triacylglycerol-rich lipoprotein margination: a potential surrogate for whole-body lipoprotein lipase activity and effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:45–50.
47. Wong AT, Chan DC, Barrett PH, Adams LA, Watts GF. Effect of omega-3 fatty acid ethyl esters on apolipoprotein B-48 kinetics in obese subjects on a weight-loss diet: a new tracer kinetic study in the postprandial state. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E1427–E1435. doi: 10.1210/jc.2013-4037.
48. Khan S, Minihane AM, Talmud PJ, Wright JW, Murphy MC, Williams CM, et al. Dietary long-chain n-3 PUFAs increase LPL gene expression in adipose tissue of subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *J Lipid Res.* 2002;43:979–985.
49. Rudkowska I, Caron-Dorval D, Verreault M, Couture P, Deshaies Y, Barbier O, et al. PPARalpha L162V polymorphism alters the potential of n-3 fatty acids to increase lipoprotein lipase activity. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54:543–550.
50. Harris WS, Lu G, Rambjor GS, Walen AI, Ontko JA, Cheng Q, et al. Influence of n-3 fatty acid supplementation on the endogenous activities of plasma lipases. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:254–260.
51. Kastelein JJ, Maki KC, Susekov A, Ezhov M, Nordestgaard BG, Machielse BN, et al. Omega-3 free fatty acids for the treatment of severe hypertriglyceridemia: the

- EpanoVa fOR Lowering Very high triglyceridEs (EVOLVE) trial. *J Clin Lipidol*. 2014;8:94–106. doi: 10.1016/j.jacl.2013.10.003.
52. Homma Y, Ohshima K, Yamaguchi H, Nakamura H, Araki G, Goto Y. Effects of eicosapentaenoic acid on plasma lipoprotein subfractions and activities of lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein. *Atherosclerosis*. 1991;91:145–153. doi: 10.1016/0021-9150(91)90196-A.
 53. Zheng C, Khoo C, Furtado J, Sacks FM. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation*. 2010;121:1722–1734. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.875807.
 54. Yao Z, Wang Y. Apolipoprotein C-III and hepatic triglyceride-rich lipoprotein production. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23:206–212.
 55. Lee SJ, Campos H, Moye LA, Sacks FM. LDL containing apolipoprotein CIII is an independent risk factor for coronary events in diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:853–858.
 56. Crosby J, Peloso GM, Auer PL, Crosslin DR, Stitzel NO, Lange LA, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med*. 2014;371:22–31. doi: 10.1056/NEJMoa1307095.
 57. Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014;371:32–41. doi: 10.1056/NEJMoa1308027.
 58. Nenseter MS, Rustan AC, Lund-Katz S, Soyland E, Maelandsmo G, Phillips MC, et al. Effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on physical properties and metabolism of low density lipoprotein in humans. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:369–379. doi: 10.1161/01.ATV.12.3.369.
 59. Nordoy A, Hansen JB, Brox J, Svensson B. Effects of atorvastatin and omega-3 fatty acids on LDL subfractions and postprandial hyperlipemia in patients with combined hyperlipemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001;11:7–16.
 60. Tani S, Nagao K, Matsumoto M, Hirayama A. Highly purified eicosapentaenoic acid may increase low-density lipoprotein particle size by improving triglyceride

metabolism in patients with hypertriglyceridemia. *Circ J*. 2013;77:2349–2357. doi: 10.1253/circj.CJ-12-1401.

61. Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Best JD, et al. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid increases LDL particle size in treated hypertensive type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2003;26:253. doi: 10.2337/diacare.26.1.253.
62. DeJager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 1993;34:295–308.
63. Calabresi L, Villa B, Canavesi M, Sirtori CR, James RW, Bernini F, et al. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism*. 2004;53:153–158. doi: 10.1016/j.metabol.2003.09.007.
64. Nozaki S, Matsuzawa Y, Hirano K, Sakai N, Kubo M, Tarui S. Effects of purified eicosapentaenoic acid ethyl ester on plasma lipoproteins in primary hypercholesterolemia. *Int J Vitam Nutr Res*. 1992;62:256–260.
65. Al-Khudairy L, Hartley L, Clar C, Flowers N, Hooper L, Rees K. Omega 6 fatty acids for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Nov 16;(11):CD011094. doi: 10.1002/14651858.CD011094.pub2.
66. Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. APO E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics*. 2000;4:101–108.
67. Minihane AM, Khan S, Leigh-Firbank EC, Talmud P, Wright JW, Murphy MC, et al. ApoE polymorphism and fish oil supplementation in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1990–1997.
68. Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest*. 1991;88:1490–1501. doi: 10.1172/JCI115459.

69. Lindsey S, Pronczuk A, Hayes KC. Low density lipoprotein from humans supplemented with n-3 fatty acids depresses both LDL receptor activity and LDLr mRNA abundance in HepG2 cells. *J Lipid Res.* 1992;33:647–658.
70. Schmidt S, Willers J, Stahl F, Mutz KO, Scheper T, Hahn A, et al. Regulation of lipid metabolism-related gene expression in whole blood cells of normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation. *Lipids Health Dis.* 2012;11:172. doi: 10.1186/1476-511X-11-172.
71. Dawson K, Zhao L, Adkins Y, Vemuri M, Rodriguez RL, Gregg JP, et al. Modulation of blood cell gene expression by DHA supplementation in hypertriglyceridemic men. *J Nutr Biochem.* 2012;23:616–621.
72. Fuke G, Nornberg JL. Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Jan 2;57(1):1-7.
73. Rodriguez-Perez C, Ramprasath VR, Pu S, Sabra A, Quirantes-Pine R, Segura-Carretero A, et al. Docosahexaenoic acid attenuates cardiovascular risk factors via a decline in proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) plasma levels. *Lipids.* 2016;51:75–83. doi: 10.1007/s11745-015-4099-4.
74. Graversen CB, Lundbye-Christensen S, Thomsen B, Christensen JH, Schmidt EB. Marine n-3 polyunsaturated fatty acids lower plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 levels in pre- and postmenopausal women: a randomised study. *Vasc Pharmacol.* 2016;76:37–41. doi: 10.1016/j.vph.2015.07.001
75. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 2012;15:518-533.
76. Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:911-919.
77. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1146-1155.

78. Risérus U. Fatty acids and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr MetabmCare*. 2008;11:100-105.
79. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, et al; KANWU Study. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU Study. *Diabetologia*. 2001;44:312-319.
80. Jebb SA, Lovegrove JA, Griffin BA, et al; RISCK Study Group. Effect of changing the amount and type of fat and carbohydrate on insulin sensitivity and cardiovascular risk: the RISCK (Reading, Imperial, Surrey, Cambridge, and Kings) trial. *Am J Clin Nutr*. 2010;92:748-758.
81. Tierney AC, McMonagle J, Shaw DI, et al. Effects of dietary fat modification on insulin sensitivity and on other risk factors of the metabolic syndrome—LIPGENE: a European randomized dietary intervention study. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35:800-809.
82. Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2:810-818.
83. Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care*. 2003;26:1362-1368.
84. Klein-Platat C1, Draï J, Oujaa M, Schlienger JL, Simon C. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:1178-1184.
85. Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:969-973.
86. Khaw KT, Friesen MD, Riboli E, Luben R, Wareham N. Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Med*. 2012;9:e1001255.

87. Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:535-546.
88. Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2014;160:398-406.
89. Jakobsen MU, O'Reilly EJ, Heitmann BL, et al. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1425-1432.
90. Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, et al. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:529-533. Yaqoob P. Monounsaturated fatty acids and immune function. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(suppl 3):S9-S13.
91. Bermudez B, Lopez S, Ortega A, et al. Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr Pharm Des.* 2011;17:831-843.
92. Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Delgado-Lista J, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Curr Pharm Des.* 2011;17:769-777.
93. van Deursen D, van Leeuwen M, Akdogan D, Adams H, Jansen H, Verhoeven AJ. Activation of hepatic lipase expression by oleic acid: possible involvement of USF1. *Nutrients.* 2009;1:133-147.
94. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis.* 2014;13:154.
95. Khalesi S, Irwin C, Schubert M. Flaxseed consumption may reduce blood pressure: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *J Nutr.* 2015 Apr;145(4):758-65.

96. Zhelev Z., Ivanova D., Lazarova D., Aoki I., Bakalova R., Saga T. Docosahexaenoic acid sensitizes leukemia lymphocytes to barasertib and everolimus by ROS-dependent mechanism without affecting the level of ROS and viability of normal lymphocytes. *Anticancer Res.* 2016;36:1673–1682
97. Kang K.S., Wang P., Yamabe N., Fukui M., Jay T., Zhu B.T. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. *PLoS ONE.* 2010;5:1257
98. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763.
99. Fukui M., Kang K.S., Okada K., Zhu B.T. EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: Role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. *J. Cell. Biochem.* 2013;114:192–203.
- 100.38. Shin S., Jing K., Jeong S., Kim N., Song K., Heo J., Park J., Seo K., Han J., Park J., et al. The Omega-3 polyunsaturated fatty acid DHA induces simultaneous apoptosis and autophagy via mitochondrial ROS-mediated Akt-mTOR signaling in prostate cancer cells expressing mutant p53. *BioMed Res. Int.* 2013;2013:1–11. doi: 10.1155/2013/568671
101. Rohrbach S. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15:4103–4116.
102. Pan J., Chung F.L. Formation of cyclic deoxyguanosine adducts from ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids under oxidative conditions. *Chem. Res. Toxicol.* 2002;15:367–372.
103. Wu J. Q., Kosten T. R., Zhang X. Y. Free radicals, antioxidant defense system, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 2013;46:200–206.
104. Taniyama Y., Griendling K. K. Reactive oxygen species in the vasculature. *Hypertension.* 2003;42:1075–1081.

105. Al-Gubory K. H., Garrel C., Faure P., Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive Biomedicine Online*. 2012;25:551–560.
106. Hansen J. M., Go Y. M., Jones D. P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2006;46:215–234.
107. Glasauer A., Chandel N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*. 2014;92:90–101. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.017.
108. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanism of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830;2013:3217–3266.
109. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th. Oxford, UK: Clarendon Press; 2007.
110. Bahorun T., Soobrattee M. A., Luximon-Ramma V., Aruoma O. I. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*. 2006;1:1–17.
111. Kumar S., Pandey A. K. Free radicals: health implications and their mitigation by herbals. *British Journal of Medicine and Medical Research*. 2015;7:438–457.
112. Kumar S., Pandey A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:16.
113. Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004;266:37–56.
114. Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39:44–84.
115. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82:47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

116. Willcox J. K., Ash S. L., Catignani G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004;44:275–295.
117. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*. 2007;87:315–424.
118. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*. 2007;19:1807–1819. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.04.009.
119. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35:1147–1150. doi: 10.1042/BST0351147.
120. Young I., Woodside J. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 2001;54:176–186.
121. Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;160:1–40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
122. Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 2005;12:1161–1208.
123. Parthasarathy S., Santanam N., Ramachandran S., Meilhac O. Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *Journal of Lipid Research*. 1999;40:2143–2157.
124. Frei B. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins. Oregon State University: Linus Pauling Institute; 1997. <http://lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive.html>.
125. Hennig B1, Toborek M, Joshi-Barve S, et al. Linoleic acid activates nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) and induces NF- κ B-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 1996;63:322–328.
126. Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Willett WC, Rimm EB. Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation*. 2003;108:155–160.

127. Petersson H, Basu S, Cederholm T, Risérus U. Serum fatty acid composition and indices of stearoyl-CoA desaturase activity are associated with systemic inflammation: longitudinal analyses in middle-aged men. *Br J Nutr.* 2008;99:1186-1189.
128. Ramsden CE, Hibbeln JR, Majchrzak SF, Davis JM. n-6 Fatty acid-specific and mixed polyunsaturate dietary interventions have different effects on CHD risk: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr.* 2010;104:1586-1600.
129. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 1984;105:121-126
130. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, eds. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods.* Philadelphia, Grune & Stratton:PA; 1984:83-85.
131. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood. Glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-888.
132. Chaturvedi S, Siegel D, Wagner CL, Park J, van de Velde H, Vermeulen J, Fung MC, Reddy M, Hall B, Sasser K. Development and validation of panoptic Meso scale discovery assay to quantify total systemic interleukin-6. *Br J Clin Pharmacol.* 2015 Oct;80(4):687-97.
133. Gao S, Shu S, Wang L, Zhou J, Yuan Z. [Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine responses of peripheral blood mononuclear cells in apparently healthy subjects]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2014 Nov;34(11):1589-93.
134. Kukoba TV, Shysh AM, Moïbenko OO, Kotsiuruba AV, Kharchenko OV. [The effects of alpha-linolenic acid on the functioning of the isolated heart during acute myocardial ischemia/reperfusion]. *Fiziol Zh.* 2006;52(5):12-20.
135. Folino A, Sprio AE, Di Scipio F, Berta GN, Rastaldo R. Alpha-linolenic acid protects against cardiac injury and remodelling induced by beta-adrenergic overstimulation. *Food Funct.* 2015 Jul;6(7):2231-9.
136. Kang JX, Leaf A. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 11;91(21):9886-90.

137. Mitchell LA, Grant DF, Melchert RB, Petty NM, Kennedy RH. Linoleic acid metabolites act to increase contractility in isolated rat heart. *Cardiovasc Toxicol.* 2002;2(3):219-30.
138. Saddik M, Lopaschuk GD. The fate of arachidonic acid and linoleic acid in isolated working rat hearts containing normal or elevated levels of coenzyme A. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Nov 5;1086(2):217-24.
139. Patten GS, Conlon MA, Bird AR, Adams MJ, Topping DL, Abeywardena MY. Interactive effects of dietary resistant starch and fish oil on short-chain fatty acid production and agonist-induced contractility in ileum of young rats. *Dig Dis Sci.* 2006 Feb;51(2):254-61.
140. Demaison L, Blet J, Sergiel JP, Gregoire S, Argaud D. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on contractile function of hearts isolated from sedentary and trained rats. *Reprod Nutr Dev.* 2000 Mar-Apr;40(2):113-25.
141. Pietri S, Bernard M, Cozzone PJ. Hydrodynamic and energetic aspects of exogenous free fatty acid perfusion in the isolated rat heart during high flow anoxia and reoxygenation: a ³¹P magnetic resonance study. *Cardiovasc Res.* 1991 May;25(5):398-406.
142. Zanetti M, Gortan Cappellari G, Barbetta D, Semolic A, Barazzoni R. Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids Improve Endothelial Dysfunction in Chronic Renal Failure: Role of eNOS Activation and of Oxidative Stress. *Nutrients.* 2017 Aug 18;9(8). pii: E895. doi: 10.3390/nu9080895.
143. Barden, A.E.; Burke, V.; Mas, E.; Beilin, L.J.; Puddey, I.B.; Watts, G.F.; Irish, A.B.; Mori, T.A. n-3 fatty acids reduce plasma 20-hydroxyecosatetraenoic acid and blood pressure in patients with chronic kidney disease. *J. Hypertens.* 2015, 33, 1947–1953.
144. Annuk, M.; Zilmer, M.; Fellstrom, B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: Impact on cardiovascular disease. *Kidney Int.* 2003, 84, S50–S53.
145. Lee, CH.; Lee, S.D.; Ou, H.C.; Lai, S.C.; Cheng, Y.J. Eicosapentaenoic acid protects against palmitic acid-induced endothelial dysfunction via activation of the AMPK/eNOS pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 10334–10349.

146. MacLeod, D.C.; Heagerty, A.M.; Bund, S.J.; Lawal, T.S.; Riemersma, R.A. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on contraction and relaxation of rat femoral resistance arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994, 23, 92–98.
147. Poulianiti, K.P.; Kaltsatou, A.; Mitrou, G.I.; Jamurtas, A.Z.; Koutedakis, Y.; Maridaki, M.; Stefanidis, I.; Sakkas, G.K.; Karatzaferi, C. Systemic redox imbalance in chronic kidney disease: A systematic review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2016.
148. Qi, X.; Qin, Z.; Tang, J.; Han, P.; Xing, Q.; Wang, K.; Yu, J.; Zhou, G.; Tang, M.; Wang, W.; et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorates testicular ischemia-reperfusion injury through the induction of Nrf2 and inhibition of NF- κ B in rats. *Exp. Mol. Pathol.* 2017, 24, 30282–30284.
149. Slee, E.L.; McLennan, P.L.; Owen, A.J.; Theiss, M.L. Low dietary fish-oil threshold for myocardial membrane n-3 PUFA enrichment independent of n-6 PUFA intake in rats. *J. Lipid Res.* 2010, 51, 1841–1848.
150. Xin, W.; Wei, W.; Li, X. Effect of fish oil supplementation on fasting vascular endothelial function in humans: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE* 2012.
151. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:287–306.
152. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-1208.
153. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 936486.
154. Finkel T. Oxidative signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003., 15: 247-254.
155. Finkel T. Redox dependent signal transduction. *FEBS letters* 2000., 476,52-54.
156. Mohr A, Buneker C, Gough RP, Zwacka RM. MnSOD protects colorectal cancer cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibition of Smac/DIABLO release. *Oncogene* 2008;27: 763-774.

- 157.Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Rad Biol Med* 2007; 43 (7):1023-1036.
- 158.Dale-Donna I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52(4):1-23.
- 159.Ferreira AR, Bonatto F, Pasquali MA, Poludor M, et al. Oxidative stress effects on the central nervous system of rats after acute exposure to ultra-high frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2006; 27: 487-493.
- 160.Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford Univercity Press, New York 1999.
- 161.Nelson DL and Cox M.M. *Lehninger principles of biochemistry*, NY: W.H. Freeman and Company 2008; 5: 720-721.
- 162.Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(10):502-508.
- 163.Ramaiyan B, Bettadahalli S, Talahalli RR. Dietary omega-3 but not omega-6 fatty acids down-regulate maternal dyslipidemia induced oxidative stress: A three generation study in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 2;477(4):887-94.
- 164.Yang LG, Song ZX, Yin H, Wang YY, Shu GF, Lu HX, Wang SK, Sun GJ. Low n-6/n-3. PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. *Lipids.* 2016 Jan;51(1):49-59.
- 165.Wang F, Miao M, Xia H, Yang LG, Wang SK, Sun GJ. Antioxidant activities of aqueous extracts from 12 Chinese edible flowers in vitro and in vivo. *Food Nutr Res.* 2016;61(1):1265324.
- 166.Yang LG, Zhang YJ, Xie JY, Xia WJ, Zhang HY, Tang MY, Mei SX, Cui T, Wang JK, Zhu ZY. Diterpenoid alkaloids from the roots of *Aconitum brachypodum* Diels. *J Asian Nat Prod Res.* 2016 Sep;18(9):908-12.
- 167.Yadav S, Mitha KV, Shenoy MT, Mayannavar S, Ganaraja B. Beneficial effect of Omega-3 polyunsaturated fatty acids on neurosensorial impairments and oxidative

status in Streptozotocin induced diabetic rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2014 Oct-Dec;58(4):346-53.

168. Balakumar, P.; Taneja, G. Fish oil and vascular endothelial protection: Bench to bedside. *Free Rad. Biol. Med.* 2012, 53, 271–279.
169. Wang, Q.; Liang, X.; Wang, L.; Lu, X.; Huang, J.; Cao, J.; Li, H.; Gu, D. Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 2012, 221, 536–543.
170. Egert, S.; Stehle, P. Impact of n-3 fatty acids on endothelial function: Results from human interventions studies. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2011, 14, 121–131.
171. Guajardo, I.; Ayer, A.; Johnson, AD.; Ganz, P.; Mills, C.; Donovan, C.; Scherzer, R.; Shah, S.J.; Peralta, C.A.; Dubin, R.F. Sex differences in vascular dysfunction and cardiovascular outcomes: The cardiac, endothelial function, and arterial stiffness in ESRD (CERES) study. *Hemodial. Int.* 2017, 8.
172. Sikorska-Wiśniewska, M.; Mika, A.; Śledziński, T.; Małgorzewicz, S.; Stepnowski, P.; Rutkowski, B.; Chmielewski, M. Disorders of serum omega-3 fatty acid composition in dialyzed patients, and their associations with fat mass. *Ren. Fail.* 2017, 39, 406–412.
173. Shoji, T.; Kakiya, R.; Hayashi, T.; Tsujimoto, Y.; Sonoda, M.; Shima, H.; Mori, K.; Fukumoto, S.; Tahara, H.; Shioi, A.; et al. Serum n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid profile as an independent predictor of cardiovascular events in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2013, 62, 568–576.
174. Chamberlain, R.M.; Shirley, D.G. Time course of the renal function response to partial nephrectomy: Measurements in conscious rats. *Exp. Physiol.* 2006, 92, 251–262.
175. Gortan Cappellari, G.; Semolic, A.; Ruozi, G.; Vinci, P.; Guarnieri, G.; Bortolotti, F.; Barbeta, D.; Zanetti, M.; Giacca, M.; Barazzoni, R. Unacylated ghrelin normalizes skeletal muscle oxidative stress and prevents muscle catabolism by enhancing tissue mitophagy in experimental chronic kidney disease. *FASEB J.* 2017.

176. Casos, K.; Zaragoza, M.; Zarkovic, N.; Andrisic, L.; Portero-Otin, M.; Cacabelod, D.; Mitjavila, M.T. A fish-oil-rich diet reduces vascular oxidative stress in apoE(-/-) mice. *Free Radic. Res.* 2010, 44, 821–829.
177. Gomaa AM, Abd El-Aziz EA. Omega-3 fatty acids decreases oxidative stress, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta in hyperthyroidism-induced hepatic dysfunction rat model. *Pathophysiology.* 2016 Dec;23(4):295-301.
178. Nikolaidis MG, Mougios V (2004) Effects of exercise on the fatty acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med* 34:1015–1076.
179. Clarke, R., Shipley, M., Armitage, J., Collins, R., & Harris, W. (2009). Plasma phospholipid fatty acids and CHD in older men: Whitehall study of London civil servants. *British Journal of Nutrition*, 102, 279-284.
180. Simon, J.A., Hodgkins, M.L., Browner, W.S., Neuhaus, J.M., Bernert, J.T. Jr, & Hulley, S.B. (1995). Serum fatty acids and the risk of coronary heart disease. *American Journal of Epidemiology*, 142, 469-476.
181. Cvetkovic, Z., Vucic, V., Cvetkovic, B., Petrovic, M., Ristic Medic, D., Tepsic, J., et al. (2010). Abnormal fatty acid distribution of the serum phospholipids of patients with nonHodgkin lymphoma. *Annals of Hematology*, 89, 775-782.
182. Dyntar, D., Eppenberger-Eberhardt, M., Maedler, K., Pruschy, M., Eppenberger, H.M., Spinass, G.A., et al. (2001). Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes*, 50, 2105-2113.
183. Kelly, F.D., Sinclair, A.J., Mann, N.J., Turner, A.H., Abedin, L., & Li, D. (2001). A stearic acid-rich improves thrombotic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55, 88-96.
184. Evans, L.M., Cowey, S.L., Siegal, G.P., & Hardy, R.W. (2009). Stearate preferentially induces apoptosis in human breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 61, 746-753.
185. Zhou, L., & Nilsson, A. (2001). Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *Journal of Lipid Research*, 42, 1521-1542.

186. Pedersen, B., Bruunsgaard, H., Ostrowski, K., Krabbe, K., Hansen, H., Krzywkowski, K., et al. (2000). Cytokines in aging and exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 21(Suppl 1), 4S-9S.
187. Simopoulos, A. (2003). Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: evolutionary aspects. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 92, 1-22.
188. World Health Organization. (1995). Fats and oils in human nutrition: report of a joint expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. *FAO Food & Nutrition Paper*, 57, 1-147.
189. Darlington LG, Stone TW (2001) Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *Br J Nutr* 85:251–269, Review.
190. Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G et al (2001) Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 36:1183–1193.
191. Healy DA, Wallace FA, Miles EA et al (2000) The effect of low to moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids* 35:763–768.
192. Kew S, Banerjee T, Minihane AM et al (2003) Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* 77:1287–1295.
193. Miles EA, Banerjee T, Dooper MWBW et al (2004) The influence of different combinations of γ -linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr* 91:893–903.
194. Halvorsen DA, Hansen J-B, Grimsgaard S et al (1997) The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. *Lipids* 32:935–942.
195. Veselinovic M, Barudzic N, Vuletic M et al (2014) Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem* 391:225–232.

196. Popovic T, Borozan S, Arsic A et al (2012) Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male Wistar rats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 96:1020–1029.
197. Erdogan H, Fadillioglu E, Ozgocmen S et al (2004) Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 71:149–152.
198. Balakumar P, Taneja G (2012) Fish oil and vascular endothelial protection: bench to bedside. *Free Radic Biol Med* 53:271–279.
199. Profumo E, Di Franco M, Buttari B, Masella R, Filesi C, Tosti ME, Scivo R, Scarno A, Spadaro A, Saso L, Riganò R. Biomarkers of subclinical atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Mediators Inflamm*. 2012.
200. Varming K, Schmidt EB, Svaneborg N et al (1995) The effect of n 3 fatty acids on neutrophil chemiluminescence. *Scand J Clin Lab Invest* 55:47–52.
201. Calder PC (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83:1505–1519.
202. Fisher M, Levine PH, Weiner BH et al (1990) Dietary n3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in monocyte enriched preparation of leukocytes. *Am J Clin Nutr* 51:804–808.
203. Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G et al (2001) Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids* 36:1183–1193.
204. Kew S, Banerjee T, Minihane AM et al (2003) Lack of effect of foods enriched with plant- or marine-derived n3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* 77:1287–1295.
205. Miles EA, Banerjee T, Dooper MWBW et al (2004) The influence of different combinations of γ -linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr* 91:893–903.

9. БИОГРАФИЈА

Кристина Радоман је рођена у Подгорици 30. 08. 1983. године. Завршила је средњу медицинску школу у Подгорици, а Високу здравствену школу струковних студија, као и Факултет за менаџмент, смер менаџмент у здравству у Београду.

Ради као наставник практичне наставе у средњој медицинској школи у Подгорици од 2011. године.

Аутор је једног рада у часопису на SCI листи и неколико радова категорије M52.

Говори енглески језик, познаје рад на рачунарима.

Удата, мајка двоје деце.

10. БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Radoman K**, Zivkovic V, Nikolic T, Stojic I, Raicevic D, Jeremic J, Srejovic I, Jakovljevic V. Differences between α -linolenic and linoleic acid supplementation on the redox status and cardiodynamic parameters of male and female *Wistar albino* rats. Archives of Biological Sciences. 2017; doi: 10.2298/ABS170810038R.
2. **Radoman K**, Vucic V, Arsic A, Cubrilo D, Jeremic N, Jeremic J, Jakovljevic V. Effects of different PUFA supplementation on inflammatory response markers in young soccer players. Ser J Exp Clin Res 2015; 16 (4): 305-311.
3. Jakovljevic B, Plecevic S, Petkovic A, Nikolic Turnic T, Milosavljevic I, **Radoman K**, Srejovic I. Is 3 weeks of exercise enough to change blood pressure and cardiac redox state in hypertensive rats? Ser J Exp Clin Res. DOI: 10.1515/sjecr-2017-0049.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД: Монографска публикација

Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР: Докторска дисертација

Аутор – АУ: Кристина Радоман

Ментор/коментор – МН: доц. др Владимир Живковић

Наслов рада – НР: Утицај исхране обogaћене ОМЕГА-3 и ОМЕГА-6 масним киселинама на функцију миокарда и оксидо-инфламацијске параметре код срца старих пацова

Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица

Језик извода – ЈИ: српски/енглески

Земља публиковања – ЗП: Република Србија

Уже географско подручје – УГП: Централна Србија

Година – ГО: 2017. година

Издавач – ИЗ: Ауторски репринт

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

Физичи опис рада – ФО: 185 страна, 20 табела, 55 графикона

Научна област – УДК: Медицина

Научна дисциплина – ДИ: Превентивна медицина

Предметна одредница/кључне речи – ПО: омега-3 масне киселине, омега-6 масне киселине, оксидациони стрес, изоловано срце пацова

Чува се – ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена – ВН:

Извод – ИД:

Увод: Резултати истраживања дају оригиналан и важан допринос сагледавању позитивних и негативних ефеката полинезасићених масних киселина заступљених у исхрани, као и могућностима и потребама измене њиховог односа у циљу постизања повољних ефеката на кардиоваскуларни систем. Резултати истраживања имају велики практични значај, пре свега имајући у виду да се ради о испитивању органског система чији поремећаји захватају далеко највећи постотак светске популације.

Циљ: Циљ овог истраживања је било испитивање хроничних ефеката примене исхране обogaћене омега-3 и омега-6 масним киселинама на функцију миокарда, коронарни проток и оксидо-инфламацијске параметре старих пацова.

Материјал и методе: Истраживање је дизајнирано као експериментална студија спроведена *ex vivo*. Након хроничног третмана од 6 недеља одговарајућом исхраном, животиње су се жртвовале како би се спровела истраживања на изолованом срцу и биохемијске анализе из узорака перфузата, плазме и лизата еритроцита. Биохемијске анализе су одређиване у узорцима коронарног венског ефлуента, који је сакупљан на крају контролног периода и на крају периода апликације испитиване супстанце. Сви реактивни молекули, који су били од интереса за наше истраживање су мерени спектрофотометријском методом. Поред тога, у узорцима плазме и лизату еритроцита мериле су се вредности про-оксидационих, антиоксидационих и инфламаторних параметара.

Резултати: Хронична примена суплементације алфа-линолеинском киселином има кардиопротективно дејство у односу на примену линолне киселине на моделу изолованог срца пацова. Исхрана обogaћена омега-6 масним киселинама утиче негативно на функцију миокарда изолованог срца пацова у односу на исхрану обogaћену омега-3 масним киселинама. Применом хроничне исхране са односом омега-3/омега-6 у нашем истраживању 1:3,3 (55%:17%) у корист омега-3 масних киселина у виду уља ланеног семена, као и примена масних киселина у односу омега-3/омега-6 1:9 (9%:73%) у виду уља ноћурка у корист омега-6 масних киселина, показали смо значајне разлике у погледу ефекта на функцију миокарда и редокс статус пацова, са нагласком на кардипротективно деловање односа 1:3,3. Механизми којима линолеинска киселина остварује кардипротективно дејство ослањају се на снижење индекса липидне пероксидације, водоник пероксида као повећање активности каталазе, супероксид дисмутазе из интактну коронарну циркулацију.

Закључак: Налази садашњег истраживања могу да помогну у бољем разумевању утицаја омега-3 и омега-6 масних киселина на одржавање кардиоваскуларне хомеостазе. Ови резултати су од великог практичног значаја, с обзиром а широку примену суплемената који се састоје од ових једињења.

Кључне речи: омега-3 масне киселине, омега-6 масне киселине, оксидациони стрес, изоловано срце пацова.

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 13.07.2016.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

1. **Проф. др Нела Ђоновић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хигијена и екологија, председник;
2. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Др сци. Александра Арсић**, научни сарадник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област Биохемија, члан.

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number – ANO:

Identification number – INO:

Documentation type – DT: Monographic publication

Type of record – TR: Textual printed material

Contents code – CC: Ph. D. Thesis

Author – AU: Kristina Radoman

Menthor/co-mentor – MN: Professor Lukas Rasulic, M.D. Ph.D.

Title – TI: Effect of diet enriched with OMEGA-3 and OMEGA-6 fatty acids on myocardial function and oxido-inflammatory parameters in the heart of old rats

Language of text – LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication – LP: Central Serbia

Publication year – PY: 2017

Publisher – PU: Author reprint

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

Physical description – PD: 185 pages, 20 tables, 55 charts

Scientific field – SF: Medicine

Scientific discipline – SD: Preventive medicine

Subject/key words – SKW: omega-3 fatty acids, omega-6 fatty acids, oxidative stress, isolated heart rats

UDC:

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

Note – N:

Abstract – AB:

Introduction: The results of the research give an original and important contribution to the examination of the positive and negative effects of polyunsaturated fatty acids present in the diet, as well as the possibilities and needs of changing their relationship in order to achieve favorable effects on the cardiovascular system. The results of the research have a great practical significance, predominantly having in mind that this disruptions of this organic system are by far the largest percentage of the world population.

Aim: The aim of this study was to examine the chronic effects of diet enriched with omega-3 and omega-6 fatty acids on myocardial function, coronary flow and oxidizing inflammatory parameters of old rats.

Material and methods: The study was designed as an *ex vivo* experimental study. After 6 weeks of chronic treatment with adequate nutrition, animals were sacrificed to perform isolated heart investigation and biochemical analysis from perfusate, plasma, and erythrocyte lysates. Biochemical analyzes were determined in samples of the coronary venous effluent, which was collected at the end of the control period and at the end of the period of application of the tested substance. All reactive molecules that were of interest to our research were measured by a spectrophotometric method. In addition, in the plasma and lysate erythrocyte samples, the values of pro-oxidation, antioxidant and inflammatory parameters were measured.

Results: The alpha-linoleic acid supplementation has a stronger cardioprotective effect than linoleic acid on the model of the isolated rat heart. Nutrition enriched with omega-6 fatty acids more affects the myocardial function of the isolated heart of the rat in relation to than diet enriched with omega-3 fatty acids. Using chronic nutrition with omega-3 / omega-6 ratio 1:3.3 (55%: 17%) in favor of omega-3 fatty acids in the form of flax seed oil, and the application of fatty acids in the ratio of omega-3 / omega-6 1:9 (95:73%) in the form of omega-6 fatty acid oil, we showed significant differences in the effect on myocardial function and rat's redox status, with an emphasis on cardioprotective ratio 1:3,3. Mechanisms through which linoleic acid achieves cardioprotective activity rely on the reduction of the lipid peroxidation index, hydrogen peroxide and increase in catalase activity and superoxide dismutase with intact coronary circulation.

Conclusions: Findings of present study may help in better understanding of the influence of omega-3 and omega-6 fatty acids on the maintenance of cardiovascular homeostasis. Taken into consideration wide usage of supplements consisting of these compounds, these results are of great practical significance.

Key words: omega-3 fatty acids, omega-6 fatty acids, oxidative stress, isolated rat heart.

Accepted by the Scientific Board on – ASB: 17th July 2016.

Defended on – DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:

1. **Associate Professor Nela Djonovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Hygiene and ecology, chairman;
2. **Full Professor Vladimir Jakovljevic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Physiology, member;
3. **Dr sci. Aleksandra Arsic**, scientific associate, Institute for Medical Research, University of Belgrade, scientific field Biochemistry, member.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Кристина Радоман, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај исхране обогаћене ОМЕГА-3 и ОМЕГА-6 масним киселинама на функцију миокарда и оксидативно-инфламацијске параметре код срца старих пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу _____, 15.12.2017. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Кристина Радоман,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај исхране обogaћене ОМЕГА-3 и ОМЕГА-6 масним киселинама на функцију миокарда и оксидативно-инфламацијске параметре код срца старих пацова

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам


не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делим под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делим под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 15.12.2017. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

Differences between α -linolenic and linoleic acid supplementation on the redox status and cardiodynamic parameters of male and female wistar albino rats

Radoman Kristina, Živković Vladimir, Nikolić Tamara, Stojić Isidora, Raičević Danijela, Jeremić Jovana, Srejšević Ivan, Jakovljević Vladimir

The aim of present study was to investigate the difference between α -linolenic acid (ALA, omega-3) and linoleic acid (LA, n-6) on the redox status and cardiac function of the isolated rat heart. ALA or LA were administered for 6 weeks by gavage to all animals, which were randomly divided into 4 groups: male rats treated with a linoleic acid (M-LA), dose of 7.3 mg/kg/day; female rats treated with a linoleic acid (F-LA), dose of 7.3 mg/kg/day; male rats treated with an α -linolenic acid (M-ALA), dose of 165 mg/kg/day; female rats treated with α -linolenic acid (F-ALA), dose of 165 mg/kg/day. Using the Langendorff technique, markers of heart function were evaluated: the maximum and minimum rates of pressure development in the left ventricle (LV; dp/dt max, dp/dt min), systolic and diastolic left ventricle pressure (SLVP, DLVP, respectively), heart rate (HR) and coronary flow (CF). We measured the concentrations of prooxidative markers: nitrites (NO²⁻), superoxide anion radicals (O²⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂), as well as the index of lipid peroxidation (TBARS) in the plasma and effluent. In the lysate, we measured the concentrations of reduced glutathione (GSH), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). ALA more negatively influenced the isolated rat heart, especially in females. In contrast, the administration of LA was linked to more prominent oxidative stress, while the application of ALA was associated with improved activity of the antioxidative defense system (with better values in males).

Keywords: α -linolenic acid, linoleic acid, redox status, cardiac contractility, rat

<http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0354-46641700038R>

Differences between α -linolenic and linoleic acid supplementation on the redox status and cardiodynamic parameters of male and female *Wistar albino* rats

Kristina Radoman¹, Vladimir Živković², Tamara Nikolić³, Isidora Stojić³, Danijela Raičević⁴, Jovana Jeremić³, Ivan Srejšević² and Vladimir Jakovljević^{2,5,*}

¹College of Health Studies, Podgorica, Montenegro

²University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology

³University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy ⁴University of Montenegro, Podgorica, Montenegro Biotechnical Faculty, Department for Viticulture and Enology

⁵IM Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

*Corresponding author: drvladakbg@yahoo.com

Received: August 10, 2017; Revised: September 24, 2017; Accepted: October 6, 2017

Abstract: The aim of present study was to investigate the difference between α -linolenic acid (ALA, omega-3) and linoleic acid (LA, n-6) on the redox status and cardiac function of the isolated rat heart. ALA or LA were administered for 6 weeks by gavage to all animals, which were randomly divided into 4 groups: male rats treated with a linoleic acid (M-LA), dose of 7.3 mg/kg/day; female rats treated with a linoleic acid (F-LA), dose of 7.3 mg/kg/day; male rats treated with an α -linolenic acid (M-ALA), dose of 165 mg/kg/day; female rats treated with α -linolenic acid (F-ALA), dose of 165 mg/kg/day. Using the Langendorff technique, markers of heart function were evaluated: the maximum and minimum rates of pressure development in the left ventricle (LV; dp/dt max, dp/dt min), systolic and diastolic left ventricle pressure (SLVP, DLVP, respectively), heart rate (HR) and coronary flow (CF). We measured the concentrations of prooxidative markers: nitrites (NO₂⁻), superoxide anion radicals (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂), as well as the index of lipid peroxidation (TBARS) in the plasma and effluent. In the lysate, we measured the concentrations of reduced glutathione (GSH), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). ALA more negatively influenced the isolated rat heart, especially in females. In contrast, the administration of LA was linked to more prominent oxidative stress, while the application of ALA was associated with improved activity of the antioxidative defense system (with better values in males).

Key words: α -linolenic acid; linoleic acid; redox status; cardiac contractility; rat

INTRODUCTION

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are fatty acids (FAs) that contain more than one double bond in their carbon backbone [1]. Polyunsaturated FAs can be classified into different groups according to their chemical structure; essential FAs are all omega-3 and omega-6 methylene-interrupted fatty acids. Among omega-6 FA, linoleic acid (LA; 18:2) is the most common PUFA, whereas α -linolenic acid (ALA; 18:3), a *cis*-omega-3 PUFA, is the most prevalent omega-3 FA in the diet [2]. Alpha-linolenic acid (ALA), or *all-cis*-9,12,15-octadecatrienoic acid, is an 18-carbon omega-3 essential FA and is the precursor of both eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Linoleic acid (LA), or *all-cis*-9,12-octadecadienoic acid, is an 18-carbon omega-6 essential FA used in the biosynthesis

of arachidonic acid (AA) and, thus, some prostaglandins, leukotrienes (LTA, LTB, LTC), and thromboxanes (TXA) [3].

Almost forty years ago, it was first hypothesized that an increased dietary intake of omega-3 and omega-6 PUFAs from fish fat and plant oil could exert protective effects against several pathologies, including cardiovascular [4,5], neurodegenerative [6], neuropsychiatric [6] and inflammatory diseases [7], as well as against some cancer types [8]. Since then, a large number of preclinical studies have clarified molecular mechanisms underlying the preventive and therapeutic effects of omega-3 PUFAs against atherosclerosis and cardiac arrhythmia [4-8], and cardiologists and other physicians have begun to prescribe them routinely [9].

There has been an enormous discontinuity in the intake of LA during the last century as the availability of vegetable oils containing LA has increased 20-fold, yet at the same time, the generally accepted benefit of LA in slowing the development of atherosclerosis has come into question [9-10]. While some studies showed that the highest category of LA intake corresponded to a 15% lower risk of coronary heart disease, others have observed no benefit of LA supplementation on coronary disease [9-12].

Since LA and ALA, as well as other PUFAs, are highly oxidizable molecules, there is concern about their use at high concentrations for the prevention of chronic diseases that have oxidative stress as an underlying mechanism [13]. Some *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the protective effects of ALA and LA against oxidative stress and lipid peroxidation. However, only a few, conflicting studies have been conducted showing the antioxidant potential of these essential FAs [14-16]. Controversy still exists over the precise mechanisms by which essential fatty acids could modulate cardiovascular function.

Omega-3 PUFAs have been shown to upregulate the antioxidant system in various cells, counteracting oxidative stress as antiinflammatory and cardioprotective FAs, while the omega-6 PUFAs were shown to be proinflammatory [7,9,17]. The intake of omega 3, omega 6 and *trans*-FAs may influence testicular function and compromise cardiovascular function in males [17]. Data have suggested that the omega-3 PUFA status is inversely associated with type 2 diabetes in women but not in men, suggesting a sex-dependent effect of PUFAs [18]. Therefore, LA and ALA likely differentially modulate the redox status and cardiac function in different genders.

Using an *ex vivo* model of the isolated rat heart and biochemical analyses, we investigated the difference between the effects of ALA omega-3 and LA omega-6, on the redox status and cardiac function of rat heart. Additionally, this study also examined the controversy over the use of these FAs as preventive/curative tools for cardiovascular disease and pays special attention to the role of gender in this.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

All research procedures were carried out in accordance with the European Directive for the Welfare of Laboratory Animals, No. 86/609/EEC and the principles of good laboratory practice (GLP). The protocol of the current study was approved by the Ethics Committee for experimental animal well-being of the Faculty of Medical Sciences at the University of Kragujevac, Serbia.

Animals and experimental design

This study was carried out using 48 adult male and female *Wistar albino* rats (24 weeks old; b.w. 550±50 g). Animals were housed under controlled environmental conditions, at 25°C and a 12-h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and tap water. For 6 weeks, the FA ALA or LA were administered by gavage to all animals [19], which were randomly divided

into 4 groups as follows: (i) male rats treated with linoleic acid (M-LA) at a dose of 7.3 mg/kg/day [20]; (ii) female rats treated with linoleic acid (F-LA) at a dose of 7.3 mg/kg/day; (iii) male rats treated with α -linolenic acid (M-ALA) at a dose of 165 mg/kg/day [21]; (iv) female rats treated with α -linolenic acid (F-ALA) at a dose of 165 mg/kg/day.

Isolated heart perfusion

On the 43rd day, after 6 weeks of treatment with the different FA, all animals were euthanized by cervical dislocation without the use of an anesthetic in order to prevent any drug interactions. The chest was then opened via midline thoracotomy. The hearts were immediately removed, immersed in cold saline and mounted on a stainless-steel cannula on the Langendorff perfusion apparatus that provided retrograde perfusion under gradually increasing coronary perfusion pressure (CPP from 40 to 120 cmH₂O). Krebs-Henseleit buffer was used for retrograde perfusion (in mmol/L: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂·2H₂O 2.5, MgSO₄·7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11 and pyruvate 2). The buffer was equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4 at 37°C. Following initiation of the heart perfusion, the preparations were stabilized within 30 min with a basal coronary perfusion pressure of 70 cmH₂O. Following the stabilization period, the perfusion pressure was reduced to 50 and then to 40 cmH₂O; the pressure was then gradually increased to 60, 80, 100 and 120 cmH₂O to establish coronary autoregulation. Testing started immediately after the control experiment to avoid unwanted, time-dependent consequences. With a sensor placed in the left ventricle, software was used to measure the cardiodynamic markers at each perfusion pressure (40, 60, 80, 100 and 120 cmH₂O). Markers of heart function included maximum and minimum rates of pressure development in the LV (dp/dt max, dp/dt min), systolic and diastolic left ventricle pressure (SLVP, DLVP, respectively), heart rate (HR) and coronary flow (CF). We evaluated all of the mentioned parameters during hypoxic (40 cmH₂O), normoxic (60-80 cmH₂O) and hyperoxic conditions (100-120 cmH₂O) according to coronary perfusion pressure (CPP).

Biochemical analyses

Blood samples were collected after 42 days of PUFA treatment and as the rats were killed by exsanguination. Samples of the coronary venous effluent were collected after stabilization of the coronary flow and for each perfusion pressure.

Preparation of plasma and erythrocyte lysate

Blood was collected into vacutainer tubes with anticoagulant (sodium citrate) and centrifuged for 10 min at 2000 x g to separate the plasma. The obtained plasma was used for determination of prooxidative markers: nitrites (the amount of NO released), superoxide anion radicals (O₂⁻), and hydrogen peroxide (H₂O₂), for the indirect quantification of the index of lipid peroxidation with reactive thiobarbituric substances (TBARS), which were measured by spectrophotometric quantification in the plasma. These parameters were also measured in the effluent samples. The remaining packed red blood cells (RBC) were washed three times with normal saline to remove the buffy coat. Hemolysis was performed by pipetting out 1 mL of washed RBC suspension in ice cold distilled water. RBC ghosts were sedimented in a high-speed refrigerated centrifuge at 10000 x g for 40 min. The cell content was separated carefully and used for reduced glutathione (GSH), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) estimation. For hemoglobin (Hb) estimation we used the lysate and an equal volume of Drabkin's reagent, which were mixed and left for 3 min to determine the hemoglobin concentration. Absorbance was read at 540 nm against a reagent blank. Hemolysates containing about 50 g Hb/L and CAT, SOD and GSH were calculated as U/Hb x 10³ according to McCord and Fridovich [22].

Determination of prooxidative parameters: superoxide anion radicals (O_2^-), nitrites (NO_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and the index of lipid peroxidation measured as TBARS

The concentration of the O_2^- radical was measured using the nitro blue tetrazolium (NBT) reagent in TRIS buffer (assay mixture) with coronary venous perfusate or plasma. The measurement was performed at 530 nm. The Krebs-Henseleit solvent served as the blank for effluent samples, and distilled water was the blank for plasma samples [23].

Nitric oxide (NO) rapidly decomposes into stable nitrite and nitrate metabolites. Nitrites can therefore be used as an index of NO production via a spectrophotometric method that uses the Griess reagent. Briefly, 0.5 mL of the perfusate or plasma was precipitated with 200 μ L of 30% sulfosalicylic acid, mixed for 30 min and centrifuged at 30000 x g. Equal volumes of the supernatant and Griess reagent were mixed and stabilized for 10 min in the dark and the sample was measured spectrophotometrically at 543 nm. Nitrite concentrations were determined using sodium nitrite as the standard [24].

Hydrogen peroxide (H_2O_2) measurement was based on the oxidation of phenol red by H_2O_2 in a reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRP). A total of 200 μ L of perfusate or plasma was precipitated with 800 μ L of freshly prepared phenol red solution, followed by the addition of 10 μ L of (1:20) HRP (made *ex tempore*). For the blank, Krebs-Henseleit solution or distilled water was used. The concentration of H_2O_2 was measured at 610 nm [25].

The index of lipid peroxidation was determined indirectly by measuring the products of the reaction with thiobarbituric acid (TBA) or reactive substances (RS). Briefly, 1% TBA in 0.05 M NaOH was incubated with coronary venous perfusate or plasma at 100°C for 15 min and then spectrophotometrically measured at 530 nm. The Krebs-Henseleit solvent or distilled water served as the blanks [26].

Determination of antioxidant parameters

In the RBC lysate, we determined the concentrations of nonenzymatic antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), and the activities of the antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD).

CAT activity was determined according to Beutler [27]. The lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform-ethanol (0.6:1 v/v) to remove Hb. Fifty μ L of CAT buffer, 100 μ L of sample and 1 mL of 10 mM H_2O_2 were mixed. Detection was performed at 360 nm.

SOD activity was determined by the McCord method [22]. The lysate (100 μ L) and 1 mL of carbonate buffer were mixed together and 100 μ L of epinephrine was added. Detection was performed at 470 nm.

The concentration of reduced glutathione (GSH) was determined based on GSH oxidation with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), using the method by Beutler [28].

Drugs

α -Linolenic acid (product number L2376) and linoleic acid (product number L1376), both of $\geq 99\%$ purity, were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, Taufkirchen, Germany.

Statistics

We used traditional parameters of descriptive statistics: average value \pm standard deviation (SD), and minimal and maximal values. Normality of the parameter distribution was evaluated with the Kolmogorov-Smirnov test. Dependent variables were compared using an analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements (*post hoc* Bonferroni test). For independent groups, we used ANOVA in one direction (*post hoc* Tukey test). Statistical

significance was based on $p < 0.05$. Complete statistical evaluation was performed with SPSS Statistics 22 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Differences between chronic treatments with LA and ALA on the cardiodynamic parameters of isolated hearts of male and female rats

The values of dp/dt min (at all CPPs) and SLVP (60 cm CPP) after chronic administration of LA were significantly lower in male than in female rats (Fig. 1A-D). The values of CF were higher in the male group when compared with the female group under hypoxic (40-60 cm CPP) and normoxic conditions (80 cm CPP) (Fig. 1F). There were no differences in HR between the groups (Fig. 1E). Females treated with ALA had lower values of dp/dt max than males only under hypoxic conditions (Fig. 1A). In addition, CF and HR were also lower at all CPPs (Fig. 1 E and F).

In males, the values of SLVP (40, 60 cm CPP) and DLVP (at all CPPs) were lower in the ALA group as compared to the LA group (Fig. 1C and D). In contrast, ALA enhanced the HR and CF only in hypoxic conditions as compared with LA (Fig. 1E and F). In females, the values of all examined cardiodynamic parameters (except HR) were lower in the ALA group when compared to the LA group at all CPPs (Fig. 1A-D). CF was also lower under hyperoxic conditions (100 and 120 CPP) (Fig. 1E and F).

Differences between chronic treatments with LA and ALA on the biomarkers of oxidative stress in isolated heart (male and female rats)

Male rats treated with LA had higher values of H_2O_2 and NO_2^- (in hypoxic conditions) when compared to female rats (Fig. 2 B and D). In contrast, under normoxic and hyperoxic conditions, the females had higher values of O_2^- and TBARS (Fig. 2A and C). Male rats treated with ALA showed a larger release of all examined biomarkers of oxidative stress (Fig. 2A-D).

Male groups treated with ALA had higher values of measured cardiac oxidative markers as compared to the LA groups (Fig. 2A-D). The values of NO_2^- were higher only in hypoxic conditions (Fig. 2D), and of O_2^- in normoxic and hyperoxic conditions (Fig. 2A). Female groups treated with ALA exhibited a stronger release of H_2O_2 (normoxic conditions) and TBARS (hypoxic and normoxic conditions) (Fig. 2B and C), and a lower release of O_2^- and NO_2^- (normoxic and hyperoxic conditions) in comparison to the LA groups (Fig. 2 A and D).

Differences between chronic treatments with LA and ALA on the biomarkers of oxidative stress in blood samples of male and female rats

Males treated with LA showed higher release of O_2^- and NO_2^- (Fig. 3A and D). There were no statistically significant differences in the production of H_2O_2 and TBARS between the sexes (Fig. 3B and C). Males treated with ALA also had higher values of O_2^- (Fig. 3 A). There were no statistically significant differences in the production of other examined biomarkers between the sexes (Fig. 3B-D).

The male ALA group had lower values of TBARS and NO_2^- when compared to the LA group (Fig. 3C and D). There were no statistically significant differences in the production of O_2^- and H_2O_2 between the compared groups (Fig. 3A and B). In females, there were no statistically significant differences in the production of all of the examined biomarkers between groups (Fig. 3A-D).

Differences between chronic treatments with LA and ALA on the levels of antioxidant markers in blood samples of male and female rats

Males treated with LA had higher activities of SOD and CAT (Fig. 4A and B), while the concentration of GSH was lower (Fig. 4C). In contrast, males treated with ALA had a higher

activity of SOD and concentration of GSH (Fig. 4A and C), whereas CAT activity was unchanged in both sexes (Fig. 4B).

The ALA group had higher values of SOD activity and GSH concentrations (Fig. 4A and C) and lower values of CAT activity when compared with the LA group (Fig. 4B). In females, there were no statistically significant differences in antioxidant markers between the compared groups (Fig. 4A-C).

DISCUSSION

The aim of the current study was to investigate the differences between the two FAs, α -linolenic acid (ALA, omega-3) and linoleic acid (LA, omega-6), on the redox status and cardiac function of rat heart. Additionally, this study aimed to evaluate the potential gender-related differences in response to ALA and LA treatment.

The two major types of long-chain PUFAs, omega-3 and omega-6, were shown to have antagonistic effects [1-7]. While omega-3 PUFAs emerged as antiinflammatory and cardioprotective, omega-6 PUFAs were shown to be proinflammatory. To test these assumptions and the differences between these FAs on cardiac contractility, we evaluated the changes in cardiac function after 6 weeks of FA treatment using the following markers of heart function: maximum and minimum rates of pressure development in the LV (dp/dt max, dp/dt min), SLVP, DLVP, HR and CF. Myocardial contractile dysfunction, a major manifestation of heart failure, can be revealed through the mechanical defects of left ventricular pressure development (+dp/dt max) and the rate of relaxation, as measured by LV negative (-dp/dt min).

The contractility parameters were lower in the F-ALA group, while the same parameters were not affected in male groups. The other important indicators used to assess LV (SLVP and DLVP) were higher in the F-LA group (compared with the F-ALA). HR had the most drastic decrease in the M-ALA group. Interestingly, CF was lower in male animals treated with LA in contrast to female rats. When comparing the effects of LA between the male and female rats, lusitropic force and cardiac perfusion was lower in the female group. When comparing the effects of ALA between male and female rats, the only differences were observed in HR and CF.

A likely explanation for the cardiac effects of PUFA is that application of FA has profound effects on calcium management. PUFA can also produce a dose-dependent reduction in sodium and calcium currents by inhibiting the ryanodine receptor (RyR). These findings support the hypothesis that a lower omega-3 index may also be a marker of an increased propensity for the hypertensive rat heart towards malignant arrhythmias [29]. Other studies have presented similar results [28]. In accordance with their results, our findings suggest that these two FAs induce changes in cardiac function of isolated rat heart and act in opposite manners between genders. Generally, compared with ALA, LA significantly affected cardiac function and strongly disturbed heart muscle function, especially in female animals. It is probable that the duration of FA treatment is one of the crucial factors in the development of cardiac dysfunction and consequently of heart hypertrophy.

LA intake may compromise the omega-3 PUFA status of the tissue since its conversion to omega-6 LC-PUFA shares a common enzymatic pathway with the n-3 family [30]. The ALA diet led to higher levels of omega-3 LC-PUFAs, including DHA in the brain and heart [30]. One investigator described the different distribution of omega-6 and omega-3 PUFAs throughout the whole rat body, and 18:2 omega-6 was the most concentrated in the heart (13 wt%); this may be one of the reasons for the diverse effects of LA and ALA on heart function in our study [31].

One more mechanism whereby LA and ALA can modulate cardiac function was demonstrated by Berecki et al [31]. They stated that membrane incorporation of PUFAs reduces the response to norepinephrine. In particular, incorporated PUFAs blunted the increase in the sarcoplasmic reticulum (SR) calcium content produced by norepinephrine and therefore attenuated the increase in transient calcium produced by norepinephrine.

To determine the mechanism by which these FAs act on cardiac function *in vitro*, we evaluated the effects of LA and ALA on the prooxidative markers and parameters of systemic redox balance in the heart. In our study, female animals treated with LA exhibited a higher release of O_2^- , while the male groups treated with ALA had higher values of H_2O_2 . On the other hand, TBARS levels were significantly changed in almost all groups, with a higher release of both TBARS and NO observed in all female groups after treatment with either LA or ALA. It is important to note that in the M-ALA group, we observed a higher rate of coronary flow and all the prooxidative parameters measured from the effluent had a positive correlation with coronary flow. Most likely, FA-induced cardiac dysfunction is a consequence of myocardial disorders but not of coronary circulation pathologies or endothelial dysfunction.

In the third part of this study we decided to exclude the effects of coronary flow rate by measuring all prooxidative and antioxidant markers from rat blood. We found higher values of O_2^- after treatment with both FAs in the male group, and higher levels of TBARS and nitrites in the M-LA group. These results are in accordance with the results of other relevant studies. Di Nunzio et al. [16] investigated the effect of LA and ALA on oxidative stress and confirmed the assumption that LA strongly induces lipid peroxidation. It is known that omega-3 PUFAs are important components of cell membranes that affect their function, and an omega-3 deficiency is deleterious to health. They are, however, prone to lipid peroxidation due to their many double bonds [4-10]. The metabolic reactions within the omega-3 and omega-6 PUFA families take place in the cell endoplasmic reticulum, apart from the last reaction of β -oxidation, which takes place in peroxisomes, thereby requiring translocation of adequate substrates into this cell compartment. PUFA residues of membrane phospholipids are very sensitive to oxidation and the action of reactive oxygen species (ROS).

Omega-3 PUFAs are known to have anti-inflammatory effects. Excess production of NO is associated with inflammation [4,5]. NO is synthesized from L-arginine by NO synthase (NOS) with NADPH and oxygen as cosubstrates [32]. Inducible NOS (iNOS) is the key enzyme that produces large amounts of NO from macrophages stimulated by the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) and by proinflammatory cytokines such as interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor (TNF) [33]. In the present study, NO was significantly higher after LA supplementation, but the elevated levels of this parameter were decreased after ALA treatment.

Furthermore, SOD activity and GSH were significantly higher in the ALA group, in contrast to CAT activity. Generally, all antioxidant markers were significantly higher in ALA male and female groups, while LA induced higher levels of antioxidant parameters in the male group. Although different omega-3 acids share common chemical characteristics, a previous work showed that EPA and DHA modulate the activity of antioxidant enzymes in different manners and they have different impacts on cell oxidative status. Popovic et al. [34] suggested that CAT activity and nitrite concentrations in liver were significantly decreased after the EPA/DHA supplementation. On the other hand, sex-related differences in this investigation indicate that the cardiodepressive effects of LA were more obvious in female rats during hypoxic conditions. Generally, males had higher values of cardiac and systemic oxidative parameters which was accompanied by a compensatory higher mobility of antioxidative protection.

Differences in the effects of LA and ALA on male and female animals may be related to the characteristics of male and female organisms. First, a higher content of body fat is characterized by a favorable fatty acid composition [35]. Second, the intake of omega-3 PUFAs is positively related to testicular volume, while the intake of omega-6 PUFAs is inversely related to testicular volume.

Finally, both fatty acids achieved their effects in hypoxic and hyperoxic conditions, suggesting that the level of oxygenation can also be an important factor in the response of the heart to the applied PUFAs. Thus, it seems that during normoxic conditions the heart is more resistant to their supplementation. ALA more negatively influenced the isolated rat heart in females. The administration of LA was connected to more prominent oxidative stress, while the application of ALA was also associated with improved activity of the antioxidative defense system (displaying higher values in males).

CONCLUSION

The findings of present study may help to elucidate the difference between the effect of ALA and LA on the heart and on local and systemic oxidative stress. The obtained results demonstrate that these PUFAs had a cardiodepressive impact on the heart, especially ALA. ALA apparently possesses antioxidative properties. Moreover, the effects of both FA were gender-specific in terms of exhibiting more negative effects in females. Lastly, ALA can be considered a beneficial supplement in all conditions and pathophysiological processes characterized by increased ROS production.

Acknowledgments: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contribution: KR and VJ designed the study, IS, DR, JJ and TN collected and analyzed all data, IS and VZ performed statistical analyses. All authors approved final version of manuscript.

Conflict of interest disclosure: All authors of the present paper confirm no actual or potential conflicts of interest, including any financial, personal, or other relationships with people or organizations.

REFERENCES

1. Spector A, Kim H. Discovery of essential fatty acids. *J Lipid Res.* 2015;56:11-21.
2. Das U. Biological significance of essential fatty acids. *J Assoc Physicians India.* 2006;54:309-19.
3. Mele M, Cannelli G, Carta G, Cordeddu L, Melis M, Murru E, Stanton C, Banni S. Metabolism of c9,t11-conjugated linoleic acid (CLA) in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;89:115-9.
4. Lunn J, Theobald H. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutr Bull.* 2006;31:178-224.
5. Simopoulos A. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med.* 2008;233:674-88.
6. Patterson E, Wall R, Fitzgerald G, Ross R, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Metab.* 2012;53:942-6.
7. Arsić A, Prekajski N, Vučić V, Tepšić J, Popović T, Vrvic M, Glibetić M. Milk in human nutrition: comparison of fatty acid profiles. *Acta Vet (Beogr).* 2009;59:569-78.
8. Du R, Zhong T, Zhang W, Song P, Song W, Zhao Y, Wang C, Tang Y, Zhang X, Zhang Q. Antitumor effect of iRGD-modified liposomes containing conjugated linoleic acid-paclitaxel (CLA-PTX) on B16-F10 melanoma. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:3091-105.
9. Farvid M, Ding M, Pan A, Sun Q, Chiuve S, Steffen L, Willett W, Hu F. Dietary linoleic acid and risk of coronary heart disease: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Circulation.* 2014;130:1568-78.
10. Chowdhury R, Wamakula S, Kunutsor S, Crowe F, Ward H, Johnson L, Franco O, Butterworth A, Forouhi N, Thompson S, Khaw K, Mozaffarian D, Danesh J, Di Angelantonio E. Association of

- dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: A systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2014;160:398-06.
11. Blasbalg T, Hibbeln J, Ramsden C, Majchrzak S, Rawlings R. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:950-62.
 12. Ramsden C, Zamora D, Majchrzak-Hong S, Faurot K, Broste S, Frantz R, Davis J, Ringel A, Suchindran C, Hibbeln J. Re-evaluation of the traditional diet-heart hypothesis: Analysis of recovered data from Minnesota Coronary Experiment (1968-1973). *BMJ.* 2016;353:1246-8.
 13. Miyashita K. Paradox of omega-3 PUFA oxidation. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014;116:1268-79.
 14. Di Nunzio M, Valli V, Bordoni A. PUFA and oxidative stress. Differential modulation of the cell response by DHA. *Int J Food Sci Nutr.* 2016;67:834-43.
 15. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015;6:183-97.
 16. Chinnadurai K, Kanwal K, Tyagi A, Stanton C, Ross P. High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats. *Lipids Health Dis.* 2016;12:121-25.
 17. Kukoba T, Shysh A, Moïbenko O, Kotsiuruba A, Kharchenko O. The effects of alpha-linolenic acid on the functioning of the isolated heart during acute myocardial ischemia/reperfusion. *Fiziol Zh.* 2006;52:12-20.
 18. Hassan A, Ibrahim A, Mbodji K, Coëffier M, Ziegler F, Bounoure F, Chardigny M, Skiba M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R. An α -linolenic acid-rich formula reduces oxidative stress and inflammation by regulating NF- κ B in rats with TNBS-induced colitis. *J Nutr.* 2010;140:1714-21.
 19. Sikorska-Wiśniewska M, Mika A, Śledziński T, Małgorzewicz S, Stepnowski P, Rutkowski B, Chmielewski M. Disorders of serum omega-3 fatty acid composition in dialyzed patients, and their associations with fat mass. *Ren Fail.* 2017;39:406-12.
 20. Folino A, Sprio E, Di Scipio F, Berta N, Rastaldo R. Alpha-linolenic acid protects against cardiac injury and remodelling induced by beta-adrenergic overstimulation. *Food Funct.* 2015;6:2231-9.
 21. Mitchell L, Grant F, Melchert B, Petty M, Kennedy R. Linoleic acid metabolites act to increase contractility in isolated rat heart. *Cardiovasc Toxicol.* 2002;2:219-30.
 22. McCord M, Fridovich I. SOD enzyme function for erythrocyte. *J Biol Chem.* 1969;244:6049-55.
 23. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *CRC handbook of methods for oxygen radical research.* CRC Press Boca Raton; 1985. p. 123-32.
 24. Green L, Wagnwr D, Glogowski J, Skipper P, Wishnok J, Tannenbaum S. Analysis of nitrate, nitrite and (15 N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126:131-8.
 25. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980;38:161-70.
 26. Ohkawa H, Ohishi N. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-8.
 27. Beutler E. Catalase. In: Beutler E, editor. *Red cell metabolism: A manual of biochemical methods.* New York: Grune and Stratton; 1982. p. 105-6.
 28. Beutler E, Duron O, Kelly B. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1963;61:882-8.
 29. Bačová B, Seč P, Radošinská J, Certík M, Vachulová A, Tribulová N. Lower omega-3 index is a marker of increased propensity of hypertensive rat heart to malignant arrhythmias. *Physiol Res.* 2013;62:201-8.
 30. 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;28:190-9.
 31. Berecki G, Den Ruijter H, Verkerk A, Schumacher C, Baartscheer A, Bakker D. Dietary fish oil reduces the incidence of triggered arrhythmias in pig ventricular myocytes. *Heart Rhythm.* 2007;4:1452-60.
 32. Blanchard H, Pédrone F, Boulter-Monthéan N, Catheline D, Rioux V, Legrand P. Comparative effects of well-balanced diets enriched in α -linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;88:383-9.
 33. Salem N, Lin Y, Moriguchi T, Lim S, Salem Jr N, Hibbeln J. Distribution of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids in the whole rat body and 25 compartments. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;100:13-20.
 34. Popović T, Borozan S, Arsić A, Martačić J, Vučić V, Trbović A, Mandić L, Glibetić M. Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male Wistar rats. *J Anim Phys Anim Nutr.* 2012;96:1020-9.

35. Komatsu W, Ishihara K, Murata M, Saito H, Shinohara K. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:1006-16.

Figure Legends

Fig.1. The effects of chronic administration of LA and ALA on the cardiodynamic parameters of isolated rat heart. **A** – The maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max); **B** – the minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt mix); **C** – SLVP; **D** – DLVP; **E** – HR; **F** – CF. All values are expressed as the means±standard deviation. Statistically significant differences ($p<0.05$) between the groups at the same coronary perfusion pressure are marked as follows: *a* – differences between the sexes treated with LA, *b* – differences between the sexes treated with ALA, *c* – differences between male rats treated with LA or ALA, *d* – differences between female rats treated with LA or ALA.

Fig. 2. The effects of the chronic administration of LA and ALA on the biomarkers of oxidative stress in isolated rat heart. **A** – O_2^- concentration; **B** – H_2O_2 concentration; **C** – the index of lipid peroxidation, measured as TBARS; **D** – the concentration of nitrites (NO_2^-).

Fig. 3. The effects of the chronic administration of LA and ALA on the levels of prooxidant markers in blood samples. **A** – O_2^- concentration; **B** – H_2O_2 concentration; **C** – the index of lipid peroxidation, measured as TBARS; **D** – the concentration of nitrites NO_2^- .

Fig. 4. The effects of the chronic administration of LA and ALA on the levels of antioxidant markers in blood samples, **A** – SOD; **B** – CAT; **C** – GSH.

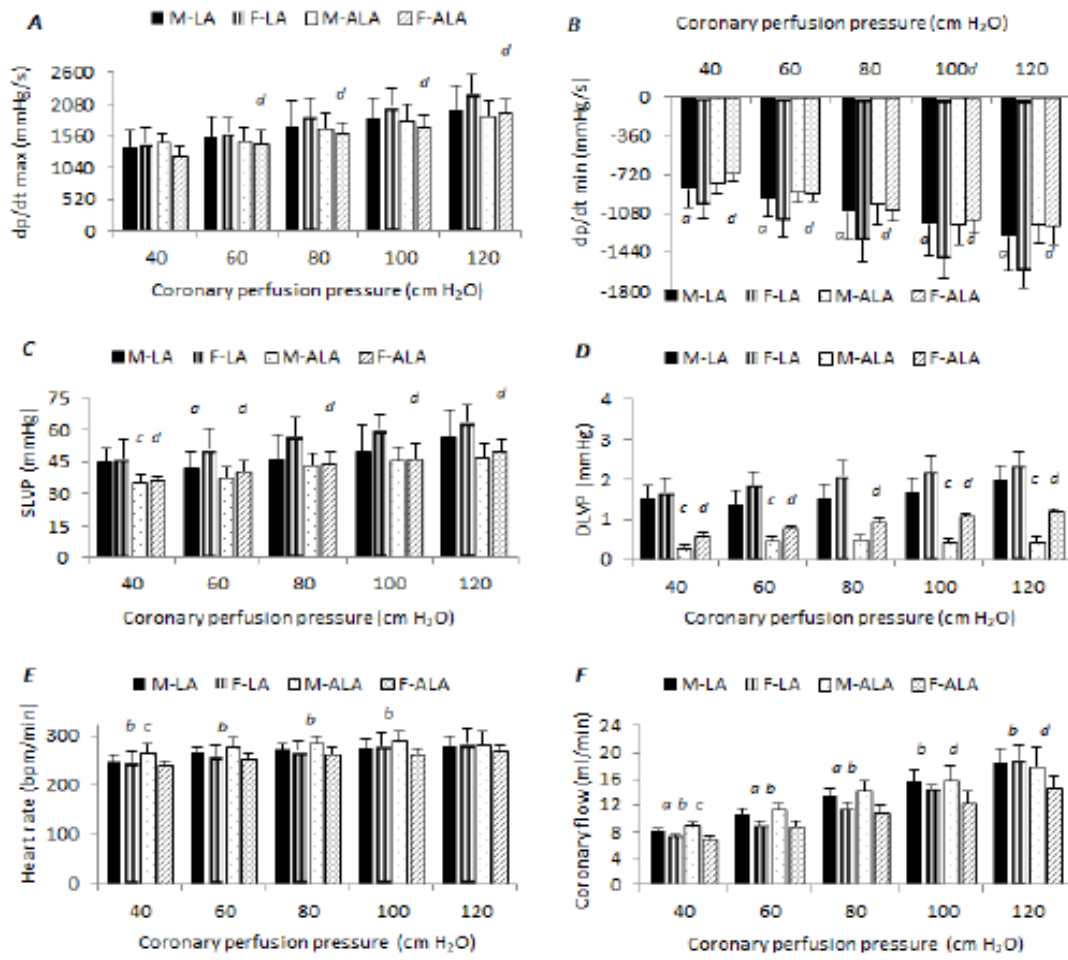


Fig. 1.

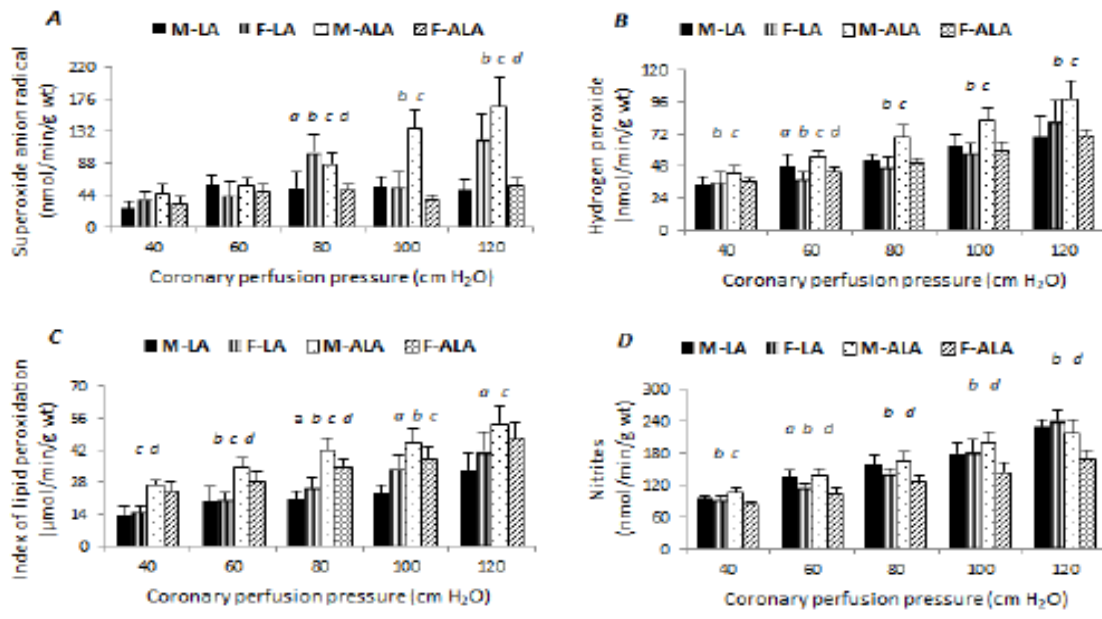


Fig. 2.

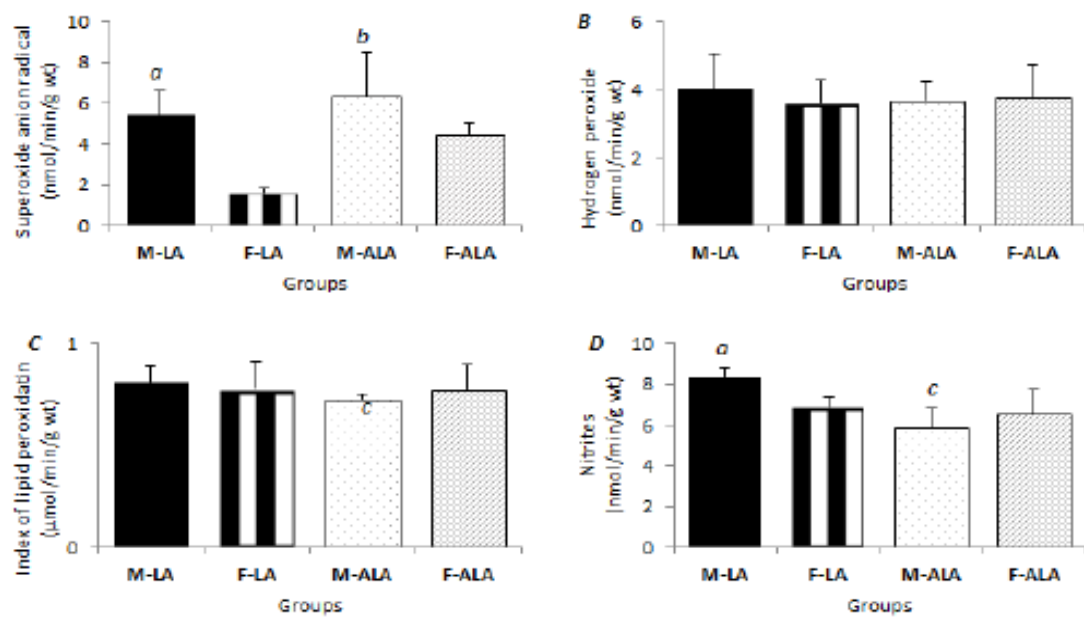


Fig. 3.

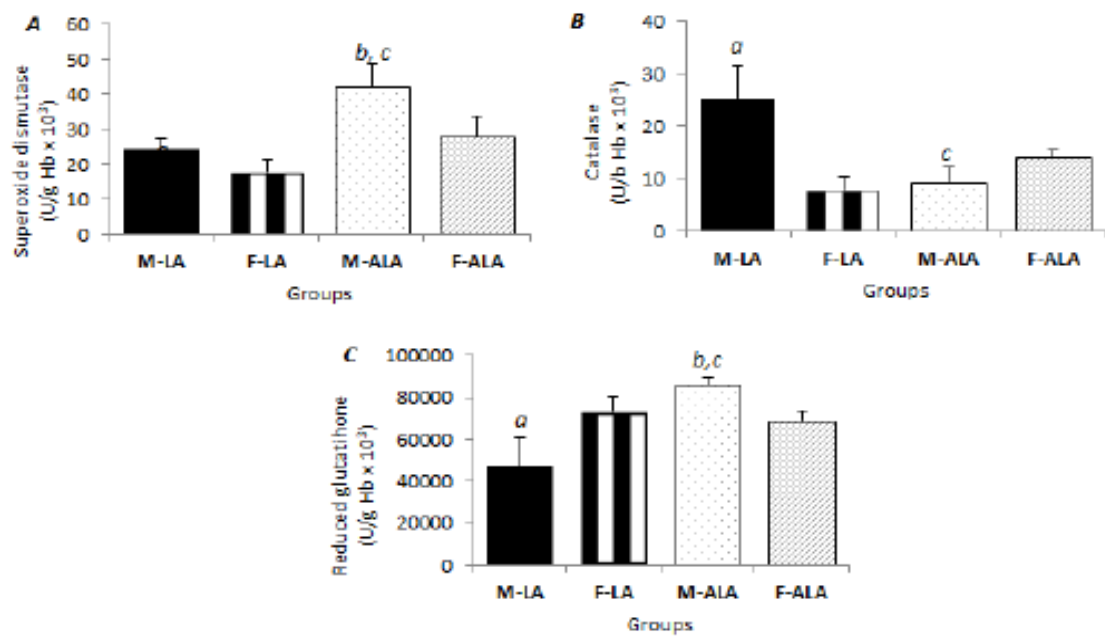


Fig. 4.