

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Ivana D. Đuričić

**Uticaj omega-3 masnih kiselina iz
različitih dijetarnih izvora na faktore rizika
za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod
ispitanika srednjih godina**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Ivana D. Đuričić

**Effect of omega-3 fatty acids from
different dietary sources on
cardiovascular risk factors in average
middle-aged subjects**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2014.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Mentor

Dr Slađana Šobajić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

Dr Jelena Kotur-Stevuljević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Sanja Mazić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za Bromatologiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Deo biohemijskih parametara je urađen u laboratoriji Kliničkog centra Srbije. Ovom prilikom bih želela svima iskreno da se zahvalim.

Najtoplije se zahvaljujem svom mentoru prof. dr Slađani Šobajić koja je osmislila temu i dizajn studije i stručno me usmeravala tokom izvođenja eksperimenta, tumačenja dobijenih rezultata i publikovanja naučnih radova. Profesorki Šobajić se takođe zahvaljujem na velikom entuzijazmu koji je uložila tokom naše dugogodišnje saradnje, kako bih prevazišla sve teškoće sa kojima sam se suočavala prilikom izrade disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Jeleni Kotur na bezrezervnoj podršci u svim fazama izrade ovog rada, a posebno na brojnim stručnim savetima i sugestijama tokom statističke obrade i interpretacije podataka.

Srdačno se zahvaljujem prof. dr Sanji Mazić na korisnim savetima i sugestijama, kao i na neophodnoj podršci i razumevanju koje mi je sve vreme pružala.

Najsrdačnije se zahvaljujem zameniku generalnog direktora Kliničkog centra Srbije prof. dr Mirku Kerkezu i njegovim kolegama na uspešnoj saradnji.

Zahvaljujem se Pharmanovi d.o.o. na interesovanju i podršci koja mi je puno značila u izvođenju eksperimenta.

Svim kolegama i osoblju Katedre za bromatologiju koji su mi na bilo koji način pomogli se ovom prilikom zahvaljujem.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici i najbližim prijateljima na velikom poverenju, podršci i ljubavi.

Uticaj omega-3 masnih kiselina iz različitih dijetarnih izvora na faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod ispitanika srednjih godina

Sažetak

Za n-3 polinezasićene masne kiseline (PMK) postoji veliki broj prikupljenih podataka da deluju u okviru svojih fizioloških uloga preko više različitih mehanizama povoljno na različite faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB). U brojnim studijama unos dugolančanih n-3 PMK pokazao je povoljne efekte na modulaciju ćelijske fluidnosti, funkciju membranskih proteina, aktivaciju transkriptornih faktora, profil lipida seruma, markere inflamacije kao i na vaskularnu reaktivnost i funkciju trombocita. Uloga dugolančanih n-3 PMK, pre svega eikozapentaenske (EPA) i dokozaheksaenske (DHA), smatra se veoma značajnom u održavanju homeostaze brojnih fizioloških procesa, tako da je pre deset godina uveden u praksu novi biomarker rizika od KVB "omega-3 indeks", koji se zasniva upravo na zasićenosti organizma ovim masnim kiselinama.

Ciljevi ove studije bili su procena sastava masnih kiselina i sadržaja n-3 masnih kiselina dugog lanca u uobičajenim dijetarnim izvorima ovih masnih kiselina; ispitivanje efekata n-3 masnih kiselina dugog lanca iz dva odabrana dijetarna izvora (losos i riblje ulje standardizovanog sastava u kapsulama) u količinama koje odgovaraju važećim dijetarnim preporukama na faktore rizika za razvoj KVB kod ispitanika srednjih godina oba pola sa umerenom dislipidemijom (sastav masnih kiselina u lipidima eritrocita, trombocita i plazme, ispitivanje profila lipida plazme, ispitivanje parametara oksidativnog stresa i ispitivanje parametara sistemske inflamacije).

Dijetarna intervencija je dizajnirana kao randomizovana, ukrštena studija. Ispitanici su po slučajnom izboru podeljeni u dve grupe koje su konzumirale dimljeni losos dva puta nedeljno (274 mg EPA + 671 mg DHA/dan) ili komercijalni suplement ribljeg ulja 396 mg EPA + 250 mg DHA/dan) tokom 8 nedelja. Nakon perioda od 6 meseci ispitanicima su zamenjene intervencije.

Analizom različitih vrsta rečne i morske ribe kao najznačajnijih izvora n-3 PMK utvrđeno je da rečne ribe imaju relativno nizak sadržaj lipida u odnosu na morske. Najveći sadržaj n-3 PMK, EPA i DHA nađen je u morskim vrstama skuši sardini i lososu. Sadržaj i odnos EPA i DHA u većini analiziranih dijetetskih suplemenata se razlikovao u odnosu na

količinu i odnos u prirodnim izvorima. Uobičajen odnos EPA/DHA u većini preparata je bio 3:2, dok je DHA bila prisutna u većoj količini u odnosu na EPA u svim uzorcima ribe. Posle 8 nedelja intervencije lososom i suplementom, zabeleženo je značajno povećanje ukupnih n-3 PMK, EPA i DHA u plazmi, eritrocitima i trombocitima u obe grupe. EPA u eritrocitima je bila jedina masna kiselina kod koje je uočen statistički značajan uticaj vrste intervencije, odnosno unete količine dijetarne EPA, na njen status ($p=0,049$). Na osnovu vrednosti omega-3 indeksa, koji predstavlja procentualni zbir EPA i DHA u ćelijskim membranama eritrocita, naši ispitanici su na početku istraživanja bili svrstani u grupu sa umerenim kardiovaskularnim rizikom. Posle obe intervencije vrednosti za omega-3 indeks su se povećale za oko 24%, ali nisu postignute ciljne vrednosti koje imaju najveći kardioprotektivni efekat. Nije bilo statistički značajnih promena u lipidnim parametrima, iako je zabeleženo veće smanjenje nivoa triglicerida posle intervencije lososom u poređenju sa suplementom. Nisu dobijene značajne promene u koncentraciji inflamatornih markera, ali je pokazana značajna negativna korelacija između ukupnih n-3 masnih kiselina plazme i rastvorljivog intracelularnog adhezionog molekula i C-reaktivnog proteina tokom ukupnog trajanja studije ($p<0,05$). Od parametara oksidativnog stresa, intervencija lososom je pokazala umereni prooksidativni efekat usled povećanja superoksidnog anjona ($p=0,025$). Statistički značajna pozitivna korelacija je nađena između ukupnih n-3 masnih kiselina i ovog parametra. Ostali markeri oksidativnog stresa nisu se značajno menjali.

Dobijeni rezultati su pokazali zadovoljavajuće trendove koji ukazuju na to da dugotrajno konzumiranje n-3 PMK u okvirima dijetarnih preporuka može imati značajan benefit u održanju kardiovaskularnog zdravlja i smanjenju faktora kardiovaskularnog rizika.

Ključne reči: n-3 masne kiseline, riba i suplementi ribljeg ulja, cirkulatorni inflamatorni markeri, oksidativni stres, kardiovaskularne bolesti i faktori rizika

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Bromatologija

UDK broj: 616.1 [577.161.4: 546.21] (043.3)

612. 392.9 (043.3)

Effect of omega-3 fatty acids from different dietary sources on cardiovascular risk factors in average middle-aged subjects

Abstract

It is widely accepted that n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially long chain (LC) eicosapentaenoic (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3), possess several physiological roles in human organism that can explain their positive impact on cardiovascular events. In numerous human studies dietary intake of LC n-3 PUFAs has shown modulating effects on membrane fluidity, membrane protein function, transcription factor activation, lipid mediator synthesis, and inflammatory markers as well as on vascular reactivity and platelet function. Through these modulating functions LC n-3 PUFAs exert beneficial effects on cardiovascular risk factors. Because of EPA and DHA importance in maintaining the homeostasis of numerous physiological processes, so-called "omega-3 index" was proposed as a new risk factor for cardiovascular disease ten years ago.

The aim of this study was to compare the main dietary sources of n-3 PUFA, such as marine or freshwater fish and fish oil dietary supplements regarding their fatty acid profile; further to investigate the relationship between recommended intake of n-3 fatty acids from oily fish or fish oil supplements and selected cardiovascular risk markers in healthy middle-aged subjects with moderate dyslipidemia (including plasma, erythrocyte and platelets fatty acid profile, blood lipid parameters, circulating inflammatory markers and oxidative stress parameters).

Participants were randomised to receive salmon (oily fish) providing 274 mg EPA + 671 mg DHA/day or commercial fish oil supplement providing 396 mg EPA + 250 mg DHA/day in cross-over trial over 8 weeks period separated by the 6 months washout period.

The analysis of different species of freshwater and marine fish as a major sources of n-3 PUFA showed that freshwater fish had relatively low content of lipids compared to the marine species. The highest content of n-3 PUFA, EPA and DHA was found in marine species, sardine, mackerel and salmon. A common ratio of EPA/DHA in most of analyzed dietary supplements was 3:2, while DHA was presented in a higher amount in all fish samples compared to EPA.

After 8 weeks of dietary intervention there was significant increase in n-3 PUFA, EPA and DHA content in plasma, RBCs and in platelets with both salmon and fish oil capsules. EPA in RBCs was the only fatty acid that mirrored the difference between fish and supplement fatty acid composition ($p=0.049$) after 8 wks of study period. After both intervention omega-3 index was increased for 24%, and although the increase was significant, both implemented dietary interventions were not effective in reaching the targeted value. Trend of triglyceride decreasing was more pronounced with salmon than with fish oil supplement, but noticed changes were not significant. Although there were no relevant changes in inflammatory marker concentrations at the end of both interventions, significant negative correlations were noticed between total plasma n-3 fatty acids and soluble intercellular adhesion molecule and C-reactive protein throughout whole intervention period ($p<0.05$). Among oxidative stress parameters, intervention with salmon have shown prooxidative effect through superoxide anion increase ($p=0.025$). Relevant positive correlation was also found among total plasma n-3 fatty acids and its concentration ($p<0.05$). Other oxidative stress markers were not significantly influenced with applied dietary interventions.

The results showed favorable trends indicating that long-term consumption of n-3 PUFA within the dietary recommendations can have additional benefit in maintaining cardiovascular health and reducing cardiovascular risk factors.

Keywords: n-3 fatty acids, fish and fish oil supplements, circulating inflammatory markers, oxidative stress, cardiovascular disease and risk factors

Scientific field: Pharmacy

Special topic: Bromatology

UDC number: 616.1 [577.161.4: 546.21] (043.3)

612. 392.9 (043.3)

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Esencijalne masne kiseline n-6 i n-3 serije.....	1
1.2	Mehanizam delovanja n-3 masnih kiselina u organizmu	4
1.2.1	Strukturna uloga	4
1.2.2	Prekursori eikozanoida	5
1.2.3	Novi antiinflamatorni medijatori-resolvini i protektini	8
1.2.4	n-3 masne kiseline i ekspresija gena	8
1.3	Zdravstveni značaj dugolančanih n-3 masnih kiselina	9
1.3.1	Kardiovaskularne bolesti (KVB).....	9
1.3.2	Inflamatorne hronične bolesti.....	10
1.3.3	Kancer.....	10
1.3.4	Oboljenja oka.....	11
1.3.5	Neuroprotektivni efekti	11
1.3.6	Protektivni efekti konzumiranja ribe na zdravlje	12
1.4	Dugolančane n-3 PMK i kardiovaskularni rizik.....	14
1.4.1	n-3 masne kiseline i metabolizam lipida	17
1.4.2	Antitrombotička i antiinflamatorna uloga n-3 PMK	17
1.4.3	Efekti n-3 PMK na vaskularne endotelne ćelije i ćelije glatkih mišića.....	18
1.4.4	Efekti n-3 PMK na proteine akutne faze	19
1.4.5	n-3 PMK i oksidativni stres	19
1.4.6	n-3 PMK i krvni pritisak.....	20
1.4.7	"Omega-3 indeks" - novi biomarker rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti	20
1.5	Dijetarni izvori dugolančanih n-3 masnih kiselina.....	23
1.5.1	Lipidi morskih i rečnih riba	23
1.5.2	Karakteristike dijetetskih suplemenata sa dugolančanim n-3 masnim kiselinama.....	26
1.6	Dijetarne preporuke za unos n-3 i n-6 PMK	27
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	31
3	MATERIJAL I METODE.....	32
3.1	Ispitanici	32
3.2	Dizajn studije.....	34

3.2.1	Odobrenje Etičkog komiteta.....	35
3.3	Metode.....	35
3.3.1	Priprema uzoraka sveže ribe.....	35
3.3.2	Ekstrakcija lipida iz uzoraka ribe i suplemenata	35
3.3.3	Ekstrakcija lipida iz plazme, eritrocita i trombocita	36
3.3.4	Određivanje sastava masnih kiselina metodom gasne hromatografije.....	36
3.3.5	Uzimanje uzoraka krvi.....	39
3.3.6	Biohemijske analize.....	39
3.3.7	Određivanje koncentracije markera inflamacije	39
3.3.8	Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	40
3.3.9	Anketiranje apoteka o dijetetskim suplementima sa n-3 MK.....	41
3.3.10	Anketa o konzumiranju ribe i drugih izvora n-3 PMK (FFQ).....	41
3.3.11	3-dnevni dnevnik ishrane (Menu records).....	41
3.3.12	Statistička analiza	42
4	REZULTATI I DISKUSIJA.....	43
4.1	Ispitivanje dijetarnih izvora dugolančanih n-3 masnih kiselina	46
4.1.1	Sastav lipida i masnih kiselina u analiziranim uzorcima ribe	46
4.1.1.1	Ukupni lipidi	46
4.1.1.2	Masne kiseline.....	47
4.1.2	Evaluacija tržišta dijetetskih suplemenata sa ribljim uljem u Srbiji.....	55
4.1.2.1	Provera sastava masnih kiselina u odabranim uzorcima suplemenata sa uljem riba.....	63
4.1.3	Izbor dijetarnih izvora n-3 MK korišćenih u intervenciji.....	67
4.2	Ispitivanje efekata nutritivno relevantnih količina n-3 masnih kiselina iz dva dijetarna izvora na faktore kardiovaskularnog rizika	70
4.2.1	Ispitanici	70
4.2.2	Izbor tipa studije	71
4.2.3	Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na profil masnih kiselina plazme, eritrocita i trombocita	72
4.2.3.1	Plazma	72
4.2.3.2	Eritrociti i trombociti.....	74
4.2.3.2.1	Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na omega-3 indeks.....	81
4.2.4	Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na profil lipida seruma.....	82
4.2.5	Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na biomarkere inflamacije.....	83

4.2.6	Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na biomarkere oksidativnog stresa ..	85
4.3	Korelacije	88
5	ZAKLJUČCI.....	89
6	LITERATURA.....	93

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

AA; arahidonska kiselina

ALA; alfa linolenska kiselina

CRP; C-reaktivni protein

DHA; dokozaheksaenska kiselina

DS; dijetetski suplementi

EMK; esencijalne masne kiseline

EPA; eikozapentaenska kiselina

HDL; high density lipoprotein, lipoprotein velike gustine

HDL-h; HDL holesterol

IL; interleukini

KVB; kardiovaskularne bolesti

LA; linolna kiselina

LDL; low density lipoprotein, lipoprotein male gustine

LDL-h; LDL holesterol

LT; leukotrieni

LX; lipoksini

MMK; mononezasićene masne kiseline

NK; natural killer cells, ćelije ubice

PG; prostaglandini

PGI; prostaciklini

PMK; polinezasićene masne kiseline

SZO; svetska zdravstvena organizacija

TG; trigliceridi

TNF; tumor nekrotični faktor

TX; tromboksani

UH; ukupni holesterol

VLDL; very low density lipoprotein, lipoprotein veoma male gustine

ZMK; zasićene masne kiseline

NO; azot monoksid, azot (II) oksid

MDA; malondialdehid

TAS; totalni antioksidativni status

VCAM-1; vascular cell adhesion molecules-1

ICAM-1; intercellular adhesion molecules-1

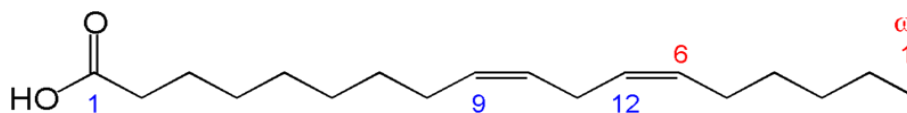
O_2^- ; superoksidni anjon

1 UVOD

1.1 Esencijalne masne kiseline n-6 i n-3 serije

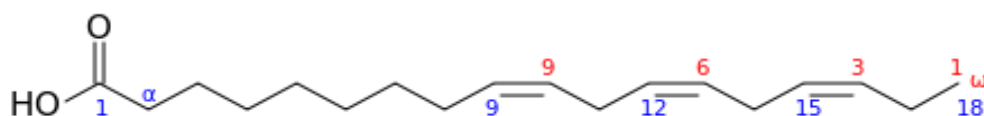
Masne kiseline esencijalne za čoveka spadaju u polinezasićene masne kiseline (PMK) i moraju se unositi hranom, jer humani organizam nema sposobnost da ih *de novo* sintetiše. Ukoliko se prva dvostruka veza kod PMK nalazi između 6. i 7. C atoma u odnosu na terminalnu metil grupu radi se o n-6 ili ω -6 seriji, a ukoliko se prva dvostruka veza nalazi između 3. i 4. C atoma radi se o n-3 ili ω -3 seriji masnih kiselina. Najvažniji predstavnici ove dve serije esencijelnih masnih kiselina su linolna (LA, 18:2) i α -linolenska kiselina (ALA, 18:3). Ove dve masne kiseline se u većoj količini nalaze u namirnicama uglavnom biljnog porekla kao što su ulje soje, lana, seme bundeve, suncokreta, orasi. S obzirom da su jako važne za brojne metaboličke procese u organizmu, postoje dokazi da nedostatak ovih kiselina može biti uzročnik mnogih patoloških stanja: dermatitisa, usporenog rasta, renalne hipertenzije, poremećaja u aktivnosti mitohondrija, poremećaja u radu srca i cirkulaciji razvoja dijabetesa tipa 2, defekta u razvoju mozga, artritisa, depresije, smanjene otpornosti organizma (1, 2).

Linolna kiselina je esencijalna n-6 PMK (slika 1). Nakon unošenja hranom, ova masna kiselina se najvećim delom ugrađuje u fosfolipide ćelijske membrane odakle može da se mobiliše i uključuje u procese biotransformacije koji su enzimski katalizovani. Tokom enzimskih procesa dolazi do nekoliko uzastopnih desaturacija i elongacija. Enzim Δ 6-desaturaza uvodi dvostruku vezu pri čemu nastaje γ -linolenska kiselina (18:3 n-6), enzim elongaza potom produžava niz za dva ugljenikova atoma pri čemu nastaje dihomogamma-linolenska kiselina (DHGA, 20:3 n-6), koja je prekursor bioaktivnih jedinjenja eikozanoida. Daljim dejstvom Δ 5-desaturaze nastaje arahidonska kiselina (AA, 20:4 n-6), takođe prekursor grupe eikozanoida. Značajni izvori linolne kiseline su semenke biljaka uljarica (suncokret, kukuruz, susam), klice i jezgrasto voće.



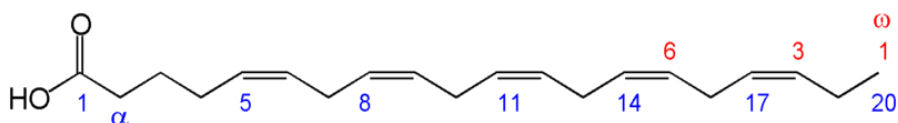
Slika 1. Linolna kiselina (9, 12-oktadekadienska kiselina)

α -linolenska kiselina je PMK koja pripada n-3 seriji (slika 2). Ona je ujedno i najjednostavnija n-3 masna kiselina, koja se sintetise u biljkama iz linolne kiseline reakcijom desaturacije, kad enzim Δ 15-desaturaza katalizuje uvođenje nove dvostruke veze u molekul (3). Humani organizam ne poseduje ovaj enzim, te je α -linolenska kiselina esencijalna za ljude.

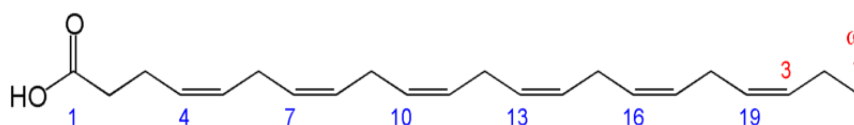


Slika 2. α -linolenska kiselina (9,12,15-oktadekatrienska kiselina)

Iako ćelije sisara ne mogu da je sintetišu, mogu da vrše metaboličku transformaciju α -linolenske kiseline unete hranom procesima desaturacije i elongacije. Ova metabolička transformacija je veoma značajna, zato što α -linolenska kiselina nema do sada dokazane fiziološke funkcije, ali proizvodi njene biotransformacije su prekursori brojnih modulatornih supstanci. α -linolenska kiselina se dejstvom enzima Δ 6-desaturaze transformiše prvo u stearidonsku kiselinu (18:4 n-3), koja zatim podleže elongaciji. Nastala masna kiselina ponovnom desaturacijom enzimom Δ 5-desaturaza se transformiše u eikozapentaensku kiselinu (EPA, 20:5n-3) koja je biološki aktivna. Iz eikozapentaenske kiseline daljom elongacijom i desaturacijom nastaje još jedna biološki značajna masna kiselina - dokozaheksaenska kiselina (DHA, 22:6 n-3) (slike 3 i 4).

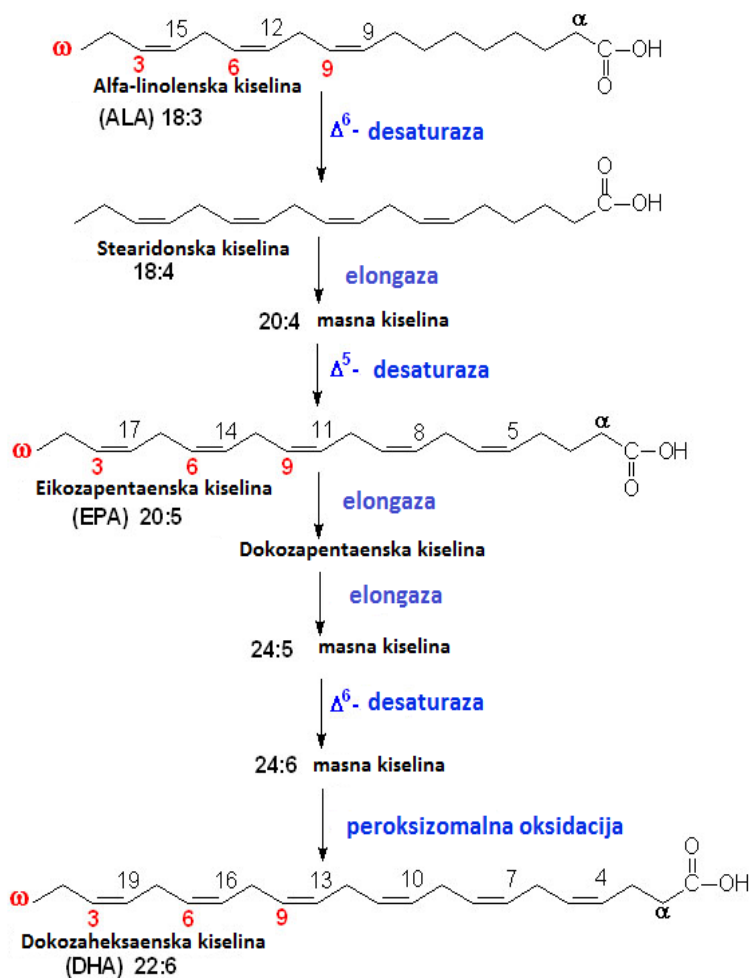


Eikozapentaenska kiselina (5, 8, 11, 14, 17- eikozapentaenska kiselina)



Dokozaheksaenska kiselina (4, 7, 10, 13, 16, 19-dokozaheksaenska kiselina)

Slika 3. Strukture EPA i DHA



Slika 4. Biotransformacija α -linolenske kiseline u EPA i DHA

Laneno seme (*Linum usitatissimum*) i ulje lanenog semena su najznačajniji biljni izvori n-3 masnih kiselina koji sadrže do 55% α -linolenske kiseline. Ulja soje i oraha također sadrže značajne količine ALA (6-10%). Količina od 15 g lanenog ulja sadrži oko 8 g ALA koja se u organizmu može konvertovati do EPA i DHA sa efikasnošću od 5-10%.

EPA i DHA imaju važne funkcije u organizmu. EPA služi kao prekursor za sintezu određenih vrsta eikozanoida i preko njih ostvaruje svoju biološku funkciju. Uloge DHA u organizmu su brojne: učestvuje u regulaciji aktivnog transporta aminokiselina (holin, glicin, taurin) kroz ćelijsku membranu, u funkciji natrijumovih kanala, u pokretanju odgovora rodopsina na stimulans. DHA je najzastupljenija n-3 masna kiselina u strukturi centralnog nervnog sistema i retine. DHA povećava koncentraciju serotonina i acetilholina u nervnom tkivu i prekursor je posebne grupe modulatornih molekula - resolvina i protektina (4).

Ljudski organizam može iz ALA da sintetiše EPA i DHA, ali ta konverzija je ograničena

smanjenom aktivnošću enzima desaturaze u nekim patološkim stanjima, kod novorođenčadi i starijih osoba. Pošto je i LA supstrat za ovaj enzim, od količine LA unete hranom takođe zavisi koliko će se enzima naći na raspolaganju za biokonverziju ALA. Oko 5 % ove kiseline unete hranom se konvertuje u EPA, a manje od 0,5 % se konvertuje u DHA (5). Utvrđeno je da se EPA ne može lako prevesti u DHA, dok se DHA lako konvertuje u EPA. I pored toga što humani organizam može sintetisati EPA i DHA iz prekursorske ALA, smatra se da su najznačajniji izvori EPA i DHA u ljudskoj ishrani morske ribe. RIBE takođe ne mogu da sintetišu ove masne kiseline, ali ih preuzimaju iz algi kojima se hrane (1). EPA i DHA se još nazivaju dugolančanim n-3 masnim kiselinama, dok se AA klasifikuje kao dugolančana n-6 masna kiselina. Dugolančane polinezasićene masne kiseline (DLPMK) se sastoje od 20 ili više C atoma i tri ili više dvostrukih veza. Smatra se da za optimalno odvijanje brojnih fizioloških procesa u organizmu u kojima učestvuju biološki aktivni metaboliti nastali iz esencijelnih masnih kiselina (EMK) mora postojati optimalan odnos između n-3 i n-6 DLPMK.

1.2 Mehanizam delovanja n-3 masnih kiselina u organizmu

1.2.1 Strukturna uloga

EMK i njihovi dugolančani derivati su deo strukturnih lipida, prvenstveno fosfolipida ćelijskih i subćelijskih membrana, gde svojim fizičkim karakteristikama utiču na osobine fluidnosti i propustljivosti membrana (6). Deficit linolne kiseline dovodi do poremećaja koji se prvenstveno manifestuju na koži, što se povezuje sa poremećenom permeabilnošću ćelijske membrane. U membranama su EMK inkorporirane najčešće u Sn-2 poziciji fosfolipida. Najzastupljenije PMK u većini ćelijskih membrana su LA i AA, dok n-3 masnih kiselina ima relativno malo, mada je u pojedinim ćelijama masnokiselinski sastav membrana visoko-specifičan. Zastupljenost EMK u većini ćelijskih membrana odražava unos ovih masnih kiselina hranom.

Kod sisara n-3 masne kiseline su selektivno raspoređene u pojedinim lipidnim klasama. Tako je ALA uglavnom zastupljena u trigliceridima i estrima holesterola, a jako malo u fosfolipidima. EPA se nalazi uglavnom u estrima holesterola, zatim u trigliceridima i fosfolipidima. Kod sisara je DHA veoma specifična masna kiselina i ulazi u sastav fosfolipida najdinamičnijih membrana (kore mozga, retine, testisa i sperme), verovatno zbog njihove visoke fluidnosti, kao i homeostatske regulacije tkiva, obnove i regeneracije. Kao glavna masna kiselina fosfolipida retine, smatra se da je DHA odgovorna za posebne

biofizičke osobine spoljnih delova membrana ćelija koje sadrže pigment vida (7). DHA je glavna masna kiselina u sivoj masi mozga (jedna trećina od svih masnih kiselina). Ispitivanja su pokazala da su neke neurološke bolesti praćene smanjenim sadržajem DHA u lipidima mozga (8). DHA je važna, ne samo za funkcionisanje i održavanje nervnog sistema, već je potencijalno presudna i za prenatalni razvoj mozga. Postoje dokazi da DHA ima prioritet u transferu kroz placentu iz majke u fetus, za šta je verovatno odgovoran neki specifični proteinski nosač (9). Takođe se zapaža selektivna akumulacija ove kiseline u mozgu fetusa. Neki naučnici idu čak toliko daleko da, na osnovu nedavnih nalaza paleontologa i dokaza da se različite vrste dugolančanih masnih kiselina kumuluju u nervnom tkivu pojedinih vrsta sisara, postavljaju hipotezu o DHA kao specifičnom glasniku u humanoj ćelijskoj membrani.

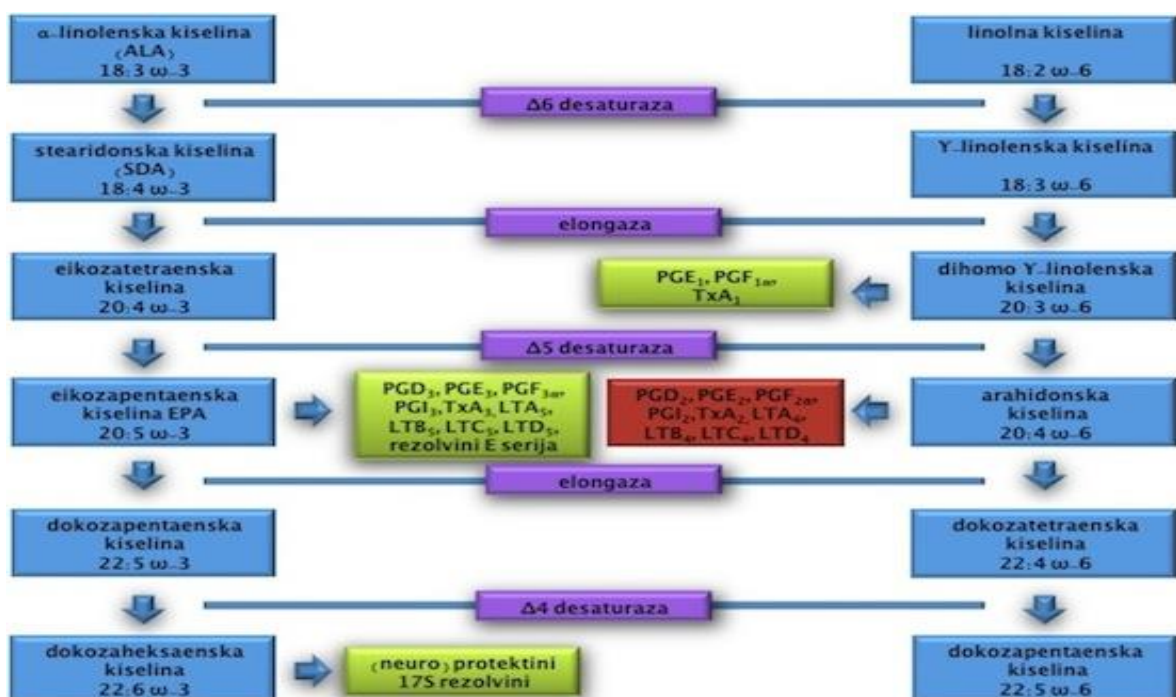
Hranom unete n-3 masne kiseline brzo se ugrađuju u strukturu ćelijske membrane, pri čemu dolazi do izmene u produkciji vazoaktivnih eikozanoida i drugih aktivnih medijatora. DHA inkorporirana u ćelijske membrane dovodi do povećanja fluidnosti i permeabilnosti utičući na ćelijsku signalizaciju, što određuje vezivanje ili oslobađanje neurotransmitera (10). Pretpostavlja se da deo pozitivnih efekata n-3 PMK zavisi i od njihove zastupljenosti u organizaciji ćelijske membrane. Tako je u nekim studijama postignut antiaritmijski efekat EPA i DHA usled zamene zasićenih masnih kiselina (ZMK) membrane kardiomiocita polinezasićenim masnim kiselinama (11). Antiaritmijski efekat n-3 PMK je najčešće rezultat modulacije elektrofiziološke funkcije kardiomiocita preko voltažno zavisnih Na i Ca kanala, pri čemu dolazi do smanjenja ventrikularnih fibrilacija (12).

1.2.2 Prekursori eikozanoida

Pored strukturne uloge, EMK i njihovi dugolančani derivati se u brojnim fiziološkim procesima mogu oslobađati iz ćelijskih membrana i metabolički biotransformisati. Kao odgovor na različite signale ove MK se oksiduju u ciklooksigenaznom i lipooksigenaznom putu do eikozanoida, metabolički aktivnih supstanci koje sadrže 20 ugljenikovih atoma. Direktni prekursori eikozanoida su dihomom γ -linolenska kiselina (DHGA) i AA iz n-6 i EPA iz n-3 serije. EPA je u konkurenciji sa AA na ciklooksigenaznom i lipooksigenaznom nivou (slika 5). U eikozanoide spada grupa prostanoida-prostaglandini (PG), tromboksani (TX) i prostaciklini (PGI), grupa leukotriena (LT), grupa lipoksina (LX) i neke hidroksi masne kiseline (13,14). Prostanoidi nastaju u ciklooksigenaznom putu i sadrže u svojim molekulima oksidisanu prstenastu strukturu, a leukotrieni nastaju u lipooksigenaznom putu i predstavljaju oksidisane molekule otvorenog niza. Tromboksani se sintetišu u

trombocitima i kada se oslobode u cirkulaciju ispoljavaju svoje dejstvo. Prostaglandini se stvaraju u zidovima krvnih sudova. Prostaglandini se u većoj koncentraciji formiraju u monocitima, a u manjoj meri u neutrofilima. Leukotrieni se formiraju u leukocitima, mastocitima i makrofagama pod dejstvom imunoloških i neimunoloških stimulatora. Jedinjenja iz iste grupe eikozanoida se, između ostalog, međusobno razlikuju i prema broju dvostrukih veza u molekuli i na osnovu toga se svrstavaju u posebne serije (npr. prostaglandini serije 3 imaju tri dvostruke veze u molekuli, što je obeleženo subskriptom 3 u skraćenom nazivu - PGD₃). Broj dvostrukih veza zavisi od prekursorske EMK. DHGA je prekursor serije 1 prostanoida (prostaglandina i tromboksana) i serije 3 leukotriena. Iz AA nastaju prostaglandini, prostaciklini i tromboksani serije 2 i leukotrieni serije 4, a iz EPA nastaju prostaglandini, prostaciklini i tromboksani serije 3 i leukotrieni serije 5.

Eikozanoidi imaju značajne uloge u mnogim fiziološkim i patološkim procesima i snažni su regulatori ćelijskih funkcija. Eikozanoidi deluju lokalno u tkivu gde su formirani i brzo prelaze u svoje neaktivne oblike. Uloge pojedinih eikozanoida su dobro proučene, a za neke se još ne zna kako deluju. Tako, na primer, PGD₂ reguliše u mozgu funkcije povezane sa spavanjem, termoregulacijom i odgovorom na bolne nadražaje, PGF_{2α} utiče na bronhokonstrikciju, mozak i semenu tečnost, TXA₂ je snažan agregator trombocita i konstriktor vaskularnih i plućnih glatkih mišića, PGI₂ je snažan vazodilatator i ima antiagregacijsko delovanje na trombocite, LTB₄ utiče na hemotaksu leukocita (15).



Slika 5. Biosinteza eikozanoida iz n-6 i n-3 serije masnih kiselina

Eikozanoidi imaju značajne uloge u mnogim fiziološkim i patološkim procesima i snažni su regulatori ćelijskih funkcija. Eikozanoidi deluju lokalno u tkivu gde su formirani i brzo prelaze u svoje neaktivne oblike. Uloge pojedinih eikozanoida su dobro proučene, a za neke se još ne zna kako deluju. Tako, na primer, PGD_2 reguliše u mozgu funkcije povezane sa spavanjem, termoregulacijom i odgovorom na bolne nadražaje, $\text{PGF}_{2\alpha}$ utiče na bronhokonstrikciju, mozak i semenu tečnost, TXA_2 je snažan agregator trombocita i konstriktor vaskularnih i plućnih glatkih mišića, PGI_2 je snažan vazodilatator i ima antiagregacijsko delovanje na trombocite, LTB_4 utiče na hemotaksu leukocita (15).

Eikozanoidi imaju direktan regulatorno-modulatorni uticaj na hemostazu, imune funkcije, inflamatorne reakcije, metabolizam glukoze i lipida. Prema podacima iz brojnih studija eikozanoidi nastali iz EPA (n-3 serija) imaju povoljnije i blaže delovanje u organizmu u odnosu na eikozanoide nastale iz AA (n-6 serija). To je od posebne važnosti kod leukotriena koji mogu izazvati snažan inflamatorni odgovor ili prouzrokovati autoimune reakcije. Eikozanoidi nastali iz n-6 masnih kiselina kada su prisutni u tkivima u većim koncentracijama, doprinose stvaranju tromba, ateroma, a podstiču i proliferaciju ćelija (16). Ukoliko se hranom unose veće količine ALA, EPA i DHA, ove MK delimično zamenjuju n-6 masne kiseline, a naročito AA u membranama verovatno svih ćelija, a posebno u membranama trombocita, eritrocita, neutrofila, monocita i ćelija jetre (3). Kao rezultat povećanog unosa EPA i DHA zabeleženo je da dolazi do (17, 18):

- ↓ produkcije PGE_2 intercelularnog medijatora u imunim odgovorima, koji inhibira aktivnosti supresora T-ćelija i vodi ka povećanoj produkciji antitela;
- ↓ TXA_2 , jakog agregatora trombocita i vazokonstriktora;
- ↓ LTB_4 , koji je izazivač zapaljenja, leukocitarne hemotakse i adhezije;
- ↑ TXA_3 , slabog agregatora trombocita i vazokonstriktora;
- ↑ PGI_3 ali bez smanjenja PGI_2 , a oba su vazodilatatori i inhibitori agregacije trombocita;
- ↑ LTB_5 , 30 puta slabijeg izazivača zapaljenja i hemotakse u odnosu na LTB_4 .

Rezultat svih ovih promena je smanjenje krvnog pritiska, smanjena agregacija trombocita i sprečavanje zapaljenskih procesa. Zbog toga se u nutritivnom smislu teži povećanju količine unetih n-3 MK, posebno što nutritivne studije pokazuju da je unos n-3 masnih kiselina u modernom načinu ishrane izuzetno nizak i u disbalansu sa unosom masnih kiselina n-6 serije. Pošto metabolizam LA i ALA vrše isti enzimi, postoji kompeticija između ove dve masne kiseline, pa se događa da veća količina jedne uzrokuje smanjenje metabolizma druge kiseline.

1.2.3 Novi antiinflamatorni medijatori-resolvini i protektini

EPA i DHA su supstrati za sintezu lokalnih lipidnih medijatora za koje je skoro otkriveno da imaju jako antiinflamatorno dejstvo. Novootkriveni molekuli su resolvini i protektini koji nastaju u ciklooksigenaznom i lipooksigenaznom putu iz EPA i DHA (19). Aktivacijom resolvina E1, resolvina D1 i protektina D1 dolazi do inhibicije transendotelne migracije neutrofila, dok protektin D1 inhibira sintezu TNF α i IL-1 β . Serhan i saradnici su proučavali E seriju resolvina koji nastaju iz EPA, i D seriju resolvina, protektina i neuroprotektina koji nastaju iz DHA (20). Ovi medijatori deluju preko G proteinskih receptora ispoljavajući antiinflamatorno delovanje. Neuroprotektin D1 se generiše tokom moždanog udara i neutrališe dejstvo proinflamatornih jedinjenja, koja nastaju usled ishemijskog oštećenja. Neuroprotektin D1 takođe sprečava potencijalno oksidativno oštećenje DNK u ćelijama retine pigmentnog epitela (21).

1.2.4 n-3 masne kiseline i ekspresija gena

Aktivacija NF- κ B transkripcionog faktora igra ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena uključenih u inflamatorne reakcije (22).

Regulacija ciljanih gena započinje u citoplazmi gde se NF- κ B vezuje sa protein inhibitorom- κ B (I- κ B). Onda kada se I- κ B fosforiliše kao odgovor na inflamatorni stimulan (citokini, virusi, LPS), oslobađa se I- κ B, time oslobađajući NF- κ B i omogućavajući njegovu translokaciju u nukleusu kako bi modulirao gene uključene u inflamatorne signalizirajuće putanje (23). Nuklearni faktor- κ B povećava ekspresiju citokina (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , GM-CSF) i hemokina (MCP-1, MIP-1 α). Aktivirani NF- κ B je bio detektovan u vlaknasto-zadebljanoj tunici intimi u zidu aterogenog krvnog suda što dovodi do progresije aterosklerotskih lezija (24). Pored toga u kulturama endotelnih ćelija, za NF- κ B se pokazalo da aktivira ekspresiju ICAM-1 i VCAM-1 i da modulira MCP-1 (makrofagni hemoatraktantni protein 1) koji signalizira leukocitima da krenu do aterosklerotične lezije. Obrnuti proces takve genske ekspresije povezane sa inflamacijom je demonstriran inhibiranjem putanje signalne transdukcije NF- κ B. Prigušivanje NF- κ B je rezultovalo i povećanjem srčane mase i boljom srčanom funkcijom.

Slično tome, n-3 PMK mogu smanjiti ekspresiju ciljanih gena uključenih u inflamaciju putem NF- κ B (23). EPA smanjuje ekspresiju TNF- α kroz prevenciju NF- κ B aktivacije, ometanjem I- κ B fosforilacije, time sprečavajući NF- κ B translokaciju u nukleusu. Proresolvirajući oksigenisani proizvod EPA, resolvin E1, takođe poseduje sposobnost da

prekinu NF- κ B aktivaciju i proizvodnju citokina vezivanjem receptora 1 sličnog hemokinu (Chem R23) za G-protein-zavisni receptor u dendritičnim ćelijama. Ovo ukazuje na to da ova ligand-receptor veza predstavlja kontraregulatornu reakciju i može predstavljati još jedan antiinflamatorni mehanizam n-3 PMK. Uzeto zajedno, deluje da se jedan od više kardioprotektivnih mehanizama n-3 PMK odvija smanjenjem transkripcije inflamatornih citokina, adhezionih molekula i COX-2 gena kroz deaktiviranje transdukcionog puta NF- κ B signala.

1.3 Zdravstveni značaj dugolančanih n-3 masnih kiselina

Mnoge epidemiološke i kliničke studije su pokazale vezu između unosa n-3 masnih kiselina i povoljnih efekata u hroničnim oboljenjima kao što su kardiovaskularne bolesti, različiti karcinomi, astma, inflamatorne bolesti creva, reumatoidni artritis, osteoporoza i dr.

1.3.1 Kardiovaskularne bolesti (KVB)

Kardioprotektivna efikasnost i bezbednost n-3 PMK pokazana je u velikom broju istraživanja, od kojih su najvažnije sledeće kliničke studije: Diet and Reinfarction Trial (DART), GISSI Prevenzione i GISSI-HF, Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) i Lyon Diet Heart Study (25-28). Sve ove studije su uključivale ispitanike iz različitih populacionih grupa sa velikim razlikama u vrsti i intenzitetu kardiovaskularnog rizika, korišćeni su različiti izvori i doze n-3 PMK, kao i različiti dizajni studija. I pored velikog broja prikupljenih rezultata o kardioprotektivnom efektu n-3 PMK, podaci nisu u potpunosti konzistentni. Tako, na primer, velika DART-2 studija nije potvrdila antiaritmijske efekte n-3 PMK i smanjenje smrtnosti kod ljudi sa stabilnom anginom (29), a u ORIGIN studiji, kod pacijenata sa visokim rizikom za pojavu dijabetesa, n-3 PMK nisu redukovale stopu kardiovaskularnih događaja (30). U OPERA studiji suplementacija n-3 PMK nije smanjila rizik od postoperativne atrijalne fibrilacije (31).

Za n-3 PMK se smatra da deluju kardioprotektivno tako što utiču na stanje više hemodinamskih faktora, kao što su krvni pritisak, dijastolno punjenje leve komore, srčani ritam i endotelna funkcija. Kardioprotektivni efekti n-3 PMK obuhvataju prevenciju aritmije, smanjenje nivoa triacilglicerida u plazmi, poboljšanje vaskularne relaksacije, antiinflamatorni efekat, sprečavanje agregacije trombocita, poboljšanje stabilnosti krvnog pritiska i antiaterogene efekte (32).

1.3.2 Inflamatorne hronične bolesti

Obavljen je veliki broj kliničkih istraživanja sa n-3 PMK kod hroničnih inflamatornih poremećaja, posebno kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom i IBD (upalnom bolesti creva) (33,34). U ovim studijama pokazano je da n-3 PMK ispoljavaju imunomodulatorne efekte menjanjem profila proizvedenih eikozanoida i smanjenjem nivoa proinflamatornih citokina, preko mehanizama povezanih ujedno i sa lipidnim i sa nelipidnim medijatorima. Veći rizik od pojave IBD povezan je sa povećanim dijetarnim unosom n-6 masnih kiselina, zato povećanje odnosa n-3/n-6 masnih kiselina u ishrani može biti od terapijskog značaja za IBD. Otkriveno je da se n-3 PMK inkorporiraju u sluzokožu creva kod pacijenata sa IBD koji koriste riblje ulje u svojoj ishrani, što kasnije rezultuje antiinflamatornim efektom u vidu smanjene proizvodnje LTB₄ od strane neutrofila i kolonijalne mukoze i smanjene proizvodnje PGE₂ i IFN- γ od strane mononuklearnih ćelija u krvi (34).

Nedavna studija na miševima kod kojih se spontano razvio kolitis, pokazala je značajno smanjenu inflamaciju debelog creva miševa koji su hranjeni ribljim uljem u odnosu na miševe koji su hranjeni kukuruznim uljem bogatim n-6 PMK (35).

U okviru jednogodišnje studije, pacijentima sa Crohn-ovom bolešću u remisiji dati su slučajnim izborom placebo ili 2,7 g n-3 PMK dnevno (datih u obliku kapsula sa ribljim uljem). Nakon 12 meseci, postojala je značajna razlika u procentu pacijenata kod kojih se za ovo vreme vratila bolest: 28% u grupi koja je koristila riblje ulje i 69% u placebo grupi (36).

Ferucci i saradnici su ispitali vezu između relativnih koncentracija masnih kiselina u plazmi tokom posta i nivoa inflamatornih markera kod 1123 osobe uzrasta 20-98 godina (37). Ukupne koncentracije n-3 PMK u plazmi su bile povezane sa nižim nivoima proinflamatornih markera (IL-6, TNF- α , C-reaktivni protein) i višim koncentracijama antiinflamatornih markera (IL-10, transformirajući faktor rasta- β). Autori su stoga zaključili da su n-3 masne kiseline od koristi kod pacijenata sa oboljenjem koje se karakteriše akutnom inflamacijom.

Studije zapaljenskih bolesti creva, reumatoidnog artritisa i drugih autoimunih oboljenja nisu takođe dale u potpunosti dosledne rezultate. Razlog mogu biti različiti odnosi n-3/n-6, različite doze i sastav masnih kiselina korišćenih u studijama (38).

1.3.3 Kancer

Postoje dokazi da konzumiranje n-3 PMK ima povoljne efekte kod različitih vrsta kancera i to kad se koristi kao dodatak redovnoj hemoterapiji, može da ima direktne

antikancerogene efekte i može da ublaži neke od sekundarnih komplikacija koje se javljaju kod kancera. (39). U eksperimentalnim radovima je utvrđeno da DHA i EPA povoljno deluju kod raka dojke, debelog creva, prostate, jetre i pankreasa, verovatno mehanizmom smanjenja inflamacije, povećanjem apoptoze i svojim antiproliferativnim i snažnim antiangiogenim efektima (38). Za DHA se smatra da ima značajnu antitumorsku aktivnost zbog svog efekta na ćelijske membrane, ali se uglavnom koristi kao adjuvans odgovarajućoj terapiji.

1.3.4 Oboljenja oka

Nedavna istraživanja su pokazala da vitamini i minerali sa antioksidativnom aktivnošću, kao što su vitamin C i E, cink, karotenoidi-lutein, zeaksantin, beta karoten, imaju važnu ulogu u održanju zdravlja i funkcije oka. DHA je važana strukturna komponenta retine, tako da nedostatak n-3 PMK u organizmu može nepovoljno uticati na njenu optimalnu funkcionalnost. Takođe, nutrijenti koji imaju antiinflamatorno dejstvo, kao što su n-3 masne kiseline, mogu smanjiti rizik za nastanak različiti oboljenja oka. Smatra se da DHA i EPA imaju važnu ulogu, pre svega u prevenciji makularne degeneracije oka uzrokovane starenjem (AMD), uključujući modulaciju metaboličkih procesa koji dovode do oksidativnog stresa, inflamacije i vaskularizacije (40). Biofizičke i biohemijske osobine DHA mogu uticati i na funkciju membrane fotoreceptora menjajući propustljivost, fluidnost, debljinu membrane, lipidni profil i aktivaciju membranskih proteina (40). Pretpostavlja se da aterosklerotske promene na krvnim sudovima retine doprinose povećanju rizika za AMD, slično mehanizmima uključenim u razvoj KVB, te svi nutritivni faktori koji utiču na usporavanje aterosklerotskih procesa povoljno deluju i kod AMD (41).

1.3.5 Neuroprotektivni efekti

n-3 masne kiseline su bitne komponente membrana nervnih tkiva i utiču na propustljivost i ekscitabilnost membrana, sinaptičku funkciju i možda na metabolizam serotonina i dopamina. Većina studija je pokazala poboljšanje simptoma kod bolesnika sa depresijom, uglavnom primenom preparata samo sa EPA. Studija kod bipolarnih poremećaja je pokazala značajno duži period do relapsa nakon primene n-3 PMK (42). Animalni modeli kojima je davana hrana obogaćena sa n-3 PMK pokazali su značajnu ulogu ovih masnih kiselina u promovisanju razvoja mozga i regulisanju ponašanja kao i u neurohemijskim aspektima vezanim za poremećaje raspoloženja (43). Nekoliko randomizovanih placebo-kontrolisanih studija sa DHA/EPA je sprovedeno kod bolesnika sa shizofrenijom i

shizoafektivnim poremećajem. Većina ovih studija je pokazala kliničku korist nakon primene većih doza EPA (42). U dvostruko slepoj studiji sa n-3 PMK u kojoj su učestvovala deca sa poremećajem pažnje i hiperaktivnošću, grupa koja je primala n-3 PMK pokazala je poboljšanje vizuelne pažnje i smanjenu anksioznost (44). Skorašnje epidemiološke studije su pokazale pozitivnu korelaciju između relativno visokog unosa DHA i EPA i nižeg relativnog rizika od pojave demencije ili njenog napredovanja (45, 46).

1.3.6 Protektivni efekti konzumiranja ribe na zdravlje

Riba i morski plodovi predstavljaju jedini značajan izvor dugolančanih n-3 PMK u ishrani savremenog čoveka. ALA se nalazi u namirnicama biljnog porekla, ali proces konverzije ove masne kiseline u EPA i DHA kod ljudi nije dovoljno efikasan. Zbog značaja ribe kao izvora n-3 DLPMK u prethodnih 40 godina vršena su brojna istraživanja njihovih zdravstvenih efekata. Sve je započelo istraživanjem danskih naučnika Bang i Dyerberga koji su u svojoj epidemiološkoj studiji uspostavili vezu između visokog unosa morske ribe, a samim tim i n-3 DLPMK, i niske incidence kardiovaskularnih oboljenja u zajednici Eskima sa Grenlanda (47). Dalja brojna istraživanja su pokazala da konzumiranje ribe u okviru svakodnevne ishrane ima brojne povoljne efekte. Istraživanjem koje je obuhvatilo ispitanike iz čak 36 zemalja, Zhang i saradnici su utvrdili značajnu povezanost između konzumiranja ribe i smanjenog rizika od opšteg mortaliteta, kao i od mortaliteta uzrokovanog ishemijskom bolesti srca i cerebrovaskularnim bolestima (48). Prema Landmarku i saradnicima, redovan unos ribe ili suplemenata ribljeg ulja dovodi do smanjenja površine zahvaćene infarktom miokarda i snižava postinfarktne vrednosti kreatin-kinaze i laktat- dehidrogenaze u serumu (49).

Mizushima je sa saradnicima utvrdio da postoji dozna zavisnost između broja nedeljnih porcija ribe i smanjenja rizika od oboljenja kardiovaskularnog sistema (50). Meta-analizom Hea i saradnika iz 2004. godine utvrđeno je da dnevni unos 20 g ribe smanjuje rizik za kardiovaskularni mortalitet za 7%, dok konzumiranje ribe najmanje 5 puta nedeljno ovaj rizik smanjuje za čak 38% (51). Dnevna doza od najmanje 35 g ribe je u tridesetogodišnjem istraživanju Orenca i saradnika povezana sa smanjenim rizikom za cerebrovaskularni insult (52). Nije utvrđena povezanost između pola ispitanika i uticaja unosa ribe na razvoj bolesti (51).

Moguće ograničenje u tumačenju pozitivnog uticaja konzumiranja ribe na smanjenje mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti u ovim istraživanjima jeste činjenica da osobe koje redovno konzumiraju ribu, takođe više vode računa i o drugim aspektima zdravog

života, više se bave fizičkim aktivnostima, manje puše i nisu skloni gojaznosti, čime nezavisno smanjuju rizik za kardiovaskularne bolesti (53). Postoje i malobrojne studije kojima nije utvrđena veza između povećanja unosa ribe ishranom i smanjenja rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja (54-56). Smatra se da je ova neusaglašenost rezultata posledica različitih uslova pod kojima su istraživanja sprovedena (53).

Pored protektivnog efekta koji ispoljava na kardiovaskularni sistem, smatra se da unos ribe može pozitivno uticati na razvoj i pravilno funkcionisanje centralnog nervnog sistema, posebno kod dece. Utvrđeno je da su deca čije su majke tokom trudnoće unosile dovoljne količine n-3 masnih kiselina putem hrane pokazala bolje mentalne i psihomotorne sposobnosti, a njihova koordinacija pokreta u uzrastu od četiri godine je bila bolja nego kod dece, čije majke nisu imale dovoljan unos ribe (57). Razvoj mozga fetusa je intenzivan u trećem trimestru, i potrebe za DHA su kritične u ovom periodu jer je ona neophodna za razvoj mozga. Meta-analiza studija sprovedenih na trudnicama je pokazala da su nizak nivo unosa ribe i niski nivoi DHA u mleku povezani sa povećanim rizikom od postpartalne depresije (58).

Unos ribe je povezan i sa povoljnim efektima kod neurodegenerativnih i retinodegenerativnih oboljenja. Istraživanjem je utvrđeno da je kod odrasle populacije unos ribe obrnuto srazmeran riziku od slabljenja kognitivnih funkcija i razvoja Alchajmerove bolesti (59). Studija koja je obuhvatila 39 876 žena srednjih godina pokazala je da su žene koje su konzumirale ribu nekoliko puta mesečno imale značajno smanjen rizik za makularnu degeneraciju u odnosu na žene koje su ribu uzimale jednom ili nijednom u toku meseca. Kao najzdravije pokazale su se tuna, skuša, losos, sardine i sabljarka (60).

Svi navedeni dokazi o pozitivnom efektu ribe u ishrani na kardiovaskularni i centralni nervni sistem uticali su da brojne internacionalne i nacionalne institucije daju formalne preporuke za unos ribe. Preporuka Američke asocijacije kardiologa na primer glasi da se riba jede najmanje 2 puta nedeljno (preporučljivo masna riba - losos, haringa i skuša) uz korišćenje biljnih ulja koja sadrže ALA za pripremanje hrane (sojino ulje). Prženu ribu, posebno onu pripremljenu u restoranima brze hrane, treba izbegavati jer ima nizak sadržaj n-3 masnih kiselina i potencijalno visok sadržaj trans-masnih kiselina (61). Kada se povećanje unosa ribe preporučuje kao jedan od načina za poboljšanje zdravlja treba obratiti pažnju na činjenicu da i ukupan sadržaj masti i sadržaj PMK značajno variraju od vrste do vrste ribe.

Treba napomenuti da konzumiranje ribe nosi i određene rizike koji su posledica zagađivanja životne sredine teškim metalima, pre svega živom i njenim jedinjenjima. U

morima, jezerima i rekama živa se pretvara u metil-živu, po zdravlje veoma opasno jedinjenje dugog biološkog poluvremena raspada, koja dospeva u ribu. Američka agencija za hranu i lekove i Agencija za zaštitu okoline izdali su 2004. godine zajedničko upozorenje koje se odnosi na trudnice, dojilje i žene koje pokušavaju da zatrudne. U upozorenju stoji kako te osetljive grupe treba da izbegavaju ribu koji sadrže povišenu koncentraciju žive, kao što su sabljarka, skuša i tuna. Preporuku da konzumiraju ribu dva puta nedeljno mogu da ispune na taj način što će jesti sardinu, oslić, losos i druge vrste sitne plave ribe koja ima nizak nivo žive, ili tunu koja je konzervirana (62).

Zbog rastućeg zagađenja životne sredine koja za posledicu ima sve neizvesniji kvalitet ribljeg mesa, u poslednje vreme postoji trend da se n-3 masne kiseline tehnološkim postupcima inkorporiraju u različite proizvode, kao što su namazi, jogurt i mleko, ili da se konzumiraju dijetetski suplementi sa ribljim uljem.

1.4 Dugolančane n-3 PMK i kardiovaskularni rizik

Kardiovaskularna oboljenja su jedan od vodećih uzročnika smrtnih ishoda u većini razvijenih zemalja, kao i u mnogim zemljama u razvoju. Svetska federacija za srce upozorava da 82% smrtnih ishoda potiče od bolesti srca i krvnih sudova i više od 60% opterećenja ishemijskom bolešću srca potiče iz nisko i srednje razvijenih zemalja. Tokom 2010. godine u Republici Srbiji, od svih oblika KVB umrlo je 56488 osoba svih uzrasta (63). Osnovni uzrok kardiovaskularnih bolesti (KVB) u 95% slučajeva je ateroskleroza, a simptomi se javljaju tek kada je proces u odmakloj fazi.

Zapaljenje vaskularnog zida predstavlja ključni faktor u dinamičkom procesu ateroskleroze. Medijatori kao što su oksidovani LDL, lipopolisaharid (LPS) iz gram-negativnih bakterija, citokini i slobodni radikali, mogu uzrokovati da u endotelu arterijskog zida započne proces razvoja ateroskleroze. Lokalna inflamatorna reakcija citokin-aktiviranog endotela dovodi do povećane ekspresije leukocitnih adhezionih molekula, uključujući vaskularne ćelijske adhezione molekule 1 (VCAM-1), intracelularne ćelijske adhezione molekule 1 (ICAM-1) i E-selektin. Monociti se vezuju za adhezione molekule na endotelnim ćelijama i kasnije migriraju u subendotelni prostor u kome se transformišu u makrofage. Makrofage se usmeravaju prema hemoatraktantnim citokinima, kao što je makrofagni hemoatraktant protein-1 (MCP-1) koga luče ćelije vaskularnih zidova kao reakciju na oksidovani LDL. Makrofage nekontrolisano preuzimaju holesterol iz LDL, postaju prepunjene lipidima i konvertuju se u penaste ćelije. U ranoj fazi ateroskleroze, akumulacija penastih ćelija evoluirala u masne pruge. Do komplikacija dolazi kada se glatke

mišićne ćelije u tunici intimi dele i proizvode ekstracelularni matriks, kao što je kolagen, a glatke mišićne ćelije u tunici mediji se pomeraju ka intimi i doprinose formiranju fibroznog omotača i stvaranju aterosklerotskog plaka.

Postoji više faktora rizika za razvoj ateroskleroze i posledično razvoj KVB. Na neke od faktora se ne može uticati (uzrast, pol i nasleđe), dok se drugi faktori rizika mogu prevenirati. Najznačajniji od njih su povišen krvni pritisak, pušenje, povišen nivo LDL-C, nizak nivo HDL-C, diabetes mellitus, gojaznost, neadekvatna ishrana, fizička neaktivnost i dr (64).

Mnoge velike studije, uključujući klinička ispitivanja u primarnoj i sekundarnoj prevenciji, došle su do zaključka da konzumiranje masnih riba, ribljih ulja ili pojedinačnih n-3 PMK predstavlja efektivnu dijetetsku strategiju za sniženje morbiditeta i mortaliteta od kardiovaskularnih oboljenja. Od ranih opservacija nad grenlandskim Eskimima, obavljena su mnoga ispitivanja suplementacije koja su demonstrirala vezu između unosa n-3 PMK i smanjenog rizika od pojave kardiovaskularnih oboljenja i smanjene smrtnosti kod ovih oboljenja. Dve velike randomizirane studije su dokumentovale efekte n-3 PMK u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja. Studija GISSI-Prevenzione je randomizirano obuhvatila 11323 pacijenata sa nedavnom inflamacijom miokarda koji su tokom 3,5 godine bili podvrgnuti tretmanu sa n-3 PMK (1 g/dnevno), vitaminom E (300 mg/dnevno), kombinacijom oba, uz kontrolnu grupu koja nije ništa uzimala. Uzimanje n-3 PMK u značajnoj meri je smanjilo smrtnost usled srčanih smetnji (za 32%), a broj iznenadnih smrti je smanjen za 45%, dok vitamin E nije bio od značajne koristi (26). Pored toga, Matsuzaki i saradnici su ispitali da li je EPA efikasna za sekundarnu prevenciju koronarne arterijske bolesti (65). Pacijenti sa potvrđenom koronarnom arterijskom bolešću su slučajno podeljeni u grupe koje su uzimale ili 1,8 g EPA u kombinaciji sa statinom ili samo statin. Nakon 4,6 godina, pojava značajnih koronarnih događaja je bila značajno niža kod pacijenata koji su primali EPA, ukazujući na to da je EPA efikasna za sekundarnu prevenciju koronarne arterijske bolesti. U skorijoj japanskoj JELIS studiji, 18645 pacijenata sa hiperholesterolemijom je randomizirano raspoređeno da primi ili samo statin ili statin zajedno sa visokoprečišćenom EPA (1,8 g/dnevno). Na kraju petogodišnje studije, otkriveno je značajno smanjenje (19%) vezano za sve važne koronarne događaje kod pacijenata koji su primali EPA (27). Meta-analiza studija koje su ispitivale uticaj unosa n-3 masnih kiselina kod ljudi sa ishemijskom bolesti srca pokazale su u trogodišnjem periodu smanjenje infarkta miokarda za 24% i smrtnosti za 16%. Studije su pokazale da i u

primarnoj i sekundarnoj prevenciji n-3 masne kiseline daju bolje rezultate u prevenciji iznenadne smrti nego nefatalnog infarkta miokarda (66).

Iako postoje neki nekozistentni rezultati između unosa n-3 PMK i kardiovaskularnog zdravlja, koji se mogu objasniti varijacijama u faktorima kao što su doza, veličina uzorka i period praćenja zdravstvenog stanja, većina eksperimentalnih i opservacionih studija je pokazala da je unos n-3 PMK povezan sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih oboljenja (67). Brojne organizacije i zdravstvene agencije stoga preporučuju unošenje EPA i DHA radi opšteg kardiovaskularnog zdravlja. I dalje nije jasno koliko n-3 PMK je potrebno kako bi se značajno smanjio rizik od kardiovaskularnih oboljenja ili koja je optimalna doza za primarnu prevenciju. Međutim, tipična preporuka za sekundarnu prevenciju infarkta miokarda je minimalni unos od 1 g/dnevno (68).

Predloženi mehanizmi kojima n-3 masne kiseline blagotvorno utiču na kardiovaskularni i cerebrovaskularni sistem vezuju se za efekte na smanjenje koncentracije triglicerida u serumu, sniženje krvnog pritiska, smanjenje agregacije trombocita i povećanje fibrinolize, stabilizaciju miokarda i smanjenje rizika od disritmije, poboljšanje funkcije endotela i elastičnosti arterijskih krvnih sudova, kao i za moguće antiaterogeno i antiinflamatorno dejstvo ovih supstanci (32).

Tabela 1. Poređenje uticaja EPA i DHA na faktore rizika za KVB (32)

	EPA	DHA
↓trigliceridi	++	++
↑HDL	-	+
↓LDL male gustine	-	+
↓krvni pritisak	+/-	+
↑endotelnu funkciju	-	+
↓puls	-	+
↓agregaciju trombocita	+	++
↓aktivaciju trombocita	+	-
↑fibrinolizu	-	-
↑glikemiju	+	+/-
↓imuni odgovor	-	+/-
↓oksidacioni stres	+	+

U tabeli 1 su prikazani različiti mehanizmi kojima EPA i DHA deluju povoljno na faktore rizika kod KVB. Iz ovog prikaza je jasno da pojedinačne n-3 DLPMK na različite načine ispoljavaju svoj kardioprotektivni efekat i da su često dopunjuju, te da je važno unositi obe masne kiseline ishranom zbog postizanja optimalnih efekata.

1.4.1 n-3 masne kiseline i metabolizam lipida

Povećani nivo triglicerida je direktno povezan sa progresijom ateroskleroze i nezavisni je faktor rizika za ishemijsku bolest srca. Smatra se da EPA i DHA modifikuju metabolizam lipida i lipoproteinskih čestica. Brojni podaci ukazuju da ove masne kiseline snižavaju prvenstveno TG u proseku za 25% do 35%, mada u slučaju kada postoji ozbiljna hipertrigliceridemija, kada je nivo TG iznad 5,5 mmol/l, taj efekat može biti čak 45% (69). Ima podataka da DHA povećava nivo HDL-C, odnosno dovodi do povećanja količine HDL2 subklase koja je mnogo aktivnija u reverznom transportu holesterola. Redukcija sinteze VLDL čestica u jetri verovatno doprinosi sniženju TG u plazmi. Mogući mehanizmi su smanjena raspoloživost masnih kiselina za sintezu TG kao rezultat smanjene *de novo* lipogeneze, povećanje beta-oksidacije masnih kiselina i redukcije u oslobađanju neesterifikovanih masnih kiselina iz jetre, izmenjene enzimske aktivnosti za sintezu TG u jetri i povećane hepatičke sinteze fosfolipida umesto TG (70). Umereno povećanje unosa n-3 PMK uglavnom nema značajnog uticaja na koncentraciju LDL holesterola, iako je DHA dovela do promene u distribuciji LDL podklasa u korist većih, manje aterogenih lipoproteinskih agregata (70). Suprotno ovim efektima, kada se primenjuju visoke doze, npr. 2-4 g/dan EPA+DHA, nivo LDL-C može da se poveća do 10%, što je potvrđeno kod pacijenata sa ekstremno visokim vrednostima TG (69). Sinergistički efekat n-3 PMK i statina može imati značajnu ulogu u optimizaciji lipidnog profila kod pacijenata sa dislipidemijom (27).

1.4.2 Antitrombotička i antiinflamatorna uloga n-3 PMK

EPA i DHA imaju veliki uticaj na trombocite. Pored toga što svojim inkorporiranjem dovode do stabilizacije membrane, n-3 masne kiseline su u konkurenciji sa arahidonskom kiselinom za ciklooksigenazni i lipooksigenazni put metaboličke transformacije, smanjujući produkciju tromboksana A₂ (71). Modulacija funkcije trombocita zavisi od primenjene doze n-3 PMK, i javlja se uglavnom pri dozama većim od 2 g/dan (11). Efekti su izgleda uglavnom posredovani delovanjem EPA (72).

Eikozanoidi proizvedeni iz EPA su generalno manje inflamatorni od svojih eikozanoidnih ekvivalenata izvedenih iz AA, služe kao vazodilatori i inhibiraju agregaciju trombocita. n-3 PMK mogu smanjiti proizvodnju eikozanoida izvedenih iz AA boreći se sa AA za inkorporisanje u fosfolipide ćelijske membrane, smanjenim oslobađanjem AA iz membrana ili inhibiranjem enzima COX-2 i 5-LOX (18). Ovo bi preusmerilo proizvodnju eikozanoida na eikozanoide iz n-3 PMK. EPA može inhibirati COX-2, time smanjujući proizvodnju PG i TX serije 2 i povećavajući količinu PG, PGI i TX serije 3. EPA takođe može inhibirati 5-LOX, što smanjuje proizvodnju LT serije 4, ali povećava sintezu LT serije 5. Iako je stvaranje proinflamatornih eikozanoida iz AA prirodna reakcija na fiziološki i patološki stimulans, posledice konzistentne i dugoročne proizvodnje ovih eikozanoida iz visokih doza n-6 PMK unetih ishranom mogle bi dovesti do hroničnog oboljenja kao što je ateroskleroza. Stoga, jedno od mogućih rešenja ovog problema je veće unošenje n-3 PMK, odnosno, smanjenje n-6/n-3 odnosa u ishrani.

1.4.3 Efekti n-3 PMK na vaskularne endotelne ćelije i ćelije glatkih mišića

Aktivacija endotela usled različitih patoloških stanja dovodi do promene u vaskularnoj homeostazi. Dolazi do disfunkcije endotela, odnosno do poremećaja ravnoteže između vazodilatatornih i vazokonstriktornih faktora (73). U normalnim fiziološkim uslovima, endotel ne dopušta cirkulišućim imunim efektornim ćelijama da adheriraju na njegovu površinu. Istraživanja su pokazala da je protokom posredovana dilatacija arterija (merilo endotelne funkcije), poboljšana nakon suplementacije n-3 PMK.

n-3 PMK imaju povoljne efekte na vaskularnu endotelnu funkciju kroz smanjenje endotelne aktivacije. Endotelne ćelije vrše ekspresiju ICAM-1, VCAM-1, E-selektina i P-selektina koji su uključeni u privlačenje leukocita i adheziju trombocita tokom tromboze i inflamacije i takođe doprinose ranoj fazi aterogeneze. Za citokin-indukovanu endotelnu aktivaciju se pokazalo da povećava ekspresiju gena za ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin, a za n-3 PMK se pokazalo da inhibira proizvodnju inflamatornih citokina koji aktiviraju endotel. De Caterina i saradnici (74) su otkrili da je kultivacija endotelnih ćelija sa DHA smanjila ekspresiju VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina i sekreciju IL-6 i IL-8. Tretiranje sa n-3 PMK je takođe smanjilo ekspresiju adhezionih molekula u ljudskim monocitima (75). Smanjenje ekspresije adhezionih molekula bi smanjilo adheziju i migraciju monocita ka endotelu i time ublažilo razvoj ateroskleroze i inflamaciju.

Ravnoteža između koncentracija vazokonstriktora (TXA₂, PGH₂, endotelin-1) i vazodilatora (NO, endotelijumski-izveden hiperpolarizujući faktor, PGI) koji se proizvode

od strane endotela, određuju vaskularni tonus. n-3 PMK mogu modifikovati proizvodnju eikozanoida u korist vazodilatacije i antitrombotične aktivnosti. Takođe je ukazano na to da n-3 PMK povećavaju endotel-zavisnu relaksaciju tako što povećavaju oslobađanje NO (76). NO inhibira agregaciju i adheziju trombocita, adheziju leukocita i proliferaciju ćelija glatkih mišića.

Još jedan n-3 PMK antiaterogeni mehanizam je efekat ovih kiselina na vaskularne glatke mišićne ćelije. Preterani rast ovih ćelija rezultuje arterijskim oštećenjem i predstavlja važnu komponentu u patogenezi ateroskleroze. EPA, i DHA u manjoj meri, mogu uticati na vaskularnu funkciju inhibiranjem rasta ovih ćelija kao i njihove proliferacije (77).

1.4.4 Efekti n-3 PMK na proteine akutne faze

Reaktanti akutne faze su proteini čije se koncentracije povećavaju ili smanjuju za 25% tokom povrede ili inflamatornih stanja. Hronična aktivacija proteina akutne faze može imati nepovoljne posledice po zdravlje. Proteini akutne faze su ceruloplazmin, C3 komponenta komplemenata, haptoglobin, transferin, α -1 antitripsin, albumin, feritin, apolipoprotein CIII (Apo CIII), CRP (C reaktivni protein) i fibrinogen. Među ovim proteinima akutne faze, povišeni nivoi fibrinogena, Apo CIII i CRP mogu da predvide kardiovaskularna oboljenja.

Povećani nivo C-reaktivnog proteina je važniji u predviđanju kardiovaskularnih oboljenja od LDL holesterola. Glavni izvor CRP su hepatociti, a njegova sinteza se reguliše putem IL-6 i IL-1. Povećane cirkulatorne koncentracije ukazuju na aterosklerozu i inflamaciju. Mehanizmi kojim n-3 PMK smanjuju CRP su inaktivacija nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) i smanjenje IL-6/IL-1 ekspresije. Aktivacija NF- κ B transkripcionog faktora igra ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena uključenih u inflamatorne reakcije (22).

1.4.5 n-3 PMK i oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje poremećene homeostaze kada se prekomerno stvaraju prooksidansi (slobodni radikala), a kapacitet antioksidativne odbrane je nedovoljan da zaštiti ćeliju. Narušava se ćelijski integritet i funkcija, što rezultuje smrću ćelije. Slobodni radikali su visoko reaktivna jedinjenja koja mogu nastati pod uticajem različitih fizičkih i hemijskih faktora ili su proizvod uobičajenih metaboličkih procesa, a zavisno od odbrambenih funkcija organizma mogu biti neutralisani ili se akumuliraju. Najznačajnija reaktivna kiseonikova jedinjenja su: superoksidni anjon (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($HO\cdot$). Usled pokrenutih lančanih reakcija u oksidativnom stresu mogu

nastati oštećenja na nivou lipidnih membrane (lipidna peroksidacija), proteinskih struktura, genetskog materijala (oksidativna oštećenja DNK). Povoljan efekat reaktivnih kiseonikovih jedinjenja javlja se samo u niskim fiziološkim koncentracijama, dok njihova hiperprodukcija može izazvati oštećenje ćelija.

Upravo je oksidativni stres nastao usled lipidne peroksidacije u direktnoj vezi sa nastankom ateroskleroze. Ove prooksidativne promene se uglavnom odvijaju na PMK u membranama endotelnih ćelija, trombocita, monocitno-makrofagnih ćelija, kao i na LDL česticama. Danas je dobro poznato da je oksidativni stres ključni faktor u nastanku ateroskleroze, u okviru koje je usko povezan sa inflamatornim odgovorom i formiranjem modifikovanih lipoproteina.

Neke studije su pokazale da n-3 PMK mogu zaštititi ćelije od oksidativnih oštećenja. Ima podataka da dugolančane PMK mogu indukovati ekspresiju antioksidantnih enzima kao što su glutation-peroksidaza, superoksid-dismutaza ili katalaza, koji održavaju oksidativnu ravnotežu u ćelijama (78). S druge strane poznato je da su dugolančane PMK sklone peroksidaciji, da dužina i broj dvostrukih veza imaju veliki uticaj na oksidativni kapacitet masnih kiselina (79, 80), tako da je uloga PMK u prooksidativnom/antioksidativnom balansu još uvek kontraverzna.

1.4.6 n-3 PMK i krvni pritisak

n-3 masne kiseline uzrokuju dozno zavisno smanjenje pritiska kod ljudi sa hipertenzijom, ali ne utiču na pritisak kod ljudi sa normalnim pritiskom ili graničnom hipertenzijom. Meta-analiza studija je pokazala smanjenje od 0,66/0,35 mm Hg stuba sistolnog/dijastolnog pritiska po gramu unetih n-3 masnih kiselina (81).

1.4.7 "Omega-3 indeks" - novi biomarker rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti

Kardiovaskularni rizik označava verovatnoću osobe da razvije aterosklerotski kardiovaskularni događaj tokom određenog vremenskog perioda. "Ukupan rizik" podrazumeva procenu rizika uzimajući u obzir glavne faktore: godine, pol, pušenje, krvni pritisak i lipide u krvi (82). Iako se ovaj termin često koristi, "ukupni rizik" nije konačan, jer uticaj drugih faktora rizika koji su takođe značajni, nisu obuhvaćeni ovim pojmom.

SCORE sistem procenjuje 10-godišnji rizik od nastanka fatalnog aterosklerotskog događaja, bilo da se radi o srčanom udaru, moždanom udaru, aneurizmi aorte, ili drugom (tabela 2).

Tabela 2. Uticaj kombinacije faktora na 10-godišnji SCORE rizik od fatalne KVB

Pol	Godine	UH (mmol/L)	SKP (mmHg)	Pušenje	Rizik %
Ž	60	8	120	ne	2
Ž	60	7	140	da	5
M	60	6	160	ne	8
M	60	5	180	da	21

UH - ukupni holesterol; SKP - sistolni krvni pritisak

Novi biomarkeri imaju samo ograničenu dodatnu vrednost kada se pridružuju proceni rizika KVB sa SCORE algoritmom. Visoko-senzitivni CRP i homocistein mogu se koristiti kod osoba sa umerenim KV rizikom.

Harris and Schacky su 2004. godine definisali "omega-3 indeks" koji predstavlja novi faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, a ujedno se predlaže i kao novi biomarker za procenu KV rizika (83). Omega-3 indeks predstavlja procentualni zbir EPA i DHA u eritrocitima u odnosu na ukupne masne kiseline. Eritrociti su uzeti kao ćelijski model za određivanje omega-3 indeksa, jer sastav masnih kiselina u njima odražava dugotrajni unos n-3 masnih kiselina. Druge krvne ćelije, kao što su mononuklearne ćelije, polimorfonuklearni leukociti ili trombociti imaju kraće poluvreme života, zbog čega pokazuju promene u sastavu masnih kiselina u kraćem vremenskom okviru. Slobodne masne kiseline u plazmi se menjaju u toku samo nekoliko minuta, dok neke frakcije kao što su plazma fosfolipidi, pokazuju samo u toku nekoliko sati ili nekoliko dana stepen inkorporacije n-3 masnih kiselina (84).

U ranijim epidemiološkim studijama je pokazano da je nizak nivo EPA+DHA u eritrocitima u korelaciji sa visokim rizikom za kardiovaskularne događaje, posebno za iznenadnu srčanu smrt i fatalni ili nefatalni infarkt miokarda (85). Takođe je dobijen dozno-zavisani odnos između omega-3 indeksa i kardiovaskularnih ishoda. Smanjenje kardiovaskularnih događaja za oko 50 % se javilo kod grupe koja je konzumirala veće količine ribe u poređenju sa grupom sa smanjenim unosom (86, 87). Ove studije su pokazale desetostruke razlike u rizicima kada se porede najmanji i najveći kvartili omega-3 indeksa. Zbog povezanosti nivoa EPA i DHA u eritrocitima sa KV rizikom, Harris and Schacky su u zavisnosti od vrednosti omega-3 indeksa podelili kardiovaskularni rizik na visok (<4%), umeren (4-8%) i nizak (>8%) (88).

Omega-3 indeks kao biomarker kardiovaskularnog rizika je pokazao normalnu distribuciju u svim do sada analiziranim populacijama. Vrednosti za omega-3 indeks ispod 1,5% ili iznad 21% nisu zabeležene, a potvrđeno je da stanovnici Aljaske imaju najveće vrednosti

(tabela 3). Epidemiološka ispitivanja zdravstvenog stanja Eskima su pokazala da ova populacija neznatno oboleva od srčanih bolesti i bolesti krvnih sudova iako ishranom unose velike količine masti. Niska incidenca srčanih i kardiovaskularnih bolesti je u korelaciji sa visokim unosom n-3 PMK iz ribe kojom se hrane.

Najniže vrednosti omega-3 indeksa su nađene kod pacijenata sa kongestivnom srčanom insuficijencijom. Depresivni ispitanici i većina ispitanika sa dijabetesom imaju vrednosti niže od 4%.

Neki faktori koji se dovode u vezu sa visokim ili niskim vrednostima za omega-3 indeks kao što su godine i pol ne mogu da se menjaju, a utiču na vrednosti omega-3 indeksa, dok drugi faktori kao što su indeks telesne mase ili postojanje dijabetesa mogu se kontrolisati, ali još uvek nije poznato koliko utiču na vrednost parametra. Indikatori socio-ekonomskog statusa su u vrlo snažnoj korelaciji sa ovim biomarkerom KV rizika. Zatim konzumiranje alkohola doprinosi višim vrednostima, kao i hormonska terapija koja utiče na povećanje konverzije α -linolenske kiseline u EPA.

Tabela 3. Omega-3 indeks u različitim populacionim grupama (90)

Nemačka	
Svi ispitanici (n = 1000)	6,14 (\pm 1,83)%
Pacijenti sa aterosklerozom (n = 190)	5,94 (\pm 1,41)%
Trudnice (24 nedelja)	7,06 (\pm 2,03)%
Pacijenti sa kongestivnom srčanom insuficijencijom (n = 895)	3,47 (\pm 1,20)%
Depresivni pacijenti (n = 90)	3,93 (\pm 1,50)%
Španija	
Ispitanici sa visokim KV rizikom (n = 198)	7,1%
Norveška	
Pacijenti sa infarktom miokarda	
Sa ventrikularnim fibrilacijama (n = 10)	4,88%
Bez ventrikularnih fibrilacija (n = 185)	6,08%
SAD	
Zdravi ispitanici (Kansas City) (n = 163)	4,90 (\pm 2,10)%
Framingham-Offspring (n = 3216)	5,30 (\pm 1,20)%
Eskimi na Aljasci	do 20%
Koreja	
Zdravi ispitanici (n = 50)	11,81% (SEM 0.35)
Pacijenti sa infarktom miokarda (n = 50)	9,57% (SEM 0.28)
Saudijska Arabija	
Pacijenti sa dijabetesom (n = 69)	3,47 (+1,20)%

1.5 Dijetarni izvori dugolančanih n-3 masnih kiselina

Najvažniji izvori n-3 masnih kiselina u ishrani su biljna ulja i ribe. U biljnim uljima je zastupljena ALA, a u mesu riba su u značajnim količinama zastupljene dve dugolančane n-3 masne kiseline EPA i DHA koje predstavljaju biološki aktivne metabolite ALA. Sadržaj dugolančanih n-3 masnih kiselina u ribi varira u velikoj meri u zavisnosti od vrste ribe, ukupnog sadržaja lipida ribe i geografske lokacije voda koje te ribe nastanjuju. Međutim, važi opšte pravilo da morske ribe kao što su tuna, losos, skuša, haringa i sardina („uljane“ ribe), koje žive na nižim temperaturama, sadrže najveće koncentracije EPA i DHA pošto skladište lipide u mesu, dok nemasne ribe koje skladište svoje lipide u jetri (kao što je bakalar) sadrže manje EPA i DHA. Rezerve lipida se kod riba nalaze u depovima i ispod kože. Lipidi u ćelijama mišićnog tkiva koji čine 4-8% ukupnih masti sastoje se najvećim delom iz fosfolipida i veoma su bogati u EPA i DHA. Pored riba, sve značajniji izvori n-3 DLPMK predstavljaju dijetetski suplementi sa ribljim uljem ili sa prečišćenim EPA i DHA.

1.5.1 Lipidi morskih i rečnih riba

Prema sredini u kojoj žive, ribe se dele na rečne, morske i ribe selice. Rečne ribe su pastrmka, som, smuđ, šaran, štika, grgeč, linjak, deverika, tolstolobik, beli amur, crvenperka, kečiga, klen, karaš i dr. Morske ribe su tuna, oslić, sardina, skuša, haringa, škarpina, zubatac, brancin, orada i dr. Ribe selice su losos, moruna, jesetra i jegulja.

Jedna od važnih hemijskih karakteristika riba je sadržaj lipida, ne samo zbog nutritivnog i energetskog značaja, već i zbog uticaja na dužinu čuvanja i stepen kvarljivosti ribe kao namirnice. Prema sadržaju lipida ribe se klasifikuju na:

- ✓ posne, sadrže manje od 5 % lipida (pastrmka, štika, šaran);
- ✓ polumasne, sadrže 5 - 10 % lipida (skuša, gajeni som);
- ✓ masne, sadrže više od 10 % lipida (tuna, losos, jegulja).

Važno je razlikovati divlju od gajene ribe, jer se značajno mogu razlikovati po sastavu i sadržaju masti (91). Lipidi riba spadaju u dve kategorije lipida - fosfolipide i trigliceride. Fosfolipidi čine integralni deo membrane ćelije, pa se često nazivaju strukturnim lipidima. Trigliceridi služe kao depoi energije, pa se često nazivaju depo mastima. Većina prirodnih triglicerida su mešoviti estri sa dve ili tri različite masne kiseline. Trigliceridi u ribama predstavljaju najveći deo lipidne frakcije (81,9-94,1%) (92). U zavisnosti od sadržaja nezasićenih masnih kiselina, lipidi riba su manje ili više tečni na sobnoj temperaturi.

Iako je sadržaj lipida u ribama veoma važna karakteristika, među različitim vrstama ribe, količina lipida mnogo više varira nego sadržaj vode, proteina ili minerala. Dok je odnos između najniže i najviše vrednosti proteina ili vode ne veći od 3:1, odnos između najviše i najniže vrednosti lipida je viši od 300:1. Sadržaj lipida kod posnih riba je nizak i relativno konstantan, dok kod masnih riba značajno varira. Kako raste sadržaj masti, tako nivo vode opada, i obrnuto. U masnim ribama sadržaj vode i masti je prilično konstantan i iznosi oko 80%. Sadržaj lipida i sastav masnih kiselina riba veoma varira između i unutar vrsta, i između belog i tamnog mesa, na šta utiče više faktora kao što su vrsta ribe, genetske osobine, starost, reproduktivni status, veličina ribe, i da li je vrsta herbivorna, karnivorna ili omnivorna, ali i faktori okoline, kao što su stanište, temperatura, salinitet, količina i vrsta dostupne hrane. Sezonske varijacije u dostupnosti hrane takođe utiču na ukupni sadržaj lipida i sadržaj n-3 masnih kiselina (93). Kod riba koje se hrane planktonom, kao npr. haringa, sezonske varijacije prate promene u produkciji planktona (91). Generalno, kod riba hladnih voda veći je sadržaj n-3 masnih kiselina nego kod tropskih vrsta. Pelagične ribe hladnih voda obično imaju najveći sadržaj EPA i DHA. Značajan je i gubitak lipida tokom mrešćenja riba, pa je i apsolutni sadržaj n-3 masnih kiselina u tom periodu smanjen, i stoga su ribe van perioda mrešćenja nutritivno vrednije (93). Uobičajeno ribe pred mrešćenje prestaju da se hrane i koriste rezerve masti i proteina (91). Pokazano je da faktori sredine, kao što su temperatura i salinitet utiču na sastav masnih kiselina. Kod jedne vrste gajene ribe povećanje saliniteta je negativno uticalo na koncentraciju DHA.

Generalno je prihvaćeno da slatkovodne ribe sadrže manje n-3 masnih kiselina nego morske, što je u većini slučajeva tačno, ali postoje i slatkovodne ribe koje su bogate n-3 masnim kiselinama. Takođe je dokazano da su procesi elongacije i desaturacije masnih kiselina efikasniji kod slatkovodnih riba, te stoga slatkovodne ribe mogu odgovarajućom ishranom postići visoke sadržaje EPA i DHA. Ipak, važi opšte pravilo da slatkovodne ribe imaju veći sadržaj n-6, a morske n-3 masnih kiselina. Morske ribe su najbogatije u DHA, zatim u EPA, a siromašne u LA i ALA, a slatkovodne su bogatije u LA i AA (94).

Gajena riba sintetizuje konstantnije količine EPA i DHA, zato što je njihova ishrana izbalansirana i kontrolisana. Gajenje morskih riba može prevazići problem varijacija sastava masnih kiselina kao posledice razlike u ishrani. Još jedna prednost gajenja riba u odnosu na iskorišćavanje prirodnih staništa je bolja kontrola zagađivača životne sredine, koji su u vezi sa konzumiranjem ribe. U jednom broju studija je nađen veći sadržaj ukupnih PMK i n-3 masnih kiselina kod divljih vrsta. Međutim, ovi rezultati su u

suprotnosti sa rezultatima drugih autora koji su pronašli veći sadržaj ukupnih PMK i n-3 masnih kiselina u gajenim primercima različitih vrsta riba (93). Sa manjim izuzecima, kod većine gajenih riba ipak je pronađen veći sadržaj lipida nego kod divljih, a razlike u sadržaju n-3 masnih kiselina između gajenih i divljih riba mogu biti objašnjene različitim sastavom masnih kiselina u hrani. Većina morskih riba su karnivore i jedu male ribe i rakove u kojima većinu PMK čine n-3 masne kiseline, a n-6 masne kiseline su vrlo slabo zastupljene. Nasuprot tome, u komercijalnoj hrani za ribe koriste se biljna ulja koja sadrže većinom n-6 masne kiseline, a malo n-3 masnih kiselina. Međutim, ima komercijalne hrane koja u visokom procentu sadrži riblje brašno i riblje ulje, pa stoga sadrži veći procenat n-3 masnih kiselina, i zato korišćenje ove vrste hrane dovodi do većeg deponovanja n-3 masnih kiselina u mesu gajenih riba (93).

Termička obrada može uticati na neke nutritivne komponente riba, dok će druge ostati nepromenjene. Termička obrada može povećati ili smanjiti ekstrakciju lipida zbog vezivanja lipida kovalentnim vezama (91). Termički tretirana riba gubi vodu, u zavisnosti od načina pripreme, vrste ribe, veličine porcije. Pošto se povećava količina čvrstih materija, koncentracija nekih materija može biti veća nego u svežoj ribi (91). Prženjem ribe se sadržaj lipida povećava, a profil masnih kiselina u uzorku nakon prženja sličan je profilu masnih kiselina ulja koja je korišćeno za takav način pripreme. Vrsta ulja za prženje značajnije određuje sastav masnih kiselina riba sa niskim sadržajem masti. Riblji lipidi, zbog velike količine nezasićenih masnih kiselina i niske količine prirodnih antioksidanasa, takođe podležu procesu autooksidacije mnogo brže od lipida drugih namirnica.

U tabeli 4 su prikazani podaci iz literature o prosečnom sadržaju n-3 masnih kiselina u različitim vrstama ribe iz kojih se vidi da sadržaj ukupnih lipida i pojedinih masnokiselinskih frakcija veoma varira u zavisnosti od vrste ribe.

Tabela 4. Sadržaj n-3 masnih kiselina i drugih lipida u različitim vrstama ribe* (95)

Vrsta ribe	Lipidi	ZMK (%)	MMK (%)	PMK (%)	ALA	EPA	DHA	Holesterol
Bakalar	0,7	0,17	0,1	0,3	Tr**	0,1	0,2	43
Iverak	1,0	0,2	0,3	0,3	Tr	0,1	0,1	46
Haringa	4,4	1,3	0,8	1,5	0,1	0,4	0,8	28
Skuša	13,0	2,5	5,9	3,2	Tr	1,0	1,2	53
Losos	3,4	0,6	0,9	1,4	Tr	0,4	0,6	/
Tuna	2,5	0,9	0,6	0,5	/	0,1	0,4	/
Pastrmka	3,4	0,6	1,0	1,2	0,1	0,1	0,4	57
Šaran	5,6	1,1	2,3	1,4	0,3	0,2	0,1	67

*Na 100 g sirove jestive ribe; **Tr=trag

1.5.2 Karakteristike dijetetskih suplemenata sa dugolančanim n-3 masnim kiselinama

Poslednjih decenija, usled značajnog napretka nauke o hrani i ishrani, postalo je jasno da se optimalnom ishranom može uticati na zdravlje organizma i prevenirati mnoge hronične bolesti. Veliki je broj široko i lako dostupnih informacija o tome kako hranom obezbediti optimalnu ishranu, ali i kako ishranu obogatiti određenim dijetetskim proizvodima. U tom smislu veliki značaj dobijaju dijetetski suplementi (DS), čija popularnost raste poslednje tri decenije.

Američki Kongres 1994. godine donosi Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA) kojim je ustanovljena kategorija dijetetskih suplemenata. Ovim aktom dijetetski suplementi se definišu kao proizvodi koji su namenjeni suplementiranju hrane i koji sadrže jedan ili više aktivnih sastojaka: vitamine, minerale, biljne komponente, aminokiseline, koncentrate, metabolite, konstituente, ekstrakte ili kombinaciju ovih komponenti. Iako se kategorišu kao hrana, dijetetski suplementi se proizvode u dozno-zavisnim oblicima (kapsule, tablete, pastile, oriblete, rastvori, sirupi i dr). U Evropskoj Uniji ova kategorija proizvoda je prepoznata tek 2002. godine kada je doneta direktiva 2002/46EC koja je doprinela prevazilaženju razlika u nacionalnim propisima zemalja članica Evropske Unije. Dijetetski suplementi su u našoj zemlji regulisani Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda koji je donet 2010. godine i koji je u najvećoj meri harmonizovan sa evropskom regulativom. I naša nacionalna i evropska regulativa u najvećoj meri regulišu proizvode sa vitaminima i mineralima, dok su ostale biološki aktivne komponente, uključujući i n-3 masne kiseline, uglavnom neregulisane, pre svega u pogledu doze, upozorenja, dozvoljenih hemijskih oblika.

Zbog opšteprihvaćenog zdravstvenog značaja n-3 masnih kiselina, sve veću pažnju i značaj dobijaju dijetetski suplementi sa uljem riba u kojima su biološki aktivne komponente upravo ove masne kiseline, pre svega EPA i DHA. Istovremeno, globalna zagađenost mora i okeana zabrinjava, jer se različite toksične supstance akumuliraju ushodno u lancu ishrane u morima, što kulminira u ribi kao izvoru hrane za ljude. Uglavnom se akumuliraju neurotoksična metil-živa i kancerogena organohlorna jedinjenja, kao što su dioksini i polihlorovani bifenili (96). Iz tih razloga sve je veća primena prečišćenih ribljih ulja u formi dijetetskih suplemenata.

Kao izvor ovih dugolančanih PMK najčešće se koristi ulje morskih riba (tuna, losos, haringa) ili ulje dobijeno iz jednoćelijskih morskih algi (*Cryptocodinium*,

Schizochytrium). Alge predstavljaju važnu grupu fitoplanktona u okeanskoj sredini i imaju značajnu primenu u industriji u proizvodnji triacilglicerola sa visokim procentom DHA.

Standardizovanjem koncentracija EPA i DHA u ribljem ulju dobijaju se različiti odnosi ovih masnih kiselina u zavisnosti od namene preparata. Preparati sa većim sadržajem EPA u odnosu na DHA primarno su namenjeni smanjenju rizika od kardiovaskularnih oboljenja, a preparati sa većom količinom DHA su uglavnom namenjeni za specifične populacije kao što su trudnice i žene koje doje, kao i za zaštitu zdravlja oka.

U prirodnim ribljim uljima EPA i DHA su u obliku triacilglicerola, dok mnogi suplementi sadrže masne kiseline u formi etil estara ili reesterifikovanih triacilglicerola (rTG). Različiti hemijski oblici uslovljavaju razlike u bioraspoloživosti aktivnih komponenti o čemu se tek poslednjih godina počelo razmišljati. Na iskoristljivost n-3 MK iz suplemenata utiče veliki broj faktora i ona se može značajno razlikovati od iskoristljivosti iz prirodnih izvora, tj. iz ribe. Prema Visioliju i saradnicima, apsorpcija EPA iz riba je 3,5 puta efikasnija, a DHA 5,5 puta u poređenju sa kapsuliranim oblicima (97). Kada se uporede pojedinačne doze tri najčešće dostupna hemijska oblika (rTG, etilestri i slobodne masne kiseline) najveću iskoristljivost su pokazali TG u odnosu na etil-estre i slobodne masne kiseline (98, 99).

1.6 Dijetarne preporuke za unos n-3 i n-6 PMK

Istraživanja su pokazala da je u toku evolucije odnos n-6 i n-3 masnih kiselina u ljudskoj ishrani bio približno 1, dok je danas taj odnos od 10:1 do 20-25:1 (100). Povećano konzumiranje n-6 masnih kiselina zabeleženo je u poslednjih sto godina. Razlog je razvoj tehnologije i primena velikih količina biljnih ulja u ishrani koja su bogata n-6 masnim kiselinama. Unos dugolančanih n-3 PMK u jednoj populaciji može značajno da varira u zavisnosti od dijetarnih navika, godina, pola, ali generalno prosečan unos je uglavnom značajno niži od poželjnih vrednosti. Podaci većine istraživanja o zastupljenosti n-3 masnih kiselina u ishrani stanovnika pojedinih zemalja ukazuju na značajni deficit ovih esencijelnih nutrijenata i odstupanja od dijetarnih preporuka.

Prema poslednjim procenama koje se odnose na unos ribe u Velikoj Britaniji, odrasli konzumiraju ~ 100 g nemasne ribe i 50 g uljane ribe nedeljno (101); sličan unos (u nekim zemljama čak i manje) zabeležen je i u drugim Evropskim zemljama (severnim i istočnim), severnoj Americi i Australiji sa okeanijom. Srednja vrednost unosa n-3 DLPMK u ovim zemljama je ~ 0,15-0,25 g/dan (101).

Unos nemasne ribe je veći u južnim evropskim zemljama, dok je unos nemasne i uljane ribe najzastupljeniji u Japanu i nekim Azijskim zemljama.

Način ishrane velikog dela svetske populacije ukazuje na to i da je unos n-3 PMK nedovoljan u ishrani većine stanovništva. To se vidi iz izveštaja u kom je 15 evropskih zemalja objavilo podatke o prosečnom unosu PMK i n-3 masnih kiselina za decu i adolescente, a 22 zemlje su dale podatke za odraslu populaciju (102). Kod dece je u ovom istraživanju utvrđeno da prosečan unos n-3 PMK varira između 1,1 i 2,2 g/dan (0,6% E i 1,4% E). Srednji unos za ALA je od 0,5-1,1 g/dan (0,5-0,6% E) za decu i adolescente. Unos EPA varira između 0,02 i 0,04 g/dan (0,01-0,02% E), a za DHA vrednosti su manje od 0,1-0,13g/dan (0,03-0,06 % E). Za odrasle srednji unos n-3 PMK se kreće između 1,5-2,6 g/dan (0,7-1,3% E). Za ALA srednji unos je između 0,7-2,3 g/dan (0,4-0,8% E). Za EPA i DHA prosečan unos iznosi 0,03 i 0,15 g/dan (0,01 i 0,06 % E) i 0,05 i 0,27 g/dan (0,02 i 0,12 % E), redom.

Prema poslednjim zvanično objavljenim podacima, u 2005. godini potrošnja ribe u Srbiji je iznosila 6,4 kg po stanovniku godišnje, što je izuzetno malo i daleko je od preporučenog nedeljnog unosa ribe (103). Korišćenje soje i lanenog semena kao najboljih dijetarnih biljnih izvora n-3 masnih kiselina je tradicionalno nisko kod naše populacije, pa se može pretpostaviti da je i unos ALA nezadovoljavajući.

Zbog procenjenog nedovoljnog unosa n-3 masnih kiselina ishranom i njihovog velikog zdravstvenog značaja donet je veći broj preporuka o unosu EMK, zatim zasebno za MK iz n-3 i n-6 serije, kao i preporuke o unosu pojedinih MK. Prikaz brojnih nacionalnih preporuka i više internacionalnih, poput DRI (Dietary Reference Intake), AI (Adequate Intake), ili AMDR (Acceptable Macronutrient Distribution Range), dat je u tabeli 5.

AI za n-3 masne kiseline iznosi 1,6 g/dan za muškarce i 1,1 g/dan za žene, dok je vrednost AMDR postavljena na 0,6% i 1,2% ukupne energije (E) za muškarce i žene (104).

Prema *German-Austrian-Swiss recommendations*, unos n-3 i n-6 PMK treba da bude između 7 i 10 % E, sa odnosom LA/ALA od 5:1. Preporučeni unos (RI) za LA je 2,5% E za odrasle i decu iznad 4 godine. Utvrđene vrednosti za unos n-3 PMK su 0,5% E za sve starosne grupe uključujući odojčad, decu i žene u trudnoći i laktaciji. U primarnoj i sekundarnoj prevenciji KVB smatraju se adekvatnim količine od 0,25 i 1 g/dan n-3 PMK, redom, dok se doze do 3 g/dan smatraju bezbednim. Tokom trudnoće i laktacije prema ovim preporukama unos DHA treba da bude najmanje 200 mg/dan (102).

Nordic Nutrition Recommendations (NNR), preporučuje unos PMK od 5-10% E za odrasle i decu stariju od 2 godine od čega se 1% E odnosi na n-3 PMK. Zahtevi na kojima se

baziraju ove preporuke su dobijeni iz minimalnih vrednosti potrebnih za decu. Odnos n-6/n-3 između 3 i 9 je prihvaćen kao adekvatan. Za n-3 PMK preporuka je da čine 0,5% E, a vrednost je zasnovana na aktuelnim podacima o dijetarnim navikama u Evropi. Prema NNR uobičajeni unos ukupnih PMK ne treba da prelazi 15% E, a n-3 PMK ne treba da prelaze 5% E. Iste preporuke su prihvaćene za trudnice i dojilje (102).

Preporuke u Velikoj Britaniji (DoH), su date za minimalni unos n-3 i n-6 PMK koji treba da iznosi 6% E, a maksimalni ne bi trebalo da prelazi 10 % E. Za odojčad, decu i odrasle LA treba da obezbedi 1% E, dok ALA treba da obezbedi najmanje 0,2% E (102).

Američki Institute of Medicine (IoM, 2005) navodi da su studije na odraslima pokazale odsustvo simptoma deficita n-6 PMK sa unosom 7,4 - 8 g/dan LA. U SAD generalno nije prisutan deficit n-6 PMK u opštoj populaciji. AI za grupe od 19-30 godina i 31-50 godina su 17 g/dan LA za muškarce i 12 g/dan za žene. Kada su u pitanju n-3 PMK, studije su pokazale da se deficit ALA javlja kod unosa 0,015 do 0,095 g/dan, dok unos od 0,3 g/dan prevenira simptome deficita. Za muškarce AI za ALA je 1,6 g/dan, za žene 1,1 g/dan. AI u trudnoći iznosi 1,4 g/dan i u laktaciji 1,3 g/dan (102).

Organizacije WHO/FAO su postavile ciljeve za unos n-6 PMK koji iznosi 5-8% E, sa ukupnim unosom PMK od 6-10% E. Preporuke WHO/FAO za unos n-3 PMK su 1-2% E.

Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) preporučuje unos od 450 mg n-3 PMK za opštu populaciju uključujući i trudnice (102).

Pošto su n-3 masne kiseline esencijalne za normalan rast i razvoj u raznim periodima, one moraju biti uključene u ishranu trudnica, dece u razvoju, mladih i starijih osoba. Najznačajniji periodi za obezbeđivanje adekvatnih količina n-3 masnih kiselina su trudnoća kada se vrši transfer ovih kiselina kroz placentu, rano detinjstvo kada se nastavlja nakupljanje n-3 masnih kiselina u mozgu i retini, i laktacija kada je potrebno obezbediti ove kiseline za postnatalni razvoj. Značaj suplementacije hrane za bebe i malu decu n-3 masnim kiselinama je takođe u centru interesovanja stručne javnosti, tako da bi prema preporukama ISSFAL grupe, lipidi u zamenama za humano mleko morali sadržati oko 10% linolne kiseline (od svih masnih kiselina), 1,5% alfa-linolenske kiseline, 0,5% arahidonske kiseline, 0,35% DHA i manje od 0,1% EPA.

Tabela 5. Pregled dijetarnih preporuka za unos lipida i masnih kiselina za odrasle koje su postavljene od strane različitih zemalja i organizacija (102)

Zemlje/ Organizacije	Godina	Ukupni lipidi	ZMK	TMK	MMK	PMK
Velika Britanija	1991	33% E	<10% E	<2% E	12% E	6% E sa najmanje 1% E LA i 0,2% E ALA
Nemačka, Austrija, Švajcarska	2000	30% E	<10% E	<1% E		7-10% E, n-6 PMK 2,5% E i n- 3 PMK 0,5% E
Francuska	2001 2005	30-35% E	<8% E	<2% E	20% E	4% E LA, 0,8% E ALA, 0,20% E DGPMK i 0,05% E DHA
Holandija	2001 2006	20-40% E	<10% E	-		<12% E, sa najmanje 2% E LA, 1% E ALA i 450 mg EPA+DHA
SAD	2002 2006	20-35% E	<10% E	-		5-10% LA i 0,6-1,2% E ALA
WHO/FAO	2003	15-30% E	<10% E	<1% E		6-10% E, 5-8% E n-6 PMK i 1-2% n-3 PMK
Nordijske zemlje	2004	25-35% E	<10% E		10-15% E	5-10% E, 1% E n-3 masne kisljine

Na zahtev Evropske Komisije, Panel za dijetetske proizvode, ishranu i alergije (NDA panel), zatraženo je da se oformi stručno mišljenje o gornjem bezbednosnom unosu (UL) za n-3 DLPMK, pre svega EPA i DHA. Na osnovu dosadašnjih procena, unos n-3 PMK nije povezan sa neželjenim efektima kod zdrave dece i odraslih. NDA panel je zaključio da suplementacija tokom dužeg vremenskog perioda sa EPA i DHA u dozama do 5 g/dan ne dovodi do povećanog rizika od spontanog krvarenja ili komplikacija, uticaja na homeostazu glukoze, imune funkcije ili lipidnu peroksidaciju, u uslovima oksidativne stabilnosti n-3 PMK. Kombinacija EPA i DHA u dozama 2-6 g/dan, i samo DHA u dozama 2-4 g/dan dovodi do povećanja LDL-C za oko 3% što ne mora da ima neželjene efekte na KV rizik, dok EPA u dozama do 4 g/dan nema značajan efekat na LDL-C. Kombinacija EPA i DHA u dozama do 5 g/dan, ili samo EPA do 1,8 g/dan ne dovodi u pitanje bezbednost primene ovako visokih doza kod odraslih. Unos DHA do 1 g/dan ne dovodi u pitanje bezbednost primene te količine za opštu populaciju. Dijetarne preporuke koje je EFSA dala za EPA i DHA bazirane su na razmatranju KV rizika kod Evropske odrasle populacije i iznose 250 - 500 mg/dan.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove studije je bilo istraživanje efekata nutritivno relevantnih količina n-3 masnih kiselina dugog lanca koje odgovaraju uobičajenim dijetarnim preporukama, kao i razlika u delovanju različitih dijetarnih izvora, na faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

1. Prvi deo istraživanja imao je za cilj procenu sastava masnih kiselina i sadržaja n-3 masnih kiselina dugog lanca u uobičajenim dijetarnim izvorima ovih masnih kiselina:
 - a) u uzorcima sveže morske ribe i sveže rečne ribe
 - b) proveru sastava i sadržaja n-3 masnih kiselina dugog lanca u kapsulama sa ribljim uljem dostupnih na tržištu Srbije;
2. Drugi deo istraživanja imao je za cilj ispitivanje efekata nutritivno relevantnih doza n-3 masnih kiselina dugog lanca iz dva dijetarna izvora odabrana na osnovu prethodno dobijenih rezultata (losos i riblje ulje standardizovanog sastava u kapsulama) na faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kod ispitanika srednjih godina:
 - a) u cilju procene stepena inkorporacije n-3 masnih kiselina iz raličitih dijetarnih izvora određivan je sastav masnih kiselina lipida eritrocita, trombocita i plazme;
 - b) od parametara lipidnog statusa određivan je sadržaj ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola i ukupnih triglicerida u serumu;
 - c) u cilju procene oksidativnog stresa određivane su koncentracije superoksidnog anjona i MDA, kao i parametar totalnog antioksidativnog statusa (TAS);
 - d) od parametara sistemske inflamacije određivani su C-reaktivni protein i sadržaj adhezivnih molekula sICAM-1 i sVCAM-1;
 - e) kao novi biomarker rizika određivan je omega-3 indeks u ispitivanoj grupi.

3 MATERIJAL I METODE

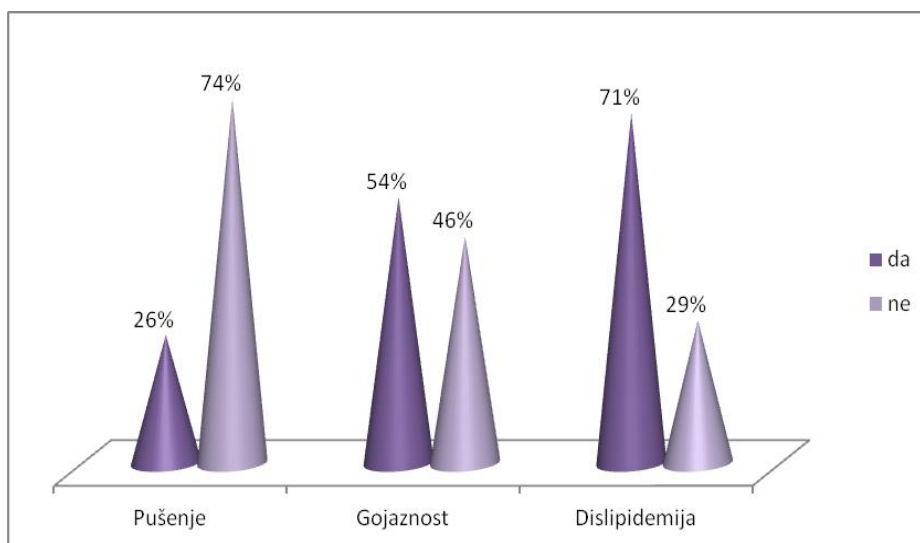
3.1 Ispitanici

Sto trideset ispitanika je popunilo anketu o načinu života i ishrane, a zatim su urađene osnovne antropometrijske i biohemijske analize. Na osnovu dobijenih rezultata, odabrano je 35 dobrovoljaca (18 muškaraca i 17 žena) koji su uključeni u intervencionu studiju. Kriterijumi za uključenje bili su: godine (između 44 i 64), indeks telesne mase (ITM) <30 kg/m² i krvni pritisak $<140/90$ mm Hg. Kriterijumi za isključenje odnosili su se na promenu telesne težine (± 3 kg) tri meseca pre početka intervencije, korišćenje lekova za regulaciju lipida u serumu ili nesteroidnih antiinflamatornih lekova kao što je aspirin. Ispitanici nisu uzimali suplemente sa n-3 masnim kiselinama, kalcijumom ili vitaminom D tri meseca pre početka studije. Ispitanici nisu prethodno imali hronične bolesti - dijabetes mellitus, hepatične, renalne ili kardiovaskularne disfunkcije. Kriterijum za utvrđivanje dislipidemije je bio koncentracija LDL-h iznad 3,36 mmol/L i/ili koncentracija triglicerida veća od 1,69 mmol/L prema vrednostima koje je postavio National Cholesterol Education Program Guidelines (105). Prisustvo dislipidemije nije bio kriterijum za isključenje iz studije. Kriterijumi za isključenje su se odnosili i na konzumiranje više od jednog obroka ribe nedeljno, prisustvo alergije na morsku hranu i konzumiranje više od tri standardna alkoholna pića tokom dana. Osnovne antropometrijske i biohemijske karakteristike ispitanika prikazane su u tabeli 6. Zastupljenost faktora kardiovaskularnog rizika prikazana je na slici 6.

Tabela 6. Osnovne antropometrijske i biohemijske karakteristike ispitanika

	Cela grupa (n=35)	Muškarci (n=18)	Žene (n=17)
Godine	53,9 ± 9,5	54,5 ± 9,6	53,3 ± 9,3
Telesna masa (kg)	79,5 ± 14,0	90,1 ± 10,6	68,9 ± 7,4
ITM (kg/m ²)	26,1 ± 3,4	27,6 ± 3,3	24,7 ± 2,9
Holesterol (mmol/L)			
UH	6,55 ± 0,93	6,22 ± 0,86	6,89 ± 0,94
LDL	4,28 ± 0,89	3,99 ± 0,85	4,56 ± 0,87
HDL	1,47 ± 0,36	1,26 ± 0,21	1,68 ± 0,36
Trigliceridi (mmol/L)	1,77 ± 0,94	2,12 ± 0,99	1,42 ± 0,58
Glukoza (mmol/L)	5,1 ± 0,57	5,15 ± 0,63	4,84 ± 0,48
Krvni pritisak (mm Hg)			
Sistolni	129,4 ± 10	130,3 ± 9,5	128,6 ± 10,4
Dijastolni	83,0 ± 7,5	83,5 ± 7,1	82,4 ± 7,9

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SD
 ITM, indeks telesne mase; UH, ukupan kolesterol;
 LDL, lipoprotein male gustine; HDL, lipoprotein velike gustine



Slika 6. Distribucija faktora rizika kod ispitanika

3.2 Dizajn studije

Dijetarna intervencija je dizajnirana kao randomizovana, ukrštena studija. Trideset i tri ispitanika su po slučajnom izboru podeljena u dve grupe koje su konzumirale 150 g dimljenog lososa dva puta nedeljno (Norveški atlantski losos, proizvođača Squadra, d.o.o., Beograd, Srbija) koji je obezbeđivao 274 mg EPA + 671 mg DHA/dan ili komercijalni suplement ribljeg ulja (proizvođača Pharmanova d.o.o., Beograd, Srbija) koji je obezbeđivao dnevno 396 mg EPA + 250 mg DHA tokom 8 nedelja.

Izbor ribe koja je korišćena u studiji je izvršen nakon detaljne analize sastava i sadržaja n-3 MK u više vrsta rečne i morske ribe. Izbor suplementa je usledio nakon detaljne analize sastava i preporučenog načina korišćenja suplemenata sa n-3 MK prisutnih na tržištu.

Toplo dimljeni losos koji je korišćen u intervenciji bio je pripremljen u obliku fileta, standardizovane neto mase u vakum pakovanju, sa utvrđenim rokom trajanja od strane proizvođača. Kapsule ribljeg ulja su pripremljene tako što je iz originalnih pakovanja izdvajano po 120 kapsula i pakovano u bele papirne kese. Na kesi sa kapsulama bilo je ispisano uputstvo o načinu korišćenja.

Prilikom prve vizite (kada se ispitanicima uzorkovala krv), grupa koja je konzumirala ribu dobila je po 8 paketa lososa za prvih mesec dana intervencije, a nakon isteka mesec dana dobila je novu seriju od 8 paketa za sledećih mesec dana. Tako je konzumirana riba bila upotrebljena u predviđenom roku trajanja proizvoda. Kada je u pitanju suplementirana grupa, tokom prve vizite ispitanicima je data predviđena količina od 120 kapsula za ceo period intervencije od dva meseca. Tom prilikom ispitanici su dobili detaljno uputstvo o protokolu studije.

Nakon perioda od 6 meseci (*washout*) ispitanicima su zamenjene intervencije (ukrštena studija), i po istom protokolu kao u prvom periodu ispitanici su dobili losos i suplemente. Cela studija je obuhvatila 4 vizite, jednu pre i jednu posle svake intervencije.

Uzorci krvi su sakupljeni pre i posle svake intervencije, a zatim su određivani lipidni, inflamatorni parametri kao i markeri oksidativnog stresa. Ispitanici nisu menjali navike u ishrani tokom trajanja studije. Da bi se pratile promene u energetske unosu, ispitanici su popunili trodnevni dnevnik ishrane na početku studije i posle washout perioda. Podaci su analizirani korišćenjem CRON-O-Meter v0.9.6. software.

3.2.1 Odobrenje Etičkog komiteta

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Pismeno odobrenje je dobijeno od svih učesnika pre početka eksperimenta, i studija je pratila Helsinški protokol.

3.3 Metode

3.3.1 Priprema uzoraka sveže ribe

Da bi se utvrdila količina n-3 PMK u uzorcima rečne i morske ribe, analizirana su po 3 uzorka ribe od svake ispitane vrste i po 3 kapsule od svakog ispitanog komercijalnog preparata sa ribljim uljem. Uzorci sveže rečne ribe (deverike, smuđa, soma, šarana) i sveže morske ribe (lososa, tune, skuše, sardine i oslića) su nabavljeni u različitim maloprodajnim objektima u Beogradu. Riba prethodno nije tretirana metodama konzerviranja i nije bila termički obrađivana niti zamrzavana.

U okviru pripreme uzoraka za analizu, odstranjivane su koža, kosti i iznutrice iz uzoraka sveže ribe da bi se dobili uzorci što konstantnijeg sastava. Dobijeni su homogeni uzorci čistog mesa ribe sličnog oblika i podjednake gramaže koji su analizirani.

3.3.2 Ekstrakcija lipida iz uzoraka ribe i suplemenata

Ukupni lipidi ribe su određivani gravimetrijski nakon ekstrakcije hloroformom metodom po Soxhlet-u koju Asocijacija analitičkih hemičara (The Analytical Chemists Association) priznaje kao standardnu metodu za analizu sadržaja lipida u uzorcima biljnog i životinjskog porekla. Metoda se zasniva na principu ekstrakcije lipida ponovljenim ispiranjem (perkolacijom) uz pomoć organskog rastvarača koji recirkuliše u posebnoj za ekstrakciju konstruisanoj aparaturi (106). Balon sa ekstrahovanim lipidima se nakon ekstrakcije i uparavanja hloroforma (organski rastvarač koji je korišćen za ekstrakciju) na vakuum uparivaču dovodio do konstantne mase sušenjem u vakuum sušnici na sobnoj temperaturi, nakon čega se merio sadržaj u balonu i rezultat izražavao u %.

Lipidi ribe korišćeni za dalje određivanje masnih kiselina su ekstrahovani smešom organskih rastvarača hloroform/metanol prema metodi po Bligh-Dyer-u (107).

Procedura za ekstrakciju: u 6-7 g homogenizovanog uzorka doda se 3 ml vode i 30 ml smeše metanol-hloroforma (2:1, v/v), mikstura se obrađuje u Lourdes-ovom homogenizatoru ili Sorvall omnimikseru 2 minuta na sobnoj temperaturi. Homogena smeša se centrifugira i odvoji se supernatant, a ostatak se recentrifugira sa 38 ml smeše metanol:hloroform:voda u odnosu 2:1:0,8. Nakon centrifugiranja, pomešaju se supernatanti

u koje se doda po 20 ml hloroforma i vode. U levku za odvajanje se izdvoji hloroformski sloj koji se zatim uparava na rotacionom evaporatoru na 30-35°C do suva. Izdvojeni lipidi se čuvaju na -20°C do analize MK.

Uljani sadržaj kapsula je izdvajan iglom i špricom da bi se dalje analizirao sadržaj MK.

3.3.3 Ekstrakcija lipida iz plazme, eritrocita i trombocita

Ukupni lipidi su ekstrahovani iz plazme, trombocita i eritrocita smešom rastvarača hloroform/metanol, prema Folsch-ovoj metodi modifikovanoj po Kates-u (108).

Procedura za ekstakciju: u 1 ml suspenzije ćelijske frakcije ili plazme, doda se 3,75 ml smeše matanol-hloroforma (2:1, v/v), mikstura se u staklenoj epruveti vorteksira nekoliko minuta na sobnoj temperaturi. Homogena smeša se centrifugira i odvoji se supernatant u drugu epruvetu, a ostatak ekstrahuje ponovo sa 4,75 ml smeše matanol:hloroform:voda u odnosu 2:1:0,8. Nakon centrifugiranja, pomešaju se supernatanti u koje se doda po 2,5 ml hloroforma i vode. Donji hloroformski sloj se izdvoji, doda se ista zapremina benzena, a zatim uparava pod strujom azota na 30°C. Izdvojeni lipidi se čuvaju u 0,05% rastvoru BHT (2,6-di-t-butil-4-metilfenol) na -40°C.

3.3.4 Određivanje sastava masnih kiselina metodom gasne hromatografije

Sastav masnih kiselina u ekstrahovanim lipidima određen je metodom gasne hromatografije nakon derivatizacije masnih kiselina u isparljive metil-estre.

Metil estri masnih kiselina su dobijeni transesterifikacijom rastvorom HCl u metanolu, kako je opisano u metodi po Ichihara i Fukubayashi (109).

Procedura za transesterifikaciju: ekstrahovani lipidi se u staklenim epruvetama rastvore u 0,20 ml toluena. U rastvor lipida doda se 1,5 ml metanola i 0,3 ml 8% rastvora HCl, redom. Epruvete se zatim vorteksiraju i stavljaju u vodeno kupatilo na 100°C tokom 1h. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi doda se 1 ml heksana i 1 ml vode za ekstrakciju metil estara masnih kiselina. Sadržaj se izmeša na vorteksu, a zatim se gornji heksanski sloj koristi za analizu masnih kiselina.

Metil estri masnih kiselina su ispitivani metodom gasne hromatografije na aparatu Agilent Technologies 7890A sa plameno jonizacionim detektorom. Korišćena je kapilarna kolona 112-88A7, HP-88 (100 m × 0.25 mm × 0.2 µm), helijum je bio noseći gas sa protokom od 105 mL/min. Uzorci su injektovani na temperaturi kolone od 175°C, temperatura injektora je bila 250°C, a detektora 280°C. Temperatura kolone se povećavala za 5°C/min od 175°C do 220°C. Masne kiseline su identifikovane na osnovu retencionih vremena standardne

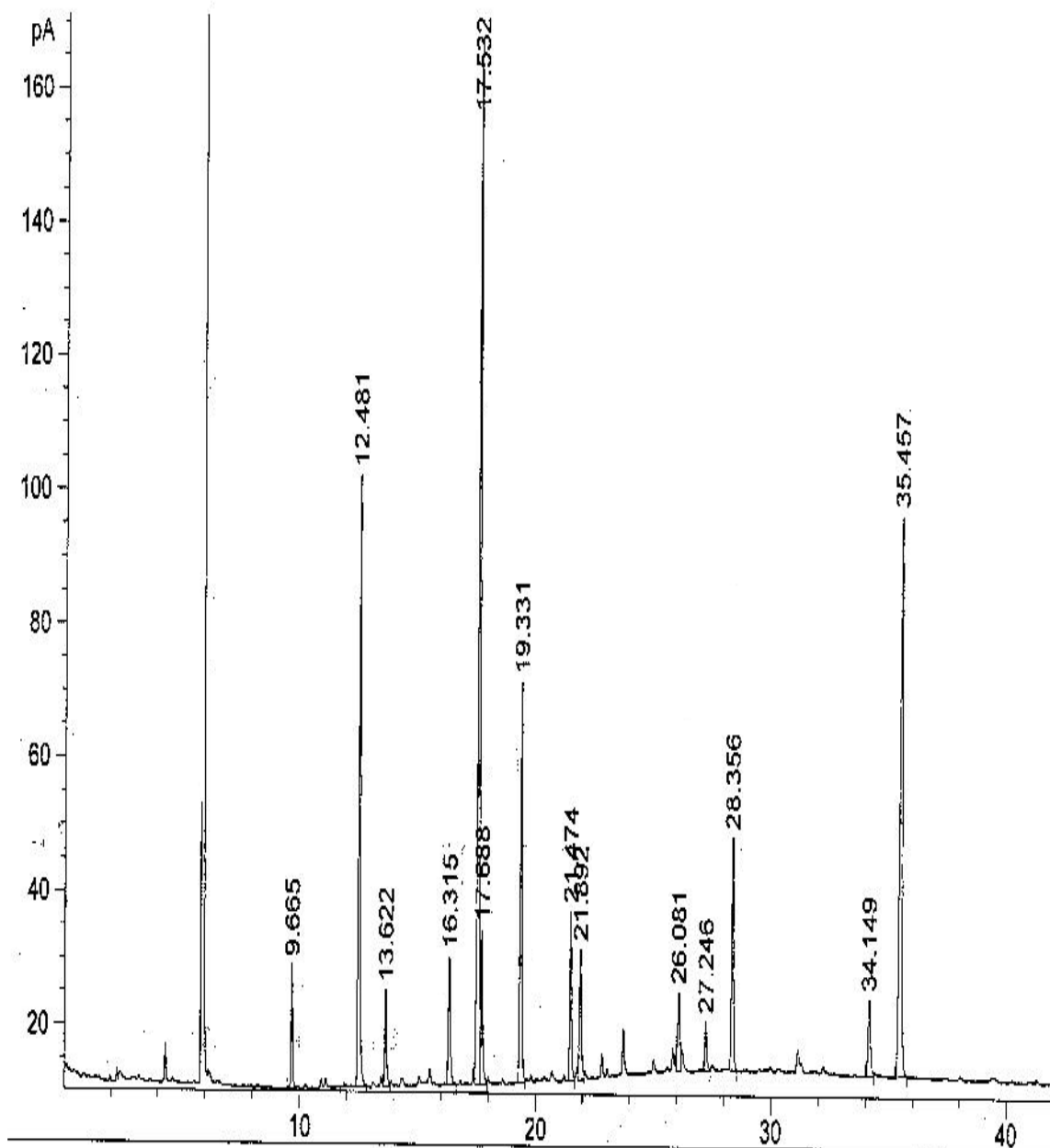
smeše masnih kiselina (Supelco FAME Mix, Bellefonte, PA). Efikasnost kolone je prikazana kroz broj teoretskih platoa standardne smeše masnih kiselina, dok je ponovljivost odgovora određena kao procenat relativne standardne devijacije (RSD%) uzastopnih merenja istog referentnog rastvora (tabela 7).

Rezultati su prikazivani kao procenti pojedinačnih masnih kiselina u odnosu na ukupne.

Hromatogram standarda masnih kiselina prikazan je na slici 7.

Tabela 7. Performanse kolone i ponovljivost rezultata

	Broj teoretskih platoa	RSD%
16:0	362870	3,8
18:0	426942	2,3
18:1	510262	4,6
18:2 n-6	649372	0,3
20:4 n-6	987485	3,4
20:5 n-3	1091739	1,5
22:6 n-3	839367	1,2



Slika 7. Hromatogram standarda masnih kiselina

3.3.5 Uzimanje uzoraka krvi

Ispitanicima je uzimana krv iz prednje kubitalne vene posle noćnog gladovanja i sakupljana u epruvete sa antikoagulansom dekstroza/citratna kiselina. Epruvete su ostavljane pola sata na sobnoj temperaturi pre centrifugiranja na 180g u toku 10 minuta na 4°C. Plazma bogata trombocitima je odvajana u druge epruvete, a zatim centrifugirana tokom 10 minuta na 1500g radi izdvajanja trombocita. Plazma je odvajana, a trombociti su ispirani dva puta fiziološkim rastvorom i centrifugirani po 10 minuta na 1500g (110). Epruvete u kojima su zaostali eritrociti su centrifugirane na 1800g tokom 15 minuta na 4°C, nakon čega su eritrociti ispirani dva puta fiziološkim rastvorom. Uzorci su odmah pripremani za dalju analizu (111).

3.3.6 Biohemijske analize

Koncentracije osnovnih biohemijskih parametara glukoze, ukupnog holesterola (UH), HDL-holesterola, LDL-holesterola i triglicerida su određivane rutinskim automatizovanim enzimskim metodama uz upotrebu Biomerieux-ovih reagenasa (Biomerieux, Paris, France) na biohemijskom analizatoru Hitaci 912. HDL-holesterol je određivan istom enzimskom metodom kao i UH nakon precipitacije seruma fosfovolframovom kiselinom u prisustvu Mg^{2+} jona.

Aterogeni indeks plazme je preračunat po formuli TG/HDL-C.

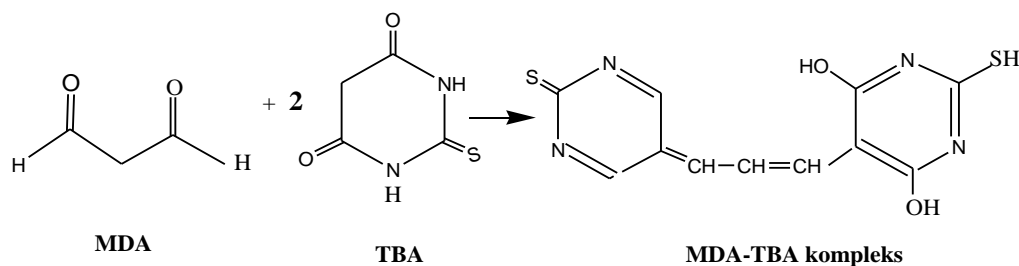
3.3.7 Određivanje koncentracije markera inflamacije

Serum ICAM-1, VCAM-1 i CRP koncentracije su određivane komercijalnim ELISA kitovima (R&D Systems, Inc, USA).

Princip određivanja: Komercijalne mikroploče su presvučene monoklon specifičnim antitelima za markere inflamacije (ICAM-1, VCAM-1 i CRP). Standardi i uzorci se pipetiraju u otvore mikroploča gde se markeri inflamacije vezuju za svoja antitela. Nakon uklanjanja nevezanih supstanci ispiranjem, dodaju se specifična enzim-vezana antitela. Ponovo se ispiraju mikroploče radi uklanjanja svih nevezanih antitelo-enzim reagenasa, a zatim se dodaje rastvor supstrata i razvijač boje, nakon čega se meri intenzitet boje.

3.3.8 Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Od parametara oksidativnog stresa određivane su koncentracije superoksidnog anjona (O_2^-) i malondialdehida (MDA), kao i totalni antioksidativni status (TAS). Koncentraciju MDA u plazmi određivana je Girotti-jevom metodom (112). Reakcija se zasniva na stvaranju kompleksa MDA i ostalih tiobarbiturna kiselina reagujućim supstratima sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) koji imaju apsorpcioni maksimum na 535 nm (slika 8).



Slika 8. Mehanizam reakcije TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom

Određivanje brzine stvaranja superoksidnog anjona je zasnovana na metodi koju su dali Auclair i Voisin (113). Metoda je zasnovana na sposobnosti superoksidnih anjon radikala da redukuju nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitroblueterazolijuma (NBT). Redukcija žuto obojenog NBT do plavog formazina koristi se kao mera stvaranja superoksidnog anjona u hemijskim i biološkim sistemima. Određivanje O_2^- u plazmi vrši se merenjem apsorpcije nastalog formazana na 550 nm.

TAS je određivan automatskom metodom po Erelu (114). Test se izvodi uz upotrebu $ABTS^+$ katjona kao hromogena. Sam $ABTS^+$ rastvor je bezbojan. Nakon oksidacije do $ABTS^+$ pomoću vodonik-peroksida u kiselom medijumu, rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Kada se obojeni $ABTS^+$ rastvor pomeša sa supstancama koje mogu da se oksiduju, kao što su antioksidansi iz uzorka, dolazi do njegove redukcije u bezbojni $ABTS$. Intenzitet obezbojavanja izmeren na 660 nm, srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u ispitivanom uzorku.

3.3.9 Anketiranje apoteka o dijetetskim suplementima sa n-3 MK

Da bi se imao uvid u broj, vrstu, namenu i kvalitet dijetetskih suplemenata koji su dostupni potrošačima u Srbiji sprovedena je anketa u 11 apoteka na teritoriji grada Beograda (4 državne i 7 privatnih apoteka).

Ispitivani parametri su bili:

- naziv preparata
- zamlja porekla
- proizvođač
- kvalitativni i kvantitativni sastav jednog doziranog oblika
- preporučeni način doziranja preparata
- namena preparata.

3.3.10 Anketa o konzumiranju ribe i drugih izvora n-3 PMK (FFQ)

Anketa o konzumiranju ribe i drugih izvora n-3 PMK sastojala se od liste različitih vrsta rečnih i morskih riba i najznačajnijih biljnih izvora n-3 PMK (laneno seme, soja, orasi, koštunjavo voće). U anketi su bile ponuđene opcije o učestalosti konzumiranja navedenih namirnica - ispitanici su navodili učestalost na dnevnom, nedeljnom ili mesečnom nivou markiranjem mesta u odgovarajućoj koloni. Bile su ponuđene i veličine porcija radi što tačnije procene unosa n-3 PMK iz navedenih izvora. Anketa je sprovedena pre početka eksperimenta, gde je jedan od kriterijuma za isključenje ispitanika bio konzumiranje više od jedne porcije ribe nedeljno.

3.3.11 3-dnevni dnevnik ishrane (Menu records)

Odabrani ispitanici su popunili anketu o unosu hrane koja je podrazumevala da zapišu vrstu konzumirane hrane za svaki obrok za unapred određena 3 dana sa aproksimativnom kvantifikacijom porcije. Ovaj oblik zapisa se inače koristi kada ispitanik nije u mogućnosti da meri svaki obrok i na taj način da kvantifikuje porciju. Takođe, ovaj tip zapisa zadovoljava potrebe israživača kada je način ishrane prilično ustaljen i kada ishrana nije previše raznovrsna. 3-dnevni dnevnik ishrane je rađen da bi se procenio aproksimativni unos makronutijenata (lipida, ugljenih hidrata i proteina) i radi preračunavanja ukupnog energetskog unosa. Anketa je sprovedena u dva perioda, na početku studije i posle washout perioda.

3.3.12 Statistička analiza

Rezultati su procenjivani primenom mešovito modela analize varijansi (mixed model ANOVA). Varijable su testirane na normalnost distribucije. Određeni broj parametara nije imao normalnu distribuciju, pa su neparametarski testovi korišćeni u statističkoj analizi, nakon što su rezultati *iskošeni* (Mann-Whitney tests, Spearman correlation). Varijable koje su imale normalnu distribuciju su prikazivane kao srednje vrednosti i standardne devijacije, a varijable koje nisu imale normalnu distribuciju kao medijane i 10th i 90th percentili ili medijane sa interkvartilnim opsegom. Za određivanje razlike između intervencije lososom i kapsulama ribljeg ulja statistički model je dopunjen fiksnim (tretman/period) i random efektima (ispitanici/vizite). Srednja vrednost najmanjih kvadrata i intervali poverenja su računati za određivanje razlike između lososa-N0, kapsula-N0, lososa-N8 i kapsula-N8, kao i za ukupnu razliku između intervencija (losos N8 – losos N0) – (kapsule N8 – kapsule N0). Statistička značajnost je uzeta u obzir kada je nivo značajnosti P bio manji ili jednak 0,05 ($P \leq 0,05$). Statistička obrada podataka je urađena u programu PASW (SPSS) verzija 18 (Chicago, IL, USA).

4 REZULTATI I DISKUSIJA

Srbija se nalazi u grupi zemalja sa kardiovaskularnim rizikom koji je viši od prosečnog za zemlje evropskog regiona (63). Način života i ishrane su prepoznati kao faktori rizika za pojavu KVB, zato je pored farmakoloških mera velika pažnja nauke i struke okrenuta ka pronalaženju i usavršavanju nefarmakoloških načina koji bi se mogli koristiti u prevenciji i terapiji ovih bolesti. U te nefarmakološke mere, koje bi se mogle svrstati i u domen samomedikacije, spada korišćenje n-3 masnih kiselina, kako u prevenciji, tako i u sekundarnoj prevenciji i terapiji KVB.

Za n-3 masne kiseline, a pre svega za dugolančane n-3 MK, postoji ogroman broj prikupljenih podataka da deluju u okviru svojih fizioloških uloga, preko više različitih mehanizama, povoljno na različite faktore rizika od KVB. U brojnim studijama sprovedenim od 1960.-tih godina prošlog veka dijetarni unos dugolančanih n-3 PMK pokazao je povoljne efekte na modulaciju ćelijske fluidnosti, funkciju membranskih proteina, aktivaciju transkriptornih faktora, profil lipida seruma, markere inflamacije kao i na vaskularnu reaktivnost i funkciju trombocita (115-120). Takođe je pokazana modifikacija profila masnih kiselina nakon unosa n-3 PMK u lipidima plazme, trombocitima, eritrocitima, leukocitima, srčanom tkivu kao i u mnogim drugim ćelijama i tkivima (3). Uloga dugolančanih n-3 MK, pre svega EPA i DHA, smatra se veoma značajnom u održavanju homeostaze brojnih fizioloških procesa, tako da je pre deset godina uveden u praksu novi dodatni biomarker rizika za KVB koji se zasniva upravo na zasićenosti organizma ovim masnim kiselinama. Pošto je još od devedestih godina nizak nivo n-3 PMK u tkivima bio povezivan sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih događaja, prvo su određene poželjne ciljne vrednosti za sadržaj EPA+DHA u fosfolipidima seruma/plazme koje su veće od 4,6% (121), a 2004. godine su Harris i Schacky definisali omega-3 indeks (zbir EPA i DHA u eritrocitima) kao novi faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti (88). U zavisnosti od vrednosti omega-3 indeksa Harris i Schacky su podelili rizik na visok (<4%), umeren (4-8%) i nizak (>8%). Vrednosti iznad 8% su povezane sa visokim kardioprotektivnim efektom. Omega-3 indeks se takođe od skoro koristi i za ličnu procenu rizika (122, 123), korišćenjem test traka za jednostavnu analizu ovog biomarkera iz krvi u kućnim uslovima (124).

Na osnovu utvrđenog inverznog odnosa između konzumiranja n-3 PMK i smanjenog kardiovaskularnog rizika, dijetarne preporuke su utvrđene na nacionalnom i internacionalnom nivou za unos n-3 masnih kiselina i zasebno za unos dugolančanih n-3

masnih kiselina (15-18). EFSA je 2012. godine utvrdila dijetarne preporuke za unos 250-500 mg/dan EPA+DHA na osnovu kardiovaskularnog rizika za odrasle osobe u Evropi (125). U cilju sekundarne prevencije za razvoj srčanih bolesti AHA preporučuje 1 g EPA+DHA/dan (126). Takođe, AHA preporučuje suplemente sa ribljim uljem kao alternativu uljanim ribama. Ove preporuke su donete pre svega zbog činjenice da je unos n-3 MK, posebno dugolančanih n-3 MK u opštoj populaciji većine zemalja ispod željenih vrednosti. Iako unos dugolančanih n-3 MK u jednoj populaciji može značajno da varira u zavisnosti od dijetarnih navika, godina, pola, generalno je prosečan unos značajno niži od preporučenih vrednosti. Bauch i saradnici (127) su pokazali koristeći podatke iz Nemačke ankete o ishrani iz 1994. godine, da je u Nemačkoj populaciji unos EPA+DHA 141 mg/dan za žene i 186 mg/dan za muškarce. U EPIC-Norfolk cohort srednji unos EPA je bio 90-110 mg/dan i DHA 130-160 mg/dan (128), dok je dnevni uobičajeni unos EPA+DHA u holandskoj populaciji srednjih godina bio u proseku 89 mg/dan (129). Za opštu populaciju u Srbiji još uvek nema publikovanih podataka o unosu EPA, DHA i ukupnih n-3 MK, ali je poznato da je unos ribe nizak - 48,7% populacije uzima manje od jedne porcije ribe nedeljno (130, 131), a naša prethodna studija iz 2007. godine pokazala je da je status n-3 MK u prosečnoj zdravoj populaciji srednjih godina bio nizak, što potvrđuje neadekvatan unos svih dijetarnih izvora ovih masnih kiselina. Za razliku od niskog unosa ribe, upotreba suplemenata sa ribljim uljem je u porastu, što je u skladu sa globalnim trendovima. Dok su do pre dvadeset godina ribe bili jedini raspoloživi dijetarni izvor dugolančanih n-3 MK u ishrani, danas veliki broj ljudi koristi dodatne izvore ovih biološki aktivnih jedinjenja u obliku dijetetskih suplemenata. Više istraživanja tržišta je pokazalo da su suplementi sa ribljim uljem na drugom mestu po popularnosti među potrošačima, posle vitaminsko-mineralnih proizvoda (132, 133). Trenutno, na tržištu Srbije ima više od 40 različitih preparata na bazi ribljeg ulja, sa daljom tendencijom rasta. Jedan od razloga njihove popularnosti je popularizovana i marketinški iskorišćena uloga ribljeg ulja u promociji zdravlja, ali i sve veće prisustvo kontaminanata u ribama za koje postoje dokazi o potencijalno štetnom delovanju (neorganski i organohlorini kontaminanti) (134).

Naša prosečna populacija ima jedan ili više faktora kardiovaskularnog rizika (130, 135) i KVB su još uvek jedan od najčešćih uzroka smrtnih ishoda u Srbiji (136). Ove činjenice ukazuju na potrebu da kod prosečne populacije u Srbiji postoji prostor za poboljšanje dijetarnih navika u smislu povećanja unosa ribe kao izvora EPA i DHA ili uvođenja suplemenata u regularni režim ishrane.

Efekti unosa n-3 PMK na kardiovaskularne ishode opisani su u brojnim randomizovanim i kontrolisanim studijama gde su se doze kretale u opsegu od 0,3-6 g/dan iz različitih dijetarnih izvora, koji nisu uvek bili dobro definisani (137). I pored utvrđenih trendova, dobijeni rezultati su često nekonzistentni, pogotovo kada se radi o intervencijama na zdravoj populaciji. Zato se i dalje vrše nova istraživanja čiji je zadatak da daju doprinos boljem razumevanju efekata n-3 masnih kiselina u zdravlju i bolesti u različitim populacijama.

EFSA je procenila bezbednost unosa n-3 PMK na osnovu čega je odobrila nekoliko zdravstvenih izjava koje se odnose na benefit ovih masnih kiselina. EFSA NDA Panel je, između ostalog, odobrio izjave da unos EPA i DHA od 2-4 g/dan doprinosi održanju stabilnog krvnog pritiska i sniženju nivoa triglicerida, i da je unos od 250 mg/dan dovoljan za održavanje zdravlja kardiovaskularnog sistema kod zdrave odrasle populacije i dece (102). Na osnovu podataka o unosu n-3 masnih kiselina u različitim zemljama, činjenica je da se količine koje se pominju u zdravstvenim izjavama ne postižu uobičajenim ishranom i postavlja se pitanje da li se uopšte mogu postići uobičajenom ishranom koja prati principe pravilne ishrane. U poslednje vreme puno pažnje se takođe posvećuje mogućoj razlici u bioiskoristljivosti i efikasnosti n-3 MK iz doziranih oblika, obzirom da se različite hemijske forme, različiti tehnološki sistemi i različiti masnokiselinski profili mogu naći u suplementima, što se u ranijim studijama nije uzimalo u obzir i što sve može biti razlog nekonzistentnosti rezultata koji se nalaze u literaturi.

Bez obzira na dosadašnje rezultate različitih kliničkih studija o efektima n-3 PMK iz ribe ili suplemenata sa ribljim uljem, očigledno je da postoji potreba za dobro kontrolisanim studijama koje bi se izvele na specifičnim populacijama sa specifičnim kliničkim ciljevima i sa dobro definisanim dijetarnim izvorima n-3 masnih kiselina.

Ideja ovog rada je bila da se doprinese rasvetljavanju pitanja efekata nutritivno relevantnih količina n-3 masnih kiselina dugog lanca koje odgovaraju uobičajenim dijetarnim preporukama, na faktore rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u prosečnoj srpskoj populaciji srednjih godina koju uobičajeno prate dislipidemija i prekomerna telesna masa (131). Kao sekundarni cilj ove studije odabrano je ispitivanje razlika u delovanju različitih dijetarnih izvora dugolančanih n-3 masnih kiselina: lososa i suplementa. Losos je odabran nakon analize sastava i sadržaja EPA i DHA u nekoliko vrsta rečne i morske ribe dostupne potrošačima Srbije kao jedan od najboljih dijetarnih izvora EPA i DHA, a dijetetski suplement korišćen u studiji je takođe odabran nakon detaljne analize preparata na tržištu Srbije.

4.1 Ispitivanje dijetarnih izvora dugolančanih n-3 masnih kiselina

U cilju procene količina n-3 MK koje se mogu uneti uobičajenom ishranom i preporučenim načinom korišćenja suplemenata izvršena je analiza sastava i sadržaja n-3 MK u svežoj morskoj i rečnoj ribi, kao i u suplementima dostupnim na tržištu Srbije.

4.1.1 Sastav lipida i masnih kiselina u analiziranim uzorcima ribe

Ribe i morski polodovi predstavljaju najvažniji izvor dugolančanih n-3 PMK u ishrani opšte populacije. Literaturni podaci ukazuju da sadržaj ovih masnih kiselina može značajno da varira zavisno od vrste ribe, njihove ishrane, temperature vode u kojoj žive kao i od godišnjeg doba. U ovom radu je procena lipida i sastava masnih kiselina urađena u vrstama rečne i morske ribe koje se najčešće koriste u svakodnevnoj ishrani - od rečnih riba to su bili šaran, som, smuđ i deverika, a od morskih skuša, sardina, tuna, oslič i losos.

4.1.1.1 Ukupni lipidi

U uzorcima rečne i morske ribe vršeno je određivanje sadržaja ukupnih lipida (tabela 8).

Tabela 8. Sadržaj ukupnih lipida (g/100 g jestivog dela ribe) u ispitivanim uzorcima

Vrsta ribe	Sadržaj lipida (%)
<i>Rečna riba</i>	
Šaran (<i>Cyprinus carpio</i>)	3,6±1,7
Som (<i>Siluris glanis</i>)	0,65±0,27
Smuđ (<i>Sander lucioperca</i>)	1,4±0,5
Deverika (<i>Abramis brama</i>)	3,4±2,4
<i>Morska riba</i>	
Skuša (<i>Scomber scombrus</i>)	13,9±0,6
Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)	11,4±9,1
Tuna (<i>Thunnus thynnus</i>)	1,2±0,2
Oslič (<i>Merluccius merluccius</i>)	1,6±1,1
Losos (<i>Salmo salar</i>)	10,3±2,8

Od rečnih riba najveći prosečan sadržaj ukupnih lipida imali su uzorci šarana 3,6 g/100 g, a najmanji uzorci soma 0,65 g/100 g. Kod uzoraka deverike uočena su najveća variranja sadržaja ukupnih lipida među pojedinačnim uzorcima.

Najveći prosečan sadržaj ukupnih lipida među morskim ribama nađen je u skuši, sardini i lososu a najmanji u tuni i osliću. Kod uzoraka sardine uočena su najveća odstupanja sadržaja ukupnih lipida od izračunate srednje vrednosti.

Primećeno je da su sve vrste rečne ribe imale sličan sadržaj lipida i da su dobijene vrednosti veoma niske u odnosu na određene vrste morske ribe, mada se generalno pravilo da morske ribe imaju više lipida ne može postaviti zbog primera oslića i tune koje su imale manje lipida od svih ispitanih rečnih riba.

Literaturni podaci o lipidnom statusu rečnih riba su u saglasnosti sa našim vrednostima (138-146), jedino su rezultati za lipide deverike bili nešto veći u odnosu na prethodne studije (145, 146). Kada su u pitanju morske ribe, veća odstupanja srednjih vrednosti pokazana su kod uzoraka sardine i skuše (138, 147), dok su ostale vrste imale vrednosti za lipide slične onima koji se mogu naći u literaturi (147-150). Sadržaj lipida i sastav masnih kiselina riba veoma varira između i unutar vrsta, na šta utiče više faktora kao što su vrsta ribe, genetske osobine, starost, reproduktivni status, veličina ribe, ali i faktori okoline, kao što su stanište, temperatura, salinitet, količina i vrsta dostupne hrane.

4.1.1.2 Masne kiseline

Analizom sastava masnih kiselina u ekstrahovanim lipidima dobijeni rezultati izraženi su u procentima ukupnih masnih kiselina i u gramima na 100 g jestive ribe. Preračunavanje sadržaja masnih kiselina u ispitivanim uzorcima u g/100 g jestive ribe vršeno je korišćenjem podataka dobijenih određivanjem sadržaja ukupnih lipida u uzorcima, masa uzoraka koje su korišćene za analizu sastava masnih kiselina u ekstrahovanim lipidima i rezultata koji su dobijeni analizom lipidnog profila uzoraka.

U tabelama 9 i 10 prikazane su srednje vrednosti sadržaja masnih kiselina izraženih u procentima u odnosu na ukupne masne kiseline za sve vrste ispitivanih uzoraka.

Tabela 9. Sadržaj masnih kiselina izražen u % u odnosu na ukupne masne kiseline (rečne ribe)

MK	Deverika	Som	Šaran	Smuđ
14:0	1,2 ± 0,34	1 ± 0,41	0,7 ± 0,27	1 ± 0,13
16:0	19,6 ± 1,12	16,6 ± 0,94	16 ± 1,37	19,7 ± 3,5
16:1	4,6 ± 0,85	5,2 ± 3,03	3,6 ± 1,38	4,8 ± 1,48
18:0	4,6 ± 1,04	5,1 ± 0,29	5 ± 0,64	4,7 ± 1,15
18:1 n-9	16,9 ± 3,5	12,6 ± 5,72	18 ± 6,24	10,6 ± 3,03
18:1 n-7	3,4 ± 0,83	4,9 ± 1,12	2,6 ± 1,02	3 ± 0,25
18:2 n-6	2,6 ± 0,76	2,5 ± 1,21	14,9 ± 7,92	1,8 ± 0,81
18:3 n-3	1 ± 0,36	1,2 ± 0,46	1,6 ± 0,63	1,3 ± 0,62
20:4 n-6	7,1 ± 1,4	9,1 ± 2,82	7,7 ± 3,25	7,5 ± 1,44
20:5 n-3	10,3 ± 1,62	8,8 ± 2,5	4,1 ± 2,46	10,3 ± 1,98
22:5 n-3	3,5 ± 1,35	4,7 ± 1,18	2,3 ± 1,38	4,1 ± 1,57
22:6 n-3	16,7 ± 3,06	19,5 ± 7,19	12,9 ± 4,71	23,4 ± 3,35

Tabela 10. Sadržaj masnih kiselina izražen u % u odnosu na ukupne masne kiseline (morske ribe)

MK	Oslić	Sardina	Skuša	Losos	Tuna
14:0	1,4 ± 0,43	4,3±3,12	3,9±0,89	1,9±0,14	0,4±0,14
16:0	21,3±4,37	21,5±2,53	14,5±1,31	14,8±1,58	17,6±1,09
16:1	2,6±0,51	5,6±4,44	2,3±0,85	1,9±0,19	1±0,20
18:0	4,9±0,72	4,1±0,77	3,3±0,80	3,3±0,24	7,7±0,45
18:1, n-9	10,4±1,36	2,8±1,79	7,6±3,00	22,1±3,46	10,6±1,58
18:1, n-7	2,4±0,17	3,6±2,71	1,4±0,98	3,9±0,13	1,6±0,25
18:2, n-6	1,2±0,27	1,1±0,31	2,1±0,13	8,2±1,08	1,1±0,65
18:3, n-3	1,4±0,62	1,2±1,62	7±1,20	2,7±0,82	0,3±0,10
20:4, n-6	1,9±0,41	3,5±1,34	12±0,93	2,1±0,25	6,9±0,87
20:5, n-3	8,2±1,18	14,7±5,57	9,7±0,72	6,5±1,27	3,2±0,35
22:5, n-3	0,9±0,30	1,5±0,30	1,3±0,20	2,5±0,11	1,2±0,32
22:6, n-3	36,8±4,33	27±14,5	21,9±7,05	21,6±3,66	33,3±2,80

Od zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina (ZMK i MMK) u uzorcima rečne i morske ribe najzastupljenije su bile palmitinska (16:0) i oleinska kiselina (18:1n-9).

Palmitinska kiselina je bila najviše zastupljena u uzorcima šarana (16%) i u uzorcima sardine (21,5%), a oleinska u uzorcima lososa (22,1%) i uzorcima šarana (18%). Esencijalna linolna kiselina (18:2 n-6) je u najvećem procentu nađena u uzorcima šarana i lososa (14,9 i 8,2 %, redom), dok je sadržaj arahidonske kiseline (20:4n-6) bio najveći u uzorcima skuše (12%). EPA i DHA su bile najzastupljenije polinezasićene masne kiseline i njihov udeo se kretao od svega 3,2% u uzorcima tune do 14,7% u uzorcima sardine za EPA i od 12,9% u uzorcima šarana do 36,8% u uzorcima oslića za DHA. Interesantno je da je skuša jedina imala ALA značajnije zastupljenu (7%). Inače, ova masna kiselina je karakteristična za biljne izvore i retko se nalazi u većim količinama u namirnicama životinjskog porekla.

Preračunavanjem sadržaja masnih kiselina na 100 g jestive ribe, dobijene su vrednosti koje su u funkciji određenog sastava masnih kiselina, ali i sadržaja lipida u mesu sveže ribe. Rezultati koji su prikazani u tabelama 11 i 12 odnose se na ukupan sadržaj zasićenih, mononezasićenih, polinezasićenih n-6 i n-3 masnih kiselina, kao i na sadržaj najvažnijih dugolančanih n-3 MK.

Tabela 11. Sadržaj masnih kiselina u g/100 g jestive rečne ribe

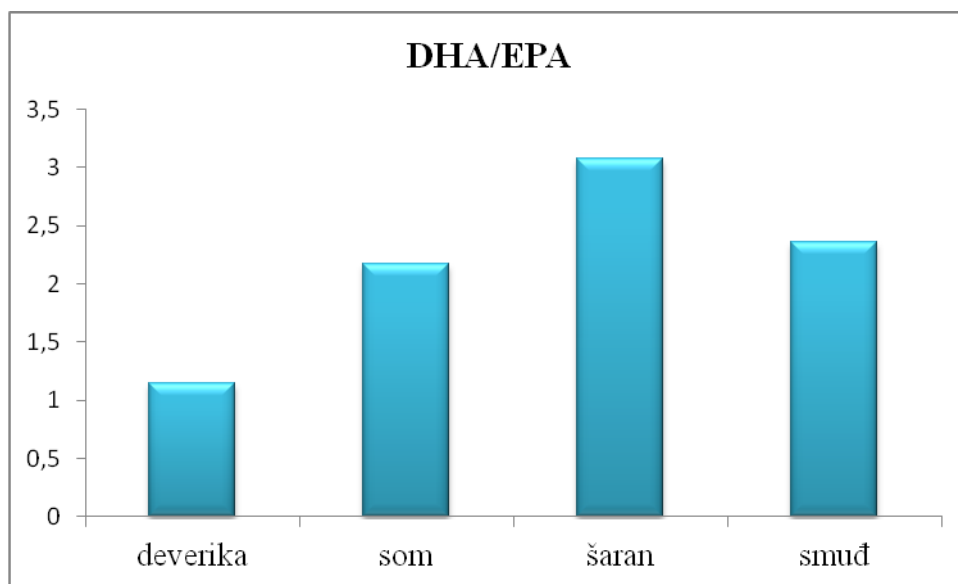
MK	Deverika	Som	Šaran	Smud
ZMK	0,86 ± 0,39	0,15 ± 0,05	0,78 ± 0,61	0,36 ± 0,07
MMK	0,85 ± 0,29	0,14 ± 0,14	0,87 ± 0,59	0,26 ± 0,08
PMK	1,4 ± 0,56	0,29 ± 0,09	1,57 ± 1,11	0,68 ± 0,20
n-3 MK	1,07 ± 0,41	0,22 ± 0,08	0,75 ± 0,50	0,55 ± 0,17
n-6 MK	0,33 ± 0,16	0,07 ± 0,01	0,81 ± 0,63	0,13 ± 0,04
EPA	0,35 ± 0,18	0,06 ± 0,03	0,15 ± 0,11	0,14 ± 0,06
DHA	0,57 ± 0,18	0,13 ± 0,06	0,46 ± 0,33	0,33 ± 0,08

Tabela 12. Sadržaj masnih kiselina u g/100 g jestive morske ribe

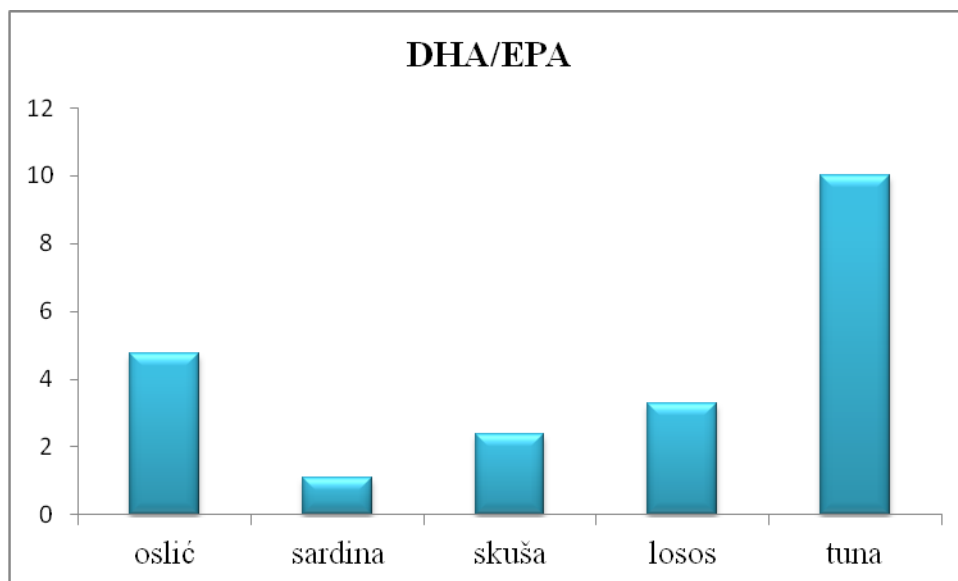
MK	Oslić	Sardina	Skuša	Losos	Tuna
ZMK	0,49 ± 0,40	3,56 ± 2,86	3,64 ± 0,70	1,28 ± 0,73	0,26 ± 0,10
MMK	0,17 ± 0,05	1,52 ± 2,26	1,50 ± 0,67	2,76 ± 0,69	0,20 ± 0,03
PMK	0,81 ± 0,41	5,03 ± 3,35	6,34 ± 2,35	4,55 ± 1,47	0,55 ± 0,08
n-3 MK	0,73 ± 0,39	4,54 ± 2,92	4,59 ± 2,05	3,49 ± 1,30	0,46 ± 0,08
n-6 MK	0,08 ± 0,05	0,49 ± 0,41	1,64 ± 0,54	1,06 ± 0,22	0,09 ± 0,01
EPA	0,12 ± 0,06	2,01 ± 2,00	1,11 ± 0,32	0,69 ± 0,31	0,04 ± 0,01
DHA	0,57 ± 0,30	2,21 ± 0,87	2,64 ± 1,40	2,27 ± 0,92	0,40 ± 0,07

Prosečno najveći sadržaj ukupnih zasićenih masnih kiselina imali su uzorci skuše (3,64 g/100 g), a najmanji sadržaj je nađen u uzorcima soma (0,15 g/100 g). Prosečna vrednost sadržaja zasićenih masnih kiselina bila je visoka i u uzorcima sardine, ali je njihova količina u pojedinim uzorcima značajno varirala. Srednja vrednost ukupnog sadržaja mononezasićenih masnih kiselina kretala se u intervalu od 0,14 g/100 g do 2,76 g/100 g. Najveći sadržaj je nađen u uzorcima lososa, nešto manji u uzorcima sardine i skuše, a najmanji u uzorcima oslića i soma. Uzorci soma su imali prosečno najmanji sadržaj ukupnih polinezasićenih masnih kiselina (0,29 g/100 g), a uzorci skuše najveći (6,34 g/100 g). Najveće vrednosti sadržaja n-3 masnih kiselina imali su uzorci skuše i sardine (4,59 g/100 g i 4,54 g/100 g), pri čemu je uočeno značajno variranje sadržaja n-3 masnih kiselina u pojedinačnim uzorcima u obe vrste ribe. Najveći sadržaj n-6 masnih kiselina imali su uzorci skuše (1,64 g/100 g). Najmanje prosečne vrednosti sadržaja n-3 i n-6 masnih kiselina uočene su u uzorcima tune i oslića od morskih riba kao i u svim vrstama rečne ribe.

Najveći prosečni sadržaj EPA nađen je u uzorcima sardine (2 g/100 g), pri čemu je u pojedinačnim uzorcima ove ribe bilo i izuzetno veliko variranje sadržaja EPA. Sardina, skuša i losos imali su sličan i visok sadržaj DHA, zatim oslić i tuna, šaran i deverika. Tuna i oslić su imali veoma mali sadržaj ove masne kiseline. U svim uzorcima ribe DHA je bila prisutna u većoj količini u odnosu na EPA. Raspon odnosa DHA/EPA se kretao od 1,1 za uzorke sardine do 10 za uzorke tune, što ukazuje da količina DHA u prirodnim uzorcima višestruko nadmašuje količinu EPA (slike 9 i 10). Odnos DHA/EPA za rečne ribe i većinu morskih riba se slaže sa literaturnim podacima (138-151). Rezultati za sastav i sadržaj masnih kiselina u skuši i tuni dobijeni u prethodnim studijama su nekonzistentni i kreću se širokom rasponu vrednosti (139, 147), a naše vrednosti su u skladu sa tim literaturnim podacima.

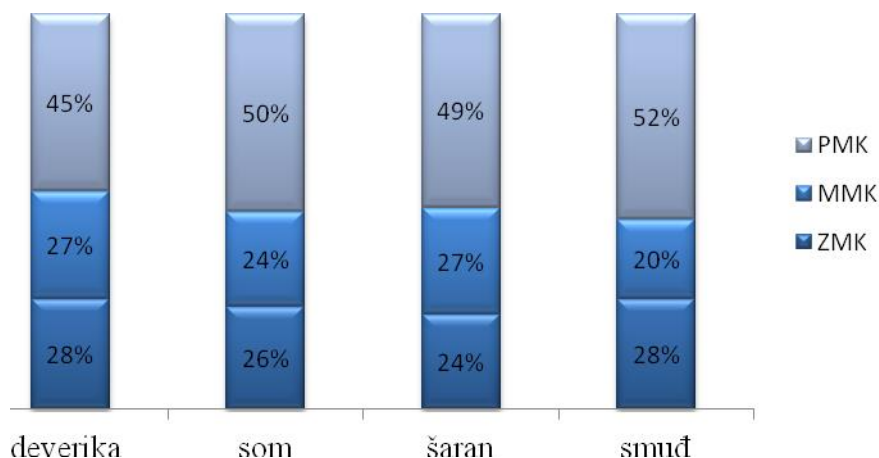


Slika 9. Odnos DHA/EPA u ispitivanim uzorcima rečne ribe

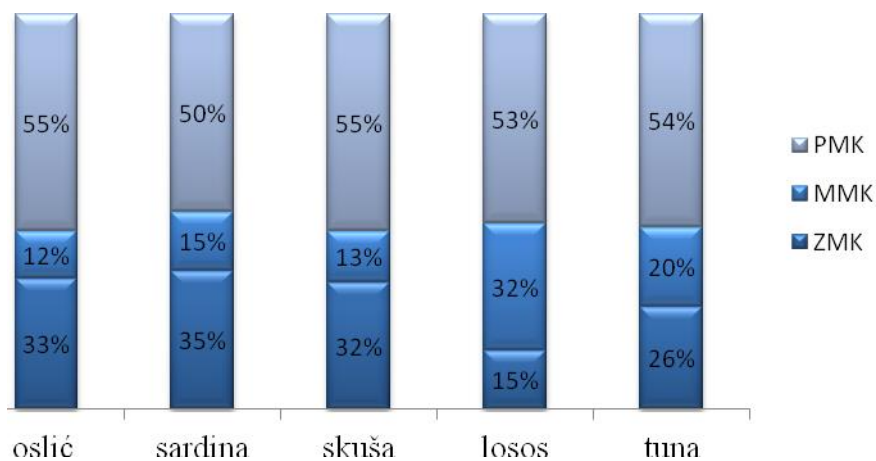


Slika 10. Odnos DHA/EPA u ispitivanim uzorcima morske ribe

Na slikama 11 i 12 prikazani su odnosi zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u analiziranim uzorcima ribe



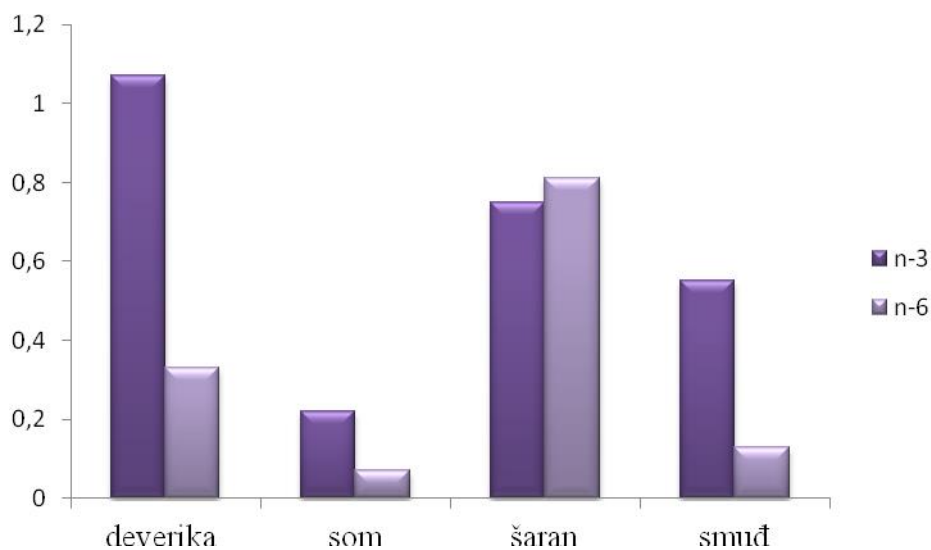
Slika 11. Prosečna zastupljenost zasićenih i nezasićenih (MMK i PMK) masnih kiselina u lipidima uzoraka rečne ribe



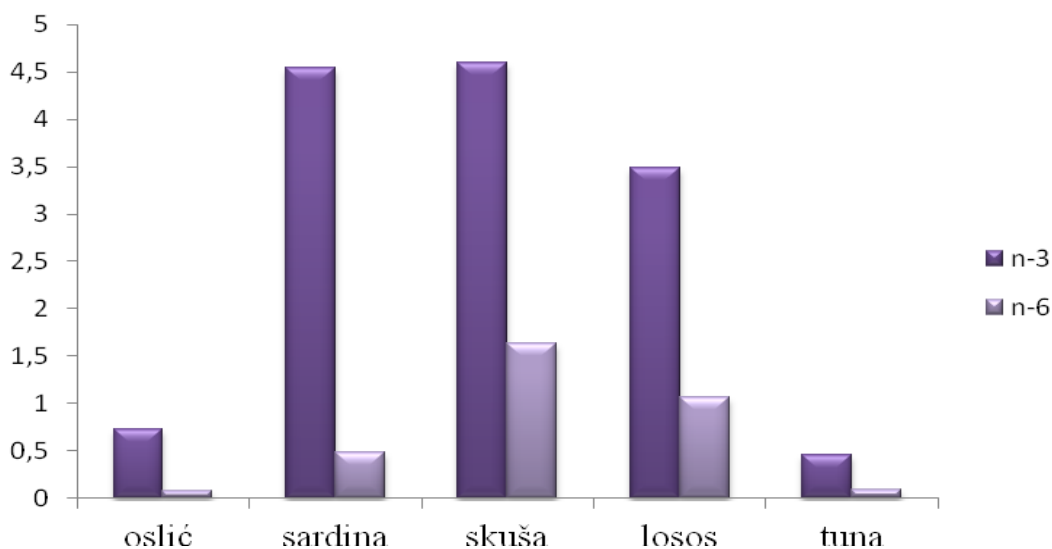
Slika 12. Prosečna zastupljenost zasićenih i nezasićenih (MMK i PMK) masnih kiselina u lipidima uzoraka morske ribe

U svim vrstama rečne ribe odnos je bio sličan i iznosio je oko 75% za nezasićene i 25% za ZMK. Slični odnosi su dobijeni i kod morskih riba, posebno je ujednačen bio sadržaj PMK, samo je losos imao nešto niži procentualni udeo ZMK (15%) na račun nešto većeg udela MMK (32%) od svih ispitivanih vrsta ribe.

Odnos srednjih vrednosti sadržaja n-3 i n-6 masnih kiselina prikazan je na slikama 13 i 14.



Slika 13. Odnos srednjih vrednosti ukupnog sadržaja n-3 i n-6 masnih kiselina (g/100g jestive ribe) u uzorcima rečne ribe



Slika 14. Odnos srednjih vrednosti ukupnog sadržaja n-3 i n-6 masnih kiselina (g/100g jestive ribe) u uzorcima morske ribe

Jedino je u uzorcima šarana odnos n-3/n-6 bio manji od 1, dok je u svim ostalim uzorcima ribe sadržaj n-3 masnih kiselina bio višestruko veći od masnih kiselina n-6 serije. Sardina je imala najveći odnos ovih masnih kiselina od 9,2.

Visoki nivoi ukupnih n-3 masnih kiselina, EPA i DHA, pronađeni su kod svih morskih i rečnih vrsta ribe, što se slaže sa literaturnim podacima (138-151). Sadržaj je, prema

očekivanjima bio veći kod morskih vrsta, ali je pokazano i da su slatkovodne vrste dobar izvor n-3 masnih kiselina (138-150). Rečne ribe koje su analizirane u različitim studijama su uglavnom poreklom iz jezera i ribnjaka u Turskoj i Poljskoj, dok su analizirane morske ribe bile iz različitih geografskih područja. Tako je Ozogul sa saradnicima (139) objavio podatke o lipidnom profilu skuše poreklom iz istočnog dela Atlantika uključujući Sredozemno i Crno more, dok je Liyanage sa saradnicima (149) objavio rezultate analiza tune poreklom iz Šri Lanke. Testi sa saradnicima (150) je objavio rad o sastavu masnih kiselina oslića poreklom iz Italije, a rezultate za sardinu objavio je grčki autor Zlatanov sa saradnicima (151). Sadržaj n-3 masnih kiselina se uvek mora posmatrati u odnosu na sadržaj lipida ribe, jer je ovaj parametar u boljoj korelaciji sa sadržajem n-3 MK u odnosu na procentualni udeo n-3 MK u ukupnim masnim kiselinama i u odnosu na poreklo ribe (rečne, morske, gajene). Ova činjenica opravdava dijetarnu preporuku o poželjnom unosu masnije ribe u ishrani, jer jedino masnija riba može obezbediti značajniju količinu EPA i DHA. Među rezultatima analiza unutar jedne vrste uočene su značajne varijacije u sadržaju pojedinih klasa masnih kiselina, što potvrđuje da veliki broj faktora utiče na sadržaj lipida i masnokiselinski profil riba, i da on može višestruko da varira što otežava procenu kvaliteta mesa ribe kao dijetarnih izvora n-3 masnih kiselina i procenu unosa EPA i DHA u opštoj populaciji, a takođe otežava davanje dijetarnih preporuka.

Na osnovu dobijenih rezultata analiziranih uzoraka ribe u našoj studiji, u tabeli 13 je prikazana količina potrebnog nedeljnog unosa rečne ili morske ribe (u gramima ili u porcijama) koja bi bila dovoljna da se postignu vrednosti preporuka za unos EPA i DHA u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Kao srednja vrednost preporuke EFSA za primarnu prevenciju uzeta je vrednost od 400 mg/dan EPA+DHA (preporučeni raspon je 250-500 mg/dan), dok AHA preporučuje 1 g/dan EPA+DHA za sekundarnu prevenciju. Odabrana porcija je bila slična srednjoj porciji masne ribe definisane od strane UK Scientific Advisory Committee on Nutrition koja iznosi ~150 g.

Tabela 13. Nedeljni unos ribe u gramima ili porcijama potreban za postizanje dijetarnih preporuka

Vrsta ribe	400 mg EPA+DHA/dan (EFSA)	1 g EPA+DHA/dan (AHA)
deverika	300 (~2)	760 (~5)
som	1570 (~10)	3680 (~24)
šaran	459 (~3)	1150 (~8)
smuđ	600 (~4)	1490 (~10)
oslić	410 (~2,5)	1010 (~7)
sardina*	67 (~0,5)	166 (~1)
skuša*	75 (~0,5)	187 (~1)
losos*	95 (~0,5)	236 (~2)
tuna	636 (~4)	1590 (~11)

* ribe sa visokim sadržajem lipida

Može se izvući generalni zaključak da su masnije ribe značajno bogatiji izvori n-3 MK čime se potvrđuje značaj dijetarnih preporuka o unosu vrsta sa visokim sadržajem lipida.

4.1.2 Evaluacija tržišta dijetetskih suplemenata sa ribljim uljem u Srbiji

Anketom sprovedenom u jedanaest apoteka utvrđeno je prisustvo 42 dijetetska suplementa sa uljem riba na tržištu Srbije. Biološki aktivne komponente ribljeg ulja su EPA i DHA. Većina preparata na tržištu je sadržala kombinaciju ovih jedinjenja čija je pojedinačna količina ili procentualna zastupljenosti bila navedena u deklaracijama. Zbog razlika u sastavu i delovanju u zavisnosti od odnosa EPA i DHA u preparatima, bilo je značajno napraviti pregled dijetetskih suplemenata prisutnih na tržištu. U tabeli 14 dat je spisak suplemenata i njihov sastav.

Tabela 14. Pregled dijetetskih suplemenata na tržištu Srbije

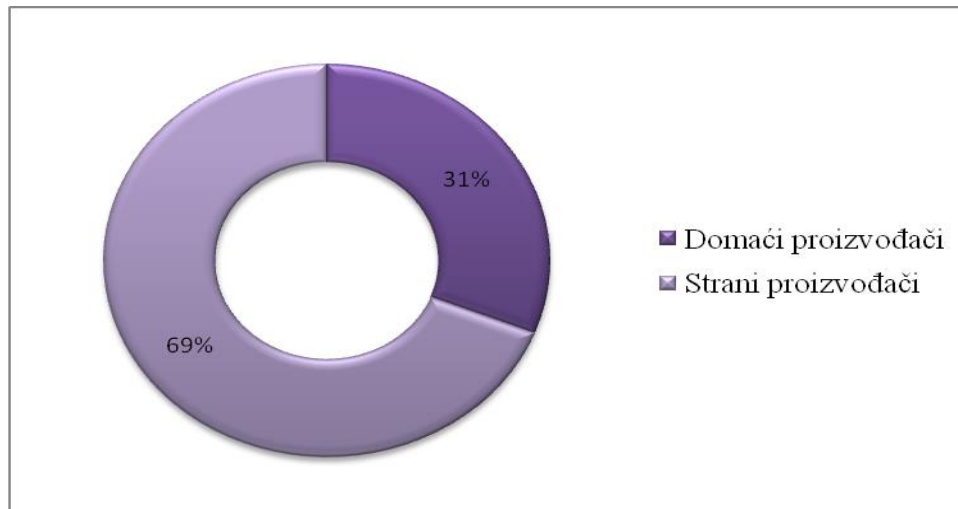
Naziv proizvoda	Proizvođač, zemlja porekla	Sastav
<i>Omega 3 Natal</i>	Natural Wealth, SAD	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 400 mg (DHA - 100 mg)
<i>Omega 3 Junior</i>	Natural Wealth, SAD	1 kapsula sadrži: riblje ulja - 400 mg (DHA - 100 mg)
<i>Omega 3 Neuro</i>	Natural Wealth, SAD	1 kapsula sadrži: riblje ulje - 1000 mg (EPA - 90 mg DHA - 110 mg) i ostale ω - 3 MK - 200 mg
<i>Omega 3 Cardio</i>	Natural Wealth, SAD	1 kapsula sadrži: riblje ulje- 1000 mg, (EPA - 300 mg, DHA - 200 mg i 100 mg ostale ω - 3 MK)
<i>Omega 3-6-9</i>	Natural Wealth, SAD	1 kapsula sadrži: vitamin E - 3, 35 mg, ulje semena lana - 400 mg, ulje semena borača - 400 mg, ω -3 - 420 mg MK: (EPA - 120 mg, DHA - 80 mg, ALA - 220 mg), ω -6 - 268 mg: (Linolna 180 mg, γ - linolenska 120 mg)
<i>Riblje ulje omega - 3</i>	Amerovit, Srbija	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 1000 mg (EPA - 180 mg i DHA - 120 mg), vitamin E- 2IU
<i>Omega - 3 Max</i>	Pharmanova, Srbija	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 1000 mg sa najmanje 30% ω -3 masnih kiselina EPA 18% (180 mg), DHA 12% (120 mg); vitamin E - 10 mg
<i>Ωmega 3²</i>	Supplement, SAD	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 1000 mg (EPA - 180 mg i DHA - 120 mg)
<i>Omegaktiv</i>	ESI, Italija	1 kapsula sadrži: laneno ulje - 800 mg, ulje noćurka - 90 mg, maslinovo ulje - 60 mg, ulje riže - 30 mg, ulje vučijeg trna - 10 mg
<i>Norwegian</i>	Twinlab, SAD	1 kapsula sadrži: ulje jetre bakalara - 830 mg (EPA - 68 mg, DHA - 64 mg), vitamin A - 2 500 IU, vitamin D - 270 IU

<i>Omega 3</i>	Alkaloid, Skoplje	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 500 mg (EPA + DHA = 275 mg)
<i>Omega Defend</i>	Wyeth Lederle, Italija	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 843 mg (EPA - 235 mg i DHA - 192 mg)
<i>Omega3 - Lifeline®</i>	Blagoleks, BIH	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 1000 mg (EPA - 180 mg i DHA - 120 mg)
<i>Riblje perlice - Lifeline®</i>	Blagoleks, BIH	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 300 mg (sa 18% EPA i 12% DHA), vitamin A - 1 333 IU, vitamin D - 280 IU
<i>Normolip+omega 3+omega 6</i>	<i>ESI, Italija</i>	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 335 mg (DHA i EPA = 120 mg), ulje boraga 166 mg, vitamin E - 2,6 mg
<i>Vega®Marine Omega-3 Fish oil</i>		1 kapsula sadrži: 1000 mg ulje plave morske ribe (sa 18% EPA i 12% DHA), vitamin E - 5 mg
<i>Norveško ulje bakalara</i>	<i>Natural Wealth MBTY Bohemia, SAD</i>	1 kapsula sadrži: EPA - 34 mg, DHA - 32 mg, vitamin A - 1 250 IU i vitamin D - 135 IU
<i>Cardioace®</i>	<i>Vitabiotics, UK</i>	1 kapsula sadrži: 400 mg ω -3 MK, 30% EPA, 20% DHA, beli luk, vitamin B6, vitamin B12, vitamin E i C, cink, selen, mangan, bakar, hrom, lecitin
<i>Nutricel omega-3</i>	<i>Pharmanova, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: 500 mg prečišćenog ribljeg ulja sa najmanje 30% ω -3 MK (EPA - 18% - 90 mg i DHA - 12% - 60 mg), vitamin E - 10 mg
<i>Cognatal</i>	<i>Pharmanova, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 500 mg (EPA - 30 mg i DHA - 215 mg)
<i>Omega-3 sa ekstraktima valerijane i srdačice</i>	<i>Vetprom hemikalije, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ulje riba severnih mora - 79,8%; ekstrakt valerijane - 2,1%, ekstrakt srdačice - 2,1%
<i>Omega-3 sa uljima kamilice, kantariona i nevena</i>	<i>Vetprom hemikalije, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ulje riba severnih mora - 67%; ulje kamilice - 5,8%; ulje nevena - 4,6%

<i>Vitalia Mega Omega-3</i>	<i>Jadran Galenski Laboratorij, Hrvatska</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 1000 mg (EPA - 330 mg i DHA - 220 mg); vitamin E - 10 mg
<i>Protektin</i>	<i>Actavis, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 100 mg sa najmanje 30% EPA i DHA, vitamin C - 160 mg, vitamin E - 50 mg, kvasac sa selenom - 50 mg, ulje borača - 50 mg i beta karoten - 250 mg
<i>Maculin plus</i>	<i>Fidifarm, Hrvatska</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 400 mg (EPA - 24 mg i DHA - 172 mg), vitamin C - 60 mg, lutein - 10 mg, vitamin E - 10 mg, cink - 10 mg, zeaksantin - 2 mg
<i>Omega-3</i>	<i>Dietpharm, Hrvatska</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 1000 mg; 18% EPA (180 mg) i 12% DHA (120 mg)
<i>Ecomer plus omega 3</i>	<i>Beopanax, Švedska</i>	1 kapsula sadrži: alkilglicerol 100 mg, EPA - 150 mg, DHA - 100 mg i ostale omega - 3 MK 50 mg
<i>Omega - 3 plus</i>	<i>Swiss Beauti, Švajcarska</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 500 mg (ω-3 MK - 175 mg), vitamin E - 2,5 mg
<i>Zdravo srce</i>	<i>Vital Health Foods, Južnoafrička Republika</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 445 mg
<i>Normolip</i>	<i>ESI, Italija</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 335 mg (EPA + DHA = 120 mg), ulje boraga -166 mg i vitamin E - 2, 3 mg
<i>Jamieson Salmon oil</i>	<i>Jamieson Laboratories, Kanada</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 1000 mg (od čega EPA - 180 mg i DHA - 120 mg)
<i>Cardio K2</i>	<i>Pharmanova, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja - 500 mg, EPA - 165 mg, DHA - 110 mg, vitamin K2 i vitamin E
<i>Richlife Triple Omega 3-6-9</i>	<i>MP Biomedical, SAD</i>	1 kapsula sadrži: ω-3: ALA - 220 mg, EPA - 120 mg, DHA - 80 mg, ω-6: Linolna kiselina 180 mg, γ- linolenska kiselina 88 mg, ω-9: olinska kiselina 152 mg
<i>Strong Nature Riblje ulje omega-3</i>	<i>Elephant Co, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ribljev ulja sa 18% EPA i 12% DHA - 500 mg

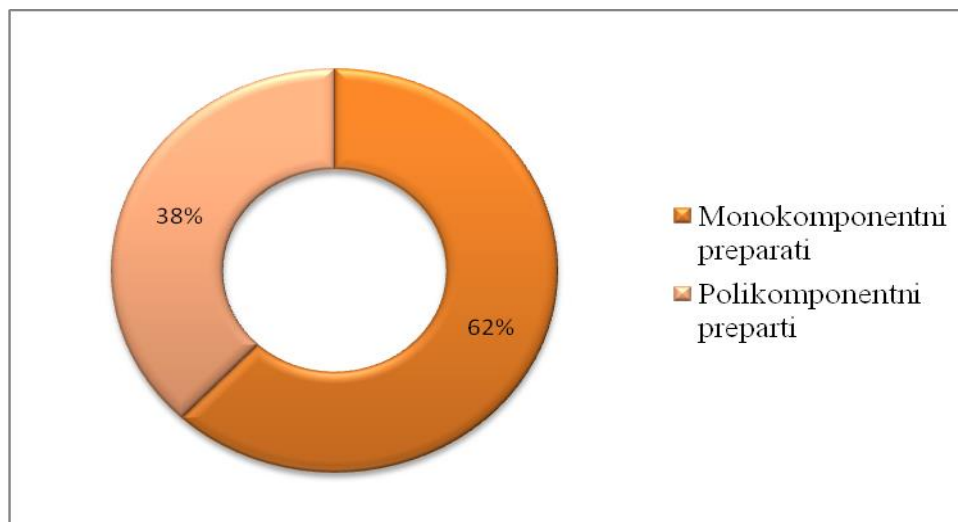
<i>Omega-3 sa ekstraktima laminarije</i>	<i>Vetprom hemikalije, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ulja riba severnih mora - 79, 8%; ekstrakt laminarije - 5, 59%
<i>Omega-3 sa uljima pšenice, šipka i pasijeg trna</i>	<i>Vetprom hemikalije, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ulja riba severnih mora - 71, 4%; ulja pšeničnih klica - 4,2%; ulja šipka - 4,2%; ulje pasijeg trna - 4,2%
<i>Omega-3</i>	<i>Now Foods, USA</i>	2 gel kapsule sadrže: 600 mg ω -3 MK (od čega EPA - 360 mg i DHA - 240 mg)
<i>Omega-3-6-9</i>	<i>Now Foods, USA</i>	2 gel kapsule sadrže: 1400 mg ulja semena lana; 300 mg ulja noćurka; 260 mg ulja kanole; 20 mg ulje crne ribizle; 20 mg ulja semena bundeve
<i>Max Epa</i>	<i>Now Foods, SAD</i>	2 gel kapsule sadrže: 2g ribljeg ulja (ω -3 masnih kiselina EPA - 360 mg, DHA - 240 mg)
<i>Omega plus</i>	<i>Nutripharm, SAD</i>	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 1000 mg EPA - 180 mg i DHA - 120 mg; vitamin E - 10 mg, beli luk - 50 mg
<i>Reumatol Nutri</i>	<i>Pharmanova, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ribljeg ulja - 500 mg (EPA - 195 mg i DHA - 35 mg)
<i>Omega Carnitine</i>	<i>Esentico, Srbija</i>	1 kapsula sadrži: ulje lososa - 600 mg; ulje lana - 10 mg; L-karnitin - 50 mg; vitamin E - 2 mg

Od 42 dijetetska suplementa trinaest (31%) je bilo proizvedeno u Srbiji, a dvadeset devet (69%) su bili poreklom iz uvoza (slika 15).



Slika 15. Odnos domaćih i uvezenih dijetetskih suplemenata sa uljem riba na tržištu Srbije

Od ukupnog broja preparata, 26 preparata je bilo monokomponentno, samo sa ribljim uljem, a 16 polikomponentno - riblje ulje u kombinaciji sa nekim drugim aktivnim sastojcima, kao što su liposolubilni vitamini, mikroelementi, L-karnitin, koenzim Q i dr. (slika 16).



Slika 16. Odnos monokomponentnih i polikomponentnih dijetetskih suplemenata sa uljem riba na tržištu Srbije

Od identifikovanih proizvoda samo pet (12%) je u svom sastavu imalo dokozaheksaensku kiselinu u većem procentu: *Omega-3 Junior Natural Wealth* (preporučuje se za pravilan rast i razvoj dece, podstiče prirodnu otpornost organizma i doprinosi boljoj pažnji i lakšem učenju), *Omega-3 Natal Natural Wealth* (preporučuje se trudnicama i dojiljama, obezbeđuje masne kiseline neophodne za pravilan razvoj mozga i vidnog sistema deteta), *Omega-3 Neuro Natural Wealth i Cognatal Pharmanova* (preporučuje se za pravilan rad mozga, za poboljšanje pamćenja i koncentracije i kod poremećaja raspoloženja), *Cognatal Pharmanova* (namenjen je trudnicama i dojiljama, smanjuje mogućnost pojave postporodajne depresije, masne kiseline su neophodne za razvoj moždanih funkcija, nervnog i očnog sistema odojčeta), *Maculin plus Fidifarm* (preporučuje se za zaštitu vida, omega-3 masne kiseline se preporučuju kod makularne degeneracije očne mrežice i doprinose zaštiti osetljivih delova retine).

Ostalih 37 preparata u većem procentu je sadržalo eikozapentaensku kiselinu, i osnovna namena ovih preparata bila je zaštita kardiovaskularnog sistema, sniženje nivoa lipida u krvi, regulisanje krvnog pritiska, smanjenje rizika od pojave ateroskleroze i ublažavanje simptoma PMS. Pregled karakteristika suplemenata sa n-3 MK ukazuje na to da se tržište počinje profilisati u skladu sa sastavom MK i posledičnim namenama, te se više ne može govoriti generalno o suplementaciji n-3 masnim kiselinama. Proizvodi sa većom količinom DHA su usmereni prevashodno na funkcije koje ova MK ima u organizmu, dok su proizvodi sa više EPA usmereni na stabilizaciju ćelijskih membrana i na kardioprotektivnu ulogu, što je u skladu sa rezultatima istraživanja njihovih efekata.

Na deklaraciji 15 preparata naznačeno je prisustvo vitamina E, koji ima ulogu antioksidansa, sprečava oksidaciju ribljeg ulja u preparatu, ali i u samom organizmu. U tabeli 15 je prikazan zbirni pregled najvažnijih karakteristika sastava i preporučenog načina korišćenja suplemenata. Kao izvor EPA i DHA u najvećem broju suplemenata bilo je navedeno riblje ulje, a na nekim preparatima navedeno je i poreklo ribljeg ulja (npr. ulje bakalara, ulje riba severnih mora, ulje lososa, ulje sardine) ili da se radi o prečišćenom ribljem ulju. U najvećem broju preparata su u stvari korišćeni koncentri ribljeg ulja sa povećanim sadržajem EPA i DHA u odnosu na sadržaj u sirovom ulju riba. Uobičajen odnos EPA/DHA u većini preparata je bio 3:2, a za samo 12% preparata je na deklaraciji bio naznačen hemijski oblik, od čega je u 7% preparata korišćen oblik etil-estra i u 5% oblik triglicerida.

Količina ribljeg ulja u jednom doziranom obliku veoma je varirala, od 0,1-1 g, kao što su varirali i preporučeni načini uzimanja.

Količina koncentrovanog prečišćenog ribljeg ulja koja se preporučuje kao dnevni unos se zato kretala u širokom rasponu od 400 mg do 2000 mg, obično podeljena u 1 do 3 doze dnevno. Riblje ulje je bilo u svim preparatima inkapsulirano u mekim želatinoznim kapsulama.

Tabela 15. Karakteristike suplemenata sa ribljim uljem na tržištu Srbije (n=42)

Sadržaj ribljeg ulja (mg)/kapsuli	Deklarisani EPA/DHA odnos	Preporučeni dnevni unos deklarisan od strane proizvođača (mg ribljeg ulja/dan)	Hemijska forma ribljeg ulja
< 500 (31%)*	3/2 (67%)	<500 mg (14%)	3 (7%) - etil estri
500 (26%)	Ostali odnosi (33%)	1000 mg (27%)	2 (5%) - TG
1000 (36%)		2000 mg (45%)	88 % - nepoznato
Ostalo (7%)		3000 mg (9%)	
		Ostalo (5%)	

*brojevi u zagradi predstavljaju procenat od ukupnog broja proizvoda

4.1.2.1 Provera sastava masnih kiselina u odabranim uzorcima suplemenata sa uljem riba

Od ukupnog broja identifikovanih dijetetskih suplemenata na tržištu, proveren je sastav masnih kiselina u 15 uzoraka. Izabrani su preparati koji sadrže n-3 masne kiseline kao jedini aktivni sastojak. Pre provere sastava masnih kiselina analiziranih preparata, izvršena je kontrola mase jednog doziranog oblika i rezultati su prikazani u tabeli 16.

Tabela 16. Izmerena i deklarirana masa kapsule, deklarirana masa ribljeg ulja u kapsuli

Preparat	Izmerena masa pune kapsule	Deklarirana masa kapsule	Deklarirana masa ribljeg ulja u kapsuli
<i>Omega 3 Natal</i> - Natural Wealth	600 mg	600 mg ($\pm 10\%$)	400 mg
<i>Omega 3 Junior</i> - Natural Wealth	600 mg	600 mg ($\pm 10\%$)	400 mg
<i>Omega 3 Neuro</i> - Natural Wealth	1400 mg	1420 mg	1000 mg
<i>Omega 3 Cardio</i> - Natural Wealth	1400 mg	1500 mg ($\pm 10\%$)	1000 mg
<i>Omega 3-6-9</i> - Natural Wealth	1700 mg	–	400 mg
<i>Riblje ulje omega 3</i> - Amerovit	1400 mg	–	1000 mg
<i>Omega 3 Max</i> - Pharmanova	1400 mg	–	1000 mg
<i>Kapsule lososa</i>	700 mg	–	
<i>Omega 3²</i> – Supplement	1500 mg	–	1000 mg
<i>Omegaktiv</i> - ESI	1400 mg	–	-
<i>Norwegian</i> – Twinlab	600 mg	–	830 mg
<i>Omega 3</i> - Alkaloid Skoplje	700 mg	–	500 mg
<i>Omega Defend</i> - Pharma Swiss	1100 mg	–	843 mg
<i>Omega3 - Lifeline®</i> - Blagoleks, BIH	1300 mg	–	1000 mg
<i>Riblje perlice - Lifeline®</i> - Blagoleks, BIH	200 mg	–	30 mg

Od 15 ispitivanih uzoraka samo 4 je na pakovanju imalo naznačenu deklarisanu masu kapsule iako je to jedan od zahteva novog Pravilnika o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda.

Upoređivanjem izmerene mase kapsula sa deklarisanom, utvrđeno je da nema značajnih odstupanja i da su odstupanja u okviru dozvoljenih za dozirane oblike. Na preparatima je takođe naznačena deklarirana masa ribljeg ulja u svakoj kapsuli.

Analizom sastava masnih kiselina za 15 uzoraka suplemenata sa uljem riba dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Sastav masnih kiselina u analiziranim uzorcima suplemenata (izražen u %)

PREPARAT	Ukupne n-3 MK	Ukupne n-6 MK	Ukupne PMK	Ukupne MNK	Ukupne ZMK
Omega 3 Natal-Natural Wealth	33,1	5,3	39,8	23,0	29,2
Omega 3 Junior -Natural Wealth	33,2	5,2	39,7	23,2	28,9
Omega 3 Neuro- Natural Wealth	26,9	11,8	40,5	27,2	22,8
Omega 3 Cardio-Natural Wealth	45,4	2,6	52,0	11,9	7,3
Omega 3-6-9-Natural Wealth	44,3	8,0	56,0	9,4	3,6
Riblje ulje omega 3- Amerovit	31,2	4,6	37,3	21,0	19,2
Omega 3 Max- Pharmanova	31,6	4,1	37,6	21,1	25,8
Kapsule lososa-Jamieson Salmon Oil	29,9	3,4	35,0	22,1	25,4
Ωmega 3 ² -Supplement	29,8	1,3	32,8	21,3	25,3
Omegaktiv ESI	34,1	25,0	59,1	24,3	12,3
Norwegian-Twinlab	21,6	14,7	38,7	23,4	21,3
Omega 3- Alkaloid Skoplje	52,6	1,5	60,2	7,9	4,8
Omega Defend –Pharma Swiss	49,5	3,2	52,7	13,3	4,1
Omega3- Lifeline®-Blagoleks,BIH	24,7	4,4	31,1	21,1	22,1
Riblje perlice-Lifeline®-Blagoleks, BIH	9,3	37,0	46,4	22,2	22,4

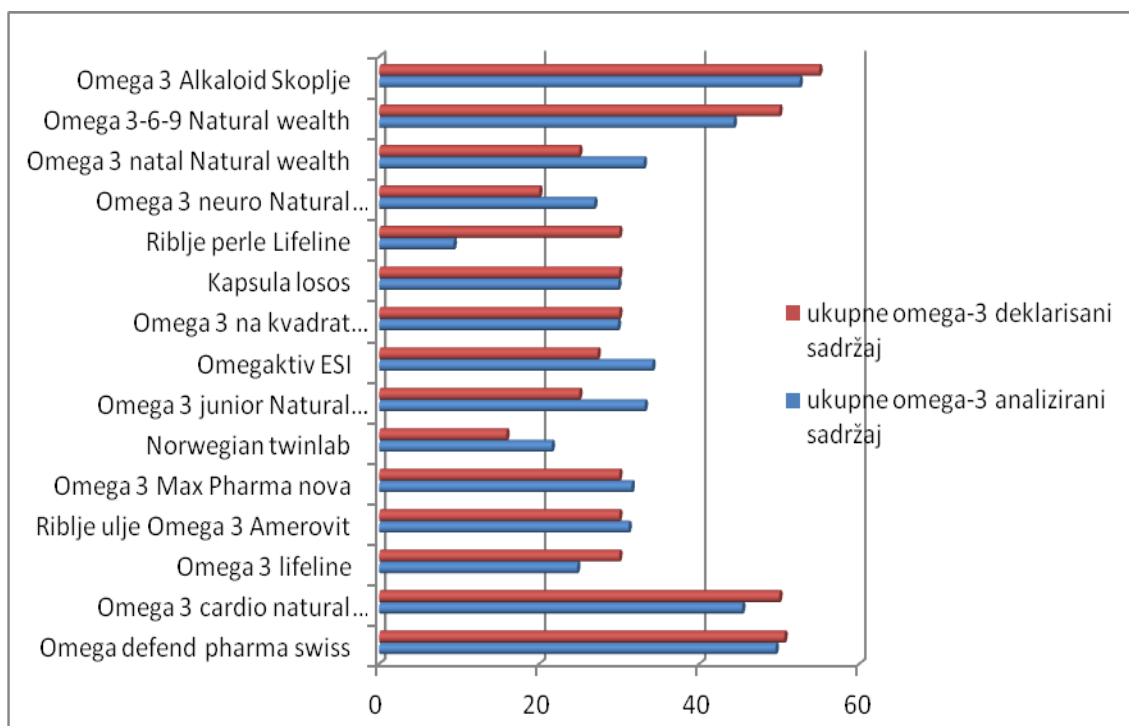
Dobijeni rezultati su pokazali da su se analizirani uzorci suplemenata međusobno veoma razlikovali u sastavu masnih kiselina, ali da su u uzorcima svih analiziranih preparata u najvećem procentu ipak bile zastupljene n-3 masne kiseline. Sadržaj ukupnih ZMK u ispitivanim preparatima su bili u rasponu od 3,6% (Omega 3-6-9 Natural Wealth) do 29,2% (Omega-3 Natal Natural Wealth). Sadržaj MMK se kretao od 7,9% (Omega-3

Alkaloid Skoplje) do 24,3% (Omegaktive ESI). Sadržaj ukupnih PMK u analiziranim uzorcima se kretao od 31,1% (Omega - 3 Lifeline®) do 60, 2% (Omega - 3 Alkaloid Skoplje). n-6 masne kiseline su u veoma različitim količinama bile zastupljene u ispitivanim uzorcima i te vrednosti su se kretale od 1,3% (Omega 3² Supplement) do 37% (Riblje perlice Lifeline®).

Sadržaj n-3 masnih kiselina u ispitivanim uzorcima se kretao u širokom rasponu od 9,3% do 52,6%. Najveći udeo n-3 MK u ukupnim lipidima imali su sledeći preparati:

- Omega-3 Alkaloid Skoplje 52,6%, Omega Defend Pharma Swiss 49,5%, Omega 3 Cardio Natural Wealth 45,4%, a najmanji:
- Riblje perlice Lifeline® 9,3%, Norwegian Twinlab 21, 6%, Omega 3 Lifeline® 24, 7%.

Sadržaj ukupnih n-3 masnih kiselina dobijen hemijskom analizom proizvoda uglavnom se nije razlikovao značajno od deklarisanih vrednosti (slika 17). Najveća odstupanja od deklarisanog sadržaja odnosila su se na sadržaj EPA u preparatu: Riblje perlice Lifeline® (6, 4% u odnosu na deklarisanih 18%) i u sadržaju DHA u preparatu Omega 3-6-9 Natural Wealth (15,7% umesto 20%). Na deklaracijama većine dijetetskih suplemenata bila je naznačena i količina EPA i DHA pored količine ukupnih n-3 MK.



Slika 17. Odnos analiziranog i deklarisanog sadržaja n-3 masnih kiselina (izraženi u %)

Nakon provjere sastava masnih kiselina analiziranih preparata, upoređene su deklarirane vrijednosti EPA i DHA sa vrijednostima ovih masnih kiselina određenim u lipidima dvije vrste ribe-lososa i skuše (tabela 18). Losos i skuša su izabrani kao najbogatiji izvori ovih masnih kiselina od analiziranih vrsta rečne i morske ribe.

Tabela 18. Uporedni sadržaj EPA i DHA u morskoj ribi i u suplementima (izraženo u % u odnosu na ukupne MK)

Uzorak	EPA	DHA
Losos	9,8	21,5
Skuša	9,3	22
<i>Omega 3 Natal - Natural Wealth</i>	7,6	23,5
<i>Omega 3 Junior - Natural Wealth</i>	7,3	23,8
<i>Omega 3 Neuro - Natural Wealth</i>	10,9	9,2
<i>Omega 3 Cardio - Natural Wealth</i>	26,7	17,9
<i>Omega 3-6-9 - Natural Wealth</i>	24,6	15,7
<i>Riblje ulje omega 3 - Amerovit</i>	16,6	11,6
<i>Omega 3 Max - Pharmanova</i>	20,2	9,8
<i>Kapsule lososa</i>	19,1	9,1
<i>Omega 3² - Supplement</i>	20	9,8
<i>Omegaktiv - ESI</i>	-	-
<i>Norwegian - Twinlab</i>	10,6	7,3
<i>Omega 3 - Alkaloid Skoplje</i>	30,3	19,9
<i>Omega Defend - Pharma Swiss</i>	28,9	19,4
<i>Omega 3 - Lifeline®-Blagoleks, BIH</i>	14,5	8,43
<i>Riblje perlice - Lifeline®-Blagoleks, BIH</i>	6,4	3

EPA je prosečno bila zastupljena u ulju lososa i skuše sa oko 10%, a DHA sa 22%. Analizom masnih kiselina analiziranih preparata potvrđeno je da se sadržaj EPA i DHA u većini analiziranih proizvoda razlikuje u odnosu na količinu u prirodnim izvorima, osim u proizvodima koji su namenjeni specifično zaštititi zdravlja oka, mozga, i kao dopuna ishrani trudnica i dojilja.

4.1.3 Izbor dijetarnih izvora n-3 MK korišćenih u intervenciji

Naša intervencija je bila usmerena ka proceni efekata dijetarnih preporuka za unos n-3 PMK u preventivne svrhe. AHA i SZO preporučuju unos dve porcije ribe nedeljno u primarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti što je i u našoj studiji korišćeno kao dijetarna preporuka ispitanicima (126, 152). Za izvođenje studije na ispitanicima losos je izabran kao jedan od najboljih izvora n-3 PMK među masnim ribama pri čemu je odabrana porcija bila slična srednjoj porciji masne ribe definisane od strane UK Scientific Advisory Committee on Nutrition (153, 154). Veličina prosečne porcije definisane od strane UK SACN za odrasle osobe je 148 g za muškarce i 143 g za žene, a preporuke se odnose na konzumiranje ribe najmanje dva puta nedeljno, od čega jedna porcija treba da bude uljana riba. Toplo dimljeni losos u našoj studiji je odabran zbog toga što je kao takav već bio spreman za konzumiranje, nikakva dalja priprema nije bila potrebna, svako pakovanje je predstavljalo jedan obrok standardizovane mase (~150 g), što je učesnicima studije u velikoj meri olakšalo korišćenje ribe na preporučeni način. Suplement je izabran tako da njegov sastav oslikava najčešći odnos n-3 PMK u preparatima (EPA/DHA odnos 3/2) i dnevna doza je izabrana kao medijana količina koje se preporučuju za korišćenje od strane proizvođača (2 g/dan). Kada se porede efekti ribe i suplementa, važno je pitanje bioraspoloživosti iz različitih izvora. Nekoliko faktora može da utiče na bioraspoloživost masnih kiselina iz suplementa, od kojih su najvažniji matriks i hemijski oblik. U cilju postizanja što bolje bioraspoloživosti, ispitanici su savetovani da uzimaju suplement uz obrok jer ima radova koji ukazuju da se tako postiže bolja apsorpcija (155). Trigliceridi u ribama predstavljaju najveći deo lipidne frakcije (81,9-94,1%) (96), tako da najveći deo n-3 PMK u ribljem ulju potiče iz TG. TG kao hemijski oblik imaju bolju bioiskoristljivost u odnosu na etil-estre ili slobodne masne kiseline, koje se takođe često nalaze u suplementima ribljeg ulja (98, 99). Iz navedenih razloga suplement korišćen u našoj studiji je bio u formi TG čime je postignuta maksimalna sličnost u iskoristljivosti n-3 masnih kiselina iz dva ispitivana dijetarna izvora. U tabeli 19 su prikazane srednje vrednosti masnih kiselina dimljenog lososa i suplementa korišćenih u intervenciji.

Tabela 19. Sastav masnih kiselina lososa i suplementa

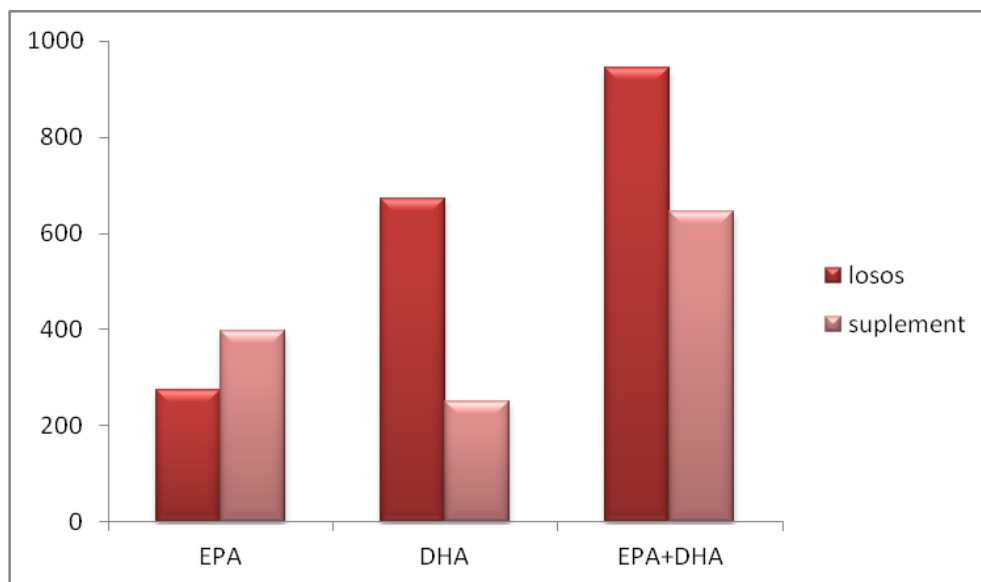
Masne kiseline	Losos (%)	Kapsule (%)
14:0	2,3	6,9
16:0	13,8	16,5
16:1	2,2	8,5
18:0	3,1	4,1
18:1n-9	22,6	10,5
18:1n-7	2,7	3,9
18:2n-6	8,8	1,6
18:3n-3	4,1	0,9
20:4n-6	0,7	1,1
20:5n-3	7,1	19,8
22:5n-3	2,6	2,0
22:6n-3	17,4	12,5
n-3 MK	mg/150 g	mg/kapsuli
EPA	958	198
DHA	2349	125
Ukupne n-3 MK	4212	352

Najznačajnije masne kiseline u lipidima lososa bile su oleinska kiselina (C18:1n-9) i DHA, a ukupne n-3 PMK (ALA, EPA i DHA) su predstavljale trećinu ukupnih masnih kiselina gde je odnos EPA i DHA bio 0,41. Profil masnih kiselina u suplementu se razlikovao u odnosu na losos. Glavne masne kiseline su bile EPA i palmitinska kiselina (C16:0), dok je odnos EPA i DHA bio 1,58, a ukupne n-3 masne kiseline su činile takođe približno trećinu ukupnih masnih kiselina. Komercijalni suplement ribljeg ulja je imao standardizovanu količinu EPA i DHA, što je tipično za slične proizvode prisutne na tržištu (deklarisane količine su 180 mg EPA+120 mg DHA/kapsuli).

Tabela 20. Dnevni unos n-3 PMK iz odabranih izvora

n-3 masne kiseline (mg/dan)		
	Losos	Suplement
EPA	274	396
DHA	671	250
EPA+DHA	945	646
Ukupne n-3 MK	1206	704

U tabeli 20 i na slici 18 prikazan je dnevni unos EPA i DHA koji je u studiji ostvaren konzumiranjem lososa i suplementa. Obzirom da je cilj studije bio uporedno ispitivanje efekata n-3 masnih kiselina unetih na osnovu važećih dijetarnih preporuka i preporuka proizvođača suplemenata, nije vršeno podešavanje njihovog unosa u interventnim grupama. Zbog toga su se, pored različitog profila masnih kiselina, razlikovale i količine n-3 masnih kiselina koje su unošene korišćenjem dva odabrana dijetarna izvora. U suplementu je sadržaj EPA bio veći u odnosu na losos (396 mg vs 274 mg), dok je DHA u većoj količini bila prisutna u lososu nego u suplementu (671 mg vs 250 mg). Dnevni unos EPA+DHA je bio veći konzumiranjem lososa nego suplementa (odnos 3/2).



Slika 18. Grafički prikaz razlika u ostvarenom dnevnom unosu EPA i DHA konzumiranjem lososa i suplementa (mg/dan)

4.2 Ispitivanje efekata nutritivno relevantnih količina n-3 masnih kiselina iz dva dijetarna izvora na faktore kardiovaskularnog rizika

4.2.1 Ispitanici

Tideset tri ispitanika su završila dve faze eksperimenta sa svim izmerenim parametrima tokom 4 posete ambulanti. Dva ispitanika nisu odgovorila zahtevima studije. Razlog za isključenje bila je neadekvatna komplijansa u okviru grupe kojoj su pripadali. Svi ispitanici su bili srednjih godina ($53,9 \pm 9,5$), bez dijagnostikovanih hroničnih oboljenja, sa jednim ili dva faktora rizika za razvoj KVB na početku studije (54% gojaznih i 71% sa poremećenim profilom lipida seruma). Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima lipidnih parametara između grupa na početku i posle 6 meseci pauze (*washout*). Bez obzira na veće koncentracije TG na početku studije u grupi koja je uzimala losos (grupa L) u odnosu na grupu koja je suplementirana (grupa S) - 2,01 mmol/L i 1,76 mmol/L, redom, razlika nije imala statističku značajnost. Osnovne karakteristike ispitanika (uključujući ITM, krvni pritisak, nivo glukoze) nisu se menjale tokom trajanja studije.

Srednje vrednosti dnevnog unosa za energiju i makronutrijente su prikazane u tabeli 21. Nije bilo statistički značajne razlike u unosu makronutrijenata pre početka studije i posle *washout* perioda. Analizom dijetarnog unosa na osnovu vođenog trodnevnog dnevnika ishrane pokazano je da je srednja energetska vrednost bila neznatno veća u odnosu na srednju vrednost referentne dijetarne preporuke za populaciju srednjih godina (156).

Tabela 21. Dnevni unos makronutrijenata ispitanika tokom trajanja studije

	Pre početka studije	Posle <i>washout</i> perioda
Energija (kcal)	2357±561	2229±601
Proteini (g)	109±6,5	104±7,1
Ugljeni hidrati (g)	295±31	279±335
Masti (g)	76±17	78±19

4.2.2 Izbor tipa studije

Crossover dizajn (ukrštena studija) koji je primenjen u studiji ima nekoliko prednosti u odnosu na paralelne tretmane. Prvo, uticaj pratećih kovarijabli na ispitivane parametre je smanjen jer svaki *crossover* pacijent predstavlja samom sebi kontrolu. Često se dešava da u randomizovanim paralelnim tretmanima različite grupe imaju velike varijacije u okviru jedne varijable, što u *crossover* studijama nije moguće. Druga važna prednost *cross overa* je efikasnost statističke analize i manji broj učesnika u studiji. *Crossover* ima i svoja ograničenja. Postojanje *carry over* efekta između dva tretmana može uticati na ishod druge intervencije. Međutim, u dobro dizajniranim studijama kada se dobro poznaje dinamika tretmana, *carry over* efekat se može izbeći izborom adekvatne dužine tzv. *washout* perioda. *Washout* period je vreme između dve intervencije za koje treba da se postigne gubitak efekta prve intervencije.

4.2.3 Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na profil masnih kiselina plazme, eritrocita i trombocita

4.2.3.1 Plazma

Određivanje masnih kiselina u plazmi omogućilo je praćenje nivoa ukupnih promena sastava i sadržaja masnih kiselina u plazmi koja je bila uslovljena primenjenim dijetarnim intervencijama. U tabeli 22 prikazane su promene u sastavu masnih kiselina plazme posle 8 nedelja intervencije.

Tabela 22. Sastav masnih kiselina lipida plazme pre i posle intervencije lososom i suplementom (% u odnosu na ukupne masne kiseline)

MK	Grupa L			Grupa S			P ^c
	Pre	Posle	P ^a	Pre	Posle	P ^b	
16:0	25,1±1,2	25,7	0,836	24,98±2,1	25,54±1,1	0,811	0,346
17:0	1,91±0,4	1,78±0,3	0,237	2,01±0,57	2,12±0,47	0,736	0,101
18:0	13,4±1,5	12,9±1,4	0,414	12,79±1,7	12,01±1,9	0,269	0,577
18:1n-9	12,21±1,	13,1±1,4	0,567	11,93±1,6	12,01±1,7	0,223	0,986
18:1n-7	1,02±0,2	0,97±0,3	0,232	1,11±0,13	1,03±0,12	0,676	0,452
18:2n-6	14,17±2,	15,01±2,	0,178	13,99±2,5	14,30±2,2	0,387	0,239
18:3n-6	1,41±0,2	1,39±0,2	0,231	1,49±0,31	1,45±0,29	0,167	0,123
18:3n-3	0,71±0,1	0,67±0,1	0,111	0,77±0,15	0,76±0,21	0,883	0,099
20:4n-6	20,91±2,	21,13±3,	0,785	19,99±2,6	20,32±2,7	0,654	0,333
20:5n-3	0,52±0,3	1,22±0,9	<0,0001	0,54±0,39	1,37±0,72	<0,0001	0,643
22:5n-3	1,03±0,1	0,97±0,1	0,236	1,15±0,12	1,13±0,15	0,841	0,115
22:6n-3	3,07±1,2	4,45±1,1	<0,0001	3,50±1,25	4,22±1,18	0,010	0,581
EPA+DHA	3,59±1,5	5,70±2,0	<0,0001	4,04±1,55	5,59±1,70	0,006	0,496
Total n-3	4,7±1,60	6,8±2,20	<0,0001	4,8±2,10	6,1±2,20	0,011	0,826
Total n-6	34,2±2,9	35,5±2,8	0,119	34,3±6,8	33,9±6,6	0,617	0,340

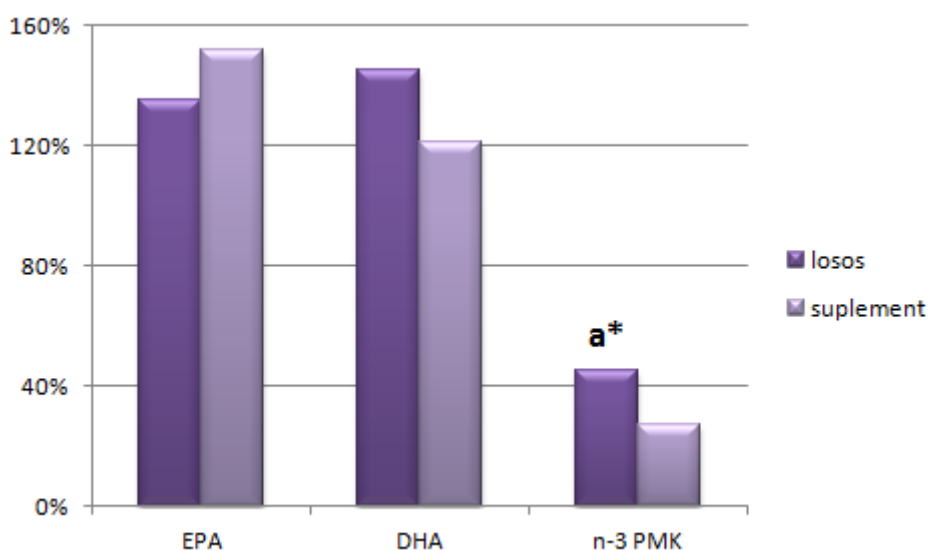
^a Značajnost razlika srednjih vrednosti pre i posle intervencije lososom

^b Značajnost razlika srednjih vrednosti pre i posle intervencije suplementom

^c Značajnost razlika srednjih vrednosti između grupa pre intervencije

Određivanje masnih kiselina u plazmi omogućilo je praćenje ukupnih promena koje su bile uslovljene različitim tretmanima. Na početku studije i posle 6 meseci pauze (*washout*) nije bilo statistički značajnih razlika u sastavu masnih kiselina u plazmi. Početne vrednosti za ukupne n-3 PMK, EPA i DHA su bile 4,7%, 0,52% i 3,07%, redom u grupi L, i 4,8%, 0,54% i 3,50% u grupi S.

Posle 8 nedelja intervencije zabeleženo je značajno povećanje ukupnih n-3 PMK, EPA i DHA u plazmi u obe grupe. Vrednost EPA se povećala za 135% u grupi L ($p < 0,0001$) i 152% u grupi S ($p < 0,0001$), dok se DHA povećala za 145% u grupi L ($p < 0,0001$) i 121% u grupi S ($p < 0,010$). Povećanje ukupnih n-3 PMK koje je dobijeno posle 8 nedelja intervencije lososom bilo je veće u poređenju sa suplementom (45% vs 27%) ($p < 0,05$) (slika 19), što je u skladu sa razlikama u količini ostvarenog unosa ovih masnih kiselina u dve interventne grupe.



Slika 19. Promena u sastavu n-3 PMK posle intervencije lososom i suplementom u plazmi

a - statistički značajno različit od suplementa; * $p < 0,05$

Komplijansa tokom intervencije je praćena promenom sastava masnih kiselina u lipidima plazme, jer masne kiseline u plazmi reflektuju tokom nekoliko sati ili dana unos dijetarnih n-3 masnih kiselina (157). Masne kiseline u plazmi su se značajno povećale tokom intervencije i lososom i suplementom. Porast EPA i DHA u plazmi je bio doznno zavisano u oba slučaja i naši rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim studijama. Cao i saradnici (159) koji su suplementirali ispitanike sa znatno većim količinama EPA (1296

mg) i DHA (864 mg), tokom 8 nedelja dobili su povećanje za 245% EPA i 73% DHA u plazmi. U studiji Harrisa (160) u kojoj su količine EPA i DHA iz ribe i suplementa podešene da budu iste, ispitanici su uzimali 485 mg EPA+DHA tokom 16 nedelja i ova intervencija je dala povećanje nivoa EPA+DHA u plazmi za 60-80%. U pomenutoj studiji masne kiseline u kapsulama su bile u formi etil-estara, dok su u našoj studiji masne kiseline bile u formi TG u oba dijetarna izvora, što može biti uzrok značajno većem povećanju nivoa ovih masnih kiselina u našem ispitivanju, pošto oblik triglicerida daje bolju iskoristljivost masnih kiselina u odnosu na etil-estre (98, 99).

4.2.3.2 Eritrociti i trombociti

Određivanje sadržaja masnih kiselina u ukupnim lipidima eritrocita može da služi kao pouzdan parametar statusa EMK u ćelijama. Najveći deo lipida eritrocita čine fosfolipidi, a pošto se n-3 masne kiseline lako inkorporiraju u fosfolipide ćelija krvi, eritrociti se često koriste za procenu efekata suplementacije ribljim uljem na status EMK. Cilj ove studije je bio da se proceni da li aktuelne dijetarne preporuke za unos ribe ili suplemenata sa ribljim uljem efikasno poboljšavaju ugradnju n-3 PMK u odabrane ćelijske strukture i da li njihovom primenom mogu da se postignu ciljne vrednosti za omega-3 indeks (>8%) kod zdrave populacije sa uobičajeno niskim unosom ribe. U tabelama 23 i 24 prikazane su srednje vrednosti sadržaja masnih kiselina u eritrocitima i trombocitima pre i posle 8 nedelja intervencije lososom i suplementom.

Tabela 23. Sastav masnih kiselina lipida eritrocita pre i posle intervencije lososom i suplementom (% u u odnosu na ukupne masne kiseline)

MK	Grupa L			Grupa S			P ^c
	Pre	Posle	P ^a	Pre	Posle	P ^b	
16:0	18,99±1,98	19,66±0,9	0,083	19,56±1,2	19,68±0,99	0,688	0,172
17:0	1,58±0,34	1,60±0,32	0,810	1,63±0,44	1,59±0,36	0,689	0,637
18:0	15,06±1,20	15,41±0,8	0,180	15,58±1,1	15,74±1,08	0,561	0,082
18:1n-9	10,39±1,27	10,80±0,9	0,125	10,49±0,9	10,58±1,39	0,734	0,718
18:1n-7	0,94±0,37	0,88±0,23	0,413	0,77±0,23	0,84±0,16	0,826	0,123
18:2n-6	10,75±1,48	11,21±1,6	0,230	10,77±1,5	10,96±1,43	0,522	0,369
18:3n-6	0,41±0,29	0,36±0,19	0,474	0,42±0,26	0,31±0,19	0,052	0,826
18:3n-3	0,26±0,11	0,28±0,14	0,511	0,22±0,14	0,29±0,19	0,123	0,231
20:4n-6	16,19±1,57	16,67±1,6	0,232	17,02±1,9	16,35±1,95	0,168	0,060
20:5n-3	0,54±0,41	0,76±0,40	0,023	0,46±0,27	0,85±0,41	<0,001	0,386
22:5n-3	1,71±0,39	1,89±0,35	0,055	1,83±0,45	1,99±0,38	0,111	0,270
22:6n-3	4,93±1,17	6,10±1,34	0,001	4,84±1,34	5,67±1,40	0,016	0,771
EPA+DHA	5,46±1,31	6,86±1,62	0,001	5,30±1,53	6,52±1,65	0,003	0,638
Total n-3	7,43±1,56	9,02±1,87	0,001	7,34±1,88	8,80±1,98	0,003	0,839
Total n-6	27,35±2,03	28,24±2,1	0,080	28,40±2,4	27,85±2,62	0,383	0,059

^a Značajnost razlika srednjih vrednosti pre i posle intervencije lososom

^b Značajnost razlika srednjih vrednosti pre i posle intervencije suplementom

^c Značajnost razlika srednjih vrednosti između grupa pre intervencije

Tabela 24. Sastav masnih kiselina lipida trombocita pre i posle intervencije lososom i suplementom (% u u odnosu na ukupne masne kiseline)

MK	Grupa L		P ^a	Grupa S		P ^b	P ^c
	Pre	Posle		Pre	Posle		
16:0	19,45±1,57	19,23±1,80	0,602	19,39±1,75	18,99±1,19	0,280	0,667
17:0	2,06±0,49	2,09±0,51	0,781	1,88±0,58	1,95±0,53	0,539	0,166
18:0	14,93±1,93	14,77±1,95	0,723	14,52±1,55	15,12±1,79	0,135	0,356
18:1n-9	11,67±1,33	11,20±1,43	0,190	11,67±1,26	11,06±1,55	0,080	0,936
18:1n-7	0,97±0,32	0,94±0,28	0,659	0,89±0,26	0,84±0,21	0,326	0,282
18:2n-6	12,46±3,31	11,18±2,48	0,077	12,50±3,37	11,49±2,55	0,111	0,957
18:3n-6	1,18±0,38	1,05±0,52	0,258	1,15±0,46	1,24±0,37	0,364	0,871
18:3n-3	0,44±0,33	0,52±0,27	0,264	0,45±0,37	0,55±0,32	0,245	0,905
20:4n-6	20,74±2,43	21,55±3,41	0,264	20,73±3,16	20,92±2,72	0,793	0,984
20:5n-3	0,56±0,42	0,81±0,48	0,028	0,57±0,33	0,87±0,38	0,002	0,830
22:5n-3	0,98±0,25	1,10±0,30	0,052	0,98±0,33	1,08±0,25	0,190	0,961
22:6n-3	2,19±0,92	2,99±1,19	0,006	2,14±0,81	2,71±1,07	0,018	0,840
EPA+DHA	2,74±1,16	3,80±1,46	0,001	2,72±0,89	3,58±1,16	0,003	0,928
Total n-3	4,17±1,34	5,44±1,58	0,001	4,15±1,14	5,20±1,47	0,002	0,958
Total n-6	35±3,26	33,79±3,07	0,119	34,47±3,72	33,16±3,04	0,122	0,537

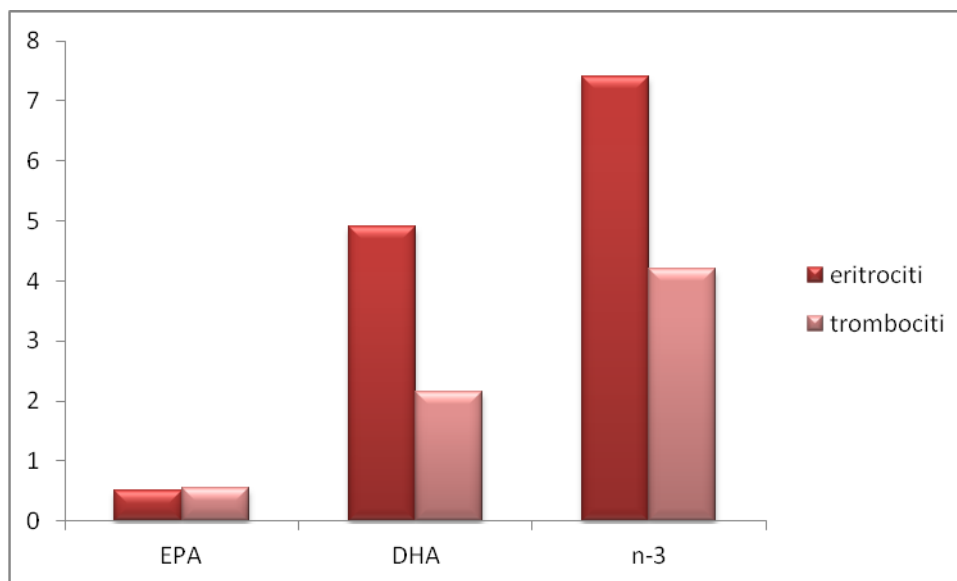
^a Značajnost razlika srednjih vrednosti pre i posle intervencije lososom

^b Značajnost razlika srednjih vrednosti pre i posle intervencije suplementom

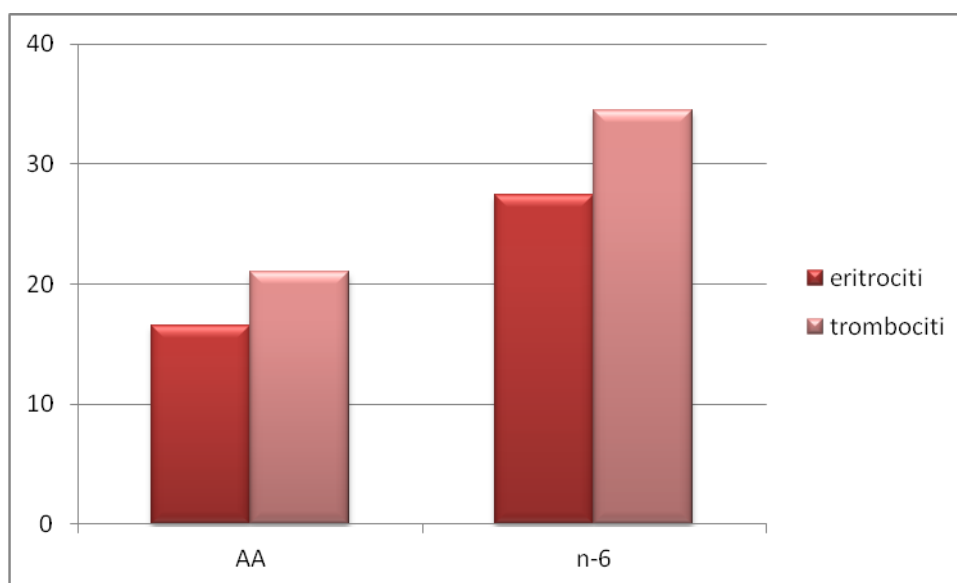
^c Značajnost razlika srednjih vrednosti između grupa pre intervencije

Na početku studije i posle *washout* perioda nije bilo statistički značajnih razlika u sastavu masnih kiselina u eritrocitima i trombocitima. Srednje početne koncentracije DHA i ukupnih n-3 masnih kiselina u eritrocitima su bile veće u odnosu na trombocite, dok su vrednosti za EPA bile slične u obe ćelijske frakcije (slika 20).

AA kao i ukupne n-6 masne kiseline bile su zastupljenije u trombocitima u poređenju sa eritrocitima (slika 21).



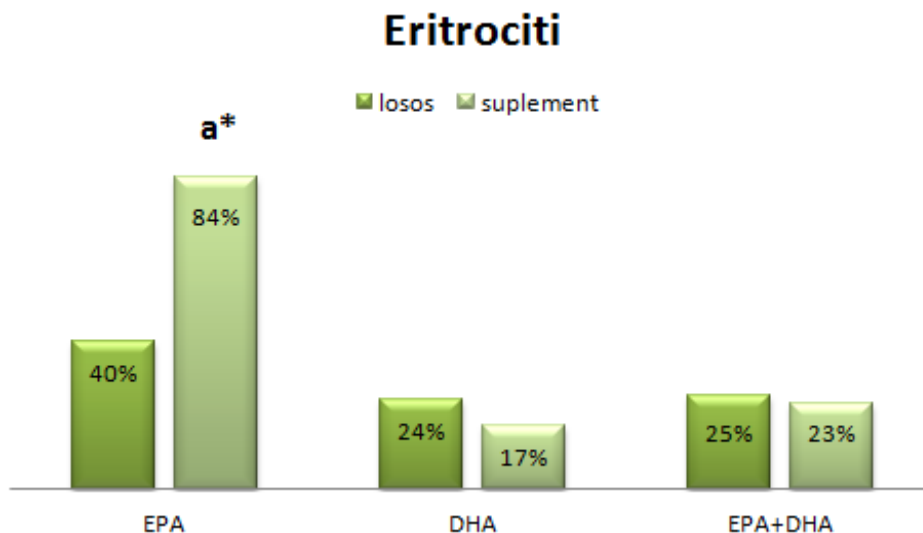
Slika 20. Odnos EPA, DHA i ukupnih n-3 masnih kiselina u eritrocitima i trombocitima (%)



Slika 21. Odnos AA i ukupnih n-6 masnih kiselina u eritrocitima i trombocitima (%)

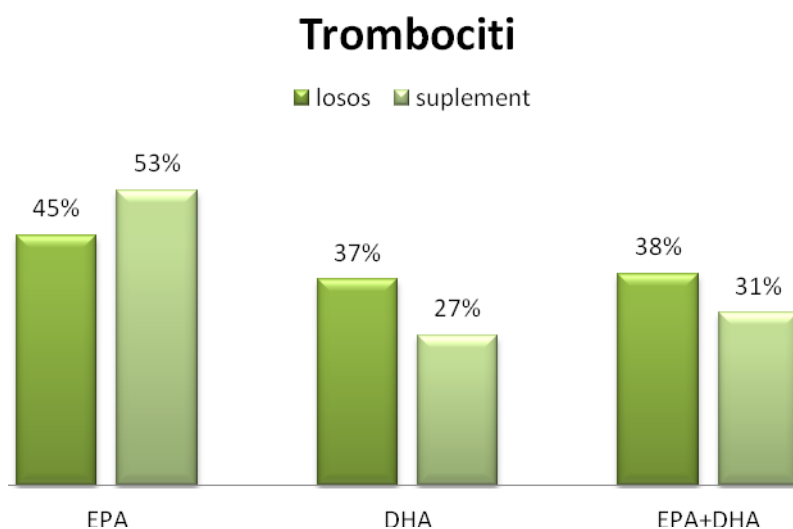
Posle obe intervencije, zabeleženo je statistički značajno povećanje EPA i DHA i u eritrocitima i trombocitima. Srednja koncentracija EPA u eritrocitima se povećala za 84% posle intervencije suplementom i za 40% posle intervencije lososom. Koncentracija DHA posle intervencije suplementom se povećala za 17% što je bio niži odgovor u odnosu na povećanje DHA posle intervencije lososom (oko 24%). Sadržaj EPA+DHA se povećao za 25% u grupi L i 23% u grupi S (slika 22). Nivo povećanja pojedinačnih dugolančanih n-3

masnih kiselina u eritrocitima odgovarao je razlikama u njihovim količinama ostvarenim u dve intervencije, mada je taj uticaj samo kod EPA dostigao statističku značajnost, dok na povećanje ukupnog sadržaja n-3 masnih kiselina u eritrocitima dijetarni izvor nije imao statističkog značaja.



Slika 22. Promena u sadržaju EPA i DHA izražena u % posle intervencije
a - statistički značajno različit od lososa; * $p < 0,05$

U trombocitima se sadržaj EPA povećao za 53% u grupi S i za 45% u grupi L, dok se ugradnja DHA povećala za 37% u grupi L i za 27% u grupi S. Količina EPA+DHA u trombocitima se povećala za 38% u grupi L i za 31% u grupi S (slika 23).



Slika 23. Promena u sadržaju EPA i DHA izražena u % posle intervencije

Obe intervencije nisu uticale na promenu AA i DPA – dve važne dugolančane masne kiseline n-6 serije u obe ćelijske frakcije.

Bez obzira na činjenicu da je sadržaj ukupnih n-3 PMK, pojedinačnih n-3 masnih kiselina i njihov međusobni odnos bio različit u lososu i suplementu, ukupna ugradnja ovih masnih kiselina u eritrocite i trombocite bila je slična za obe grupe ($p > 0,05$). EPA u eritrocitima je bila jedina masna kiselina kod koje je uočen statistički značajni uticaj vrste intervencije, odnosno unete količine dijetarne EPA, na njen status ($p = 0,049$) (Tabela 25).

Tabela 25. Procena razlike u tretmanima pre i posle intervencije lososom i suplementom

Razlike u intervencijama			
	Procena ^a	95% CIs	P ^b
<i>Eritrociti</i>			
EPA	-0,164	(-0,328; -0,001)	0,049
DHA	0,158	(-0,378; 0,694)	0,559
EPA+DHA	0,007	(-0,554; 0,567)	0,952
∑ n-3	0,042	(-0,537; 0,620)	0,886
<i>Trombociti</i>			
EPA	-0,038	(-0,128; 0,052)	0,403
DHA	0,136	(-0,258; 0,531)	0,472
EPA+DHA	0,098	(-0,326; 0,523)	0,645
∑ n-3	0,116	(-0,340; 0,572)	0,613

^a Procena = (Losos N 8 - Losos N 0) – (Suplement N 8 - Suplement N 0)

^b Vrednosti za poređenje promena posle tretmana lososom i suplementom

Negativna vrednost ukazuje da je suplementacija pokazala veću promenu u ishodu, dok pozitivna vrednost ukazuje da je losos pokazao veću promenu u ishodu

Rezultati su pokazali da praćenje uobičajenih dijetarnih preporuka za unos ribe i dugolančanih n-3 masnih kiselina namenjenih opštoj populaciji značajno poboljšava status EPA, DHA, EPA+DHA, i ukupnih n-3 masnih kiselina u eritrocitima i u trombocitima. I pored toga što razlike u ostvarenim ishodima uglavnom nisu bile statistički značajne, može se zaključiti da je trend povećanja ovih masnih kiselina bio dozno-zavisano i da je oslikavao potencijal korišćenog dijetarnog izvora. Jedino se sadržaj EPA u eritrocitima povećao značajno više posle suplementacije, dok je nakon intrevencije lososom povećanje bilo

skoro dva puta manje. Dnevni unos EPA lososom bio je niži nego suplementom iako je unos ukupnih n-3 masnih kiselina lososom bio znatno veći nego suplementom. To može biti objašnjenje za ukupno veći porast koncentracije EPA u grupi S. Nasuprot tendenciji EPA u eritrocitima, porast DHA je bio veći u grupi L u poređenju sa grupom S (23% u odnosu na 17%), što je i očekivano zbog većeg sadržaja DHA u lososu. Razlika u sadržaju DHA između grupa nakon intervencija nije bila statistički značajna.

Ugradnja EPA u eritrocite ima tendenciju da bude brža nego što je slučaj sa DHA (160) što može biti dodatno objašnjenje za veću inkorporaciju EPA ostvarenu u našoj studiji. Cao i saradnici (158) koji su ispitanike suplementirali većim dozama EPA (1296 mg) i DHA (864 mg) posle 8 nedelja su zabeležili povećanje od 300% za EPA i samo 42% za DHA. Ugradnja DHA u ćelijske membrane zavisi i od početne koncentracije (158), tako da bi visoka varijabilnost koja je uočena među ispitanicima mogla uticati na manje izražen dozno-zavisni odgovor.

Postoje brojne studije koje su pratile efekat n-3 PMK na inkorporaciju u eritrocitima, ali je veoma mali broj studija bio posvećen analizi trombocita. n-3 PMK nakon inkorporacije u trombocitima konkurišu sa arahidonskom kiselinom za ciklooksigenaznu aktivnost smanjujući produkciju eikozanoida koji nastaju iz arahidonske kiseline (161, 162). Ovi efekti su najčešće posredovani sa EPA (163). Pošto povećana ugradnja n-3 PMK u trombocite smanjuje njihovu reaktivnost i agregaciju (164, 165), od značaja je pratiti uticaj ribe ili suplementa na modifikaciju profila masnih kiselina kada se daju u preporučenim količinama.

Cocchi i saradnici (166) su analizirali profil masnih kiselina u trombocitima kod 350 ispitanika. Od svih masnih kiselina, tri su imale konstantan sadržaj-palmitinska, linolna i arahidonska (53,3%), što je u saglasnosti sa našim rezultatima (oko 53% na početku studije u celoj grupi). Nakon intervencije ugradnja n-3 PMK u trombocite nije promenila udeo tri glavne masne kiseline u ukupnom sastavu, dok su se ukupne n-3 PMK značajno povećale. Ugradnja EPA i DHA je bila statistički značajna u obe grupe. Značajna dozno-zavisna ugradnja EPA koja je nađena u eritrocitima, nije nađena kod trombocita. Iako se sadržaj EPA više povećao u grupi S (52% vs 44%), dobijene razlike među intervencijama nisu bile statistički značajne. Veći stepen ugradnje DHA je nađen u grupi L u poređenju sa grupom S (36% vs 26%). Iako je ovo povećanje posledica većeg sadržaja DHA u lososu, dobijena razlika nije bila statistički značajna.

U trombocitima je EPA takođe imala tendenciju brže ugradnje u poređenju sa DHA, ali je DHA pokazala veći stepen ugradnje u trombocitima nego u eritrocitima za obe

intervencije. Kada je Larson sa saradnicima (165) sproveo intervenciju sa 1,86 g EPA+1,5 g DHA/dan, sadržaj EPA i DHA u trombocitima se povećao osam i dva puta, redom, ali su ove visoke količine dovele i do redukcije sadržaja arahidonske kiseline. U našoj studiji, nijedna intervencija nije dovela do redukcije arahidonske kiseline u eritrocitima i trombocitima. Može se zaključiti da preporučene doze n-3 PMK, kako iz ribe tako i iz suplementa, jesu efikasne u modulaciji profila masnih kiselina u trombocitima, ali na manje drastičan način.

Sadržaj EPA+DHA u trombocitima se povećao za 38% u grupi L i za 31% u grupi S. Razlika u efektima na status ukupnih n-3 PMK postignutih korišćenjem dva različita izvora nije bila statistički značajna nakon primene doza koje odgovaraju dijetarnim preporukama. Ukršteni dizajn predstavlja jednu od prednosti ove studije jer doprinosi povećanju statističke moći u tumačenju rezultata svakog pacijenta. Dug period između dve intervencije (period pre ukrštanja) sveo je na minimum *carry over* efekat prve intervencije. Takođe postoji i nekoliko ograničenja sprovedene studije. Veličina uzorka je bila relativno mala i period intervencije je trajao 8 nedelja, što se može smatrati kratkim vremenskim intervalom za postizanje razlika u efektima dva različita izvora n-3 PMK i za postizanje ciljnih vrednosti za EPA+DHA.

4.2.3.2.1 Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na omega-3 indeks

Na osnovu vrednosti omega-3 indeksa, koji predstavlja procentualni zbir EPA i DHA u ćelijskim membranama eritrocita, naši ispitanici su svrstani u grupu sa umerenim rizikom prema Harrisovoj klasifikaciji (88). Srednja vrednost omega-3 indeksa na početku studije bila je 5,4%, a umereni kardiovaskularni rizik podrazumeva vrednosti od 4-8%. Srednja vrednost za omega-3 indeks se povećala posle 8 nedelja za 25% u grupi L ($p=0,001$) i za 23% u grupi S ($p=0,003$). Iako se u našoj studiji sadržaj EPA+DHA razlikovao u lososu i suplementu (odnos 3/2), dobijeni efekti za omega-3 indeks nisu bili značajni između tretmana ($p=0,952$). Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjem Paula i saradnika (167) koji nisu zabeležili relevantne razlike između ugradnje n-3 PMK u eritrocite nakon konzumiranja mnogo većih količina n-3 PMK iz uljane ribe (3003 mg/dan) i iz suplementa (1418 mg/dan) tokom 8 nedelja.

Na kraju studije omega-3 indeks je dostigao vrednost od oko 6,7% i bez obzira što je povećanje bilo značajno, obe intervencije nisu postigle ciljne vrednosti od 8%. Ako su ove vrednosti povezane sa najvećim kardioprotektivnim delovanjem (168), može se zaključiti da zdrava populacija srednjih godina sa niskim unosom ribe, nakon primene preporučenih

doza n-3 PMK iz ribe ili suplementa postiže umereni efekat ukoliko se posmatra kratak period od 8 nedelja primene dijetarnog režima.

4.2.4 Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na profil lipida seruma

U tabeli 26 prikazane su promene lipidnog profila seruma posle 8 nedelja intervencije lososom i suplementom.

Tabela 26. Lipidi seruma pre i posle intervencije lososom i suplementom

	Grupa L			Grupa S			
	Pre	Posle	P ^a	Pre	Posle	P ^b	P ^c
Ukupni holesterol	6,57±1,01	6,38±0,91	0,345	6,40±0,84	6,69±1,08	0,151	0,361
LDL (mmol/L)	4,29±0,88	4,24±0,85	0,754	4,23±0,80	4,46±0,86	0,234	0,870
HDL (mmol/L)	1,43±0,42	1,37±0,35	0,778	1,37±0,30	1,38±0,36	0,805	0,906
TG (mmol/L)	2,01±1,17	1,70±0,83	0,380	1,76±0,86	1,77±0,70	0,784	0,528
AIP	1,62±1,20	1,43±0,97	0,686	1,43±0,94	1,33±0,71	0,849	0,483

Posle 8 nedelja dijetarne intervencije lososom i suplementom, nije bilo statistički značajne promene u lipidnim parametrima u serumu. TG su bili jedina lipidna komponenta koja se značajnije smanjila i to samo posle intrevencije lososom, mada i ta promena nije dostigla statističku značajnost. Iako je zabeleženo smanjenje TG za 15% u grupi L rezultiralo smanjenjem AIP za 11,7%, ove promene nisu dostigle statističku značajnost.

Dislipidemija je poznat faktor rizika za razvoj ateroskleroze i usko je povezana sa povećanjem endotelijalne disfunkcije. Pokazano je u ranijim istraživanjima da n-3 PMK mogu povećati ukupan holesterol za 5% do 10% i smanjiti TG za 20% do 50% (169, 170). Generalno, n-3 PMK se koriste pre svega zbog njihove sposobnosti da smanjuju koncentraciju TG (171).

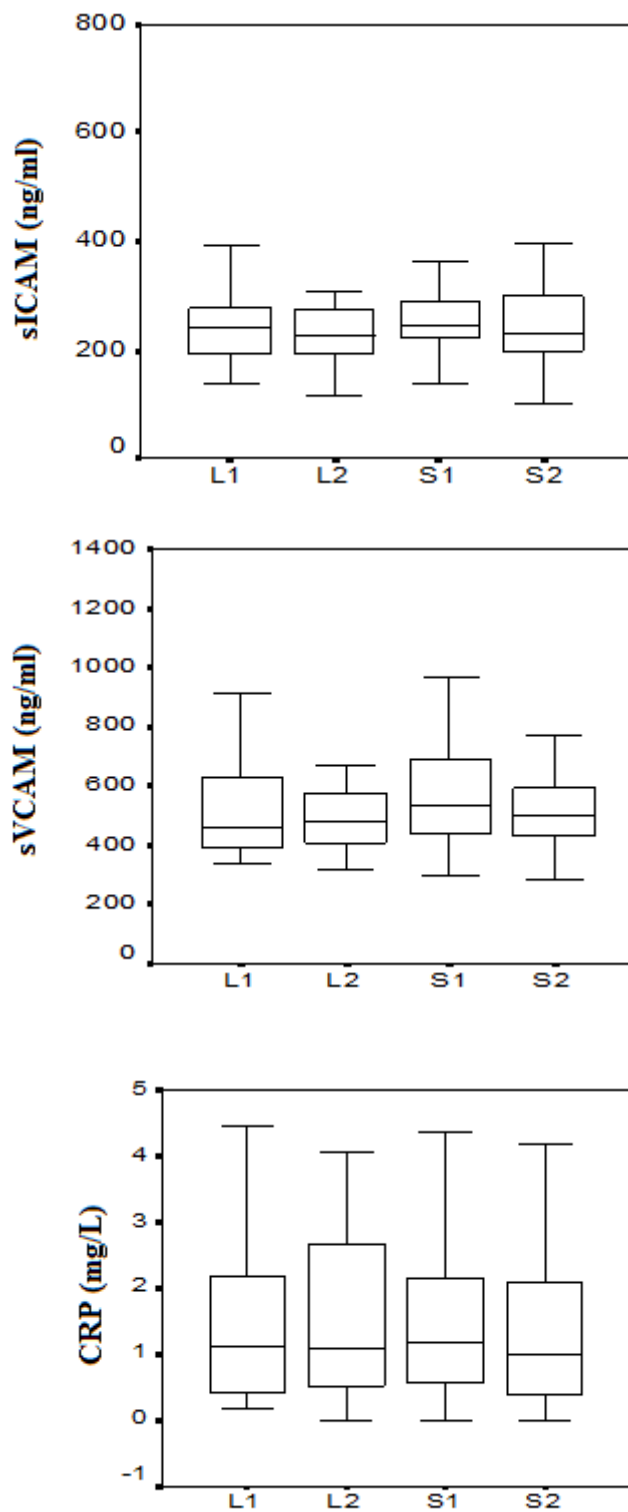
Ispitanici u našoj studiji su imali umereno povećane vrednosti ukupnog holesterola, LDL-h i TG na početku studije i preporučene doze za ribu i suplemente nisu dale statistički značajne promene lipidnih parametara, iako je pozitivan trend u redukciji TG potvrđen u grupi L. Ovi rezultati su u saglasnosti sa drugim autorima, koji nisu zabeležili relevantne promene u nivou ukupnog holesterola i TG kod zdravih ispitanika posle 6 nedelja intervencije sa 927 mg EPA+DHA (172) i posle 8 nedelja intervencije sa 1200 mg EPA+DHA (173). Razlike u sniženju TG koje su zabeležene u grupi L i grupi S mogu biti objašnjene većom početnom koncentracijom TG u grupi L u odnosu na grupu S (2,01

mmol/L vs 1,76 mmol/L) i većim dnevnim unosom ukupnih n-3 PMK lososom u poređenju sa suplementom (1206 mg/dan vs 704 mg/dan). Izgleda da se efekti na TG mogu očekivati pri njihovim većim početnim koncentracijama, ali i pri unosu većih doza n-3 PMK (32). EFSA je autorizovala zdravstvenu izjavu koja se odnosi na redukciju TG pri unosu 2 g EPA i DHA, što je količina koja se ne može postići unosom koji odgovara dijetarnim preporukama za ove masne kiseline. Iako smanjenje TG za 15% posle intervencije lososom nije dostiglo statističku značajnost, 15% smanjenja može imati klinički značaj, što potvrđuje racionalnost korišćenja ribe i ribljeg ulja u regulisanju ovog faktora rizika u opštoj populaciji.

4.2.5 Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na biomarkere inflamacije

Imajući u vidu činjenicu da je endotelijalna disfunkcija najranija manifestacija ateroskleroze u koju su uključeni inflamacija i oksidativni stres u svim fazama koronarnog aterosklerotskog razvoja, markeri inflamacije kao što su sICAM-1, sVCAM-1 i CRP su od posebnog značaja (174). Postoje malobrojni podaci da ovi parametri mogu biti regulisani masnim kiselinama. Koncentracije inflamatornih markera u serumu sICAM-1, sVCAM-1 i CRP pre i posle intervencije su prikazane na slici 24.

Nije bilo statistički značajnih razlika nakon obe intervencije, ali neki trendovi su se ipak pokazali. Koncentracija sICAM-1 se umereno smanjila posle obe intervencije, dok su koncentracije sVCAM-1 i CRP bile neznatno veće posle intervencije lososom i niže posle intervencije suplementom u poređenju sa početnim vrednostima. Nedostatak direktne povezanosti između unosa n-3 PMK iz različitih izvora i sICAM-1 je u saglasnosti sa retkim prethodnim studijama, koje su pokazale neznačajne promene nakon primene mnogo većih doza EPA+DHA (175-177). Paulo i saradnici (167) su takođe pokazali da se koncentracija sICAM-1 nije promenila, ali da se koncentracija sVCAM-1 značajno povećala posle 8 nedelja intervencije lososom koji je obezbeđivao 3003 mg/dan n-3 PMK i suplementom koji je obezbeđivao 1418 mg n-3 PMK dnevno. Povećanje nivoa sVCAM-1 je potvrđeno u studiji u kojoj su zdrave žene uzimale 6,6 g/dan n-3 PMK, ali ne i u grupi koja je uzimala 2 g/dan tokom 12 nedelja (175). Naši rezultati podržavaju mogući dozno-zavisni efekat n-3 PMK na sVCAM-1 s obzirom da niske količine primenjene u našoj studiji nisu pokazale efekat na ovaj parametar.



Slika 24. Koncentracije sICAM-1, sVCAM-1 i CRP pre i posle 8 nedelja dijetarne intervencije lososom i suplementom (tačke: L1-losos pre, L2-losos posle, S1-suplement pre, S2-suplement posle). Vrednosti su prikazane kao medijane i interkvartilni opseg.

Obe intervencije u našoj studiji nisu pokazale značajan uticaj na nivo CRP u plazmi, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u studijama Vega-Lopez i saradnika (178) i Madsen i saradnika (179) koji nisu dobili promene u serum CRP nivou, mada su neke druge studije pokazale smanjenje koncentracije CRP u serumu sa niskim dozama n-3 PMK. Generalno je prihvaćeno da efekti n-3 PMK na CRP pokazuju veliku varijabilnost (180).

Adhezione molekule i CRP koji su praćeni u našoj studiji su samo deo inflamatornog odgovora. Često ispitivani inflamatorni markeri u mnogim studijama su i drugi adhezioni molekuli kao E-selektin ili P-selektin, zatim citokini IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α i hemokini (MCP-1, GM-CSF, IL-8). Pot i saradnici (181) nisu postigli promene u koncentracijama ovih parametara sa dozama od 700 mg EPA + 560 mg DHA posle 12 nedelja suplementacije. Kalley i saradnici (182) su pokazali smanjenje IL-6 i GM-CSF nakon 3 meseca suplementacije sa 3 g DHA-ulja. I u drugim studijama u kojima je obuhvaćeno ispitivanje više inflamatornih markera sa značajnim biološkim funkcijama niske doze EPA i DHA uglavnom nisu dale značajne promene u njihovim koncentracijama (183, 184).

4.2.6 Uticaj konzumiranja ribe i suplementa na biomarkere oksidativnog stresa

Disbalans između stvaranja reaktivnih kiseonikovih jedinjenja i antioksidativne zaštite vodi ka oksidativnom stresu i oksidaciji LDL-h (185). Povoljan efekat reaktivnih kiseoničnih vrsta javlja se samo u niskim fiziološkim koncentracijama, dok njihova hiperprodukcija može izazvati oštećenje ćelija. Povećan oksidativni stres je uključen u razvoj aterosklerotskog procesa i jedan je od faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti.

Poznato je da su dugolančane PMK sklone peroksidaciji usled produkcije slobodnih radikala uključujući reaktivna kiseonikova jedinjenja, pa dužina i broj dvostrukih veza imaju veliki uticaj na oksidativni kapacitet masnih kiselina (186, 187). S druge strane, studije su pokazale da PMK neutrališu oksidativni stres (188), tako da je uloga PMK u prooksidativnom/antioksidativnom balansu još uvek kontraverzna.

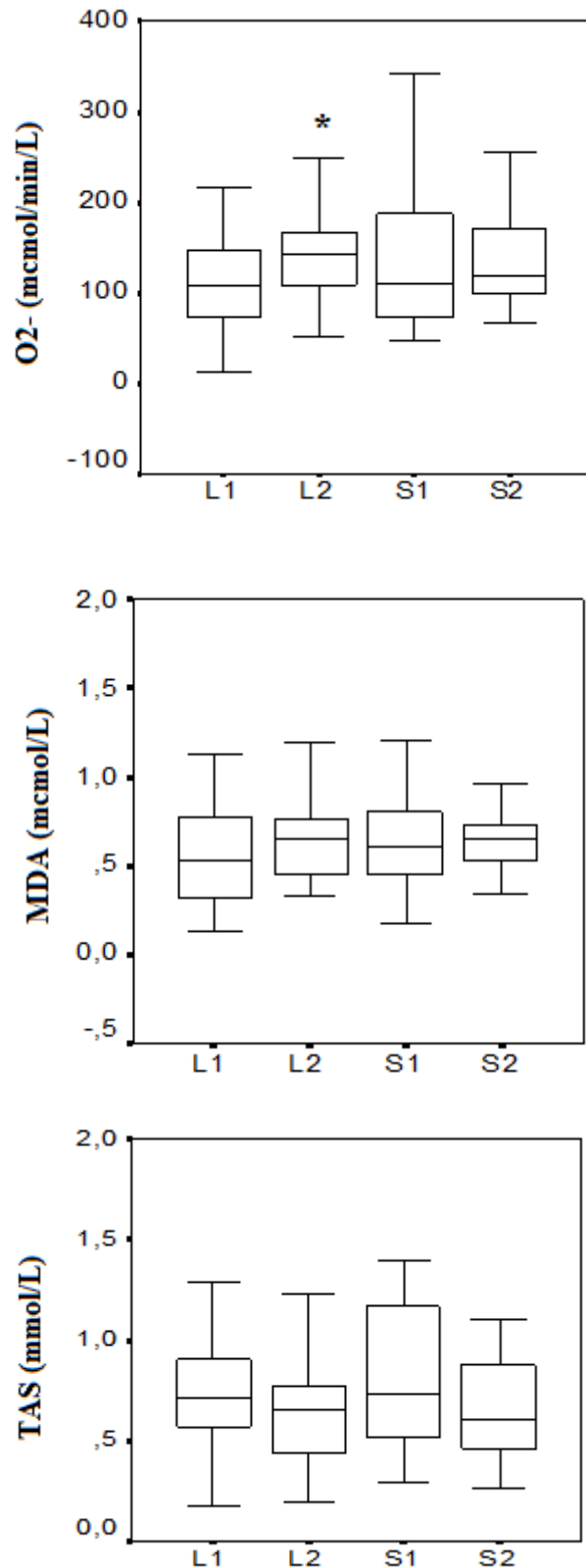
U našoj studiji za procenu oksidativno/prooksidativnog kapaciteta plazme izabrane su superoksidni anjon (O₂⁻), MDA i TAS. Soperoksidni anjon se smatra ključnim parametrom u oksidativnom stresu, dok je MDA krajnji produkt lipidne peroksidacije i koristi se kao najpouzdaniji i široko korišćen indeks oksidativnog stresa. TAS se uspešno koristi kao pokazatelj sposobnosti organizma da neutrališe oksidativni stres, s obzirom da TAS reprezentuje različite komponente plazme sa redukcionim kapacitetom. Dinamika ukupnih

promena analiziranih parametara oksidativnog stresa (O_2^- , MDA, TAS) tokom intervencije prikazana je na slici 25.

Koncentracija O_2^- se povećala za 29% u grupi L što je bilo statistički značajno ($p=0,025$) i 9,5% ($p=0,218$) u grupi S nakon intervencije. Iako je zabeleženo i povećanje nivoa MDA posle intervencija lososom i suplementom to povećanje nije bilo statistički značajno ($p=0,188$ i $p=0,869$, redom). Neenzimska antioksidativna zaštita, TAS koncentracija, se umereno smanjila posle obe intervencije, što takođe nije dostiglo statističku značajnost ($p=0,307$ u grupi L i $p=0,246$ u grupi S).

Rezultati su pokazali da su obe intervencije u našoj studiji dovele do blagog i neznačajnog povećanja koncentracije parametara oksidativnog stresa (O_2^- i MDA) i redukovale TAS u odnosu na početne vrednosti. Intervencija lososom je jedina pokazala značajan prooksidativni efekat kroz povećanje O_2^- tokom trajanja studije. Zabeleženi disbalans slobodnih radikala je verovatno neutralisan drugim protektivnim faktorima, tako da nije zabeleženo značajno povećanje koncentracije MDA.

Intervencija lososom je pokazala veći prooksidativni efekat tokom trajanja studije, što se može objasniti većim sadržajem n-3 PMK u lososu (189, 190). Ovaj efekat se smatra da je u fiziološkim granicama kada se uzmu u obzir rezultati iz literature dobijeni u našoj populaciji kod zdravih ispitanika srednjih godina (191) i verovatno je deo zaštitnog mehanizma koji omogućava antioksidativnu ekspresiju gena kao reakciju odbrambenog sistema da smanji lipidnu peroksidaciju (192). U našoj studiji TAS se umereno smanjio posle obe intervencije, ali to nije bilo statistički značajno. Povećan utrošak faktora antioksidativne zaštite se može očekivati kod povećanog nivoa ugradnje n-3 PMK u biološke membrane tokom intervencije, i to bi moglo da bude objašnjenje za ovo smanjenje u merljivoj antioksidativnoj odbrani (47).



Slika 25. Koncentracije O₂⁻, MDA i TAS pre i posle 8 nedelja dijetarne intervencije lososom i suplementom (tačke: L1-losos pre, L2-losos posle, S1-suplement pre, S2-suplement posle). Vrednosti su prikazane kao medijane i interkvartilni opseg. Statistička značajnost, p<0,05 (*).

4.3 Korelacije

Koeficijent korelacije između plazma n-3 PMK i serum lipida, markera inflamacije i parametara oksidativnog stresa prikazan je u Tabeli 27.

Uprkos nerelevantnim promenama u markerima inflamacije posle intervencije lososom i suplementom, ustanovljena je značajna negativna korelacija između plazma n-3 PMK i sICAM-1 i CRP tokom perioda intervencije. Ovaj rezultat sugerise da unos n-3 PMK u preporučenim dozama može biti koristan zbog uticaja na ekspresiju sICAM-1/CRP i da doprinosi održanju nivoa inflamacije u vaskularnom endotelijumu u fiziološkim granicama.

Relevantna pozitivna korelacija je nađena između plazma n-3 PMK i O_2^- što ukazuje da unos dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina u količinama koje slede dijetarne preporuke utiče na povećanje biološke oksidacije, ali da su te promene u okvirima fiziološkog odgovora.

Tabela 27. Korelacije između plazma n-3 PMK (n=140) i markera inflamacije i parametara oksidativnog stresa pre i posle 8 nedelja svake intervencije lososom i suplementom tokom trajanja studije

	UH	HDL	LDL	TG	sVCAM-1	sICAM-1	CRP	O_2^-	MDA	TAS
EPA	-0,119	0,057	-0,152	-0,145	0,063	-0,048	-0,143*	0,009	-0,066	0,177
DHA	-0,109	0,065	-0,098	-0,118	-0,050	-0,077	-0,225*	0,139	-0,015	0,027
EPA+DHA	-0,123	0,078	-0,118	-0,141	-0,024	-0,146	-0,231*	0,105	-0,025	0,095
Σ n-3 MK	-0,121	0,053	-0,128	-0,104	-0,066	-0,186*	-0,227*	0,176*	-0,037	0,127

*Statistička značajnost $p < 0,05$.

5 ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitivan je uticaj n-3 DLPMK iz dva različita dijetarna izvora primenjenih u količinama koje prate važeće dijetarne preporuke na faktore kardiovaskularnog rizika kod zdrave populacije srednjih godina. Iz dobijenih rezultata zaključili smo sledeće:

a) Procena kvaliteta komercijalno dostupne rečne, morske ribe i dijetetskih suplemenata sa uljem riba kao dijetarnih izvora dugolančanih n-3 masnih kiselina:

- ✚ Sadržaj n-3 masnih kiselina se mora posmatrati u odnosu na sadržaj lipida ribe, jer je ovaj parametar u boljoj korelaciji sa sadržajem n-3 MK u odnosu na procentualni udeo n-3 MK u ukupnim masnim kiselinama i u odnosu na poreklo ribe (rečne, morske, gajene);
- ✚ Sve vrste rečne ribe imale su relativno nizak sadržaj lipida (do 3,5%) - dobijene vrednosti su bile značajno niže u odnosu na određene vrste morske ribe, mada se generalno pravilo da morske ribe imaju više lipida ne može postaviti zbog primera oslića i tune koje su imale manje lipida od većine ispitanih rečnih riba;
- ✚ Najveći prosečan sadržaj ukupnih lipida među morskim ribama nađen je u skuši, sardini i lososu a najmanji u tuni i osliću. U svim ispitivanim uzorcima rečne i morske ribe, osim u skuši, uočen je veći sadržaj nezasićenih nego zasićenih masnih kiselina.
- ✚ Sadržaj n-3 PMK u 100 g jestivog dela ribe bio je najveći u uzorcima skuše, sardine i lososa (> 3 g), a najmanji u uzorcima rečne ribe, oslića i tune;
- ✚ U svim uzorcima ribe DHA je bila prisutna u većoj količini u odnosu na EPA. Raspon odnosa DHA/EPA se kretao od oko 1 za uzorke sardine i deverike do 10 za uzorke tune, što ukazuje da količina DHA u prirodnim uzorcima višestruko nadmašuje količinu EPA;
- ✚ Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je meso rečnih riba slabiji dijetarni izvor n-3 DLPMK u odnosu na morske ribe, ali da je kvalitativni sastav ukupnih lipida kao i polinezasićenih masnih kiselina uporediv sa kvalitativnim sastavom lipida i masnih kiselina kod najkvalitetnijih morskih riba;
- ✚ Anketom koja je sprovedena u apotekama ustanovljeno je da su tokom 2012. godine 42 dijetetska suplementa sa uljem riba kao izvorom n-3 DLPMK bila prisutna na tržištu Srbije. Od ukupnog broja preparata 31% poticao je od proizvođača iz Srbije, a 69% preparata je bilo uvezeno. Od ukupnog broja preparata 62% su bili monokomponentni, a 38% polikomponentni preparati;

- ✚ Uobičajen odnos EPA/DHA u većini preparata je bio 3:2, a za samo 12% preparata je na deklaraciji bio naznačen hemijski oblik, od čega su u 7% preparata korišćeni etil-estri i u 5% trigliceridi;
 - ✚ Količina ribljeg ulja u jednom doziranom obliku veoma je varirala, od 0,1-1 g, kao što su varirali i preporučeni načini uzimanja. Količina koncentrovanog prečišćenog ribljeg ulja koja se preporučuje kao dnevni unos se kretala u širokom rasponu od 400 mg do 2000 mg, obično podeljena u 1 do 3 doze dnevno. U samo tri preparata najznačajniji aktivni princip bila je DHA, u jednom ALA i u 11 preparata je osnovni aktivni princip bila EPA;
 - ✚ Sadržaj i odnos EPA i DHA u većini analiziranih proizvoda se razlikovao u odnosu na količinu i odnos u prirodnim izvorima, osim u proizvodima koji su namenjeni specifično zaštititi zdravlja oka, mozga, i kao dopuna ishrani trudnica i dojilja;
- b) Ispitivanja efekata dijetarne intervencije dva odabrana izvora n-3 masnih kiselina (losos i suplement) na faktore kardiovaskularnog rizika kod zdrave populacije srednjih godina:
- ✚ Posle 8 nedelja intervencije u kojoj su primenjena dva seta dijetarnih preporuka za unos n-3 DLPMK zabeleženo je značajno povećanje ukupnih n-3 PMK, EPA i DHA u plazmi kod svih ispitanika ($p < 0,05$);
 - ✚ Povećanje ukupnih n-3 PMK koje je dobijeno posle 8 nedelja intervencije lososom bilo je veće u poređenju sa suplementom, i ova razlika je bila statističku značajna ($p < 0,05$);
 - ✚ Posle obe intervencije, zabeleženo je značajno povećanje nivoa EPA i DHA i u eritrocitima i trombocitima, pri čemu je porast nivoa EPA nakon korišćenja suplementa bio statistički veći u eritrocitima u poređenju sa lososom ($p = 0,049$). U trombocitima se sadržaj EPA povećao posle obe intervencije, s tim što je posle intervencije suplementom porast bio neznačajno veći;
 - ✚ Koncentracija DHA se u eritrocitima i u trombocitima povećala više nakon konzumiranja lososa, ali uočene razlike između primenjenih intervencija nisu imale statističku značajnost;
 - ✚ U eritrocitima i trombocitima je EPA imala tendenciju brže ugradnje u poređenju sa DHA, ali je DHA pokazala veći stepen ugradnje u trombocite nego u eritrocite tokom obe primenjene intervencije;

- ✚ Nakon obe intervencije ugradnja n-3 PMK u trombocite nije promenila udeo tri glavne masne kiseline u ukupnom sastavu (palmitinske, linolne i arahidonske), dok su ukupne n-3 PMK značajno povećale ($p < 0,05$);
- ✚ Nivo povećanja pojedinačnih dugolančanih n-3 masnih kiselina u eritrocitima i trombocitima odgovarao je razlikama u njihovom ostvarenom unosu u obe primenjene intervencije, dok na povećanje ukupnog sadržaja n-3 masnih kiselina dijetarni izvor nije imao statističkog značaja;
- ✚ Na osnovu vrednosti omega-3 indeksa, ispitanici su na početku istraživanja bili svrstani u grupu sa umerenim kardiovaskularnim rizikom;
- ✚ Posle obe intervencije vrednosti za omega-3 indeks su se povećale za oko 24 %, ali nisu postignute ciljne vrednosti koje prema literaturi imaju najveći kardioprotektivni efekat (8%);
- ✚ Posle 8 nedelja dijetarne intervencije lososom i suplementom, nije bilo statistički značajnih promena u svim ispitivanim lipidnim parametrima u serumu;
- ✚ Trigliceridi su bili jedina lipidna komponenta čije je smanjenje imalo kliničku značajnost (15%) i to samo posle intrevencije lososom, mada ta promena nije dostigla statističku značajnost ($p = 0,380$);
- ✚ Ispitivanje efekata nutritivno relevantnih količina n-3 DLPMK na odabrane faktore inflamacije je pokazalo da se nakon 8 nedelja oba dijetarna tretmana koncentracija sICAM-1 umereno smanjila ($p > 0,05$), dok su koncentracije sVCAM-1 i CRP bile neznatno veće posle intervencije lososom i niže posle intervencije suplementom u poređenju sa početnim vrednostima ($p > 0,05$);
- ✚ Rezultati su pokazali da su obe intervencije dovele do malog i neznačajnog povećanja koncentracije parametara oksidativnog stresa O_2^- i MDA, i neznačajno redukovale TAS u odnosu na početne vrednosti;
- ✚ Intervencija lososom je jedina pokazala značajan prooksidativni efekat kroz povećanje O_2^- tokom trajanja studije ($p = 0,025$);
- ✚ Ustanovljena je značajna negativna korelacija između nivoa n-3 PMK u plazmi i sICAM-1 i CRP tokom perioda intervencije. Relevantna pozitivna korelacija je nađena i između nivoa n-3 PMK u plazmi i O_2^- ;
- ✚ I pored toga što primenjene dijetarne intervencije nisu modifikovale parametare kardiovaskularnog rizika na nivou statističke značajnosti, uočeni trendovi ukazuju da dugotrajno konzumiranje n-3 PMK u okvirima dijetarnih preporuka može

koristiti u održanju kardiovaskularnog zdravlja i da izvor n-3 PMK nije od presudnog značaja za konačne efekte.

6 LITERATURA

1. Sikorski ZZ, Kolakowska A. (Eds.). Chemical, biological, and functional aspects of food lipids. CRC Press. 2011
2. Šobajić S, Masti u hrani i ishrani.
<http://supa.pharmacy.bg.ac.rs/courses/86/posts/9203>
3. Calder PC, Yaqoob P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors* 2009; 35(3): 266-272.
4. Serhan CN. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2005; 8(2): 115-121.
5. Plourde M, Cunnane SC. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 2007; 32(4): 619-634.
6. Arterburn LM, Hall, EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition* 2006; 83(6): 1467-76.
7. Neuringer M, Connor WE. Omega-3 fatty acids in the retina. In : Galli and Simopoulos. *Dietary n-3 and n-6 fatty acids: Biological effects and nutritional essentiality*. Plenum Publishing , New York 1989, pp 177-190.
8. Martinez M. Developmental profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain of normal infants and patients with peroxisomal diseases : Severe deficiency of docosahexaenoic acid in Zellwegers and Pseudo-Zellwegers syndromes. *World Rev Nutr Diet* 1991; 66: 87-102.
9. Yavin E, Glozman S, Green P. Docosahexaenic acid sources for the developing brain durin intrauterine life. *Nutr health* 2001; 15: 219-24.
10. Mozurkewich E, Berman DR., Chilimigras J. Role of omega-3 fatty acids in maternal, fetal, infant and child wellbeing. *Expert Rev of Obstet Gynecol* 2010; 5(1): 125-38.
11. WoodmanRJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Barden A, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2003; 166(1): 85-93.

12. Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 2003; 107(21): 2646-52.
13. Weber PC, Fischer S, von Schacki C, Lorenz R, Strasser T. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in man. In: Simopoulos AP, Kifer RR, Martin RE. Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. FL; Academic Press. Orlando 1986, pp 49-60.
14. Lewis RA, Lee TH, Austan KF. Effects of omega-3 fatty acids on the generation of products of the 5-lipoxygenase pathway. In: Simopoulos AP, Kifer RR, Martin RE. Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. FL; Academic Press. Orlando 1986, pp 227-238.
15. Šobajić S. Uloga, zdravstveni značaj i dijetarni izvori ω -3 masnih kiselina, *Hrana i ishrana* 2002; 43: 102-7.
16. Simopoulos, Artemis P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 560-9.
17. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Molecular nutrition & food research* 2012; 56(7): 1073-80.
18. Calder PC. Long-chain fatty acids and inflammation. *Proceedings of the Nutrition Society* 2012; 71(2): 284-9.
19. Serhan CN. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2005; 8(2): 115-21.
20. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8(5): 349-361.
21. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *Journal of neurochemistry* 2007; 101(3): 577-99.
22. Sigal LH. Basic Science for the Clinician 39: NF- κ B-Function, Activation, Control, and Consequences. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology* 2006; 12(4): 207-11.
23. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003; 284(1): 84-9.

24. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 2005; 352(16): 1685-95.
25. Burr ML, Gilbert JF, Holliday RA, Elwood PC, Fehily AM, Rogers S, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *The Lancet* 1989; 334(8666): 757-61.
26. Marchioli R, Schweiger C, Tavazzi L, Valagussa F. Efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: results of GISSI-Prevenzione trial. *Lipids* 2001; 36(1): 119-26.
27. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *The Lancet* 2007; 369(9567): 1090-8.
28. Kris-Etherton P, Eckel RH, Howard BV, Jeor SS, Bazzarre TL. Lyon Diet Heart Study Benefits of a Mediterranean-Style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation* 2001; 103(13): 1823-5.
29. Burr ML, Ashfield-Watt PAL, Dunstan FDJ, Fehily AM, Breay P, Ashton T, et al. Lack of benefit of dietary advice to men with angina: results of a controlled trial. *European journal of clinical nutrition* 2003; 57(2): 193-200.
30. Bosch J, Gerstein HC, Dagenais GR, Díaz R, Dyal L, Jung H, et al. n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia. *The New England journal of medicine* 2012; 367(4): 309-18.
31. Mozaffarian D, Marchioli R, Macchia A, Silletta MG, Ferrazzi P, Gardner TJ, ... & OPERA Investigators. Fish oil and postoperative atrial fibrillation: the Omega-3 Fatty Acids for Prevention of Post-operative Atrial Fibrillation (OPERA) randomized trial. *JAMA* 2012; 308(19): 2001-11.
32. Vrablik M, Prusikova M, Šnejdrová M, Zlatohlavek L. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease risk: do we understand the relationship? *Physiological Research* 2009; 58.
33. Calder PC. Session 3: Joint Nutrition Society and Irish Nutrition and Dietetic Institute Symposium on "Nutrition and autoimmune disease" PUFA, inflammatory processes and rheumatoid arthritis. *Proc Nutr Soc* 2008; 67: 409-18.
34. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune disease, *Am J Clin Nutr* 2002; 21: 495-505.

35. Chapkin RS, Davidson LA, Ly L, Weeks BR, Lupton JR, McMurray DN. Immunomodulatory effects of (n-3) fatty acids: putative link to inflammation and colon cancer. *J Nutr* 2007; 137: 200-4.
36. Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1557-60.
37. Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, et al. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 439-46.
38. Gomez Candela C, Bermejo Lopez LM, Loria Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutr Hosp* 2011; 26(2): 323-9.
39. Vaughan VC, Hassing MR, Lewandowski PA. Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. *Br J Cancer* 2013; 108: 486-92.
40. SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in retinal and eye research* 2005; 24(1): 87-138.
41. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology* 2003; 48(3): 257-93.
42. Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Alternative Medicine Review* 2007; 12(3).
43. Balanzá-Martínez V, Fries GR, Colpo GD, Silveira PP, Portella AK, Tabarés-Seisdedos R, Kapczinski F. Therapeutic use of omega-3 fatty acids in bipolar disorder 2011; 1029-47.
44. Vaisman N, Kaysar N, Zaruk-Adasha Y, Pelled D, Brichon G, Zwingelstein G, & Bodennec J. Correlation between changes in blood fatty acid composition and visual sustained attention performance in children with inattention: effect of dietary n- 3 fatty acids containing phospholipids. *The American journal of clinical nutrition* 2008; 87(5): 1170-80.
45. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, et al. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology* 2003; 60(7): 940-6.

46. Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, et al. Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Archives of neurology*, 2006; 63(11): 1545-50.
47. Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *The American journal of clinical nutrition* 1980; 33(12): 2657-61.
48. Zhang J, Sasaki S, Amano K, et al. Fish consumption and mortality from all causes, ischemic heart disease and stroke: an ecological study. *Prev. Med.* 1999; 28: 520-29.
49. Landmark K, Abdelnoor M, Kilhovd B, et al. Use of fish may reduce infarct size as estimated from peak creatine kinase and lactate-dehydrogenase activities. *Cardiology* 1998; 98: 94-102.
50. Mizushima S, Moriguchi EH, Ishikawa P, et al. Fish intake and cardiovascular risk among middle-aged Japanese in Japan and Brazil. *J Cardiovascular risk* 1997; 4: 191-9.
51. He K, Yiqing S, Daviglius ML, et al. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation* 2004; 109: 2705-11.
52. Orenca AJ, Daviglius ML, Dyer AR, et al. Fish consumption and stroke in men: 30-year findings in the Chicago Western Electric Study. *Stroke*, 1996; 27: 204-9.
53. Kang JX, Leat A. Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids: recent studies. *Circulation* 1996; 94: 1774-80.
54. Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Dietary intake of marine omega-3 fatty acids, fish intake, and risk of coronary disease among men. *N Engl J Med* 1995; 332: 977-82.
55. Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, et al. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* 1998; 279: 23-28.
56. Guallar E, Aro A, Jimenez FJ, et al. Omega-3 fatty acids in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1111-18.
57. <http://www.dietrific.com/2007/10/06/new-recommendation-for-fish-intake-during-pregnancy/>

58. Appleton KM, Rogers PJ, Ness AR. Updated systematic review and meta-analysis of the effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on depressed mood. *The American journal of clinical nutrition* 2010; 91(3): 757-70.
59. Morris MC, Evans DA, Btentas JL, et al. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003; (60): 940-6.
60. Chong E, Kreis A, Wong TY, et al. Dietary ω -3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age related macular degeneration, a systematic review and meta-analysis. *Arch Ophtalmol* 2008; 126(6): 826-33.
61. http://www.heart.org/HEARTORG/GettingHealthy/NutritionCenter/HealthyDietGoals/Fish-and-Omega-3-Fatty-Acids_UCM_303248_Article.jsp#.TuDkm9SE7
62. <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/fishshellfish/outreach/factsheet.cfm>
63. www.batut.org.rs
64. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I new genes and pathways. *Circulation* 2004; 110(13): 1868-73.
65. Masunori Matsuzaki MD, Mitsuhiro Yokoyama MD, Yasushi Saito MD, Hitoshi Hishida MD, Hiroshige Itakura MD, Toru Kita M, et al. Incremental effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in statin-treated patients with coronary artery disease. *Circulation Journal*, 2009; 73: 1283-90.
66. Guilliams TG. The use of fish oil supplements in clinical practice: a review. *JANA* 2005; 8(1): 21-34.
67. He K. Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease – eat or take fish oil supplements? *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 52: 95-114.
68. Van de Werf, Bax J, Betriu A. Management of acute myocardial infarction in Patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008; 29: 2909-45.
69. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *The American journal of clinical nutrition*, 1997; 65(5): 1645-54.
70. Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O'Neal DN, Best JD, Beilin LJ. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *The American journal of clinical nutrition* 2000; 71(5): 1085-94.

71. Larson MK, Ashmore JH, Harris KA, Vogelaar JL, Pottala JV, Sprehe M, Harris WS. Effects of omega-3 acid ethyl esters and aspirin, alone and in combination, on platelet function in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2008; 100(4): 634-41.
72. Din JN, Harding SA, Valerio CJ, Sarma J, Lyall K, Riemersma RA, et al. Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis* 2008; 197(1): 290-6.
73. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1993; 22, S1-hyhen.
74. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone Jr MA, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1829–36.
75. Hughes DA, Southon S, Pinder AC. (n-3) Polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes in vitro. *J Nutr* 1996; 126: 603–10.
76. Abeywardena MY, Head RJ. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 361-71.
77. Nakayama M, Fukuda N, Watanabe Y, Soma M, Hu WY, Kishioka H, et al. Low dose of eicosapentaenoic acid inhibits the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats through suppression of transforming growth factor-beta. *J Hypertens* 1999; 17: 1421–30.
78. Giordano E, Visioli F. Long-chain omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 2014; 90(1): 1-4.
79. Siddiqui RA, Harvey K, Stillwell W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. *Chemistry and physics of lipids* 2008; 153(1): 47-56.
80. Mori TA. Dietary n-3 PUFA and CVD: a review of the evidence. *Proc Nutr Soc* 2014; 73(1): 57-64.
81. Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 1993; 88(2): 523-33.
82. *Evropski vodič za prevenciju kardiovaskularnih oboljenja u kliničkoj praksi (verzija 2012)*, pp 11
83. Harris WS, von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 2004; 39: 212-20.

84. von Schacky, Clemens. "Use of red blood cell fatty-acid profiles as biomarkers in cardiac disease." 2009; 25-32.
85. Albert CM, Campos H, Stampfer MJ, Ridker PM, Manson JE, Willett WC, Ma J. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *New England Journal of Medicine* 2002; 346(15): 1113-18.
86. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Jama* 2006; 296(15): 1885-99.
87. Von Schacky C. Omega-3 fatty acids vs. cardiac disease--the contribution of the omega-3 index. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 2009; 56(1): 93-101.
88. Harris WS, Sands SA, Windsor SL, Ali HA, Stevens TL, Magalski A, Porter CB, Borkon AM. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation* 2004; 110: 1645-9.
89. von Schacky C. The Omega-3 Index as a risk factor for cardiovascular diseases. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2011; 96(1): 94-98.
90. Batlić Z, Todorović B. Higijena mesa, riba, rakova i školjki. Veterinarski fakultet, Beograd, 1997.
91. www.fao.org
92. Miller MR, Nichols PD, Barnes J, Davies NW, Peacock EJ, Carter CG. Regiospecificity profiles of storage and membrane lipids from the gill and muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) grown at elevated temperature. *Lipids* 2006; 41(9): 865-76.
93. Hossain MA. Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which one is better-farmed or wild. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2011; 3(6): 455-66.
94. Ugoala C, Ndukwe GI, Audu TO. Comparison of fatty acids profile of some freshwater and marine fishes. *Internet Journal of Food Safety* 2008; 10: 9-17.
95. Simopoulos AP, Kifer RR, Martin RE. Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. Academic Press Inc 1986.
96. Brunner EJ, Jones PJ, Friel S, Bartley M. Fish, human health and marine ecosystem health: policies in collision. *International journal of epidemiology* 2009; 38(1): 93-100.

97. Visioli F, Rise P, Marangani F, Galli C. Omega-3 fatty acids are much more efficiently absorbed from fish than from capsules. Book of Abstracts 15th Congress of ISSFAL«, Montreal, Canada 2002, 128.
98. Beckermann B, Beneke M, Seitz I. Comparative bioavailability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from triglycerides, free fatty acids and ethyl esters in volunteers. *Arzneimittel-Forschung* 1990; 40(6): 700-4.
99. Hansen JB, Olsen JO, Wilsgård L, Lyngmo V, Svensson B. Comparative effects of prolonged intake of highly purified fish oils as ethyl ester or triglyceride on lipids, haemostasis and platelet function in normolipaeamic men. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47(7): 497-507.
100. Simopoulos A. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 438-63.
101. Scientific Advisory Committee on Nutrition/Committee on Toxicity. Advice on Fish Consumption: Benefits and Risks. TSO, London, 2004.
102. EFSA Journal. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol 2010; 8(3): 1461.
103. Serbian Republic Statistic Office, Report on household budget survey, 2000-2005.
104. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine of the National Academics. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington, DC: The National Academics Press, 2005. ISBN 0-309-08537-3.
105. The Expert Panel Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
106. Dean JR. Extraction techniques in analytical sciences (Vol. 34). John Wiley & Sons 2010.
107. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 1959; 37(8): 911-17.
108. Kates M. Techniques in lipidology. Amsterdam: North-Holland Publishing Company 1972.
109. Ichihara K, Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* 2010; 51(3): 635-40.

110. Witt PM, Christensen JH, Ewertz M, Aardestrup IV, Schmidt EB. The incorporation of marine n-3 PUFA into platelets and adipose tissue in pre-and postmenopausal women: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 2010; 104(3): 318-25.
111. Otto SJ, Hornstra G. Effects of storage on venous and capillary blood samples: the influence of deferoxamine and butylated hydroxytoluene on the fatty acid alterations in red blood cell phospholipids. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1997; 35(12): 907-14.
112. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation product in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 32-5.
113. Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, et al Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2007; 40: 181-7.
114. Alamdari DH, Morbarhan MG, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebbati M, Ghafoori F, et al. Pro-oxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008; 41: 375-80.
115. Judé S, Roger S, Martel E, Besson P, Richard S, Bougnoux P, Champeroux P, Le Guennec JY. Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 90: 299-325.
116. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and cardiovascular disease: further evidence and insights. *Nutr Res* 2004; 24: 761-72.
117. Lee KW, Blann AD, Lip GY. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on plasma indices of thrombogenesis and inflammation in patients post-myocardial infarction. *Thromb Res* 2006; 118: 305-12.
118. Cocchi M, Tonello L, Lercker G. Fatty acids, membrane viscosity, serotonin and ischemic heart disease. *Lipids Health Dis* 2010; 9:97.
119. De Mello VDF, Erkkilä AT, Schwab US, Kolehmainen M, Atalay M, Mussalo H, Lankinen M, Orešič M, Lehto S, Uusitupa M, Pulkkinen L. The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. *Eur J Nutr* 2009; 48: 447-55.

120. Grimm H, Mertes N, Goeters C, Schlotzer E, Mayer K, Grimminger F, Furst P. Improved fatty acid and leukotriene pattern with a novel lipid emulsion in surgical patients. *Eur J Nutr* 2006; 45: 55-60.
121. Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem* 2004; 263: 217–25.
122. Grenon SM, Conte MS, Nosova E, Alex H, Chong K, Harris WS, Vittinghoff E, Owens CD. Association between n-3 PUFA content in red blood cells and inflammatory biomarkers in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2013; 58(5): 1283-90.
123. Kim YJ, Jeong DW, Lee JG, Lee HC, Lee SY, et al. Omega-3 index and smoking in patients with acute ST-elevation myocardial infarction taking statins: a case-control study in Korea. *Lipids Health Dis* 2012; 11: 43-50.
124. Udani JK, Ritz BW. High potency fish oil supplement improves omega-3 fatty acid status in healthy adults: an open label study using a web-based, virtual platform. *Nutr J* 2013; 12: 112.
125. Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). *EFSA J* 2012; 10: 2815-63.
126. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, Erdman JW Jr, Kris-Etherton P, Goldberg IJ, Kotchen TA, Lichtenstein AH, Mitch WE, Mullis R, Robinson K, Wylie-Rosett J, St Jeor S, Suttie J, Tribble DL, Bazzarre TL. AHA dietary guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000; 102: 2284-99.
127. Bauch A, Lindtner O, Mensink GBM, Niemann B. Dietary intake and sources of long-chain n-3 PUFAs in German adults. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 810-2.
128. Welch AA, Shakya-Shrestha S, Lentjes MAH, Wareham NJ, Khaw KT. Dietary intake and status of n-3 polyunsaturated fatty acids in a population of fish-eating and non-fish-eating meat-eaters, vegetarians, and vegans and the precursor-product ratio of α -linolenic acid to long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: results from the EPIC-Norfolk cohort. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 1040-51.
129. van Rossum CTM, Fransen HP, Verkaik-Kloosterman J, Buurma-Rethans EJM and Ocké MC, 2011. Dutch National Food Consumption Survey 2007-2010: Diet of

- children and adults aged 7 to 69 years. RIVM Report number: 350050006/2011, National Institute for Public Health and the Environment.
130. Djuricic I, Sobajic S, Perunicic-Pekovic G, Stojanov M, Rasic Z. Consumption of fish oil supplement alters erythrocyte fatty acid composition in overweight, hypercholesterolemic middle-aged Serbians. *Nutr Res* 2007; 27: 529-34.
 131. Health Statistical Yearbook of Republic Serbia for 2011 (2012). <http://www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2011.pdf>. Accessed 5 July 2013
 132. Consumer consumption of vitamin and mineral food supplements. Food Standards Agency, 2008
(http://www.foodbase.org.uk//admintools/reportdocuments/472841_viminsupconsumer.pdf)
 133. Barnes PM, Bloom B, Nahin RL. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007, National Health Statistics Report 2008; 12: 2-24.
 134. Antonijevic B, Jankovic S, Curcic M, Durgo K, Stokic B, Tomic-Naglic D. Risk characterisation for mercury, dichlorodiphenyltrichloroethane and polychlorinated biphenyls associated with fish consumption in Serbia. *Food Chem Toxicol* 2011; 49 (10): 2586-93.
 135. Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Topic A, Zeljkovic A, Stefanovic A, Zunic G. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 15-23.
 136. Incidence and mortality of acute coronary syndrome in Serbia in 2011. Serbian Acute Coronary Syndrome Registry - Report No 6. Institute of Public Health of Serbia, 2012, Belgrade.
 137. Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, Crowe F, Ward HA, Johnson L, et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: A systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine* 2014; 160(6): 398-406.
 138. Endinkaeu K, Tan KK. Profile of fatty acid contents in Malaysian freshwater fish. *J Trop Agri Sci* 1993; 16 (3): 215-21.
 139. Ozogul Y, Ozogul F, Alagoz S. Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: A comparative study. *Food Chem* 2007; 103: 217-23.

140. Jabeena F, Chaudhryb AS. Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Journal of Food Chemistry* 2011; 125 (3): 991-6.
141. Mráz J, Máchová J, Kozák P, Pickova J. Lipid content and composition in common carp – optimization of n-3 fatty acids in different pond production systems. *Journal of Applied Ichthyology* 2011; 28 (2): 238–44.
142. Ćirković M, Trbović D, Ljubojević D, Djordjević V. Meat quality of fish farmed in polyculture in carp ponds in Republic of Serbia. *Meat technology* 2011; 52: 106–121.
143. Guler GO, Aktumsek A, Cakmak YS, Zengin G, Citil OB. Effect of season on fatty acid composition and n-3/n-6 ratios of zander and carp muscle lipids in Altınapa Dam Lake. *Journal of Food Science* 2011; 76(4): 594-597.
144. Jankowska B, Zakęś Z, Żmijewski T, Ulikowski D, Kowalska A. Impact of diet on the fatty acids profile of european catfish (*Silurus Glanis*). *Arch Pol Fish* 2004; 12 (2): 99-100.
145. Kupcewicz B, Stanek M, Janicki B. Chemometric analysis of fatty acids profile of bream (*Abramis Brama*), ruffe (*Gymnocephalus cernua*) and perch (*Perca fluviatilis*) meat from Lake Gopło and Włocławski Dam Reservoir. *J Centr Eur Agric* 2011; 12(4): 601-13.
146. Łuczńska J, Paszczyk B, Borejszo Z, Tarkowski L. Fatty Acid Profile of Muscles of Freshwater Fish from Olsztyn Markets. *Pol J Food Nutr Sci* 2012; 62(1): 51-55 ICID: 982069.
147. Ho BT, Paul DR. Fatty acid profile of Tra Catfish (*Pangasius hypophthalmus*) compared to Atlantic Salmon (*Salmo solar*) and Asian Seabass (*Lates calcarifer*). *International Food Research Journal* 2009; 16: 501-6.
148. Judith Krzynowek J, Murphy J, Maney RS, Panunzio LJ. Proximate composition and fatty acid and cholesterol content of 22 species of northwest Atlantic finfish. NOAA Technical Report NMFS 74, 1989.
149. Liyanage DWD, Wijesundera RC, Wikramanayake TW. Some nutritionally important fatty acids in seven varieties of fish eaten in Sri Lanka. *Ceylon J Med Sci* 1989; 32 (1): 23-32.
150. Testi S. Caratteristiche merceologiche, nutrizionali, sensoriali e di freschezza di Nasello (*Merluccius merluccius*), Lanzardo (*Scomber japonicus*) e Suro (*Trachurus trachurus*). Dottorska teza. Università di Bologna: Alma Mater Studioru, 2008.

151. Zlatanov S, Laskaridis K. Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish-sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). *Food Chemistry* 2007; 103: 725-28.
152. Joint WHO/FAO Expert Consultation, diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2003; 916: 89-90.
153. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 2747-57.
154. Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) and Committee on Toxicity (COT) Advice on fish consumption: benefits & risks. London, United Kingdom: Her Majesty's Stationery Office, 2004.
155. Schuchardt JP, Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013; 89: 1-8.
156. Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc* 2002; 102(11): 1621-30.
157. von Schacky C. Use of red blood cell fatty-acid profiles as biomarkers in cardiac disease. *Biomarkers* 2009; 3(1): 25-32.
158. Cao J, Schwichtenberg KA, Hanson NQ, Tsai MY. Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clin Chem* 2006; 52: 2265-72.
159. Harris WS, Pottala JV, Sands SA, Jones PG. Comparison of the effects of fish and fish-oil capsules on the n-3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(6): 1621-25.
160. Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, Young S, Wang L, Jebb SA, Calder PC. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical of oily fish. *Am J Clin Nutr* 2012; 96: 748-58.
161. Calder PC. The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 1073-80.
162. Larson MK, Ashmore JH, Harris KA, Vogelaar JL, Pottala JV, Sprehe M, Harris WS. Effect of omega-3 fatty acids ethyl esters and aspirin, alone and in combination, on platelet function in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2008; 100: 634-41.

163. Din JN, Harding SA, Valerio CJ, Sarma J, Lyall K, Riemersma RA, Newby DE, Flapan AD. Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis* 2008; 197: 290-6.
164. Von Schacky C, Fischer S, Weber PC. Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function, and eicosanoid formation in humans. *J Clin Invest* 1985; 76: 1626-31.
165. Larson MK, Shearer GC, Ashmore JH, Anderson-Daniels JM, Graslie EL, Tholen JT, Vogelaar JL, Korth AJ, Nareddy V, Sprehe M, Harris WS. Omega-3 fatty acids modulate collagen signaling in human platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011; 84: 93-8.
166. Cocchi M, Tonello L, Lercker G. Fatty acids, membrane viscosity, serotonin and ischemic heart disease. *Lipids Health Dis* 2010; 9: 97.
167. Paulo MC, Andrade AM, Andrade ML, Morais MG, Kiely M, Parra D, Martínéz JA, Thorsdottir I, Bandarra NM. Influence of n-3 polyunsaturated fatty acids on soluble cellular adhesion molecules as biomarkers of cardiovascular risk in young healthy subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18(10): 664-70.
168. Harris WS, von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med* 2004; 39: 212–20.
169. Harris WS. n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: Human studies. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1645-54.
170. Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, O’Neal DN, Best JD, Beilin LJ. 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: 1085-94.
171. Harris WS, Dayspring TD, Moran TJ. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new developments and applications. *Postgrad Med* 2013; 125(6): 100-13.
172. Visioli F, Risé P, Barassi MC, Marangoni F, Galli C. Dietary intake of fish vs. formulations leads to higher plasma concentrations of n-3 fatty acids. *Lipids* 2003; 38(4): 415-18.
173. Elvevoll EO, Barstad H, Breimo ES, Brox J, Eilertsen KE, Lund, T, et al. Enhanced incorporation of n-3 fatty acids from fish compared with fish oils. *Lipids* 2006; 41(12): 1109-14.
174. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54(1): 24-38.

175. Eschen O, Christensen JH, De Caterina R, Schmidt EB. Soluble adhesion molecules in healthy subjects: a dose-response study using n-3 fatty acids. *Nutr Metab Cardiovas* 2004; 14(4): 180-5.
176. Kew S, Banerjee T, Minihane AM, Finnegan YE, Muggli R, Albers R, et al. Lack of effect of foods enriched with plant-or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(5): 1287-95.
177. Miles EA, Banerjee T, Dooper MM, M'Rabet L, Graus YM, Calder PC. The influence of different combinations of γ -linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr* 2004; 91(6): 893-903.
178. Vega-López, S, Kaul N, Devaraj S, Cai RY, German B, Jialal I. Supplementation with omega 3 polyunsaturated fatty acids and all-rac alpha-tocopherol alone and in combination failed to exert an anti-inflammatory effect in human volunteers. *Metabolism* 2004; 53(2): 236-40.
179. Madsen T, Christensen JH, Blom M, Schmidt EB. The effect of dietary n-3 fatty acids on serum concentrations of C-reactive protein: a dose-response study. *Br J Nutr* 2003; 89(4): 517-22.
180. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 2006; 189(1): 19-30.
181. Pot GK, Brouwer IA, Enneman A, Rijkers GT, Kampman E, Geelen A. No effect of fish oil supplementation on serum inflammatory markers and their interrelationships: a randomized controlled trial in healthy, middle-aged individuals. *European journal of clinical nutrition*, 2009; 63(11): 1353-59.
182. Kelley DS, Siegel D, Fedor DM, Adkins Y, Mackey BE. DHA supplementation decreases serum C-reactive protein and other markers of inflammation in hypertriglyceridemic men. *The Journal of nutrition* 2009; 139(3): 495-501.
183. Plat J, Jellema A, Ramakers J, Mensink RP. Weight loss, but not fish oil consumption, improves fasting and postprandial serum lipids, markers of endothelial function, and inflammatory signatures in moderately obese men. *The Journal of nutrition* 2007; 137(12): 2635-40.
184. Browning LM, Krebs JD, Moore CS, Mishra G D, O'Connell MA, Jebb SA. The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on inflammation, insulin sensitivity and CVD risk in a group of overweight women

- with an inflammatory phenotype. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2007; 9(1): 70-80.
185. Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinaz G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Translational Research* 2009; 153(5): 217-23.
 186. Siddiqui RA, Harvey K, Stillwell W. Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. *Chem Phys Lipids* 2008; 153: 47-56.
 187. Mori TA. Dietary n-3 PUFA and CVD: a review of the evidence. *Proc Nutr Soc* 2014; 73(1): 57-64.
 188. Giordano E, Visioli F. Long-chain omega 3 fatty acids: Molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostag Leukotr Ess* 2014; 90: 1-4.
 189. Eritsland J. Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1): 197-201.
 190. Kimura Y, Sato M, Kurotani K, Nanri A, Kawai K, Kasai H, et al. PUFAs in serum cholesterol ester and oxidative DNA damage in Japanese men and women. *Am J Clin Nutr* 2012; 95(5): 1209-14.
 191. Stefanović A, Kotur-Stevuljević J, Spasić S, Vekić J, Zeljković A, Spasojević-Kalimanovska V, Jelić-Ivanović Z. HDL 2 Particles are associated with hyperglycaemia, lower PON1 activity and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients. *Clin Biochem* 2010; 43(15): 1230-35.
 192. Schmidt S, Stahl F, Mutz KO, Scheper T, Hahn A, Schuchardt JP. Transcriptome-based identification of antioxidative gene expression after fish oil supplementation in normo- and dyslipidemic men. *Nutr Metab* 2012; 1: 45.

OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi u međunarodnim časopisima

1. Djuricic ID, Mazic SD, Kotur-Stevuljevic JM, Djordjevic VR, Sobajic SS. Long-chain n-3 PUFA dietary recommendations are moderately efficient in optimizing their status in healthy middle-aged subjects with low fish consumption: A cross-over study. *Nutr Res* 2014; 34: 210-18. **(M22)**
2. Ivana Đuričić, Jelena Kotur-Stevuljević, Milica Miljković, Mirko Kerkez, Vladimir Đorđević, Ljubomir Đurašić, Slađana Šobajić. Effect of nutritionally relevant doses of long-chain n-3 PUFA on lipid status, oxidative stress, and inflammatory markers in average middle-age Serbian population. *J Med Biochem* 2014; 33: 1-10. **(M23)**

Saopštenja na skupovima međunarodnog značaja

1. Đuričić I, Šobajić S, Đorđević B, Vidović B, Ivanović N. The incorporation of n-3 fatty acids from fish and fish oil supplements into platelets in healthy middle-aged subjects. Abstract Book – 8th International Congress Taste, Nutrition, Health, Dižon, Francuska 19-20. mart 2013.
2. Đuričić I, Trbojević J, Timić J, Šobajić S, Đorđević B. Analysis of omega-3 fatty acid content in fresh marine fish. Proceedings from 6th Central-European Congress of Food (CEFood), 23-26. maj 2012., Novi Sad, Srbija, 200-204
3. Đuričić I, Šobajić S, Medaković N. Omega-3 fatty acids supplementation and health benefits. 3rd European Congress on Preventive, Regenerative and Anti-ageing Medicine. 29-31. maj, Istanbul, Turska

Saopštenja na skupovima nacionalnog značaja

1. Đuričić I, Šobajić S, Timić J. Analiza sadržaja masnih kiselina u uzorcima rečne ribe. Izvodi radova 12. kongres o ishrani sa međunarodnim učešćem, Beograd, 31. oktobar -3. novembar 2012; 336-337; ISBN 978-86-909633-2-4
2. Đuričić I, Milentijević D, Šobajić S. Dijetetski suplementi sa omega-3 masnim kiselinama sa tržišta Srbije – analiza i komentar sastava. Knjiga apstrakata 3. kongres o dijetetskim suplementima, Beograd, 2011, 80-82.
3. Đuričić I, Šobajić S. Uticaj suplementacije ribljim uljem na status polinezasićenih masnih kiselina eritrocita kod zdravih ispitanika sa umerenom hiperlipemijom. Knjiga apstrakata 3. kongres o dijetetskim suplementima, Beograd, 2011, 159-160.
4. Đuričić I, Šobajić S. Omega 3 indeks kao factor rizika za razvoj kardiovaskularnih oboljenja, Izvodi radova 4. Kongres o dijetetskim suplementima sa međunarodnim učešćem, Beograd 24. oktobar-25. oktobar 2013; 99 - 100; ISBN 978-86-917167-0-7

BIOGRAFIJA AUTORA

Ivana Đuričić rođena je 29.09.1975. godine u Podgorici. Na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu diplomirala je 2000. godine sa prosečnom ocenom 9,32 na smeru diplomirani farmaceut. Nakon diplomiranja završila je obavezan staž i položila stručni ispit 2001. godine. Februara 2002. god počela je da radi u Institutu za bromatologiju na mestu stručnog saradnika, septembra 2002. godine izabrana je za asistenta pripravnika, a februara 2010. primljena je na mesto asistenta gde i sada radi. Marta 2008. godine odbranila je magistarsku tezu. U okviru svog posla angažovana je na izvođenju praktične nastave iz predmeta Bromatologija i Kontrola zdravstvene ispravnosti namirnica, kao i na izbornom predmetu Dijetetika na studijskim grupama farmacija i farmacija - medicinski biohemičar. Aktivno je angažovana na unapređenju nastave kroz uvođenje novih vežbi i osavremenjivanje i uvođenje novih vidova prezentacije sadržaja teorijske nastave.

Ivana Đuričić je koautor praktikuma za praktičnu nastavu iz Bromatologije koji je izdat 2011. godine.

Učestvuje u radu nevladine organizacije «Celijak», gde se aktivno bavi analizom hrane i lekova koji su namenjeni celijačnim bolesnicima. Član je Saveza farmaceutskih udruženja Srbije-Sekcija za sanitarnu hemiju i Društva za ishranu Srbije.

Objavila je 10 naučnih radova u međunarodnim časopisima i 20 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

U periodu 2002-2005. godine bila je saradnik na dva projekta Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije (BTN.7.1.2.0445.B i BTN.7.1.2.0440.B). U periodu 2005-2008. bila je saradnik na dva projekta Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije (BTN-371005 B i BTN-351005B). U periodu 2008-2011. bila je saradnik na dva projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, u okviru programa novih tehnologija u prehrambenoj industriji (20049 i 20121).

Saradnik je na dva tekuća naučno-istraživačka projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, u okviru programa novih tehnologija u prehrambenoj industriji:

»Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za evropsko i svetsko tržište-stvorimo bogatstvo iz bogatstva Srbije« III46001; »Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu« III46009.

Govori engleski jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ђуричић Ивана

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај омега-3 масних киселина из различитих дијетарних извора на факторе ризика за развој кардиоваскуларних болести код испитаника средњих година

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда



У Београду, 15. 6. 2014.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ђуричић Ивана

Број уписа _____

Студијски програм Докторске академске студије из Броматологије

Наслов рада Утицај омега-3 масних киселина из различитих дијетарних извора на факторе ризика за развој кардиоваскуларних болести код испитаника средњих година

Ментор Др Слађана Шобајић, редовни професор, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

Потписани Ђуричић Ивана

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда



У Београду, 15. 6. 2014.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај омега-3 масних киселина из различитих дијетарних извора на факторе ризика за развој кардиоваскуларних болести код испитаника средњих година

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15. 6. 2014.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.