

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписаница TAMARA B. Popović  
број уписа 24/2009

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

MASNOKISELINSKI PROFILI FOSFOLIPIDA I PARAMETRI  
OKSIDATIVNOG STRESA U KRVI I JETRI PACOVA  
WISTAR SOJA TRETIRANIH RIBLJIM UJEM

- 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, 29. 05. 2012.

Tamara Popović

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора TANARA Popović

Број уписа 24/2009

Студијски програм biohemija

Наслов рада MASNOKISELINSKI PROFILI FOSFOLIPIDA I PARAMETRI  
OKSIDATIVNOG STRESA U KRUVI I JETRI RADOVA VISTAR SODA TRETIRANIH  
RIBUIM UJEM

Ментор PROF. DR. LJUBA MANDIĆ

Потписани Tanara Popović

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, 29.05.2012.

Tanara Popović

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

MASNOKISELINSKI PROFILI FOSFOLIPIDA I PARAMETRI OKSIDATIVNOG STRESA U KRUI I JETRI PACOVA KISTAR SA ZA TRETIRANIH RIBLJIM UBJEM

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, 29.05.2012.

Tamara Popović

UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET

Tamara B. Popović

**Masnokiselinski profili fosfolipida i  
parametri oksidativnog stresa u krvi i jetri  
pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY

Tamara B. Popović

**Fatty acids phospholipids profiles and  
parameters of oxidative stress in blood and  
liver in Wistar rats treated with fish oil**

PhD thesis

Belgrade, 2012

Članovi komisije:

Mentor: Dr Ljuba Mandić, redovni profesor Hemijski Fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Dr Mihajlo Spasić, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja, Univerziteta u Beogradu

---

Dr Miroslav Vrvić, redovni profesor, Hemijski Fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Dr Sunčica Borozan, redovni profesor, Veterinarski Fakultet Univerziteta u Beogradu

---

Dr Marija Glibetić, naučni savetnik, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

---

Datum odbrane:

## Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je izvedena na Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za ishranu i metabolizam.

### *Posebnu zahvalnost dugujem:*

-prof. dr Ljubi Mandić, mentoru koja je dala veliki doprinos u svim fazama rada na ovoj tezi.  
-prof. dr Mihajlu Spasiću, koji je od trenutka definisanja oblasti istraživanja do samog kraja tj. do obrade rezultata i pisanja teze bio uz mene i svojim korisnim sugestijama, savetima pomogao da teza dobije izgled kakav ima. Profesorov doprinos mom celokupnom posle diplomskog radu i karijeri je neophodno pomenuti.

- prof. dr Sunčici Borozan koja je svojim nesebičnim zalaganjem u svim fazama a posebno tokom eksperimentalnog dela rada dala veliki doprinos. Njenu laboratoriju doživela sam kao prijatnu čemu je doprinela zajedno sa svojim saradnicima.

-prof. dr Miroslavu Vrviću, na korisnim savetima, sugestijama i optimizmu tokom čitavog mog školovanja na Hemijskom fakultetu.

- prof. dr Mariji Glibetić, mojoj šefovici, koje me je podržavala na čitavom putu izrade teze. Dala je doprinos u odabiru samog model sistema, brzom dolasku do suplemenata, brizi i obezbeđivanju kolone za GC koja nam je bila neophodna. Hvala na svim onim malim svakodnevnim usputnim stvarima kojih više i ne mogu da se setim ali znam da su mi značile u datom trenutku.

### *Zahvaljujem se najsrdačnije:*

-koleginicama mr. Aleksandri Arsić i dipl.biol. Jasmini Debeljak-Martaćić iz laba koje su dale svoj doprinos i drugarski mi pomagale u eksperimentu

-koleginici dr Vesni Vučić koja mi svojim iskustvom, savetima i podrškom puno pomogla.

-dr Danijeli Ristić-Medić na puno razgovora o samoj tematici i tajnama masnih kiselina koje je sa mnom podelila.

-koleginici dr Gordani Oggiano na drugarskim savetima i pomoći, mr Mariji Takić i članovima laboratorije koji su se dnevno interesovali kako moj rad napreduje.

### *Zahvalnost upućujem i kolegama:*

-sa Instituta za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na čelu sa dr Silviom de Lukom.

-iz KBC Zemun dr Zorica Rašić-Milutinović i dr Gordana Peruničić-Peković na podršci u radu

-Mr Sebastianu Kujundžiću koji mi je pomogao u analitičkom delu rada, koji je drugarski bezrezervno bio uvek spreman da mi ponudi svoje znanje, pomoć, podršku.

### *Zahvalnost je velika i upućena je:*

-bliskim prijateljima koji su bili uz mene i bodrili me na ovom putu i imali razumevanja za moja odsustva sa zajedničkih sastanaka u poslednje vreme

-Draganu Jovanoviću, našem kumu, bez koga teza ne bi ovako izgledala, koji je svojim strpljenjem i znanjem pomogao u tehničkoj obradi slika u tekstu.

Zahvalnost je najveća i najznačajnija a upućena je mojoj porodici, roditeljima i Nebojši koji su me svojom ljubavlju svih ovih godina štitili.

„Masnokiselinski profili fosfolipida i parametri oksidativnog stresa u krvi i jetri pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem“

### *izvod*

Polinezasićene masne kiseline, posebno eikozapentaenska (EPA) i dokozaheksaenska (DHA) masna kiselina koje ulaze u sastav ribljeg ulja i pripadaju n-3 familiji masnih kiselina, imaju efekte na čitav niz fizioloških parametara. Značaj balansa odnosa n-6/n-3 masnih kiselina u fosfolipidima kao i balans između produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta i reaktivnih azotnih vrsta s jedne i antoksidativne zaštite s druge strane je od važnosti za normalno funkcionisanje organizma.

Suplementirali smo pacove Wistar soja dve starosne dobi (3 i 22 meseca) u trajanju od 6 nedelja sa ribljim uljem (EPA+DHA i vitamin E). Ispitivani su biohemijski parametri plazme, masnokiselinski profili fosfolipida plazme i jetre kao i parametri oksidativnog stresa u krvi i jetri pomenutih životinja.

Dobijeni rezultati su pokazali više vrednosti holesterola, HDL- holesterola i triglicerida u plazmi mladih pacova u odnosu na stare. Tretman ribljim uljem doveo je do povišenja HDL-holesterola, koncentracije mokraćne kiseline i sniženja LDL-holesterola kod obe grupe tretiranih životinja dok je kod mladih tretman izazvao sniženje koncentracije triglicerida a kod starih sniženje holesterola.

Starenjem, povećava se sadržaj linolne, arahidonske kiseline kao i ukupnih n-6 MK. Tretman ribljim uljem, doveo je do povećanja sadržaja EPA, DPA, sniženja koncentracije arahidonske kiseline u fosfolipidima plazme u obe starosne grupe životinja. Sadržaj oleinske kiseline je kod mladih pacova tretmanom povišen, dok je kod starih pacova došlo do povećanja dihomog- $\gamma$ -linolenske kiseline. Starenjem, snižava se i sadržaj ukupnih n-3 MK i odnos n-6/n-3 u fosfolipidima jetre. Tretman u životinja obe starosne dobi doveo je do povećanja sadržaja EPA, DPA, ukupnih n-3, smanjenja sadržaja arahidonske kiseline u fosfolipidima jetre. Kod mladih tretman je povećao sadržaj MUFA, a kod starih SFA i PUFA.

Starenjem, povećava se lipidna peroksidacija u hepatocitima, kao i aktivnost SOD i koncentracija nitrita, dok je aktivnost PON1 u plazmi veća kod mladih pacova što je u korelaciji sa višim vrednostima HDL-holesterola u odnosu na stare pacove. Tretman ribljim uljem kod pacova obe starosne dobi doveo je do sniženja lipidne peroksidacije, koncentracije plazma nitrita i zastupljenosti LDH5 izoenzimskog oblika a do povišenja aktivnosti SOD, CAT i PON1 u krvi tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. U jetri pacova tretman ribljim uljem doveo je



do sniženja lipidne peroksidacije, koncentracije nitrita kod obe grupe životinja, dok je kod mladih došlo i do sniženja aktivnosti katalaze i povećanja PON1. Kod starih pacova tretman je doveo do povećanja aktivnosti CAT, SOD i količine SH grupa, dok se aktivnost PON1 značajno snizila u odnosu na kontrolnu grupu.

Tretman ribljim uljem na ispitivane životinje imao je kardioprotektivni efekat, i dovodi do smanjenja rizika od ateroskleroze. Tretman je doveo do ugradnje EPA i DPA u plazmi i u membranama hepatocita kao i do povećanja ukupnih n-3 MK. Promene sadržaja pojedinačnih MK uticale su na balans zastupljenosti PGA1 i PGA2 eikozanoida, koji se pomeren u pravcu sprečavanja agregacije trombocita, smanjenja zapaljenja, snižavanja krvnog pritiska. Smanjenje lipidne peroksidacije, koncentracije plazma nitrita u krvi i jetri, povećanje mokraćne kiseline u plazmi najizrazitiji su efekti na parametre oksidativnog stresa kod pacova obe starosne dobi.

Ključne reči: masnokiselinski profili fosfolipida, EPA, DHA, starenje, oksidativni stres

Naučna oblast: biohemija

Fatty acids phospholipids profile and parameters of oxidative stress in blood and liver in Wistar rats treated with fish oil

#### Abstract

Polyunsaturated fatty acids, especially eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA) which are the content of fish oil and belong to the n-3 fatty acid family. n-3 are known to have effect on physiological parameters. The balance of the n-6/n-3 ratio in phospholipids, as well as the balance between reactive oxygen species and reactive nitric species on the one side and on the anti oxidative defense on the other is important for the normal function of organism.

Wistar rats (3 and 22 months) were supplemented with fish oil (EPA+DHA and vitamin E) over the period of 6 weeks. Biochemical parameters in plasma, fatty acid phospholipids profiles and the parameters of oxidative stress in blood and liver were examined.

In young rats plasma concentrations of cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides in plasma were increased compared to aged rats. Fish oil treatment increased HDL-cholesterol, uric acid and LDL-cholesterol in both groups of animals (3 and 22 months). Treatment decreased triglycerides concentrations in young rats and decreased plasma cholesterol in aged rats.

Senescence increased LA, AA and n-6 FA. Fish oil treatment increased EPA, DPA, decreased AA in plasma phospholipids in both group of animals. In young rats treatment increased oleic acid while in aged it increased DGLA. Senescence decreased n-3 FA and the n-6/n-3 ratio in liver phospholipids. Treatment increased EPA, DPA, n-3 and decreased AA in liver phospholipids in both group of animals. In young rats, treatment increased MUFA while in aged rats it increased SFA and PUFA.

Senescence also increased lipid peroxidation in liver cells, as well as SOD activity and nitrite concentration while the activity of PON1 in plasma is increased in young rats compared to aged Wistar rats. Fish oil treatment in both groups of rats (3 and 22 months) decreased lipid peroxidation, concentration of plasma nitrite and LDH5 and increased SOD, CAT, PON1 activity in blood. Treatment decreased lipid peroxidation, nitrite concentration in liver of both groups of rats. In young rats treatment also decreased CAT activity and increased PON1. In aged rats treatment increased CAT, SOD activity, concentration of SH groups while PON activity decreased compared to control.

Fish oil treatment had cardio protective effect and decreased risk of atherosclerosis. Treatment increased EPA, DPA in plasma and its incorporation in hepatocyte membrane, as well as n-3 PUFA. Changes in percentage of FA affect balance of PGA1 and PGA2 eicosanoids toward decreasing in inflammation, aggregation of platelets and arterial blood pressure.

A decrease in lipid peroxidation and nitrite concentration in the blood and liver of examined animals, and an increase of uric acid in plasma are the most remarkable effects of oxidative stress parameters in Wistar rats in both groups (3 and 22 months)

Keywords: fatty acids phospholipids profiles, EPA, DHA, senescence, oxidative stress

Scientific field: biochemistry

## LISTA SKRAĆENICA

**AA**- arahidonska kiselina

**ADP**- adenzin-difosfat

**ALA**-  $\alpha$ -linolenska kiselina

**ABCA1**- ATP –vezujući transporter (eng. ATP binding cassette transporter ABCA1)

**AMPK**- 5' -adenozin- monofosfat-aktivirana protein-kinaza (eng. 5' -adenosine monophosphate-activated protein kinase)

**ApoA, B, C, D**- apolipoproteinske frakcije

**AOS**- antioksidativni zaštitni sistem (eng. antioxidant defense system)

**cAMP**- ciklični adenzin-monofosfat

**CAT**- katalaza

**CERP**- holesterol-regulatorni protein

**COX**-ciklooksigenaze

**CPT-1**- karnitin-palmitoil-transferaza-1

**CTK ciklus**- ciklus trikarbonskih kiselina (Krebsov ciklus)

**CVD**- kardiovaskularne bolesti (eng. cardiovascular diseases)

**DHA**- dokozaheksaenska kiselina

**EPA**- eikozapentaenska kiselina

**ESR metoda**- elektron-spin-rezonanca

**FAD<sup>+</sup>**- flavin- adenin-dinukleotid

**FATP**- transportni protein masnih kiselina (eng. fatty acids transport protein)

**FAS**- sintaza masnih kiselina (eng. fatty acid synthase)

**GPAT**- glicero–fosfat-acil-transferaza

**GSH**- glutation

**GSH-Px**- glutation-peroksidaza

**GR**- glutation-reduktaza

**GST**- glutation-S-transferaza

**HDL**- lipoproteini velike gustine (eng. high density lipoproteins)

**ICAM-1**- (eng. Inter-Cellular Adhesion Molecule)

**IDL**- lipoproteini srednje gustine (eng. intermediate density lipoproteins)

**IGF**- insulinski faktor rasta (eng. insulin growth-1 factor)

**IL**- interleukin

**LA**- linolna kiselina

**LDL**-lipoproteini male gustine (eng. low density lipoproteins)

**LDH**- laktat-dehidrogenaza

**LX**- lipoksin

**LT**- leukotrieni

**LXR-X**- receptor x jetre (eng. liver x receptor)

**Membranski premosti** - (eng. membrane rafts)

**MK**- masne kiseline

**Mn-SOD**- mangan-zavisna superoksid-dismutaza

**MUFA**- mononezasićene masne kiseline (eng. monounsaturated fatty acids)

**n-3 MK**- n-3 serija masnih kiselina

**n-6 MK**- n-6 serija masnih kiselina

**NAD<sup>+</sup>**- nikotinamid-adenin-dinukleotid

**NADPH**- nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

**NEFA**- neesterifikovane masne kiseline (eng. nonesterified fatty acids)

**NF- $\beta$ B**- nuklearni faktor beta

**NOS**- azot-oksid-sintaza

**PC**- fosfatidil-holin

**PE**- fosfatidil-etanolamin

**PG**- prostaglandini

**PI**- fosfatidil-inozitol

**PL**- fosfolipidi

**PON1**- paraoksonaza-1

**PPAR- $\alpha$**  -peroksizomalni proliferišući aktivirani receptor (eng. peroxisome proliferator-activated receptor)

**PS**- fosfatidil-serin

**PUFA**- polinezasićene masne kiseline (eng. polyunsaturated fatty acids)

**RNS**- reaktivne vrste azota (eng. reactive nitric species)

**ROS**- reaktivne vrste kiseonika (eng. reactive oxigen species)

**SFA**- zasićene masne kiseline (eng. saturated fatty acids)

**SOD**- superoksid-dismutaza, (**Cu, Zn-SOD**- bakar,cink-superoksid-dismutaza)

**SREBP**-vezujući protein sterolnog regulatornog elementa (sterol regulatory element-binding protein)

**TG**- trigliceridi (triacilgliceroli)

**TNF- $\alpha$** - faktor nekroze tumora- $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor)

**TX**- tromboksani

**VCAM-1**-vaskularni ćelijski adhezioni protein (molekul)-1 (eng. vascular cell adhesion protein (molecule)-1)

**VEGF**- vaskularni endotelni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor)

**VLDL**- lipoproteini vrlo male gustine (eng.very low density lipoproteins)

**UH**- ugljeni hidrati

# SADRŽAJ

I UVOD	1
II PREGLED LITERATURE	3
<b>2.1 Fosfolipidi, sastav, podela i funkcija</b>	<b>3</b>
2.1.1 Metabolizam fosfolipida	6
<b>2.2 Masne kiseline</b>	<b>7</b>
2.2.1 Biosinteza masnih kiselina i regulacija	9
2.2.2 Razgradnja masnih kiselina i regulacija	13
2.2.3 Masne kiseline i njihova biološka uloga	14
2.2.3.1 Zasićene masne kiseline	14
2.2.3.2 Mononezasićene masne kiseline	15
2.2.3.3 Polinezasićene masne kiseline	15
2.2.3.4 n-3 masne kiseline	16
2.2.3.5 n-6 masne kiseline	16
2.2.4 Uticaj masnih kiselina na regulaciju genske ekspresije	17
2.2.5 Studije o n-3 masnim kiselinama	19
<b>2.3 Lipoproteini</b>	<b>21</b>
2.3.1 Metabolizam lipoproteina	22
2.3.2 Egzogena faza metabolizma lipoproteina	22
2.3.3 Endogena faza metabolizma lipoproteina	23
<b>2.4 Holesterol</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Oksidativni stres</b>	<b>26</b>
2.5.1 Fiziološki značaj ROS	27
2.5.2 Reaktivne kiseonične vrste	27
2.5.3 Oksidativna oštećenja makromolekula	32

2.5.3.1 Oksidativna oštećenja lipida	32
2.5.3.2 Oksidativna oštećenja proteina	35
2.5.3.3 Oksidativna oštećenja NK	35
2.5.3.4 Oksidativno oštećenja UH	35
2.5.4 Metode za identifikacije ROS	36
<b>2.6 Antiksidativni sistem odbrane organizma</b>	<b>36</b>
2.6.1 Antioksidativni enzimi	37
2.6.2 Neenzimski antioksidansi	38
2.6.3 Vanćelijski antioksidansi	38
<b>2.7 Laktat-dehidrogenaza (LDH)</b>	<b>39</b>
<b>2.8 Paraoksonaze (PON enzimska familija)</b>	<b>39</b>
<b>2.9 Starenje i slobodno-radikalna teorije</b>	<b>40</b>
2.9.1 Kalorijska restrikcija i starenje	41
2.9.2 Farmakološka intervencija	41
2.9.3 Autofagija	42
<b>III MATERIJAL I METODE</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Hemikalije i reagensi</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Analiza sastojaka ribljeg ulja</b>	<b>43</b>
3.2.1 HPLC analiza tokoferola u ribljem ulju	43
<b>3.3 Eksperimentalne životinje i dijeta</b>	<b>44</b>
3.3.1 Tretiranje pacova Wistar soja ribljim uljem	44
3.3.2 Žrtvovanje životinja i priprema uzorka	44
<b>3.4 Biohemijske analize krvi pacova</b>	<b>45</b>
3.4.1 Određivanje koncentracije hemoglobina	45
<b>3.5 Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane</b>	<b>45</b>



3.5.1	Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	45
3.5.2	Određivanje aktivnosti CuZn-SOD	45
3.6	Određivanje količine malondialdehida	46
3.7	Određivanje koncentracije nitrita u plazmi	46
3.8	Određivanje aktivnosti paraoksonaza u plazmi	46
3.9	Određivanje ukupnih tiolnih grupa	46
3.10	Određivanje zastupljenosti LDH izoenzimskih oblika u plazmi	47
3.11	Analiza MK profila fosfolipida plazme gasno-tečnom hromatografijom	47
3.11.1	Ekstrakcija ukupnih lipida iz plazme	47
3.11.2	Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom	48
3.11.3	Analiza MK fosfolipida sa GC	48
3.12	Analiza MK u fosfolipidima jetre i parametri oksidativnog stresa	49
3.12.1	Priprema tkiva jetre za analizu MK fosfolipida jetre	49
3.12.1.1	Analiza MK fosfolipida jetre	49
3.12.2	Priprema tkiva jetre za analizu parametara oksidativnog stresa	50
3.12.2.1	Određivanje parametara oksidativnog stresa u jetri	50
3.13	Statistička obrada podataka	51
IV	REZULTATI	52
4.1	Analiza satojaka ribljeg ulja	52
4.2	Biohemijski parametri pacova Wistar soja različite starosne dobi	53
4.2.1	Biohemijski parametri plazme kod mladih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem	55
4.2.2	Biohemijski parametri plazme kod starih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem	57
4.3	Profili MK fosfolipida plazme i jetre kod pacova Wistar soja različite starosne dobi	59
4.3.1	Sadržaj MK fosfolipida plazme kod pacova Wistar soja različite starosne dobi	59
4.3.2	Sadržaj MK u fosfolipidima jetre kod pacova Wistar soja različite starosne dobi	60

<b>4.4 MK profili fosfolipida plazme i jetre, aktivnost desaturaza i elongaza kod mladih i starih pacova tretiranih ribljim uljem</b>	<b>61</b>
4.4.1 Uticaj tretmana ribljim uljem na profile MK fosfolipida plazme mladih pacova	62
4.4.1.1 Procenjene vrednosti desaturaza i elongaza kod mladih pacova u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj ribljim uljem u trajanju 6 nedelja	63
4.4.2 Uticaj tretmana ribljim uljem na profile MK fosfolipida jetre mladih pacova	64
4.4.2.1 Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u jetri pacova Wistar soja	65
4.4.3 Uticaj tretmana ribljim uljem na profile MK fosfolipida plazme starih pacova	66
4.4.3.1 Procena aktivnosti desaturaza i elongaza na osnovu MK profila fosfolipida starih pacova	68
4.4.4 Profili MK fosfolipida jetre kod starih pacova Wistar pacova	68
4.4.4.1 Procena aktivnosti elongaza i desaturaza u jetri starih pacova Wistar soja	70
<b>4.5 Parametri oksidativnog stresa u krvi i jetri pacova različite starosne dobi</b>	<b>71</b>
4.5.1 Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima i plazmi pacova različite starosne dobi	71
4.5.2 Parametri oksidativnog stresa u jetri pacova različite starosne dobi	72
<b>4.6 Parametri oksidativnog stresa kod pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem</b>	<b>72</b>
4.6.1 Parametri oksidativnog stresa u krvi mladih pacova	73
4.6.1.2 Relativna aktivnost LDH izoenzimskih oblika kod mladih pacova Wistar soja	74
4.6.2 Parametri oksidativnog stresa u jetri mladih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem	75
4.6.3 Parametri oksidativnog stresa u jetri mladih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem	75
4.6.4 Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima i plazmi starih Wistar pacova	76
4.6.4.1 Relativna aktivnost LDH izoenzimskih oblika kod starih pacova Wistar soja	77
4.6.5 Parametri oksidativnog stresa u jetri starih pacova tretiranih ribljim uljem	78
<b>4.7 Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaja MK u fosfolipidima plazme i jetre mladih i starih pacova</b>	<b>80</b>

4.7.1 Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaj MK u fosfolipidima plazme mladih i starih pacova	79
4.7.2 Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaja MK u fosfolipidima jetre mladih i starih pacova	80
V DISKUSIJA	82
5.1 Biohemijski parametri u plazmi pacova Wistar soja i uticaj suplementacije ribljim uljem	82
5.2 Uticaj suplementacije ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida plazme i jetre pacova različitih starosti kao i na aktivnost desaturaza i elongaza	84
5.2.1 Uticaj suplementacije ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida plazme pacova različitih starosti	84
5.2.2 Uticaj suplementacije ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida jetre pacova različitih starosti	86
5.2.3 Profili MK fosfolipida jetre kontrolnih grupa pacova Wistar soja različite starosne dobi	89
5.2.4. Elongaze i desaturaze	89
5.3 Parametri oksidativnog stresa	92
5.3.1 Parametri oksidativnog stresa u krvi i jetri mladih i starih pacova Wistar soja posle tretmana ribljim uljem	92
5.3.2 Rezultati drugih studija i povezanost sa dobijenim rezultatima	93
5.3.2.1. Starenje i antioksidativna zaštita	93
5.3.2.2. Tretman ribljim uljem i antioksidativna zaštita	95
VI ZAKLJUČAK	100
VII LITERATURA	104

## I UVOD

Polinezasićene masne kiseline (PUFA) imaju različite biološke uloge u organizmu i zbog toga su niz godina u fokusu naučnih istraživanja. Regulacija rasta i razvoja, razvoj retine i moždanih funkcija, regulacija imunog odgovora, uticaj na karcinogenezu, kao i uticaj na koncentraciju lipoproteina, membransku fluidnost, funkciju membranskih enzima i receptora, modulaciju produkcije eikozanoida, regulaciju krvnog pritiska i metabolizam mineralnih supstanci, neke su od uloga u kojima učestvuju. Dve su familije polinezasićenih masnih kiselina n-6 i n-3, koje se biosintetišu iz prekursora linolne (LA) i alfa-linolenske kiseline (ALA) u prisustvu istog enzimskog sistema, mikrozomalnih desaturaza i elongaza. Glavni metabolički proizvodi n-3 familije su eikozapentaenska (EPA, 20:5 n-3) i dokozoheksaenska kiselina (DHA, 22:6 n-3). Poremećaj nivoa PUFA i odnosa n-6/n-3 PUFA u organizmu utiče na sve pomenute uloge koje imaju. Radi sprečavanja neželjenih posledica ovih poremećaja, preporučuje se suplementacija ribljim uljem koje sadrži n-3 PUFA, odnosno EPA i DHA. U literaturi je opisan veći broj epidemioloških, eksperimentalnih studija, studija *in vivo* i *in vitro* koje su opisivale efekte suplementacije sa EPA i DHA u različitim dozama i dužinama trajanja. Kao pozitivni efekti suplementacije navedeni su antiinflamatorni, antitrombični, antiaterogeni, kardioprotektivni, kao i hipoholesterolemijski, hipotrigliceridemijski i hipoglikemijski.

Oksidativni stres može uzrokovati oksidativna oštećenja ćelija i ćelijskih konstituenata i time dovesti do ubrzavanja procesa starenja, razvoja bolesti i smrti organizama. Oksidativni stres predstavlja narušavanje balansa između produkcije ROS i RNS s jedne i antoksidativne zaštite s druge strane ili poremećaj prooksidativne-antioksidativne ravnoteže u pravcu prve. Povećana produkcija ROS nađena je u različitim patološkim stanjima, kanceru, dijabetesu, aterosklerozi, neurodegenerativnim bolestima, reumatoidnom artritisu, stanjima ishemije/reperfuzije, kao i pri starenju i starenjem izazvanim oboljenjima. U narušenoj ravnoteži ROS oštećuju se lipidi, proteini, nukleinske kiseline i ugljene hidrate. Lipidna peroksidacija je najbolje izučen proces, serija lančanih slobodno-radikalnih reakcija koje dovode do razaranja PUFA, što za posledicu ima razaranje ćelijskih membrana i smrt ćelija. Ispitivanje efekata tretmana sa EPA i DHA na parametre oksidativnog stresa zaokuplja naučnu pažnju kako u epidemiološkim humanim

studijama, tako i na animalnim modelima. Studije sa animalnim modelima omogućavaju ispitivanja efekata suplementacije u sistemskej cirkulaciji, ali i u organima što doprinosi njihovom potpunijem razumevanju.

Starenju kao biohemijskom procesu doprinose genetski potencijali vrste. Postojeće teorije starenja su se složile u jednom da kalorijska restrikcija ili inaktivacija nutrijentno-zavisnih puteva predstavljaju mehanizme koji deluju na produženje života kod različitih eukariota. Starenje, kao posledica metaboličkih aktivnosti, utiče na organizme. Veruje se da je nemoguće izbeći oksidativna oštećenja koja doprinose starenju. Ispitivanje efekata tretmana sa EPA i DHA na parametre oksidativnog stresa kod osoba različite starosne dobi je, stoga, od interesa.

Cilj istraživanja ove doktorske teze bio je ispitivanje efekata hronične suplementacije ribljim uljem na biohemijske parametre u krvi, na masnokiselinske profile fosfolipida plazme i jetre, i na parametre oksidativnog stresa u krvi i jetri pacova Wistar soja, različite starosne dobi.

Iz datog cilja proistekli su sledeći zadaci:

- Odrediti masnokiselinski sastav u kapsuli ribljeg ulja sa GC/MS.
- Odrediti vrednosti biohemijskih parametara plazme u kontrolnim grupama i grupama tretiranim ribljim uljem na početku i na kraju tretmana.
- Tretirati pacove Wistar soja različite starosne dobi (3 i 22 meseca) u trajanju od šest nedelja ribljim uljem.
- Analizirati masnokiselinske profile fosfolipida plazme i jetre kontrolnih grupa životinja i grupa tretiranih ribljim uljem, na početku i na kraju tretmana, metodom gasne hromatografije.
- Odrediti vrednosti parametara oksidativnog stresa. (spektrofotometrijskim metodama, ELISA metodom i elektroforezom), kod tretiranih i netretiranih životinja, na početku i na kraju eksperimenta.
- Porediti masnokiselinske profile fosfolipida i parametre oksidativnog stresa u krvi i jetri kod netretiranih i tretiranih životinja u odnosu na starosno doba.

Dobijeni rezultati bi trebalo da daju doprinos boljem razumevanju procesa starenja i efekata suplementacije ribljim uljem kod starih u odnosu na mlade životinje.

## II PREGLED LITERATURE

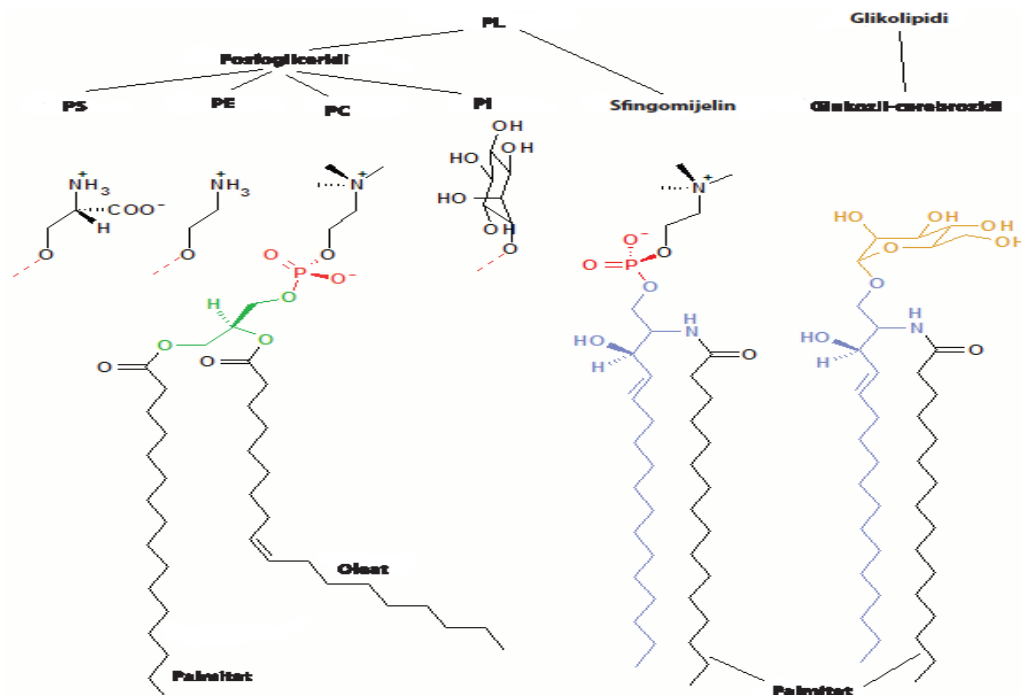
Lipidi (grčki: *lipos*-mast) su heterogena grupa organskih jedinjenja čija je zajednička karakteristika nerastvorljivost u vodi, a uloge u organizmu su im mnogobrojne. Lipidi su estri masnih kiselina i alkohola-holesterola, glicerola i sfingozina. Lipidi predstavljaju izvore energije, strukturni su i funkcionalni elementi ćelijskih membrana, izvor esencijalnih masnih kiselina, nosači liposolubilnih vitamina. Oni cirkulišu u krvi u formi lipoproteina, čestica koje pored proteina sadrže holesterol-estre, triacilglicerole i fosfolipide. Lipidi se dele prema hemijskom sastavu, naelektrisanju i funkciji. Nastaju od biohemijskih jedinica „gradivnih blokova“ ketoacil- i izoprenske grupe. Prema naelektrisanju dele se na neutralne (trigliceridi, holesterol, holesterol-estri) i polarne (fosfolipidi i glikolipidi). Prema biološkoj funkciji dele se na rezervne (trigliceridi), strukturne (holesterol, fosfolipidi i glikolipidi) i lipide kao signalne molekule. Amfipatična struktura nekih lipida omogućava im formiranje lipozoma (fosfolipidni dvosloj). I ako sisari koriste različite metaboličke puteve za razgradnju i sintezu lipida, neki esencijalni lipidi moraju se unositi hranom (Dowhan, 2002).

### 2.1. Fosfolipidi, sastav, podela i funkcija

Fosfolipidi (PL) su složeni lipidi koji se sastoje od ostataka alkohola (glicerola ili sfingozina), masnih kiselina (MK), fosforne kiseline i azotne baze (slika 1).

U zavisnosti od alkohola koji ulazi u sastav fosfolipida dele se na glicerofosfolipide i sfingofosfolipide. Fosfolipidi su amfipatični molekuli i kao takvi glavna su komponenta ćelijske membrane (lipidni dvosloj). Hidrofilne glave fosfolipida sadrže negativno naelektrisane fosfatne grupe, dok se hidrofobni rep sastoji od ostataka masnih kiselina i okrenut je ka unutrašnjosti lipidnog dvosloja (slika 2). Od prirode polarnih grupa i njihove jonizacije zavisi naelektrisanje fosfolipida (Athenstaedt, 2006). Neutralni PL su fosfatidilholin, fosfatidiletanolamin, sfingofosfolipidi i lizofosfatidilholin, dok su kiseli PL fosfatidilinozitol, fosfatidilserin, bis(monoacil)glicero-fosfat (prisutan u lizozomima) i kardiolipin (prisutan u mitohondrijama). U ćelijskoj membrani PL imaju asimetričan raspored, kiseli su lokalizovani na unutrašnjoj strani membrane a neutralni ka spoljnoj strani i izmedju njih postoji stalna dinamička ravnoteža sa PL plazme. Nivoi PL i njihovih

frakcija u plazmi (fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, sfingofosfolipida i lizofosfatidilholina) su direktan odraz membranskih PL (Bloom,1991).

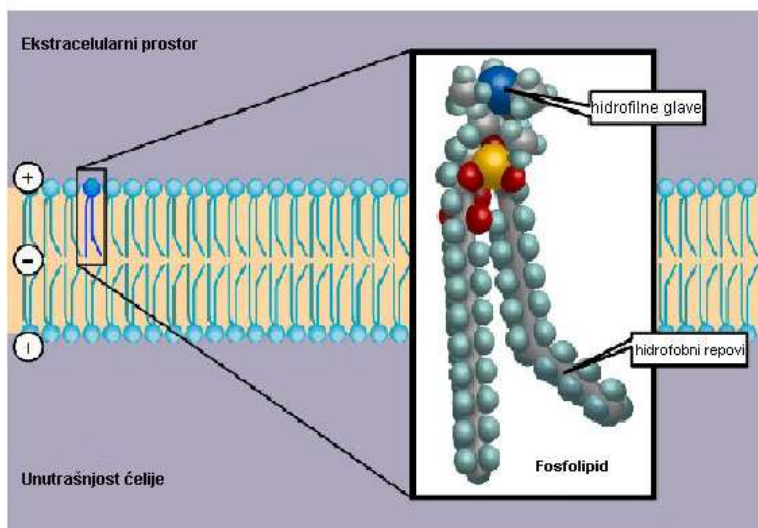


**Slika 1.** Membranski fosfolipidi i glikolipidi: PL-fosfolipidi, PC-fosfatidil-holin, PE-fosfatidil-etanolamin, PI-fosfatidil-inozitol, PS-fosfatidil-serin

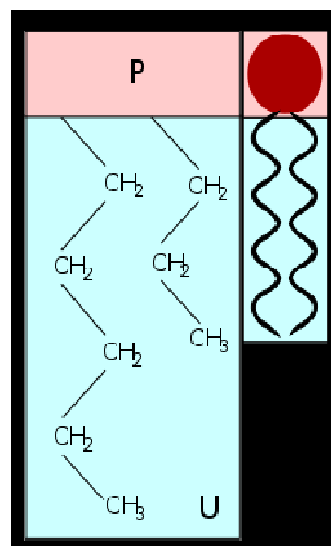
Fosfolipidi omogućavaju održavanje integriteta svih ćelijskih membrana, prenos signala hormona, influks jona kalcijuma. Velika pokretljivost fosfolipida (lateralna difuzija i mobilnost između spoljašnjeg i unutrašnjeg sloja-flip/flop mehanizam) baziraju se na mogućnosti prelaska iz gel (u kome su čvrsto upakovani) u sol stanje (tečno). Dužina ugljovodoničnog lanca MK koje ulaze u sastav PL, njihova nezasićenost, sadržaj holesterola u membrani su faktori koji utiču na fluidnost i funkcionalnost membrana.

Održavanje plazma membrane u polučvrstom stanju je preduslov transmembranskog transporta (Kent, 1995).

a)



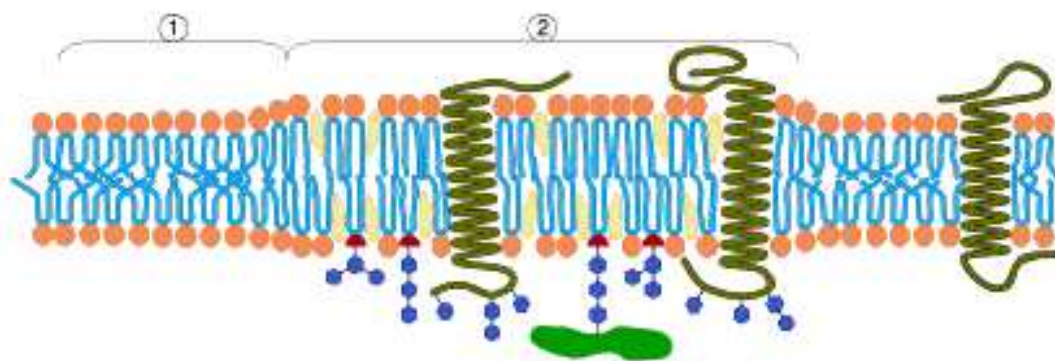
b)



**Slika 2.** Shematski prikaz membranskog lipidnog dvosloja: **a)** modela molekula fosfolipida, sastojka membrane **b)** glave i repa fosfolipida (crveni krug-polarne glave molekula, U-hidrofolbni deo molekula)

Za membrane su karakteristični tzv. lipidni premosti (eng. rafts) (slika 3). Lipidni splavovi, premosti (nazivaju se još i lipidni mikrodomeni), su plazma membranski regioni od 100-200 nm poluprečnika, smanjene fluidnosti. Bogati su holesterolom, fosfolipidima i sfingolipidima. Kaveole su delovi tih lipidnih premosta, pljosnate strukture i predstavljaju invaginacije membrane bogate u holesterolu, sfingolipidima i holesterol- vezujućem proteinu kaveolinu, koji je uključen u brojne signalne puteve (Ma, 2007). Membranski premosti imaju funkciju jonskih kanala (neuroni), a i ciljne su mete acilovanih proteina (Pristera, 2012). Izmene u dijetarnom unosu MK modifikuju strukturu premosta u skladu sa njihovom nezasićenošću. Mnogobrojne studije bavile su se ulogama pojedinih MK u menjanju lipidnih premosta, u menjanju njihove veličine, okruženja i distribucije što može uticati na produkciju nekih citokina u inflamatornim stanjima (Brown, 2000, Ehringer, 1990).





Slika 3. Shematski prikaz lipidnog dvosloja membrane: 1. standardni lipidni dvosloj 2. lipidni premost (eng.raft)

### 2.1.1. Metabolizam fosfolipida

Formiranje, razgradnja i obnavljanje membrane predstavlja dinamičan i stalan proces. Sintaza fosfolipida odvija se u citosolu u okolini membrane endoplazmatičnog retikuluma koja je bogata proteinima koji u toj sintezi učestvuju.

Metabolički put PL (glicerofosfolipida ili sfingolipida) ide preko formiranja CDP-odgovarajućih derivata. U reakciji CDP-diacilglicerola (aktivirani molekul fosfatidne kiseline) i inozitola nastaje fosfatidil-inozitol. Fosfatidiletanolamin u reakciji sa serinom sintetiše fosfatidil-serin reverzibilnom izmenom baze PE sa molekulima L-serina. Sfingolipidi (SPL) se sintetišu reakcijom CDP-holina, sfingozina i acil-CoA ili alternativno preko ceramida (N-acetil-sfingozina). Ukratko, adenzin trifosfat (ATP) fosforiliše OH grupu holina ili etanolamina uz pomoć holin-kinaze i etanolamin-kinaze i nastaju fosfoholin ili fosfoetanolamin. Oni se aktiviraju u reakciji sa CTP, dolazi do stvaranja CDP-holina i CDP-etanolamina. Iz CDP-holina i CDP-etanolamina, u reakciji sa 1,2-diacilglicerolom (DAG) nastaje fosfatidil-holin (lecitin) i fosfatidil-etanolamin. (Dowhan, 2002).

## 2.2. Masne kiseline

Masne kiseline (MK) su karboksilne kiseline sa dugim nerazgranatim ugljovodoničnim lancem (repom). Lanac MK sadrži najčešće paran broj ugljenikovih atoma (4-28). Najzastupljenije su MK sa 16 i 18 C- atoma. Prema broju ugljenikovih atoma u lancima dele se na MK kratkih lanaca (sadrže < 8 C-atoma), srednjih (sadrže 8-12 C-atoma) i dugih lanaca (sadrže > 12 C- atoma) (Ehringer, 1990).

U zavisnosti od prisustva ili odsustva dvogubih veza MK mogu biti zasićene (eng.saturated fatty acids, SFA) i nezasićene. Prema broju dvogubih veza mogu biti mononezasićene MK (MUFA-eng. monounsaturated fatty acids) i polinezasićene MK (PUFA-eng. polyunsaturated fatty acids) (Tvrzicka, 2011). PUFA karakteriše pentadienska (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) struktura dvostrukih veza. Prema konfiguraciji dvogubih veza masne kiseline se javljaju u *cis* (preovladava u prirodi) i *trans* konfiguraciji. Masnokiselinski profili su specifični za vrste i za tkiva. U životinjskim tkivima najzastupljenije su MK sa 16 i 18 C-atoma (palmitinska, stearinska, oleinska i linolenska kiselina). Masne kiseline sisara dostižu dužinu lanca od 24 C-atoma, i 6 dvogubih veza. MK sa lancima kraćim od 14 i dužim od 22 C-atoma su prisutne u zanemarljivim koncentracijama (Nelson, 2005). U Tabeli 1 prikazane su MK koje se najčešće sreću u životinjskim mastima.

Masne kiseline se u organizmu mogu naći u dva oblika: kao slobodne (free fatty acids-FFA ili NEFA) ili esterifikovane MK. U fiziološkim uslovima slobodne MK su u jonizovanom obliku. U plazmi slobodne masne kiseline su reverzibilno vezane za albumin, a u manjem iznosu za globuline i lipoproteine (oko 5% od ukupnih MK u krvi). Najveći deo MK u cirkulaciji je esterifikovan, vezan u obliku triglicerida, holesterol-estara i fosfolipida (Simopoulos 1999).

Naziv masne kiseline	Naziv
<b>zasićene masne kiseline</b>	
buterna	C 4:0
kapronska	C 6:0
kaprilna	C 8:0
kaprinska	C 10:0
laurinska	C 12:0
miristinska	C 14:0
palmitinska	C 16:0
stearinska	C 18:0
arahinska	C 20:0
behenska	C 22:0
<b>mononezasićene masne kiseline</b>	
palmitoleinska	C 16:1 n-7
oleinska	C 18:1 n-9
gondonska	C 20:1 n-9
eručna	C 22:1 n-9
<b>polinezasićene masne kiseline</b>	
linolna (LA)	C 18:2 n-6
gama-linoleinska (gama-LNA ili GLA)	C 18:3 n-6
α-linoleinska (αLNA ili ALA)	C 18:3 n-3
dihomo gama-linolenska (DHGLA)	C 20:3 n-6
eikozatrienska	C 20:3 n-9
arahidonska (AA)	C 20:4 n-6
eikozapentaenska (EPA)	C 20:5 n-3
dokozatetraenska	C 22:4 n-6
dokozapentaenska	C 22:5 n-6
dokozaheksaenska (DHA)	C 22:6 n-3

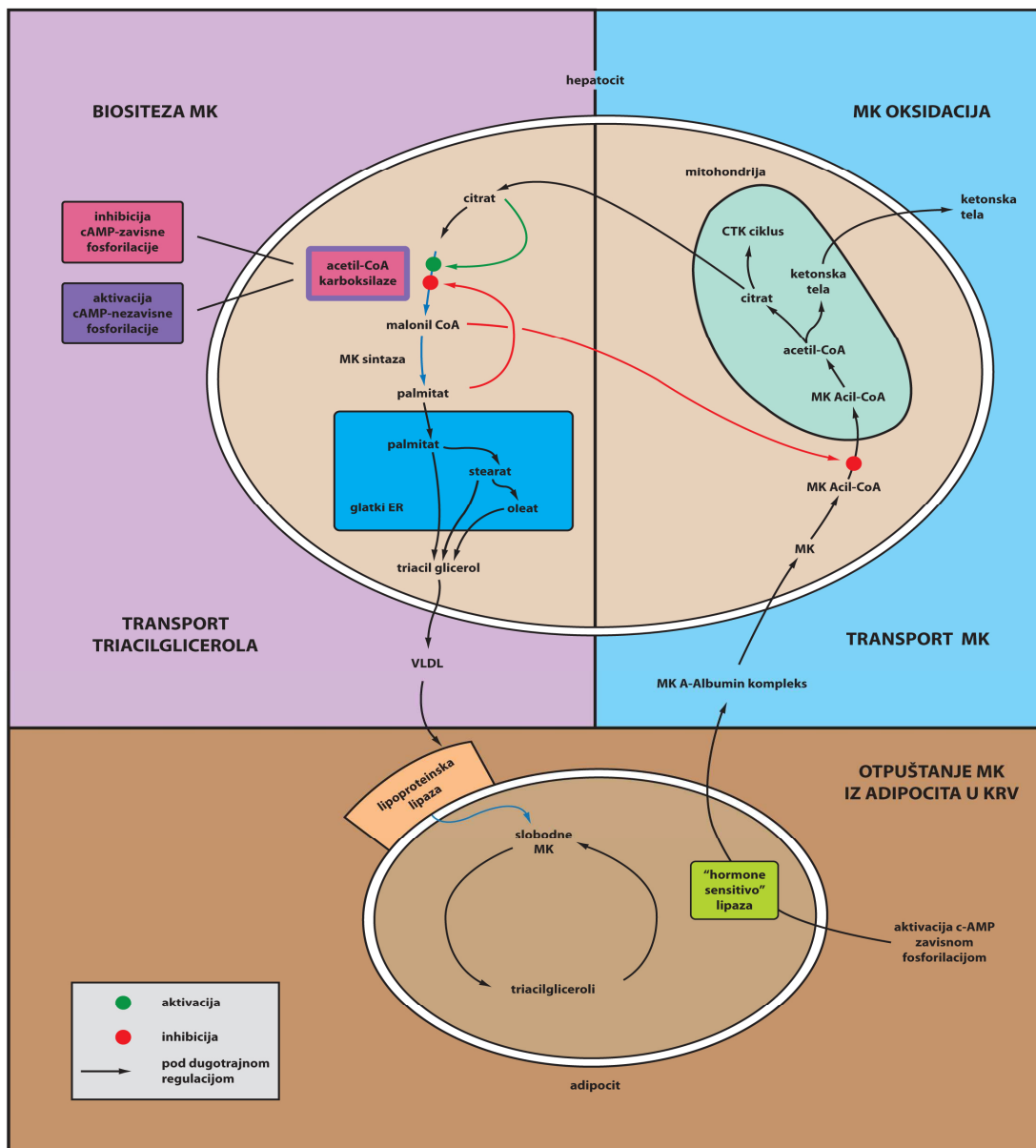
Tabela 1. MK koje se najčešće nalaze u životinjskim mastima

### 2.2.1. Biosinteza masnih kiselina i regulacija

*De novo* sinteza MK odvija se u jetri, masnom tkivu, plućima, mozgu. Acetil-CoA je prekursor svih ugljenikovih atoma u MK. Nastaje razgradnjom aminokiselina (citosolni), oksidativnom dekarboksilacijom piruvata,  $\beta$ -oksidacijom MK u mitohondrijama. Sinteza MK započinje karboksilacijom acetil-CoA do malonil-CoA u prisustvu acetil-CoA-karboksilaze. Procesima redukcije i dehidratacije (četiri reakcije) dolazi do elongacije butiril-SACP uz potrošnju NADPH do 16 C-atoma, tj. palmitoil-CoA (Gunstone, 1994). Ukratko, acetil-CoA i ACP (acil-noseći protein) uz pomoć acetil-CoA ACP-transacilaze stvara acetil-ACP, koji u reakciji sa malonil-ACP-om daje acetoacetil-ACP. Acetioacetil-ACP se uz pomoć NADPH i enzima  $\beta$ -ketoacil-ACP-reduktaze redukuje do D- $\beta$ -hidroksibutiril-ACP. Procesom dehidratacije, u prisustvu  $\beta$ -ketoacil-ACP-dehidrataze, nastaje  $\alpha,\beta$ -trans-butenoil-ACP. Uz učešće molekula NADPH i enzima enoil-ACP-reduktaze nastaje butiril-SACP. U nastavku kroz 6 ponovljenih krugova elongacije nastaje palmitoil-ACP, odnosno palmitat (Slika 4).

Enzim MK sintaza (eng. fatty acid syntase-FAS) je glavni multifunkcionalni enzim koji katalizuje sveukupan put palmitata (Smith 2003). FAS je aktivna u jetri i adipoznom tkivu. Uloga u *de novo* sintezi varira medju vrstama. Kod ljudi, jetra je glavno mesto *de novo* lipogeneze, dok se kod pacova sinteza masnih kiselina odvija i u jetri i u adipoznom tkivu (Pullen 1990). Regulacija enzimske aktivnosti odvija se kroz nekoliko mehanizama. Aktivacija FAS se reguliše hormonima (insulin, glukagon) (Sul, 2000). Insulin aktivira sintazu MK dok glukagon i kateholamini inhibiraju njenu aktivnost (cAMP-zavisnom fosforilacijom). Regulacija aktivnosti FAS se takođe odvija i sa intracelularnom koncentracijom MK, njihovo povećanje smanjuje FAS aktivnost (Wiegman 2003). Regulacija genske ekspresije acetil-CoA- karboksilaze, komponente FAS insulinom i sa MK je uglavnom posredovana transkripcionim faktorima, kao što su sterol- regulatorni element-vezujući proteini (SREBPs) (Kim 2002), a delimično i nuklearnim receptorima kao što su LXRs (Yamamoto 2007). Povećana ekspresija SREBP-1a značajno povećava ekspresiju gena, uključenih u sintezu holesterola i FAS, i izaziva odgovarajuću akumulaciju holesterola i triglicerida. Povećana ekspresija SREBP-1c uzrokuje samo selektivnu indukciju lipogenih gena, bez efekata na gene za sintezu holesterola (Eberle

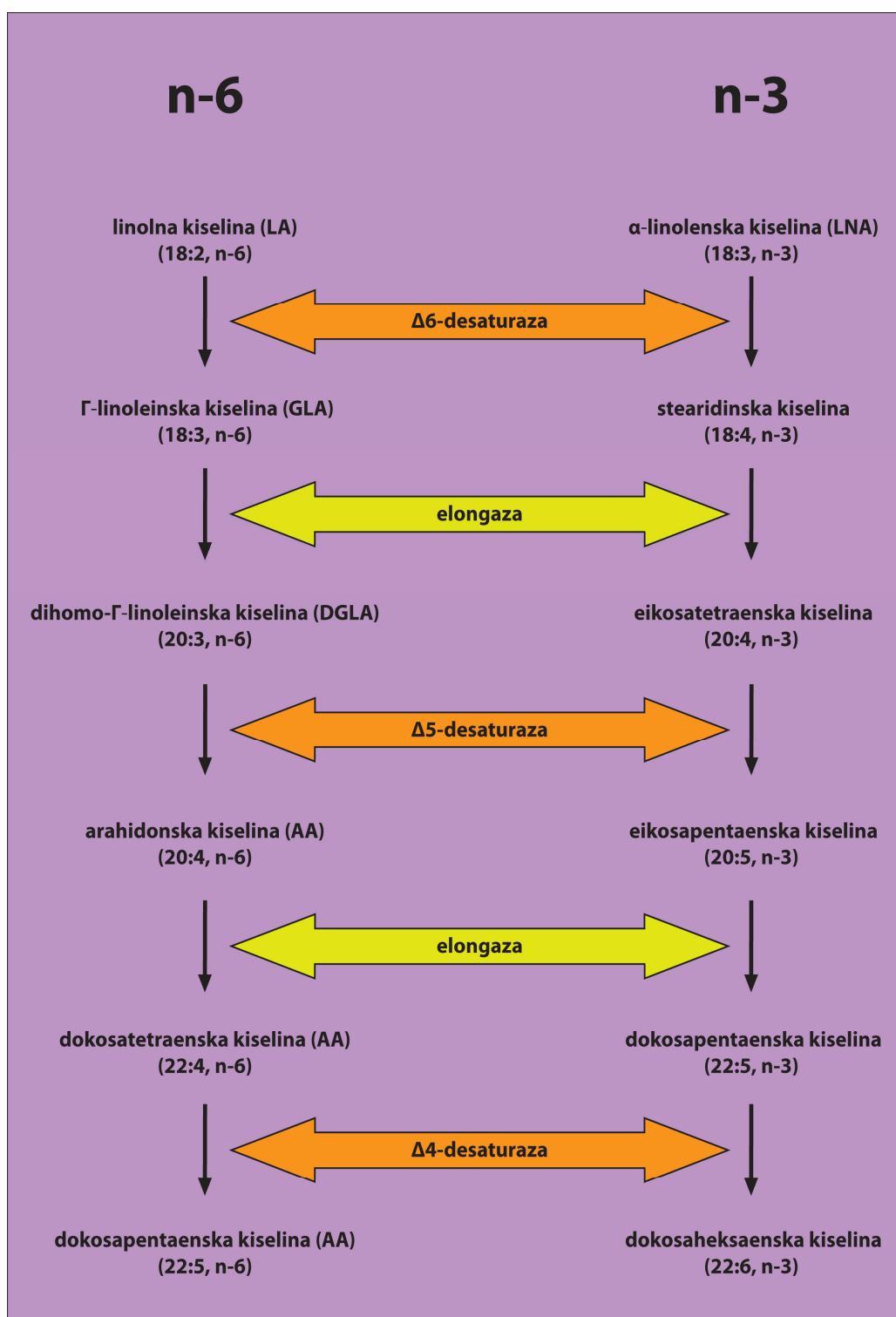
2004). SREBP-1 i FAS geni se eksprimiraju i koreliraju u tkivima koja sintetišu MK *de novo*.



Slika 4. Regulacija biosinteze i razgradnje MK

U sintezi masnih kiselina čiji je ugljovodonični niz duži od 16 C-atoma, kao i više nezasićenih MK učestvuju mikrozomalni enzimi elongaze i desaturaze. Elongacija MK se dešava kroz četiri koraka sukcesivne kondenzacije malonil-CoA i acil-CoA. Reakcije su praćene NADPH- redukcijom, dehidratacijom i ponovljenom redukcijom (NADPH) koje

vode elongaciji lanca (Larsson, 1994). Sistemi desaturaza katalizuju stvaranje dvostrukih veza u molekulima MK. Kod sisara postoje 4 tipa desaturaza  $\Delta^9$ ,  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$ ,  $\Delta^4$ . Supstrati su im aktivirane MK u formi acil-CoA (iz organizma ili unete hranom). Delovanjem desaturaza nastaju MK n-9, n-6 i n-3 serije, metaboliti palmitinske, linolne (LA) i  $\alpha$ -linolenske kiseline (ALA). Desaturacija LA i ALA se odvija pod dejstvom  $\Delta^6$ -desaturaze, dok je desaturacija dihomogama-linolenske do arahidonske kiseline (AA) određena aktivnošću  $\Delta^5$ -desaturaze (Slika 5). Sisari nemaju  $\Delta^{12}$  i  $\Delta^{15}$ -desaturaze koje katalizuju konverziju oleinske kiseline u LA i ALA. Zbog toga je *de novo* sinteza polinezasićenih n-6 i n-3 MK neizvodljiva. Budući da su bitne za organizam moraju se unositi hranom biljnog i životinjskog porekla. U organizmu čoveka one pomažu funkcionisanju ćelija i organa, a od njih se stvaraju jedinjenja slična hormonima (prostaglandini, leukotrieni) koji utiču na vaskularni tonus, zgrušavanje krvi, nivo lipida u krvi, imunološko stanje. Dejstvom  $\Delta^9$ -desaturaze u jetri (stearil-CoA desaturaze), uvodjenjem dvogube *cis* veze na  $\Delta^9$  položaju (pri čemu iz stearil-nastaje oleil-CoA, dok iz palmitoil- nastaje palmitoleil-CoA) vrši se konverzija SFA u MUFA (Kim, 1989).



Slika 5. Biosinteza n-6 i n-3 familije polinezasićenih MK

### 2.2.2. Razgradnja masnih kiselina i regulacija

Masne kiseline, pre nego što se oksiduju, moraju da se aktiviraju u ATP-zavisnoj reakciji acilovanja u kojoj nastaje acil-CoA. Proces aktivacije je katalizovan sa najmanje tri acil-CoA sintaze (tiokinaze), nastajanjem acil-CoA prethodi stvaranje acil-adenilat anhidrida. Iako se aktivacija masnih kiselina dešava u citosolu, oksidacija se odvija u mitohondrijama, dakle neophodan je transport acil-CoA kroz unutrašnju membranu mitohondrija (Mead, 1958).

Proces translokacije posredovan je specifičnim proteinskim nosačem (CPT-I) koji transportuje acil-karnitin u mitohondriju, a slobodan karnitin u citosol (Kerner and Hoppel, 2000). Acil-CoA transport se obavlja kroz četiri reakcije: acil-grupa citosolnog acil-CoA se prenosi na karnitin, tako uz oslobađanje CoA u citosol. Acil-karnitin se transportuje u mitohondrijalni matriks transportnim sistemom. Energija oslobođena hidrolizom acil-karnitina omogućava prenos acil-grupa na CoA, a oslobođeni karnitin se vraća u citosol. Čelija na taj način održava citosolni i mitohondrijalni „pool“ CoA. Mitohondrijalni CoA učestvuje u oksidativnoj degradaciji piruvata i nekih AK, dok citosolni učestvuje u biosintezi masnih kiselina (Bridle 1985).

Beta-oksidacija masnih kiselina se odvija kroz 4 reakcije: Iz acil-CoA, uz pomoć enzima acil-CoA dehidrogenaze, formira se trans- $\alpha,\beta$  dvostruka veza, odnosno nastaje trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA. Hidratacijom dvostruke veze, u prisustvu enoil-CoA-hidrataze stvara se 3-L-hidroxiacil-CoA. Dehidrogenizacijom  $\beta$ -hidroxiacil-CoA, uz pomoć 3-L-hidroxiacil-CoA-dehidrogenaze nastaje  $\beta$ -ketoacil-CoA. Raskidanjem  $C_\alpha$ - $C_\beta$  veze u reakciji tiolize (Claisen estarskim cepanjem), pomoću tiol-grupe drugog molekula CoA, u prisustvu  $\beta$ -ketoacil-CoA-tiolaze, formira se acetil-CoA i novi acil-CoA, koji sadrži 2C atoma manje nego početni (Macfarlane, 2008).

Mitohondrija sadrži 3 acil-CoA-dehidrogenaze specifične za kratke, srednje i dugolančane MK-acil-CoA. Reakcija katalizovana ovim enzimom uključuje uklanjanje protona sa  $C_\alpha$  i transfer vodonikovog jona sa  $C_\beta$  na FAD. Rezultujući  $FADH_2$  se reoksiduje u mitohondrijalnom elektron-transportnom lancu. Deficijencija ovog enzima može dovesti do iznenadne smrti novorodjenčadi (McGarry 1989).

Svaki krug oksidacije masnih kiselina produkuje 1NADH, 1FADH<sub>2</sub>, 1acetil-CoA. Oksidacija acetil-CoA u CTK ciklusu generiše dodatno 1FADH<sub>2</sub> i 3NADH koji se



reoksiduju kroz oksidativnu fosforilaciju uz stvaranje ATP-a. Kompletna oksidacija molekula MK je egzoterman proces, u kom nastaje puno molekula ATP. (npr. oksidacijom palmitinske kiseline dobija se 129 molekula ATP).

Pod uslovima kad je povećano preuzimanje MK jetra često produkuje velike količine ketonskih tela, acetoacetata i beta-hidroksibutirata u procesu ketogeneze. Ketogeneza je povećana i kada nizak nivo insulina dovodi do aktivacije CPT-I povećanog transfera MK u mitohondrije. Konverzija acetil-CoA do ketonskih tela (pre nego kompletna oksidacija u CTK ciklusu) rezultuje smanjenom sintezom ATP/mol MK (Hegardt 1999).

Ketogeneza (kao i biosinteza holesterola) je kontrolisana indirektno sa CPT-I i direktno aktivnošću mitohondrijalnog regulatornog enzima 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintaze. Aktivnost se reguliše preko dva mehanizma: sukcinilacijom (kratkoročna regulacija) i transkripcijom (dugoročna regulacija). Kada se sukcinil-CoA „pool“ poveća, kao rezultat povećanog fluksa glikogenskih metabolita, sukcinil- grupa se vezuje za regulatornu subjedinicu HMG-CoA sintaze, čime se enzim inaktivira. Oba kontrolna mehanizma su pod uticajem nutritivnih i hormonskih faktora (McGarry 1989).

### **2.2.3. Masne kiseline i njihova biološka uloga**

#### **2.2.3.1. Zasićene masne kiseline**

Kratkolančane zasićene masne kiseline (SFA), kao što su sirćetna kiselina (2:0), propionska (3:0) i buterna kiselina (4:0), nastaju defragmentacijom vlakana u proksimalnom kolonu (debelom crevu). Buterna kiselina i delimično propionska kiselina koriste se u metabolizmu, proliferaciji i ćelijskoj replikaciji kolonocita (Gunstone 1994).

Kaprilna (8:0) i kaprinska (10:0), koje se direktno resorbuju, su MK srednjih lanaca. Njihov intramitohondrijski transfer ne zahteva prisustvo karnitina ili karnitin-palmitoil-transferaza. MK srednjih lanaca koriste se u enteralnoj ishrani za vreme kalorijske restrikcije, za vreme nekih strogo određenih režima ishrane (kod gojaznih pacijenata).

Dugolančane SFA, laurinska (12:0), miristinska (14:0), palmitinska (16:0) i stearinska (18:0), imaju značajan aterogeni i trombogeni potencijal. Unos dugolančanih SFA povećava nivo serumskog holesterola, LDL-holesterola (eng. low density lipoproteins), što je povezano sa gojaznošću i vodi ka povećanom riziku od kardiovaskularnih oboljenja

(CHD). Stearinska kiselina ima protektivni efekat na proces ateroskleroze. Povećanje SFA u membranskim lipidnim premostima još uvek nije razjašnjeno (Nelson 2005).

SFA vrlo dugačkih lanaca behenska (22:0), lignocerinska (24:0) javljaju se u značajnim koncentracijama kod naslednih metaboličkih poremećaja (Zellweger-ov sindrome, Refsum-ova bolest). Kod obolelih od ovih bolesti, pozitivni efekti postižu se suplementacijom n-3 PUFA.

### 2.2.3.2. Mononezasićene masne kiseline

Mononezasićene masne kiseline (MUFA) su *cis* konfiguracije. Glavni predstavnici MUFA su oleinska kiselina (18:1 n-9), vascenska (18:1 n-7) i palmitoleinska kiselina (16:1 n-7). Oleinska kiselina ima antiaterogena i antitrombična svojstva, povećava odnos HDL/LDL holesterola. Inkorporacija oleinske kiseline u holesterol-estre, trigliceride i fosfolipide lipoproteinskih čestica ima uticaj na smanjenje lipoproteinske oksidacije. U sastavu membranskih lipida oleinska kiselina reguliše fluidnost ćelijske membrane, efikasnost transmembranskog transporta i utiče na transdukciju signala (Mead 1971).

Mononezasićene masne kiseline *trans* konfiguracije su elaidinska (18:1 n-9t) i trans-vascenska (18:1 n-7t) kiselina. Trans-masne kiseline ispoljavaju aterogene efekte. Glavni izvori trans MK su margarini nastali iz hidrogenizovanih biljnih ulja korišćenjem neodgovarajućeg katalizatora. Hidrogenizovane masti koriste se u industriji brze hrane, ali primenom novih tehnoloških procesa značajno je smanjena produkcija *trans*-masnih kiselina (Larson 1994).

### 2.2.3.3. Polinezasićene masne kiseline

Polinezasićene MK (PUFA) imaju više dvogubih veza. U organizmu učestvuju u: regulaciji rasta i razvoja, razvoja retine i moždanih funkcija, regulaciji imunog odgovora, utiču na pojavu karcinogeneze. Endogene PUFA uglavnom pripadaju n-9 familiji MK. Linolna kiselina (18:2, n-6) i  $\alpha$ -linolenska kiselina (18:3, n-3) su esencijalne MK koje se moraju unositi hranom, dakle ne mogu se sintetisati *de novo*. Esencijalne MK imaju antiaterogene i antitrombične efekte. Utiču na koncentraciju lipoproteina, membransku

fluidnost, funkciju membranskih enzima i receptora, modulaciju produkcije eikozanoida, regulaciju krvnog pritiska i na metabolizam minerala (Tvrzicka, 2011).

#### **2.2.3.4. n-3 masne kiseline**

Prekursor n-3 PUFA familije je  $\alpha$ -linolenska kiselina (18:3, n-3; ALA). Glavni metabolički proizvodi su eikozapentaenska (EPA, 20:5, n-3) i dokozaheksaenska kiselina (DHA, 22:6, n-3) kao i dokozapentaenska kiselina (DPA, 22:5, n-3). Izvori ALA su semena i lišće biljaka kao što su lan, soja, ribizla i njihova ulja. Metaboliti EPA i DHA mogu se uzimati iz ribe (sardina, losos, tuna) i ribljih preradevina i ulja. Kao ligandi peroksizomalnog proliferišućeg aktiviranog receptora (PPAR- $\alpha$ ), n-3 PUFA imaju efekte na metabolizam lipida. Smatra se da PPAR- $\alpha$  smanjuju lipogenezu i VLDL sekreciju supresijom SREBP-1 (eng. sterol response element binding protein). n-3 PUFA povećavaju aktivnost lipoproteinske lipaze, smanjuju koncentraciju C-III i potenciraju reversni transport holesterola. Imunomodulatorski efekti n-3 PUFA su povezani sa sposobnošću da supresuju aktivaciju T-limfocita. Aktivacija T-limfocita zahteva acilovane proteine lokalizovane u membranskim premostima ćelija. Povećano izlaganje n-3 PUFA ostavlja premoste praznim (SANC, 2004). Pri unosu n-3 PUFA dolazi do smanjene proizvodnje inflamatornih i hemotaktičkih derivata, čime se smanjuje incidenca za razvoj hroničnih zapaljinskih procesa i oboljenja. Adhezioni molekuli uključujući ICAM-1, VCAM-1 i E-selektin, putem ushodne regulacije olakšavaju kretanje imunih ćelija u tkiva. Suplementacija sa ALA kod ljudi, u epidemiološkim studijama, dovela je do redukcije plazma koncentracije solubilnog E-selektina, CRP-a, IL-1, IL-6. Redukcija proinflamatornih citokina povezana je smanjenim rizikom od nastanka kardiovaskularnih bolesti. EPA i DHA mogu inhibirati IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  produkciju od strane monocita i nastajanje IL-6 i IL-8 iz endotelnih ćelija. Povećana produkcija ovih citokina može biti rizična u stanjima zapaljenja (Schmitz, 2008).

#### **2.2.3.5. n-6 masne kiseline**

Prekursor n-6 familije PUFA je linolna kiselina (18:2, n-6; LA). Njeni metabolički produkti su  $\gamma$ -linolenska kiselina (GLA, 18:3, n-6), dihomo- $\gamma$ -linolenska (DHGLA, 20:3 n-6) i arahidonska kiselina (AA, 20:4, n-6), a u manjim koncentracijama to su dokozaetraenska (22:4, n-6) i dokozapentaenska (22:5, n-6) kiselina. Izvori n-6 PUFA su

suncokretovo ulje, ulje šafranike, ulje semenki groždja. U nižim koncentracijama nalaze se u ulju pšeničnih klica, kukuruznom ulju, susamovom ulju. PUFA n-6 su aktivatori PPAR- $\gamma$ . Utiču na produkciju citokina, povećavaju sintezu holesterola, i smanjuju konverziju VLDL u LDL. Suplementacija n-6 vodi smanjenju ukupnih LDL i HDL holesterola i povećanju osetljivosti LDL čestica na lipoperoksidaciju (ovaj efekat je rezultat ushodne regulacije LDL receptora i aktivacije Cyp7A1). Kao ligandi PPAR- $\gamma$  povećavaju insulinsku senzitivnost. Arahidonska kiselina je glavni prekursor eikozanoida koji su potentni signalni molekuli u i izvan ćelije (EFSA, 2010).

Poremećaj nivoa PUFA i odnosa n-6/n-3 PUFA u organizmu utiče, između ostalih faktora, na nastanak oboljenja kao što su: astma, neke autoimune bolesti, neurološka oboljenja, endokrinološki poremećaji, neka maligna oboljenja. Zbog toga je izbalansiran unos n-6 i n-3 važan za optimalan rast razvoj i funkcionisanje organizma (Sigal, 1991).

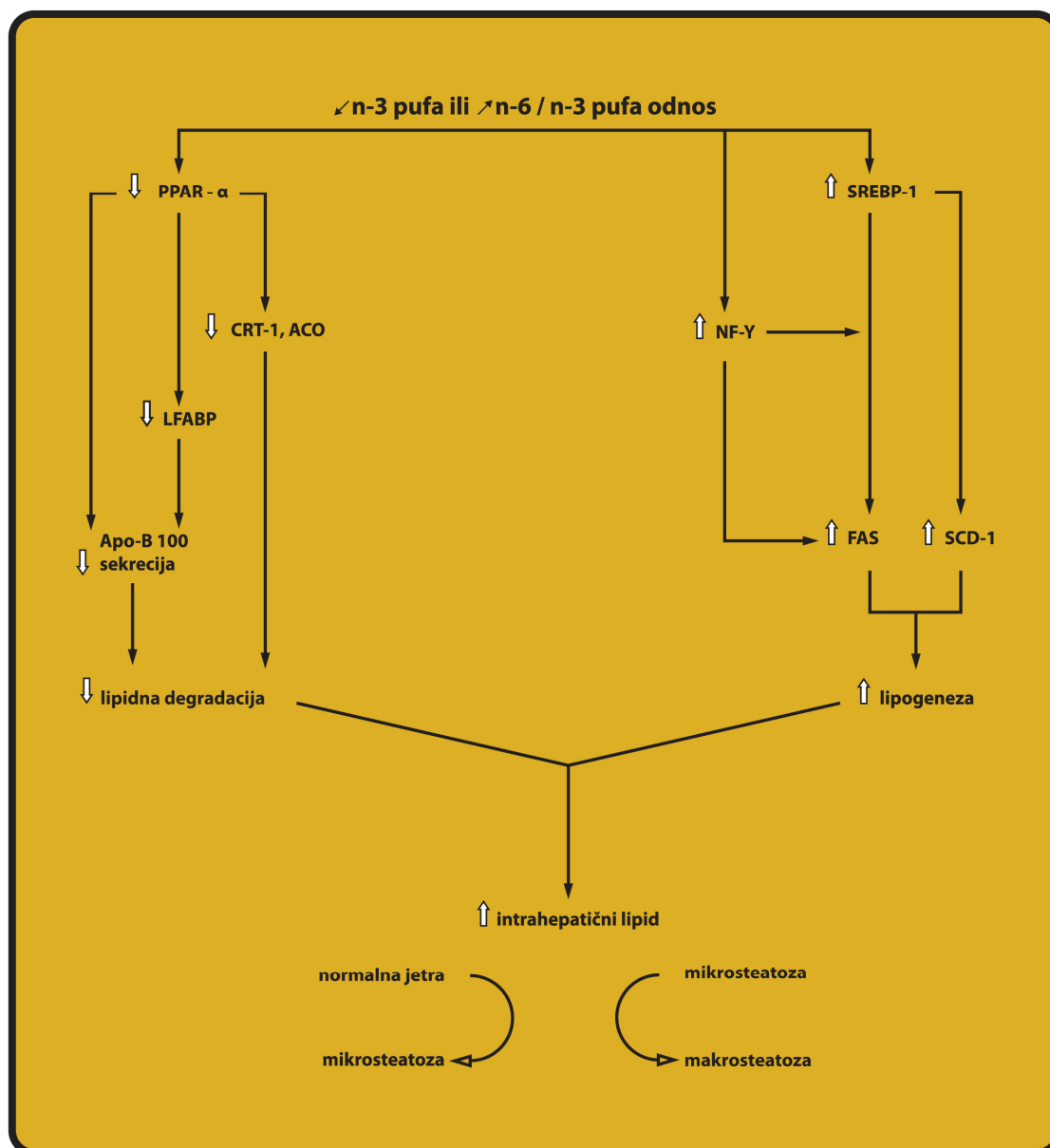
S obzirom na to da se n-6 i n-3 familije sintetišu iz pomenutih prekursora u prisustvu istog enzimskog sistema mikrozomalnih desaturaza i elongaza, reakcija koju katalizuje  $\Delta^6$  desaturaza je odlučujući korak, afinitet ovog enzima za supstrat određuje tok sinteze. Najveći afinitet  $\Delta^6$  desaturaza ima za ALA, manji za LA i najmanji za oleinsku kiselinu (Benatti, 2004).

#### **2.2.4. Uticaj masnih kiselina na regulaciju genske ekspresije**

ALA, EPA, DHA redukuju citokin-posredovanu indukciju ekspresije inflamatornih gena u ćelijskoj kulturi. Regulacija ekspresije inflamatornih gena posredovana je sa nuklearnim faktorom kB (NF-kB) i peroksizom-proliferativnim aktiviranim receptorima (PPARs). NF-kB u svojoj neaktivnoj formi ima inhibitornu subjedinicu, koja se stimuliše fosforilacijom i disosuje od ostatka neaktivnog NF-kB heterotrimeru. Preostala NF-kB jedinica prelazi u nukleus i reguliše transkripciju target gena (Fann YY, 2004). PPAR- $\alpha$  i  $\gamma$ - nađeni su u inflamatornim ćelijama. Regulisani su direktnim vezivanjem PUFA i eikozanoida (Devchand, 1996).

Unos EPA i DHA (kroz riblje ulje) redukuje nivoe mRNA za inflamatorne medijatore TNF-alfa, IL-1B, i IL-6 u animalnim studijama. Tako je potvrđena veza između inflamacije, EPA i DHA i genske ekspresije. PPARs su regulisani direktnim vezivanjem

EPA i DHA što rezultuje u smanjenoj LTB4 produkciji. *In vivo* EPA i DHA imaju potentnije dejstvo na PPARs od ostalih MK (Fann YY, 2003).



Slika 6. Uticaj n-3 i n-6 na gensku ekspresiju

### 2.2.5. Studije o suplementaciji n-3 masnim kiselinama i ribljim uljem

Poslednjih desetak godina uloga n-3 masnih kiselina je dosta izučavana. Suplementacija n-3 masnim kiselinama putem hrane, ulja, dijetetskih suplemenata u humanim, animalnim i *in vitro* studijama, doprinela je i izvođenju zaključaka o efektima n-3 MK na organizam. U studiji Breslow i saradnika, od 14 prospektivnih kohort studija u kojima su postojale suplementirane i nesuplementirane grupe ispitanika u 12 je suplementacija sa n-3 MK pokazala benefit efekte na kardiovaskularni sistem (Breslow, 2006). Takođe, u randomiziranim kontrolnim studijama (eng. randomized controlled studies), RCT (DART) zaključeno je da umeren unos ribe (2-3 porcije nedeljno, što odgovara dozi od 500-800 mg/dnevno n-3 (EPA+DHA)) može redukovati mortalitet kod ljudi koji su u fazi oporavka od infarkta miokarda (Levitan 2010). Zaključak o pozitivnom dejstvu na kardiovaskularni sistem zasnovan je na nekoliko efekata koje n-3 MK uključuju: prevencija aritmija različitih etiologija (Breslow, 2006), snižavanje triglicerida izmerenih u plazmi (El-Badry, 2007), snižavanje arterijskog pritiska (Far, 2010), smanjenje agregacije trombocita i poboljšanje vaskularne reaktivnosti (Anderson, 2009) kao i smanjenje inflamacije (Walter, 2008). U animalnim studijama izučavano je antiaritmično dejstvo ribljeg ulja, redukcija ventrikularne fibrilacije kod pacova (Chapman, 2000). *In vitro*, (Brown, 1999) dodavanje EPA i DHA u kulturi neonatalnih pacovskih kardiomiocita inhibiralo je indukciju tahiaritmija sa ekstracelularnim kalcijumom, acil-karnitinom, tromboksanom. Ovi istraživači su ispitivali efekte ribljeg ulja i na elektrofiziološka dejstva tj. generisanje akcionog potencijala u delimično depolarizovanim kardiomiocitima. U studiji Breslow-a i sar. posebno je naglašena uloga odnosa n-6/n-3 za koji postoje podaci da je do četrdesetih godina prošlog veka bio oko 4, danas dostigao i 10 pa čak i 20 što je krajnje zabrinjavajuće. Takođe u studiji se naglašava i uloga ALA kao prekursora n-3 i količine ALA koja bi se trebala uneti kako bi se dovoljne količine EPA i DHA sintetisale (Breslow, 2006)

Studija Wakatsu i sar bavi se ulogom n-3 PUFA u aktivaciji PPARs receptora. Naime, riblje ulje snižava nivo lipida u plazmi i jetri putem PPAR-nezavisnog mehanizma. U dijeti koja je podrazumevala riblje ulje snizio se plazma holesterol, kao i akumulacija triglicerida u jetri. Zaključak ove studije da je inhibirana ekspresija SREBP-1c ribljim uljem predstavlja glavni mehanizam redukcije nivoa lipida kod miševa (Wakatsu, 2010)

U studiji Barone i sar. (2006), izučavan je model (pacovi), NESH-a, nealkoholnog steatohepatitisa, čestog oboljenja kod ljudi sa ciljem da se ispita uloga n-3 MK. S obzirom da je eksperiment potvrdio da n-3 MK tretman doprinosi smanjenju oštećenja jetre, predložene su konkretne eksperimentalne terapije ribljim uljem kad je ova dijagnoza u pitanju, imajući u vidu ulogu n-3 PUFA u ushodnoj regulaciji PPAR- $\alpha$  ekspresije u jetri.

U studiji Anderson i Ma i sar, izučavani su odvojeni efekti ALA, EPA i DHA na kancerogena oboljenja, insulinsku rezistenciju, kardiovaskularne bolesti. Sudije (Denmark-Wahnefried, 2001, 2008, 2004) kod kojih je rađena suplementacija lanenim semenom (bogato sa ALA) kod muškaraca sa kancerom prostate pokazale su da je došlo do redukcije ćelijske proliferacije i povećanja apoptoze i smanjenja PSA (prostatičnog specifičnog antigena), ali se mora naglasiti da su studije pokazivale izvesne nedostatke i zahtevale još dopunjavanja kako u dizajnu tako i u količini merenih parametara. U studiji (Connolly, 1997) izvedenoj na miševima posle tretmana sa EPA+DHA u određenoj dozi dolazi do smanjenja rasta tumora prostate. Takodje veliki broj *in vitro* studija (du Toit, 1996) zaključuju o antikancerogenom delovanju ALA, dok tretman sa EPA i DHA dovodi do dozno-zavisne inhibicije humanih kancer ćelija (Rose, 1991). U nemalom broju studija pokazan je protektivni efekat EPA+DHA na rast tumora dojke i metastaze kod velikog broja modela glodara (pacova, miševa i sl) (Hubbard 1998, Rose, 1993).

n-3 PUFA povećavaju insulinsku senzitivnost, smanjujući inflamatorne medijatore. U studiji (Far, 2010) u koju su bile uključene žene sa gojaznošću i insulinskom rezistencijom suplementirane su sa EPA+DHA u dozi od 6g/dan, 6 nedelja, praćeni su im različiti faktori inflamacije koji su se po tretmanu smanjili u odnosu na početak studije. Studije na životinjama kod nekoliko modela gojaznosti i dijabetesa, suplementacija je popravila insulinsku rezistenciju i povećala koncentraciju insulin-zavisnog adiponektina. EPA i DHA redukuju mRNA nivoe inflamatornih medijatora kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 u različitim animalnim studijama. EPA i DHA preveniraju aloksanom indukovani dijabetes i popravljaju antioksidativni status u različitim tkivima kod pacova (Barre, 2008).

DHA tretman značajno utiče na lipidno okruženje kaveola u endotelnim ćelijama što rezultuje u selektivnom premeštanju kaveolina i eNOS, inhibira produkciju citokina i

signalizaciju što se može povezati sa DHA-indukovanim modifikacijama kaveola u aterosklerozi i drugim inflamatornim stanjima (Caramori, 2000).

EPA je važna komponenta lipida nervnih ćelija služeći kao prekursor sinteze prostaglandin-3, troponin-3 i LT-5. Pozitivni efekti EPA pokazani su u nekim neurološkim bolestima kao što je šizofrenija (Peet, 2001), suicidalna ponašanja (Perica, 2011). DHA ima ulogu u razvoju i strukturi moždanog tkiva i važna je za održavanje kognitivnog zdravlja kod ljudi. (Singh, 2005)

n-3 MK doprinose neuronalnoj membranskoj fluidnosti i održavanju integriteta delimično kroz nastajanje dokozanoida. Ovo je važno u retini gde je količina n-3 masnih kiselina i najveća. DHA reguliše ćelijski transport i sinaptičke funkcije (Lukiw, 2008). Neuroprotektivna uloga n-3 ogleda se kroz uticaj na ekspresiju nekih gena u CNS-u preko transkripcionih faktora, a mogu da utiču na neke neurotransmitere. Choikwon i sar. 6-nedeljni tretman sa PUFA smanjuje obim infarkta mozga posle ishemije/reperfuzije u poredjenju sa kontrolnom grupom bez tretmana.

### **2.3. Lipoproteini**

Hidrofobni karakter lipida sprečava njihov direktan transport u plazmi, pa se oni transportuju izmedju tkiva i organa putem čestica koje se označavaju kao lipoproteini. Svaka lipoproteinska čestica se sastoji iz hidrofobnog jezgra (koje se sastoji od nepolarnih komponenti: estara holesterola i triglicerida) i hidrofilnog omotača (koji sadrži amfipatični fosfolipidni dvosloj, neesterifikovani holesterol sa polarnom hidroksilnom grupom i apolipoproteine). Različiti sadržaji lipida i apolipoproteina u česticama uslovljavaju različita fizičko-hemijska svojstva ovih čestica (veličina, gustina, flotaciona konstanta i elektroforetska pokretljivost). Ultracentrifugiranjem razdvaja se pet glavnih klasa lipoproteina: hilomikroni, lipoproteini vrlo male gustine (VLDL), lipoproteini intermedijerne gustine (IDL), lipoproteini male gustine (LDL) i lipoproteini velike gustine (HDL).

Hilomikroni su lipoproteini male gustine, a vrlo velike čestice koje se nakon centrifugiranja izdvajaju iznad plazme u vidu mlečnog prstena. Sastoje se uglavnom iz egzogenih triglicerida i imaju ulogu transporta ovih molekula (Caramori, 2000).



Lipoproteini vrlo male gustine (VLDL) imaju ulogu u transportu endogeno sintetisanih triglicerida. Relativno su velike čestice. Sadrže i ostale lipidne komponente, a pre svega holesterol. Lipoproteini intermedijerne gustine (IDL) sadrže holesterol i trigliceride (Breslow, 1985). Lipoproteini male gustine (LDL) sadrže uglavnom holesterol u vidu estara holesterola, tako da je njihova glavna funkcija transport holesterola. Lipoproteini velike gustine (HDL) sadrže od lipidnih komponenti holesterol, fosfolipide i trigliceride. Njihova uloga je protektivna jer uklanjaju holesterol iz perifernih tkiva (Caramori, 2000).

### **2.3.1. Metabolizam lipoproteina**

Metabolizam lipida se odvija u više faza egzogenim i endogenim putem kroz procese lipidne kaskade. Nakon varenja lipida u crevima i njihove apsorpcije u enterocite lipidi se transportuju u vidu lipoproteina iz creva u jetru, što čini egzogenu fazu u metabolizmu lipida. Lipidi sintetisani u hepatocitima se iz jetre transportuju u periferno tkivo endogenim putem (Breslow, 1985). Ova dva puta se parcijalno preklapaju u stadijumu hidrolize čestica bogatih trigliceridima dejstvom enzima lipoproteinske i hepatične lipaze. Pored toga HDL transportuje holesterol iz perifernog tkiva ponovo u jetru što predstavlja reversni transport holesterola. U jetri se holesterol metaboliše u žučne kiseline i izlučuje iz organizma putem žuči i fecesa. Konačna ekstrahepatična koncentracija holesterola i stepen njegovog deponovanja u zidu krvnog suda, rezultat je ravnoteže ovih procesa (Brown, 1984).

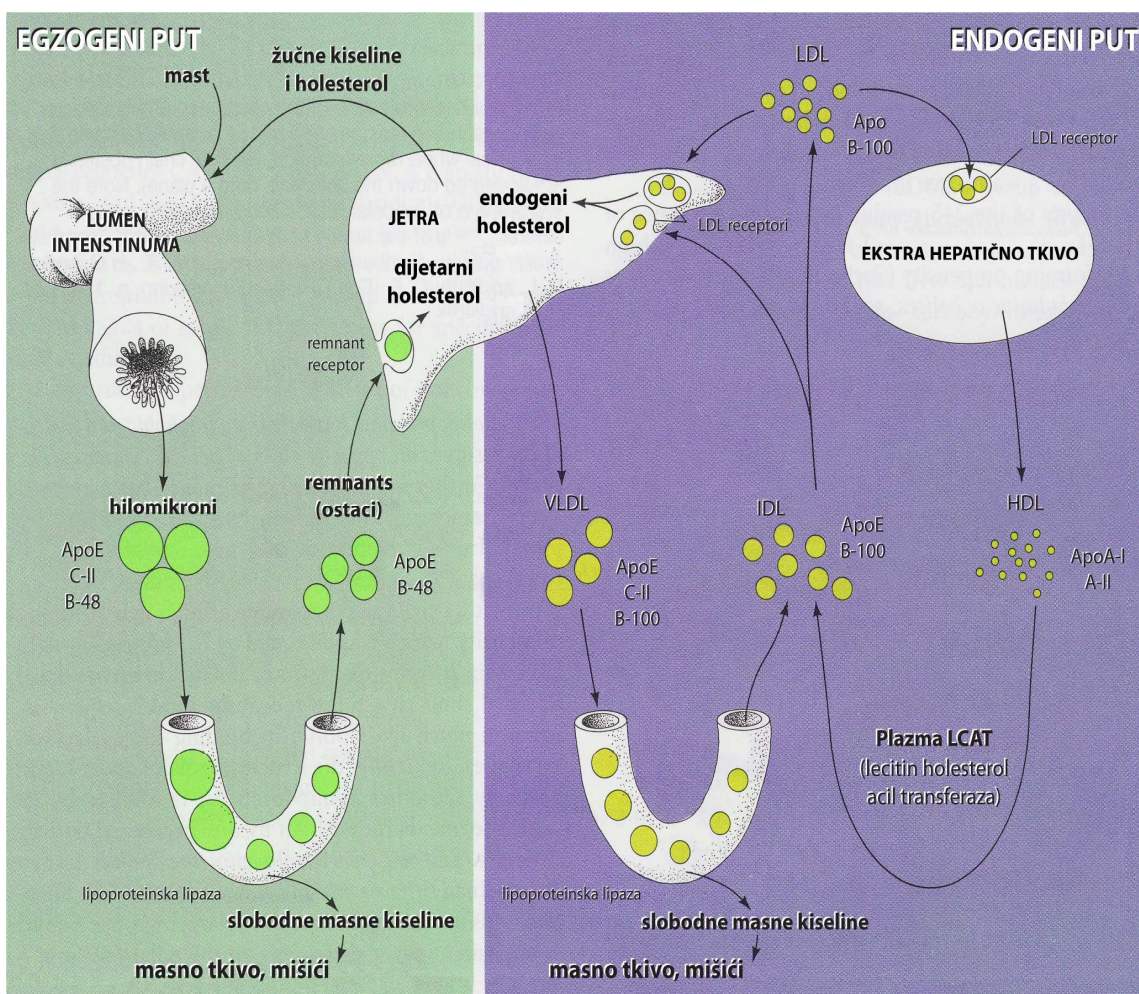
### **2.3.2. Egzogena faza metabolizma lipoproteina**

Egzogena faza započinje u enterocitima stvaranjem hilomikrona iz lipidnih komponenti i apolipoproteina koji se sintetišu u endoplazmaticnom retikulumu enterocita. Holesterol unet hranom (kao estar holesterola) se absorbuje u intestinumu. Estri se hidrolizuju pomoću holesterol-esteraze i oslobađaju se holesterol i masne kiseline (Brown, 1984). Trigliceridi se hidrolizuju pomoću pankreasne i interstinalne lipaze i uglavnom apsorbuju kao slobodne MK i monogliceridi. Masne kiseline dugih lanaca nakon apsorpcije učestvuju u reesterifikaciji holesterola i resintezi TG u enterocitama, dok se MK kratkih lanaca

vezuju za albumin i tako transportuju u cirkulaciju. Resintetisani TG, holesterol i apolipoproteini se udružuju i grade velike lipoproteinske čestice poznatije kao hilomikroni. Hilomikroni se sastoje najvećim delom od TG, sekretuju se u limfu i ulaze u plazmu (Miller, 2011). U plazmi hilomikroni prihvataju apolipoprotein C I (Apo C I), apolipoprotein E (apo E) iz HDL-a u zamenu za estar holesterola i apolipoprotein A. Apo C utiče na lipoproteinsku-lipazu enzim koji se nalazi u vaskularnom endotelu ekstrahepatičnog tkiva. Lipoproteinska lipaza hidrolizuje TG hilomikrona na glicerol i slobodne MK koje zatim preuzimaju ćelije. U ovom stadijumu hilomikroni se transformišu u ostatke hilomikrona ("remnant" čestice). Vezivanje ostataka hilomikrona za odgovarajuće receptore u hepatocitima i njihovom razgradnjom u istim, završava se egzogena faza metabolizma lipoproteina. Povećanje hilomikrona i ostataka hilomikrona bogatih sa TG posle obroka (postprandijalno) može preći kritičnu granicu što dovodi do taloženja ovih čestica odnosno njihovih sastojaka u zidu arterija (Schwartz, 1993) (Slika7).

### **2.3.3. Endogena faza metabolizma lipoproteina**

Endogena faza metabolizma lipoproteina započinje stvaranjem VLDL čestica u hepatocitima. VLDL čestice nastaju u jetri iz endogeno sintetisanih TG, estara holesterola, apolipoproteina B-100 (apo B-100), koji se sintetišu u endoplazmatskom retikulumu, a sekretuju se putem Goldžijevog aparata u cirkulaciju. VLDL čestice se sastoje iz nekoliko subtipova, različitih veličina, koje su iako manji od hilomikrona jako bogati trigliceridima, i održavaju energetske stanje organizma. VLDL kao i hilomikroni razmenjuju svoje komponente sa HDL-om. Na bilo kom stepenu VLDL-LDL kaskade lipoproteinske čestice bogate trigliceridima se mogu ukloniti iz plazme pomoću jetre. Ostaci velikih VLDL se direktno metabolišu dok ostaci malih VLDL ulaze u IDL-LDL put. U slučaju nekog poremećaja na LDL receptoru manje VLDL čestice se direktno uklanjaju i više transformišu u LDL. Ovo dovodi do povećanja koncentracija LDL-holesterola (Breslow, 1985).



Slika 7. Metabolizam lipoproteina

LDL transportuje holesterol iz jetre u periferna tkiva. Normalan LDL se preuzima pomoću LDL receptora i taj put je regulisan i ne dolazi do prekomerne akumulacije holesterola u ćeliji. U slučaju modifikacije LDL on ne može da se preuzima pomoću receptora hvatača (eng. scavenger-a) u makrofage i dolazi do njegove akumulacije (Kume, 1998).

## 2.4. Holesterol

Holesterol je glavna komponenta plazmine membrane, strukturni je element intraćelijskih i ćelijskih membrana. Polarna -OH grupa mu daje amfifilan karakter dok steranski prsten omogućava veću rigidnost nego kod drugih membranskih lipida. Nalazi se i u lipoproteinima plazme gde je 70% holesterola esterifikovano pod uticajem enzima lecitin-holesterol-acil-transferaze (LHAT). Najčešće je esterifikovan sa linolnom kiselinom. Holesterol u cirkulaciji potiče iz ćelija gde je sintetisan (endogeni) ili je unet hranom (egzogeni). Sintetiše se u jetri i CNS-u. Oko 30% dnevne proizvodnje holesterola se kataboliše u jetri u žučne kiseline (Tietz, 1996). Holesterol je prekursor steroidnih hormona kako polnih tako i hormona nadbubrežne žlezde, vitamina D i žučnih kiselina (Charlton – menys and Durrington, 2008). U ćelijskim membranama reguliše fluiditet, učestvuje u domenima kaveola i drugim svingolipidno-bogatim domenima (Jacobson, 2007). Holesterol se transportuje iz endoplazmatičnog retikuluma do plazmine membrane protein-posredovanim i vezikularnim putevima. Signalani putevi koji su uključeni su kompleksni i nisu kompletno razjašnjeni. Sterol-noseći-protein (sterol carrier protein 2-SCP-) je povezivan sa transportom lipida kao što su fosfatidilinozitol, sfingomijelin i fosfolipidi do plazmine membrane. On je uključen i u intracelularni put holesterola do plazmine membrane. (Schroeder, 2007).

Apolipoprotein-posredovano celularno otpuštanje holesterola zahteva specifične interakcije apolipoproteina sa proteinima na ćelijskoj površini. CERP je holesterol oslobađajući regulatorni protein (poznat kao ABCA1-ATP vezujući transporter). Imajući u vidu ulogu transportera kao glavnog regulatora celularnog holesterola i fosfolipidne homeostaze predloženo je da ABCA1 doprinosi okretanju (flipping) lipida od unutrašnje ka spoljašnjoj membrani procesom uz učešće ATP-a (Oram, 2002).

## 2.5. Oksidativni stres

Evolutivnim razvojem odbrambenih mehanizama, aerobni organizmi su postali sposobni da koriste kiseonik kao krajnji akceptor elektrona i da zaštite sebe od štetnih efekata reaktivnih metabolita kiseonika. Poremećaj balansa između nastajanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, eng. reactive oxygen species) s jedne i aktivnosti antioksidativnog zaštitnog sistema (AOS, eng. antioxidant defence system) sa druge strane uzrokuje oksidativni stres (Halliwell1, 1999). Poremećaj balansa između nastajanja ROS i AOS može uzrokovati razvoj različitih oštećenja ubrzavajući proces starenja, razvoj bolesti i smrt organizama (Sies, 1991).

Povećanje u stvaranju ROS prisutno je u različitim patofiziološkim stanjima: kanceru, dijabetesu, aterosklerozi, neurodegenerativnim bolestima, reumatoidnom artritisu, stanjima ishemije/reperfuzije i drugim bolestima. Postoje dokazi da starenje uključuje progresivne promene u slobodno-radikalsko-posredovanim regulatornim procesima (Droge, 2002). ROS mogu dovesti do oštećenja ćelijskih lipida, proteina ili DNK i na taj način do inhibicije njihove normalne funkcije (Valko, 2007). Uspostavljanje delikatne i optimalne ravnoteže između dobrih i loših efekata slobodnih radikala je veoma važno za normalno funkcionisanje živih organizama.

Uloga reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijskoj diferencijaciji, signalnim putevima, regulaciji metabolizma i intercelularnoj komunikaciji je nezaobilazna. Rasvetljavanje uloge azot monoksida (NO) kao endogenog transmitera i povezanost sa ROS, kao i nastanak novih vrsta (ONOO-) upotpunjuje moguće reaktivne vrste sa reaktivnim vrstama azota (RNS).

Dakle, slobodno radikalske vrste mogu nastati (u mitohondrijama, mikrozmima, citosolu i endoplazmatičnom retikulumu) oksidativnim hidroksilovanjem u mikrozmima, autooksidacijom malih molekula oksidativnog praska u aktiviranim fagocitima za vreme inflamatornog odgovora (Jackson and O'Farrell 1993, Close 2005), u peroksizomima za vreme sinteze eikozanoida (dejstvom ciklooksigenaza, lipooksigenaza, i citohroma P450), kao produkti katalize, u toku procesa lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, tokom oksidoredukcionih procesa u prisustvu metala kao i pod uticajem zračenja i ksenobiotika (Movat 1985, Jenkins 1988).

### 2.5.1. Fiziološki značaj ROS

ROS se stvaraju pri prenosu elektrona na kiseonik u mitohondrijalnom transportnom lancu elektrona (Valko, 2004). U izmenjenim uslovima stvaraju se u neutrofilima za vreme respiratornog praska. U procesu  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina i njihovom metaboličkom putu nivo vodonik-peroksida u peroksizomima se značajno povećava. Oksidacijom D-amino-kiselina, aktivacijom citohroma P450, degradacijom ksantina do mokraćne kiseline i autooksidacijom nekih kateholamina stvaraju se superoksid-anjon-radikal, kao i vodonik-peroksid (Li, 1999).

Slobodni kiseonični radikali pod fiziološkim uslovima imaju višestruke korisne uloge (Gutteridge and Halliwell, 1989). Učestvuju u biološkim procesima kao što su normalan ćelijski rast, pomažu ćelijsku adaptaciju i njen oporavak (Close 2005), programiranu ćelijsku smrt kao i starenje ćelije, učestvuju u fagocitozi (Movat 1985). U procesima signalizacije vezivanje brojnih peptidnih faktora rasta stimulišu ROS (u signalizaciji obavljaju oksidativnu ulogu): insulinski faktor rasta (IGF), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) (Finkel 2003), citokini koji učestvuju u sistemske inflamaciji (Colavitti, 2002).

Mnogi od ROS-posredovanih odgovora zapravo štite ćelije od oksidativnog stresa i učestvuju u ponovnom uspostavljanju „redoks homeostaze“. Kod viših organizama azot-monoksid i redoks- aktivne vrste uključeni su kao signalni molekuli za druge fiziološke funkcije kao što su regulacija vaskularnog tonusa, produkcija eritropoetina i signalna transdukcija od membranskih receptora.

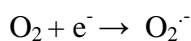
Sposobnost neutrofila za produkciju ROS i uloga u borbi protiv mikroorganizama je bitna za odbranu ćelija domaćina (Close 2005). Proizvodnja ROS u fagocitima i uloga NADPH oksidaze kao i mijeloperoksidaze (MPO), uz oslobađanje neutrofilnih proteaza, u ubijanju bakterija navođena je u literaturi mnogo puta (Reeves 2002).

### 2.5.2 Reaktivne kiseonične vrste

Slobodni radikali mogu ometati funkciju više molekula. Oni su reaktivne hemijske vrste sa jednim ili više nesparenih elektrona, kao što su hidroksil-radikali, superoksid-anjoni, peroksil-radikali (Slika 8).

*Superoksid- anjon-radikal ( $O_2^{\cdot-}$ )*

Ovaj radikal nastaje u svim aerobnim ćelijama jednovalentnom redukcijom molekulskog kiseonika prema reakciji:



Superoksid-anjon-radikal se stvara u respiratornom lancu mitohondrija uključujući NADH-dehidrogenazu i ubihinon-Q-citohrom b-kompleks. Mitohondrijalno nastali superoksid-anjon spontano dismutuje do vodonik-peroksida i kiseonika ili je reakcija efikasno katalizovana sa mitohondrijalnom MnSOD. Mitohondrijalna produkcija superoksid-anjona može biti povećana fiziološkim koncentracijama azot-monoksida koji inhibira citohrom-oksidadazu i sukcinat i NADH-koenzim-Q-reduktazu u membranama mitohondrija pacovskih srca (McIntyre, 1999).

Superoksid-anjon-radikal nastaje pri autoksidaciji flavina, pterina, kateholamina (Cross, 1991). Može nastati i delovanjem različitih enzima oksidaza i dehidrogenaza. Superoksid-anjon može da nastane u ćeliji delovanjem spoljašnjih agenasa kao što je zračenje (Petkau, 1986) i delovanjem citostatika. Nastaje i oksidacijom hemoglobina (Hb) i mioglobina (Mb) u njihove oksidovane oblike methemoglobin (MetHb) i metmioglobin (MetMb) (Petkau, 1986).

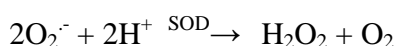
Višestruko je štetan za ćeliju: može da stvori nove radikalske kiseonične vrste (Singh, 1978), može da reaguje kao oksidaciono i redukciono sredstvo (Weiss, 1986). Takođe može da izazove depolimerizaciju polisaharida (Fridovich 1978), inaktivaciju nekih virusa, da remeti sintezu DNK, oštećuje enzime i ćelijske membrane. Superoksid-anjon-radikal može da indukuje peroksidaciju lipida i transkripciju ribonukleinskih kiselina.

Kada su fagocitne ćelije (npr. neutrofili) izložene nekom stimulusu dolazi do niza reakcija koje su označene kao oksidativni prasak (respiratory burst) (De Coursey i Ligeti, 2005). Nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat-oksidadaza u neutrofilima generiše superoksid-anjon radikal, koji je neophodan za destrukciju bakterijskih ćelija. Ovaj enzimski kompleks se sastoji od dve, za membranu-vezane komponente, gp91<sup>phox</sup> i p22<sup>phox</sup>, koje čine citohrom b585, koji predstavlja enzimsko jezgro kompleksa. Posle aktivacije, citosolne komponente p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> p40<sup>phox</sup> i g-vezani protein, Rac i Rap1A, translociraju se do membrane pri čemu se formira aktivni enzimski kompleks. NAD(P)H-oksidadaza, koja se nalazi van fagocitnih ćelija, produkuje superoksid-anjon-radikal, u količini koja iznosi 1 do 10 % od

nivoa produkcije  $O_2^-$  u neutrofilima i za ovako nastali radikal smatra se da ima funkciju u intraćelijskim signalnim procesima.

#### *Vodonik-peroksid*

Vodonik-peroksid je najstabilniji međuproizvod redukcije molekulskog kiseonika (Cadenas, 1989). Nastaje dismutacijom superoksid-anjon-radikala pomoću enzima superoksid-dismutaze, reakcijom:



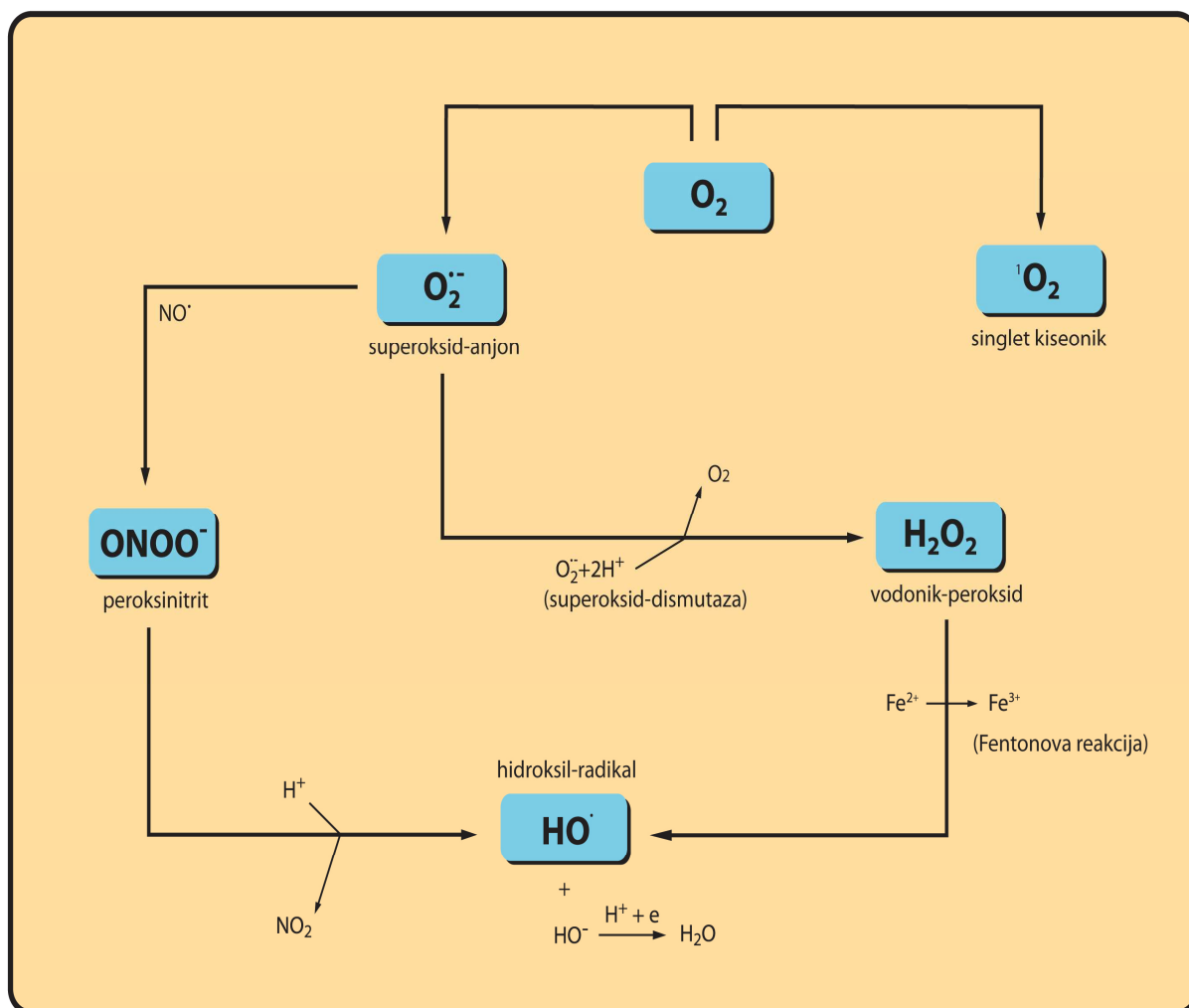
U ćeliji vodonik-peroksid može da nastane u peroksizomima, mitohondrijama, mikrozomima i endoplazmatičnom retikulumu (Sies 1985). Vodonik-peroksid nastaje u ćeliji i delovanjem nekih oksidaza: urat-oksidade, monoaminooksidaza (MAO), oksidaze D-aminokiselina, oksidaze L-hidroksikiselina, kao i u reakcijama autooksidacije askorbata, glutationa, tiola i kateholamina (Halliwell, 1993). Dovodi do oksidacije sulfhidrilnih grupa proteina i do inicijacije procesa lipidne peroksidacije (Cohen, 2009). Vodonik-peroksid u reakciji sa jonima metala ( $Fe^{2+}$ ) dovodi do stvaranja izuzetno reaktivnog hidroksil-radikala ( $\cdot OH$ ) (Cadenas, 1989) (Slika 8).

Peroksizomi predstavljaju ćelijske organele koje produkuju vodonik-peroksid kao sporedni produkt oksidacije masnih kiselina i aminokiselina u fiziološkim stanjima. Toksičnost vodonik-peroksida sprečena je dejstvom katalaze koja ga razlaže do vode i kiseonika. Na ovaj način, peroksizomi održavaju delikatnu ravnotežu između produkcije i neutralizacije ROS. Kako peroksizomi to čine još uvek nije dovoljno jasno. Kada su peroksizomi oštećeni, velike količine vodonik-peroksida izlaze u citoplazmu, dovodeći ćeliju u stanje oksidativnog stresa (Valko, 2004).

#### *Hidroksil-radikal ( $\cdot OH$ )*

Hidroksil-radikal je najtoksičnija reaktivna vrsta kiseonika koja može da reaguje sa biološkim molekulima i da izazove njihovo oštećenje. Nastaje redukcijom molekulskog kiseonika pomoću tri elektrona.



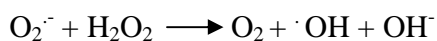


**Slika 8. ROS i putevi njihove međukonverzije**

Hidroksil-radikal može da nastane iz vodonik-peroksida (Halliwell, 1990). Fenton je krajem 19. veka opisao reakciju u kojoj vodonik-peroksid može da reaguje sa jonima metala ( $Fe^{2+}$  ili  $Cu^+$ ), pri čemu nastaju hidroksil-radikali (Fenton, 1984). Ova reakcija je po njemu i dobila ime (Fentonova reakcija):



Reakcijom između superoksid-anjon-radikala i vodonik-peroksida u prisustvu jona metala (Fe) nastaju hidroksil-radikali, a ova reakcija se zove Haber-Weissova reakcija:



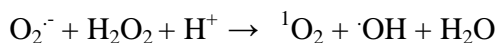
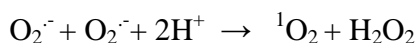
OH može nastati iz vode pri aplikaciji većih doza zračenja (Cohen, 1986). Hidroksil-radikali su kratkoživeći, reaguju sa drugim biološkim molekulima (šećeri, amino kiseline, fosfolipidi, DNK baze, organske kiseline) i stvaraju sekundarne radikale (Halliwell, 1999). Za Fentonovu reakciju se zna da se odvija u *in vitro* uslovima, ali njen značaj u fiziološkim stanjima još uvek nije potpuno jasan, imajući u vidu činjenicu da su slobodni katalitički joni skoro nedostupni, jer ih vrlo efikasno uklanjaju metal-vezujući proteini (Kakhlon i Cabantchik, 2002). Međutim, postoje stanja "prepunjenosti gvožđem" u organizmu (npr. hemohromatoza) kada su dostupne veće količine „slobodnog gvoždja", što može imati štetne efekte na ćelijske strukture.

#### *Peroksil-radikal (ROO)*

Sledeća reaktivna vrsta koja može nastati od kiseonika u biološkim sistemima je peroksil-radikal (ROO). Najjednostavnija forma peroksil-radikala je hidroperoksil-radikal (HOO), ili perhidroksil-radikal (De Grey, 2002). Hidroperoksil-radikal može inicirati proces peroksidacije masnih kiselina preko dva paralelna mehanizma. Jedan od mehanizama se odvija u *in vivo* uslovima i ksantin-oksidaza ima ulogu u ovom procesu. Ksantin-oksidaza (XO) i ksantin- dehidrogenaza (XD) su dve forme istog enzima označenog kao ksantin-oksidoreduktaza (XOR) (Borges, 2002; Vorbach, 2003). U katabolizmu purina, XOR katalizuje oksidativnu hidroksilaciju hipoksantina do ksantina, a zatim ksantina do mokraćne kiseline. Ksantin oksidoreduktaza, na taj način ima bitnu ulogu u enzimskoj odbrani ćelije od oksidativnog stresa (Vorbach, 2003).

#### *Singlet kiseonik ( $^1O_2$ )*

Singlet kiseonik nema nesparenih elektrona, nije radikal, javlja se u aerobnim organizmima kao snažan oksidujući agens i prvo je „pobudjeno“ stanje molekuskog kiseonika. Singlet kiseonik nastaje reakcijama:



Singlet kiseonik može da nastane pri osvetljavanju bioloških pigmenata i osvetljavanjem hloroplasta (Halliwell, 1999). Usled njegove reakcije sa različitim konstituentima ćelije

nastaju i štetni efekti (Halliwell, 1990). Singlet kiseonik reaguje direktno sa membranskim lipidima i učestvuje u formiranju lipidnih peroksil-radikala (Halliwell, 1990).

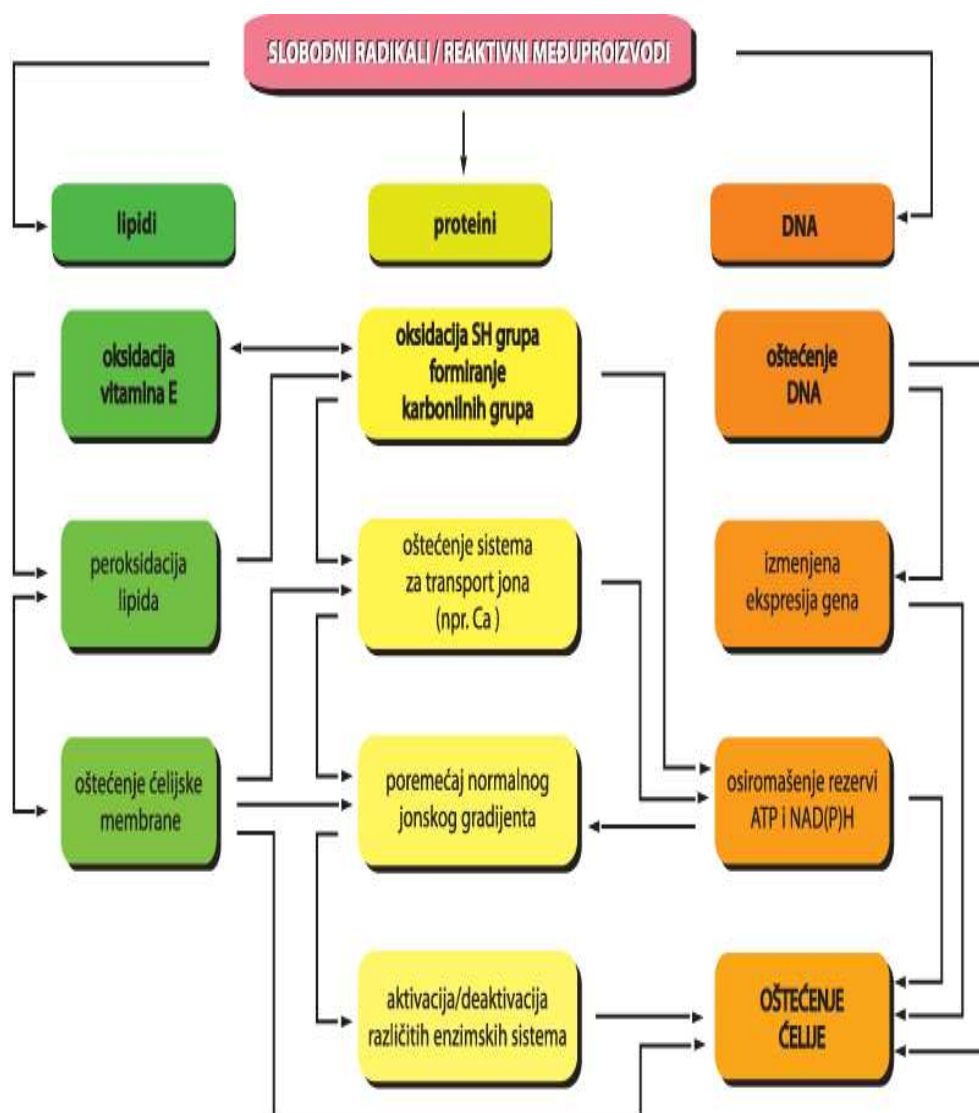
### **2.5.3. Oksidativna oštećenja makromolekula**

Oksidativni stres uzrokuje oksidativna oštećenja ćelija. Narušena ravnoteža ROS i AOS odražava se na lipide, proteine, nukleinske kiseline i ugljene hidrate (Aguilo 2005, Tauler 2006). Slobodni radikali mogu da izazovu oštećenja DNK, destrukciju nukleotidnih koenzima, mogu dovesti do poremećaja aktivnosti SH-zavisnih enzima, do oštećenja ćelijske membrane (Slater, 1989). Lipidna peroksidacija predstavlja niz lančanih slobodno-radikalnih reakcija koje dovode do razlaganja polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) što za posledicu ima razaranje ćelijskih membrana i smrt ćelija (Close, 2005). Štetno delovanje ROS povezano je sa starenjem (Finkel, 2003) i nekim bolestima koje su posledica starenja (kancer, ateroskleroza i neurodegeneracija). (Slika 9)

#### **2.5.3.1. Oksidativna oštećenja lipida**

U interakcijama ROS sa biološkim makromolekulima nastaju organski radikali. Jedan od najbolje proučenih procesa je lipidna peroksidacija (LP). U ovom procesu stvaraju se lipidni peroksil-radikali ( $\text{ROO}\cdot$ ) i lipidni hidroperoksidi (ROOH). Lipidni peroksidi, u reakcijama koje su katalizovane jonima metalima stvaraju alkoksi-radikale ( $\text{RO}\cdot$ ), holesterol-hidroperokside, endoperokside, epokside holesterola i masnih kiselina (Behrman, 1993, Halliwell, 1995, Halliwell i Chirico 1993).

LP može da dovede do degradacije lipidnih membrana, interakcije degradacionih produkata sa različitim molekulima u ćeliji i izvan nje, kao i do produkcije novih ROS u toku lančane reakcije (Dargel, 1991).

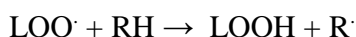
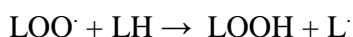
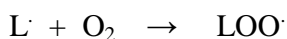
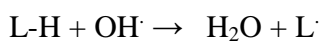


Slika 9. Oštećenja makromolekula slobodnim radikalima i posledice oštećenja

Reakcija lipidne peroksidacije je lančana reakcija. Prvi korak u inicijaciji LP predstavlja oduzimanje atoma vodonika iz PUFA, koje ulaze u sastav bioloških membrana, tako da nastaje lipidni radikal ( $L\cdot$ ) (Halliwell i Gutteridge, 1989, Fridovich, 1989). Što je veći broj dvogubih veza u lancu viših masnih kiselina to je lakše odvajanje vodonikovog atoma a to je i razlog zbog koga su PUFA podložne peroksidaciji.

U daljim procesima teku lančane slobodno-radikalske reakcije (propagacija) dolazi do stvaranja peroksil-radikala i organskih hidroperoksida (Dargel, 1991). Tok propagacije

zavisi od odnosa lipida i proteina u membrani. Sastav masnih kiselina, koncentracija kiseonika u membrani utiču na fazu propagacije. Za vreme propagacije lipidni hidroperoksidi (LOOH) u prisustvu gvožđa disosuju do lipoksidnog (LO $\cdot$ ) i peroksilradikala (LOO $\cdot$ ) koji reiniciraju peroksidaciju.



Krajnji proizvodi lipidne peroksidacije su: 4-hidroksi nonenal (HNE) i malondialdehid (MDA). MDA je glavni izvor lipofuscina čija se koncentracija u tkivima povećava tokom starenja. Malondialdehid može da reaguje sa slobodnim amino-grupama proteina i nukleinskih kiselina i da dovede do još većih oštećenja ćelije (Scott, 1995). Proizvod n-6 PUFA (LA i AA), 4-OH-nonenal (HNE), je toksičan i inhibira rast ćelija, modifikuje lipoproteine, podstiče aterosklerozu (Leonarduzzi, 2005). On se metaboliše preko GSH-konjugata do merkapturane kiseline (Yang, 1998).

Autooksidansi prekidaju lančane reakcije i stvaraju stabilne proizvode tj. uvode reakcije u terminalne faze. Terminaciju otpočinje vitamin E koji daje elektrone za prekidanje reakcije.

Stepen lipidne peroksidacije je moguće odrediti određivanjem gubitka nezasićenih masnih kiselina, određivanjem količine primarnih produkata peroksidacije i količine sekundarnih proizvoda kao što su karbonili i ugljenohidratni proizvodi (Halliwell and Chirico, 1993). Lipidna peroksidacija dovodi do nastanka novih slobodnih MK (Evereklioglu, 2003). Unos PUFA masnih kiselina hranom omogućava njihovu ugradnju u membrane, što rezultira povećanom lipidnom peroksidacijom kao uz porast aktivnosti SOD i CAT (Pizato, 2005).

### **2.5.3.2. Oksidativno oštećenje proteina**

Mehanizmi uključeni u oksidaciju proteina reaktivnim kiseoničnim vrstama su proučavani u eksperimentima u kojima su aminokiseline, prosti peptidi i proteini izlagani jonizujućem zračenju u uslovima gde se formiraju hidroksil-radikali ili mešavina hidroksil- i superoksid-anjon-radikala (Stadtman, 2004). Bočni lanci aminokiselinskih ostataka proteina, posebno cisteina i metionina, su osetljivi na oksidaciju izazvanu ROS/RNS (Stadtman, 2004). Oksidativno oštećenje proteina podrazumeva izmenu sekundarne i tercijarne strukture proteina, oštećenja proteina produktima lipidne peroksidacije. Usled oksidativnog oštećenja proteina dolazi do promena propustljivosti membrana, narušavanja ćelijske signalizacije, transporta jona. Kaskadno se iniciraju peroksidacioni procesi i menja inflamatorni odgovor (Slater, 1987, Lansing, 1991).

### **2.5.3.3. Oksidativno oštećenje nukleinskih kiselina**

Rezultat oštećenja nukleinskih kiselina sa ROS može biti: prekid jednog lanca, prekidi oba lanca DNK, DNK-DNK unakrsno povezivanje („cross-links“), modifikacija baza (otvaranje prstena, hidroksilacija prstena), oštećenja na ugljenohidratnom ili fosfatnom delu polinukleotidnog lanca (Valko, 2006). Oksidaciona oštećenja mogu dovesti do mutacija, narušiti DNK replikaciju, transkripciju, translaciju, prouzrokovati starenje i smrt ćelije (Ames, 1991).

### **2.5.3.4. Oksidativna oštećenja ugljenih hidrata**

Izolovani molekuli ugljenih hidrata (monosaharidi) kao što su glukoza ili fruktoza podložni su oksidaciji sa ROS. Veći fiziološki efekat prouzrokuju oštećenja na složenijim molekulima, koji imaju ugljeno-hidratnu komponentu (nukleinske kiseline-u čiji sastav ulaze pentoze, kao i preteini koji imaju razgranate oligosaharidne lance kovalentno vezane za asparagin ili treonin) (Halliwell i Gutteridge, 1989).

#### 2.5.4. Metode za identifikaciju ROS

S obzirom na to da je poluživot ROS kratak za njihovo identifikovanje i određivanje potrebne su posebne tehnike, kao što je elektron spin rezonanca (ESR) (Jackson, 1985). U širokoj primeni su metode određivanja proizvoda nastalih u reakciji ROS sa biomolekulima. Modifikovane baze, kao što su timin-glikol i 8-hidroksi-guanozin mogu se nalaziti u urinu, a promene u njihovom sadržaju koriste se za praćenje i procenu oksidacionih oštećenja DNK *in vivo* (Maidt i Floyd, 1996). Za procenu stepena lipidne peroksidacije primenjuje se spektrofotometrijsko merenje koncentracije MDA, u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom (Close 2005). Imunološke tehnike koriste se za identifikaciju oksidovanog LDL-a u patogenezi ateroskleroze, ali i nekih drugih oboljenja (Vaughan, 1997).

#### 2.6. Antioksidativni sistem odbrane organizma (AOS, eng. antioxidative defence system)

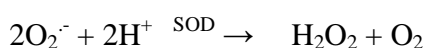
Antioksidanti sprečavaju delovanje slobodnih kiseoničnih radikala na više nivoa: lokalnim smanjenjem slobodnih kiseoničnih radikala, sprečavanjem stvaranja ROS, vezivanjem slobodnih metalnih jona, uklanjanjem ROS, prekidanjem stvaranja novih radikala (Gutteridge and Halliwell, 1988). Antioksidativni zaštitni sistem obuhvata primarnu i sekundarnu antioksidativnu zaštitu. Primarna se sastoji od enzimskih (katalaza, superoksid-dismutaza, enzimi glutation ciklusa, citohrom-oksidaza, ksantin-oksidaza) i neenzimskih komponenata (vitamini A i E, vitamin C, albumin, transferin mokraćna kiselina, bilirubin). Sekundarnu antioksidativnu zaštitu čine: protein-specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaze) (Brigelius 1985), protein-ADP-ribozil-transferaze (Berger, 1985) i ATP i  $\text{Ca}^{2+}$ -nezavisne proteaze (Cadenas, 1989).

### 2.6.1 Antioksidativni enzimi

Enzimske komponente primarne antioksidativne zaštite su SOD, CAT, enzimi glutacion-ciklusa (GSH-Px, GST, GR i fosfolipid-hidroperoksid) (Evereklioglu 2003), citohrom-oksidaza, tioredoksin i familija peroksiredoksin-proteina. Njima je zajedničko svojstvo da blokiraju početak lančanih slobodnoradikalnih reakcija.

#### *Superoksid-dismutaza (SOD)*

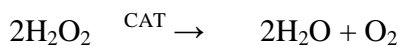
SOD pripada grupi metaloenzima. Katalizuje dismutaciju superoksid-anjon-radikala u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (McCord i Fridovich, 1969).



Ima 3 izoenzimske forme: citosolna (CuZnSOD) koja je dimer, mitohondrijalna (MnSOD), tetramer i ekstracelularna (EC SOD) tetramer i prokariotska SOD koja sadrži jon gvožđa (FeSOD) (Fridovich, 1989).

#### *Katalaza (CAT)*

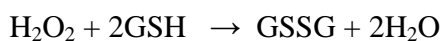
Katalaza (CAT) katalizuje razgradnju vodonik-peroksida do vode i kiseonika (Margeritis 2003).



Katalaza je tetramerni hemoprotein molekulske mase 240kDa. Sastoji od 4 subjedinice, sadrži protoporfirinsko jezgro sa jonom gvožđa u aktivnom centru. Prisutna je u svim tkivima sisara (u peroksizomima). Peroksizomi su respiratorne organele koje katabolizuju većinu supstanci preko vodonik-peroksid generišućih enzima koji se onda razlaže pomoću katalaze. Katalaza se može naći i slobodna u citosolu u retikulocitima i u zrelih eritrocitima, dok su najviši nivoi katalazne aktivnosti nađeni u jetri i eritrocitima (Halliwell i Gutteridge, 1999).

#### *Glutation-peroksidaza (GSH-Px)*

Glutation-peroksidaza katalizuje glutacion-zavisnu redukciju vodonik-peroksida u vodu i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole, prema sledećim jednačinama:







GSH-Px, GPx nalazi se u citosolu (92%) i matriksu mitohondrija. Mogu biti selen-nezavisne (katalizuju redukciju organskih hidroperoksida i pretpostavlja se da pripadaju porodici glutathion-S-transferazne aktivnosti) i selen-zavisne (tetramerni enzim, sa selenom u aktivnom centru u obliku selenocisteina) (Cotgreave, 1988).

### 2.6.2. Neenzimski antioksidansi

Neenzimske komponente AOS dele se na komponente rastvorljive u mastima i rastvorljive u vodi (Margeritis 2003). Liposolubilne su: vitamin E (alfa-tokoferol, vitamin A (retinol), provitamin A (beta-karoten), koenzim Q (ubihinon).

Hidrosolubilni antioksidansi su: vitamin C (askorbinska kiselina), redukovani glutathion (GSH), mokraćna kiselina, albumin, transferin, ceruloplazmin, feritin, bilirubin, cistein, histidin, laktoferin. Osim pomenutih ubrajaju se i melatonin, metalotioneini, piruvat, alfa-ketoglutarat, estrogeni, lipoijska kiselina, karnozin.

Vitamin E je najznačajniji liposolubilni egzogeni prirodni membranski antioksidans kod ljudi. Uklanja ROS i prekida lanac reakcija peroksidacije membranskih lipida. U krvnoj plazmi štiti lipoproteine od oksidacije (Halliwell, 1991). Za njegovu aktivnost značajan je vitamin C koji ga regeneriše.

### 2.6.3. Vanćelijski antioksidansi

U vanćelijske antioksidanse ubrajaju se: transferin, laktoferin, haptoglobin, ceruloplazmin, albumini, EC-SOD, EC GPx, glukoza, bilirubin, urati. Osnovna uloga nekih od njih je zadržavanje jona Fe i Cu u nereaktivnom obliku i onemogućavanje delovanja sa vodonik-peroksidom i superoksid-anjonom (Marklaud, 1982). EC-SOD katalitički uklanja superoksid-anjon. EC-GSHPx uklanja hidroperokside, glukoza uklanja hidroksil-radikal, bilirubin peroksil-radikale, a urati vezuju jone metala.

## 2.7. Laktat-dehidrogenaza (LDH)

Merenje aktivnosti LDH koristi se u dijagnostici, ali je značajnije analiziranje izoenzimskih oblika LDH jer se raspodela pojedinih oblika u organima razlikuje. Laktat-dehidrogenaza katalizuje prelazak piruvata (krajnji proizvod glikolize) u laktat (uz učešće NADH) kad postoji odsustvo ili slabo prisustvo kiseonika. Izoenzimi LDH se označavaju na osnovu svoje elektroforetske pokretljivosti od 1 do 5, tako da LDH<sub>1</sub> ima najveću a LDH<sub>5</sub> najmanju elektroforetsku pokretljivost. Heterogenost LDH objašnjena je subjediničnom strukturom njenih izoenzima. Prema distribuciji izoenzima LDH u tkivima i organima oni se mogu podeliti u tri grupe: prvu grupu (čine tzv. "brzi izoenzimi" LDH<sub>1</sub> i LDH<sub>2</sub> koji su najviše zastupljeni u srcu, bubrezima i eritrocitima, drugu grupu čine tzv. "spori izoenzimi", LDH<sub>4</sub> i LDH<sub>5</sub> karakteristični za jetru i skeletne mišiće, i treću grupu srednji izoenzimi LDH<sub>3</sub>; karakteristični za pluća, tiroideu i nadbubreg. Usled oštećenja ćelijske membrane u procesu peroksidacije lipida i promene u njenoj permeabilnosti dolazi do „curenja“ mnogih enzima citosola u ekstracelularni prostor. Na taj način se utvrđuje stepen oštećenja pojedinih organa.

## 2.8. Paraoksonaze (PON enzimska familija)

Esteraze su klasifikovane u tri grupe (A, B i C esteraze) na bazi njihove reaktivnosti sa organofosforim jedinjenjima kao što je paraokson i diizopropil-fluorofosfat. A-esteraze (uključujući arilesteraze) hidrolizuju organofosfate brzo, dok su B-esteraze (uključujući acetilholinesteraze i nespecifične karboksilesteraze) inhibirane organofosfatima. C-esteraze (npr. acetilesteraza) ne interaguju sa organofosfatima. Inter-individualna varijacija u aktivnosti esteraza je važan faktor koji utiče na farmakološke i toksikološke efekte prekursora aktivnih supstanci u kod ljudi i životinja (Atessahin, 2004).

Studije pokazuju da paraoksonaze mogu značajno sniziti stvaranje proizvoda lipidne peroksidacije za vreme LDL oksidacije i da zbog toga omogućavaju HDL- vezanu zaštitu protiv procesa ateroskleroze (Mackness, 1993). Oksidovani LDL igra ulogu u događajima vezanim za inicijaciju ateroskleroze. HDL se pokazalo da sprečavaju oksidativne modifikacije LDL *in vitro* i *in vivo* (Klemola 2002). Paraoksonaze (PON1 i PON3 familije)

cirkulišu vezani za HDL čestice. Oni inhibiraju aterogenezu hidrolizom lipidnih hidroperoksida i sprečavajući LDL oksidaciju (Carro, 2005).

## 2.9. Starenje i slobodno-radikalska teorija

Harmanova teorija starenja predstavlja slobodno-radikalsku teoriju starenja. Po njemu dužina života je inverzna funkcija metaboličke stope, a to je proporcionalno potrošnji kiseonika. Ukratko, po ovoj teoriji, ROS produkovane za vreme respiracije u toku života, mogu uzrokovati kumulativna oštećenja koja vode gubitku funkcija organizma i smrti. Kasnije, ta teorija je modifikovana tako da ne samo starenje *per se* već starenjem izazvane bolesti kao što su kancer, artritis, ateroskleroza, dijabetes, Alchajmerova bolest dovode do promena na ćelijama i organima. Dakle, po ovoj hipotezi degenerativne bolesti, udružene sa starenjem, uključuju slobodno-radikalske procese (Harman, 1950).

Danas se fokus i naučna pažnja vezana za starenje sve više premešta iz mitohondrija u citoplazmu. Kalorijska restrikcija svakako dovodi do smanjenja mitohondrijalne funkcije. Blagi ROS odgovor, posredovan peroksidom, ključan je za aktivaciju adekvatnog odgovora u citoplazmi, posredovanu ćelijsku signalizaciju i produžetak dužine života.

Slobodno radikalska teorija koja je zastupala da akumulacija oksidativnih oštećenja dovodi do starenja doživela je kritike (Blagosklonny, 2010). Prvo, povećana ekspresija glavnih AOS enzima, koji hvataju slobodne radikale, nije produžila život miševa (Perez, 2009). Drugo, delecija myt SOD (Sod2) produžila je život *C.elegans* (Van Raamsdonk, 2009). Treće, produženje života sa kalorijskom restrikcijom nije bilo povezano sa zaštitom protiv oštećenja somatskih DNK u *D.melanogaster* (Edman U, 2009). Četvrto, SOD2 haplotipska insuficijencija nije favorizovala starenje kod miševa sa disfunkcionalnim telomerama (Guachalla, 2009).

Postoji nekoliko teorija koje su objašnjavale starenje. Složile su se da ili kalorijska restrikcija ili inaktivacija nutrijentno-zavisnih puteva (protein kinaza A) predstavljaju mehanizme koji deluju na produženje života kod različitih eukariota (eng. living on the edge).

### 2.9.1. Kalorijska restrikcija i starenje

Kalorijska restrikcija bez malnutricije odlaže starenje i produžava život kod različitih vrsta. Kod primata ti efekti nisu dovoljno razjašnjeni. Longitudinalna dvadesetogodišnja studija, iz 2009-te na odraslim majmunima pokazala je da umerena kalorijska restrikcija snižava stopu smrtnosti povezanu sa starenjem. Procenat preživljavanja bio je veći u grupi sa kalorijskom restrikcijom u odnosu na kontrolnu grupu bez nje. Kalorijska restrikcija odlaže incidencu nekoliko patologija povezanih sa starošću kao što su dijabetes, kancer, kardiovaskularne bolesti, pa je to ojačalo teoriju o značaju primene iste na ljude.

U 2009. godini brojne studije su ustanovile vezu između kalorijske restrikcije, dužine života, i signalnih puteva koji uključuju Sir2 (sirtuin) i p53 kod *D.melanogaster* (Bauer JH, 2009) i E3 ubiquitin ligaze WWP-1 kod *C.elegans* (Carrano AC, 2009), kao i komponente ushodnog i nishodnog puta TOR (targeta rapamicina).

### 2.9.2. Farmakološke intervencije

Serotonin/treonin protein kinaza (mTOR) reguliše ćelijski rast, ćelijsku proliferaciju, ćelijsko preživljavanje, transkripciju. Smanjenjem TOR aktivnosti usporava se starenje kod *S.cerevisiae*, *C.elegans* i *D.melanogaster*. Rapamicin je mTOR inhibitor, za koga je potvrđeno da produžava život. Kalorijska restrikcija i metioninska restrikcija dovode do produženja životnog veka smanjenjem mTOR aktivnosti dok se rapamicin koristi u prevenciji odbacivanja transplantiranog tkiva.

U eksperimentu Harrison i sar, u kome je postojala administracija tOR-inhibitora u 600 dana stare miševe značajno je produžila njihov život. Dakle, mTOR inhibitori su zapravo gerosupresanti (Harrison DE, 2009).

Wang i sar. su ispitivali farmakološke efekte clioquinol-a (5-hloro-7-jodohinolin-8-ol), metalnog helatora koji je ispoljio pozitivne efekte u nekoliko modela neurodegenerativnih bolesti inhibirajući aktivnost mitohondrijalnog enzima CLK-1 (clk-1/mclk-1 kodiraju mitohondrijalnu hidrolazu koja je neophodna za biosintezu ubihinona tj. koenzima Q) u ćelijama sisara. Kao inhibitor CLK-1 može usporiti procese starenja (Wang Y, 2009).

### 2.9.3. Autofagija

Veza autofagije i procesa starenja je vrlo kompleksna. Autofagija se aktivira za vreme celularnog starenja. Prirodni polianjon spermidin može produžiti životni vek u kvascima, kod ptica, nematoda. Spermidin izaziva gubitak esencijalnih autofagnih gena u *C.elegans* (Isenberg T, 2009).

Epel i sar. ispitivali su dužinu života kod *S.pombe*. Studija je pokazala da sty 1 MAP kinaza (za koju je poznato da je aktivira vodonik-peroksid) igra ulogu u promociji dužine života, za vreme kalorijske restrikcije, kada se indukuje ROS produkcija (Epel ES, 2009). Starenje, kao posledica metaboličkih aktivnosti utiče na sve žive organizme. Veruje se da je nemoguće izbeći oštećenja koja uzrokuje oksidacija, što doprinosi starenju. Oksidaciona oštećenja kao i ROS rastu sa starenjem. Štaviše, kalorijska restrikcija izaziva redukciju u metaboličkom turnoveru, slobodno-radikalskoj produkciji i produžava život različitim organizmima. Zapravo, živa bića se adaptiraju na ROS. Manipulacija sa redoks statusom ili targetima metaboličke aktivnosti može uticati na antioksidativnu mašineriju (Rasler, 2009).

### III MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Hemikalije i reagensi

Sve hemikalije su bile p.a. kvaliteta, komercijalno dostupne. Za pripremu rastvora korišćena je dvostruko dejonizovana voda.

-Za određivanje biohemijskih parametara krvi pacova korišćeni su komercijalno dostupni kitovi, Elitech Diagnostic, Sees, France.

- u postupku ekstrakcije lipida i razdvajanju lipidnih klasa na TLC-u korišćeni su organski rastvarači, Baker J.T.

- Sve ostale korišćene hemikalije i reagensi bili su kompanije Sigma-Aldrich, Germany.

#### 3.2. Analiza sastojaka ribljeg ulja

Sastav ribljeg ulja u kapsuli (Natural Wealth, Nordvik, Srbija) analiziran je primenom GC/MS firme Agilent GC/MS (7890A) MS (59755C inert XL EI/CIMSD) sa DB23 kolonom (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) sa konstantim pritiskom. Temperaturni program počeo je od 50 °C (1min), a onda se temperatura povećavala za po 25 °C/min do 175 °C a potom za 4 °C/min do 235 °C za 5 minuta. Pritisak je bio 46.07 psi, a split protok 150 ml/min. Rezultati analize prikazani su u odeljku 4.1.1.

##### 3.2.1. HPLC analiza tokoferola u ribljem ulju

Priprema uzorka: u 2 g ribljeg ulja dodato je 100 ml 50% KOH u etanolu, i hidroliza je trajala 16 h. U 10 ml hidrolizata dodato je 5 ml vode i 5 ml n-heksana. Smeša je vorteksirana i gornji n-heksanski sloj je uzet za dalja ispitivanja. Proces ekstrakcije je ponovljen još dva puta. n-heksanski sloj je uparen na vakuumu i dodato mu je 1ml metanola. Pre analize uzorci su profiltrirani kroz 0.45 µm špric filtere sa regenerisanom celulozom.

Uzorci su analizirani tečnom hromatografijom na uređaju firme Agilent 1100 sa DAD detektorom, na Sun Fire C-8 koloni (4.6 x 150mm, 3.8 µm) (P.N. 186002732, Waters,

Ireland). Trihlorsirćetna kiselina (0.01%) je bila mobilna faza. 25  $\mu$ L uzorka je injektovano u sistem, vitamini su detektovani u oblasti talasnih dužina 284-326 nm, a referentna talasna dužina je na 450 nm. Rezultati analize prikazani su u odeljku 4.1.2.

### **3.3. Eksperimentalne životinje i dijeta**

Eksperimenti su izvedeni sa 3 meseca (kontrolna grupa, telesna masa  $283 \pm 7.3$ g. i tretirana grupa, telesna masa  $287 \pm 8.1$ g.) i 22 meseca starim muškim pacovima Wistar soja (kontrolna grupa telesna masa  $380 \pm 7.3$ g i tretirana grupa, telesna masa  $387 \pm 8.1$ g.), gajenim individualno u kavezima u prostorijama pod kontrolisanim uslovima (12 h svetlost/mrak ciklusi, temperatura  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). U svakoj grupi bilo je po 10 pacova. Svi eksperimenti su izvedeni u skladu sa principima Evropske konvencije za zaštitu životinja vertebrata korišćenih za eksperimente (N.L 358/1-358/6.18 decembar 1986.).

#### **3.3.1. Tretiranje pacova Wistar soja ribljim uljem**

Eksperimentalne životinje hranjene su standardnom laboratorijskom hranom (Veterinarski zavod Subotica). Riblje ulje koje je davano životinjama, dobijeno je u cilju eksperimenta. Svaka kapsula sadrži 300 mg EPA i 200 mg DHA. Tretman je trajao 6 nedelja. Svaka životinja u tretmanu dobijala je po 200  $\mu$ L ribljeg ulja koje sadrži 45 mg EPA i 30 mg DHA, *in house* metodom u kojoj se jedan briketić natapa ribljim uljem i stavlja u hranilicu nakon prethodnog uklanjanja hrane.

#### **3.3.2. Žrtvovanje životinja i priprema uzoraka**

Svi pacovi su žrtvovani 24 h nakon poslednjeg tretmana ribljim uljem, dekapitacijom. Punoj krvi koja je dobijena dodat je kao antikoagulans natrijum-citrat. Krv je centrifugovana na 1300 g, eritrociti su odvojeni od plazme, isprani tri puta fiziološkim rastvorom i korišćeni za određivanje enzimskih aktivnosti. Plazma je čuvana na  $-80^\circ\text{C}$  do analize. Posle žrtvovanja pacova delovi jetre isprani su na ledu hladnim fiziološkim rastvorom, i smrznuti na  $-80^\circ\text{C}$ .

### **3.4. Biohemijske analize krvi pacova**

Holesterol, trigliceridi i mokraćna kiselina su određivani u plazmi. Primenom enzimskih metoda sa holesterol-oksidadom, glicerol-oksidadom i ksantin-oksidadom (Elitech Diagnostic, Sees, France) na biohemijskom analajzeru (CobasMira, Roche). HDL-olesterol je određivan posle taloženja drugih klasa lipoproteina sa fosfovolframovom kiselinom i magnezijum hloridom (Lopez-Virella et al 1977). LDL-olesterol je određivan primenom formule Friedwald i sar (Friedwald, 1972).

#### **3.4.1. Određivanje koncentracije hemoglobina (Tentori i Salvati, 1981)**

Reakcijom hemoglobina sa kalijum-heksacijanoferatom(III) i cijanidom dobija se cijanomethemoglobin, čija je koncentracija određena spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 540 nm, upotrebom molarnog apsorpcionog koeficijenta ( $a = 44000 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Sva spektrofotometrijska merenja vršena su na aparatu Cecil CE 2021 UV/VIS.

### **3.5. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane**

#### **3.5.1. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) (Aebi, 1984)**

Aktivnost CAT određena je u eritrocitima na osnovu funkcije ovog enzima da katalizuje razgradnju vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika. Smanjenje koncentracije vodonik-peroksida praćeno je merenjem apsorbancije na 240 nm ( $A_{240}$ ), kinetičkom metodom analize. Jedinica aktivnosti CAT izražena je brojem  $\mu\text{mola}$  vodonik-peroksida koji se razlaže u jednom minutu po gramu hemoglobina u hemolizatu ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb} \times 10^4$ ).

#### **3.5.2. Određivanje aktivnosti CuZn-superoksid-dismutaze (Beauchamp and Fridovich, 1971).**

SOD aktivnost je određena koristeći Calbiochem Superoxide Assay Kit. Apsorbancija nagrađenog proizvoda 5,6,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroksibenzo(c)florin-a merena je na 525nm,  $A_{525}$  (Beauchamp and Fridovich, 1971). SOD aktivnost je izražena u U/g Hb.



### 3.6. Određivanje količine malondialdehida (MDA) (Cynamon et al., 1985)

Koncentracija malondialdehida (MDA) određena je reakcijom sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje obojeni proizvod. Intenzitet boje nastalog proizvoda određuje se spektrofotometrijski merenjem apsorbancije na 535 nm. Koncentracija MDA izračunata je na osnovu molarnog apsorpcionog koeficijenta bojenog proizvoda ( $a = 1.56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) i izražena u nmol/gHb.

### 3.7. Određivanje koncentracije nitrita u plazmi (Guevara et al., 1998)

Koncentracija nitrita je određena ELISA testom, korišćenjem Grisovog reagensa. Apsorbancija je merena na 545 nm korišćenjem čitača (Plate reader, Mod A1, Nubenco Enterprises, INC). Rezultati su izraženi u  $\mu\text{molL}^{-1}$ .

### 3.8. Određivanje aktivnosti paraoksonaza u plazmi (Schiavon, 1996)

Određivanje paraoksonazne aktivnosti u plazmi je zasnovano na spektrofotometrijskom merenju p-nitrofenola, kao rezultat enzimске hidrolize paraoksona. Merenje paraoksonazne aktivnosti je izvedeno u prisustvu i odsustvu natrijum-hlorida. PON1 aktivnost određena je sa natrijum-hloridom (osnovna aktivnost) i u prisustvu 1mol/L natrijum hlorida (NaCl-stimulisana aktivnost) u skladu sa metodom po Sciavon-u. Inicijalni stepen hidrolize paraoksona određivan je merenjem nagrađenog p-nitrofenola. Paraoksonazna aktivnost merena je na Cecil CE 2021 UV/VIS spektrofotometru na 405nm.

### 3.9. Određivanje ukupnih tiolnih grupa (Ellman, 1959)

Broj ukupnih (proteinskih i neproteinskih) tiolnih grupa u plazmi određen je spektrofotometrijski sa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoevom kiselinom, merenjem apsorbanice na talasnoj dužini od 412 nm na spektrofotometru (CECIL CE 2021 UV/VIS), korišćenjem apsorpcionog koeficijenta,  $a=14150 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Dobijeni rezultati su izraženi u  $\mu\text{M/L}$ .

### **3.10. Određivanje zastupljenosti LDH izoenzimskih oblika u plazmi (Yoshida and Takakuma, 1997)**

LDH izoenzimi (LDH<sub>1-5</sub>) su analizirani nedenaturišućom, nativnom elektroforezom na 7% PAG-u (Yoshida and Takakuma, 1997). Trake su detektovane u prisustvu litijum-laktata kao supstrata, kofaktora NADH i tetrazolijumskog plavog. Intenziteti traka izoenzima LDH mereni su denzitometrijski korišćenjem Scion Image Beta 4.02 software (scion, Corp., 2007). Intenzitet svake trake izražen je kao procenat u odnosu na ukupnu površinu.

### **3.11. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme gasno-tečnom hromatografijom**

Ukupni lipidi plazme ekstrahuju se smešom organskih rastvarača. Lipidne klase se razdvajaju tankoslojnom hromatografijom (TLC). Masne kiseline izolovane fosfolipidne frakcije se metiluju, a dobijeni metil-estri MK razdvajaju gasno-tečnom hromatografijom (GLC).

#### **3.11.1. Ekstrakcija ukupnih lipida iz plazme**

Princip metode: Ukupni lipidi plazme ekstrahuju se smešom rastvarača hloroform-metanol 2:1 (v/v).

Postupak: 0.5 ml plazme ekstrahovati 3 puta sa po 1,5 ml smeše rastvarača hloroform-metanol 2:1 (v/v), u koji je dodato 50 mg BHT (antioksidant). Između dodavanja porcija hloroform-metanol 2:1 (v/v) smeša se snažno mućka oko 1 minut. Dobiveni lipidni ekstrakt propušta se kroz disk natrijum-sulfata, i upari do suva. Suvi prečišćen ekstrakt rastvara se u 0.2 ml smeše hloroform-metanola 2:1 (v/v) i koristi za hromatografsko razdvajanje lipidnih klasa.

### 3.11.2. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom (Ristić, 1991)

Fosfolipidi plazme odvojeni su jednodimenzionom TLC na silika gelu GH debljine 0.5 mm. Ukupni lipidni ekstrakt plazme nanosi se na ploču koja je prethodno aktivirana na 110 °C u toku 1 h. Kao sistem za razvijanje koristi se smeša petroleter-dietiletar-sirćetna kiselina (87:12:1, v/v/v). Razdvojene frakcije lipida identifikuju se pod UV- lampom (sl.10).



**Slika 10.** TLC hromatogram neutralnih lipida (PL = fosfolipidi, DG = diacilgliceroli, HOL = holesterol, TG = triacilgliceroli, HOL-E = estri holesterola, FFA= slobodne masne kiseline

### 3.11.3. Analiza masnih kiselina fosfolipida gasno-tečnom hromatografijom

Masne kiseline fosfolipida analizirane su gasno-tečnom hromatografijom (GLC, eng. gas liquid chromatography) na aparatu Shimadzu GC 2014 sa jonizacionim detektorom. Korišćena je semikapilarna kolona DB-23. Debljina filma stacionarne faze je 0,25 mm. Protok nosećeg gasa (azota) je 5 ml/min, protok vazduha 320 ml/min, a vodonika 30 ml/min. Temperatura detektora podešena je na 250 °C, a injektora na 220 °C. Kolona se drži na 130 °C 15 minuta i temperatura podiže do 190°C, brzinom 3 °C/minuti.

### *Priprema uzoraka za GLC*

Frakcija fosfolipida izdvojena na TLC se ekstrahuje sa odgovarajućeg sloja silika gela sa 1.5 ml n-heksana. Posle mućkanja dodaje se 0.2 ml 2M NaOH u metanolu. Epruvete se stave u termostat na 85°C i hidroliza odvija jedan sat. U hidrolizat se doda 0.2 ml 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u metanolu i termostatira još dva sata na 85°C. Nakon hlađenja smeša se centrifugira na 3000 o/min i odvojeni heksanski sloj upari do suva u struji azota. Dobljene masne kiseline su esterifikovane po modifikovanoj metodi transesterifikacije Christopherson i Glass-a (Christopherson, 1969). Uzorci pripremljenih metil-estara rastvoreni su neposredno pre injektiranja u oko 10 µl n-heksana (zavisno od količine suvog ostatka), a od toga je injektirano 0.2 µl. Masne kiseline su identifikovane upoređivanjem sa hromatogramom standarda masnih kiselina dobijenim pri istim uslovima. Sadržaji pojedinačnih masnih kiselina izraženi u procentima od ukupno detektovanih masnih kiselina na osnovu površine njihovih pikova.

## **3.12. Analiza masnih kiselina u fosfolipidima jetre i parametara oksidativnog stresa**

### **3.12.1. Priprema tkiva jetre za analizu masnih kiselina fosfolipida jetre (Harth, 1978)**

Tkivo jetre (5g) je homogenizovano i dodato mu je 5 ml smeše hloroform:metanol (2:1) u koju je dodato 50 mg 2,6-bi-tercbutil-hidroksi-toluena (BHT) kao antioksidanta. Ekstrakt je ispran dodatkom 0.2 zapremine vode. Posle centrifugiranja gornja faza je uklonjena i ekstrakt uparen do suva u vakuum-uparivaču na 50°C. U suvi ekstrakt dodaju se smeše: metanol/benzen (2:1), aceton/benzen (2:1), etanol/benzen (2:1) i posle dodatka svake od smeša vrši se uparavanje na vakuum-uparivaču. Dodavanjem hloroforma i njegovim uparavanjem suvi ekstrakt se koristi za hromatografsko (TLC) razdvajanje lipidnih klasa.

#### **3.12.1.1. Analiza masnih kiselina fosfolipida jetre (Folch, 1957)**

Frakcija fosfolipida izoluje se TLC-om, sistemom za razvijanje heksan:dietiletar:sirćetna kiselina (87:2:1,v/v) koristeći Silikagel GF ploče (Merck, Darmstadt, Germany).

Ekstrakcija i priprema metil-estara masnih kiselina i njihova GC analiza izvedena je kao što je opisano (Popović, 2009). Masne kiseline su identifikovane upoređivanjem sa

hromatogramom standarda masnih kiselina (Sigma, Chemical Co, St.Louis, MO, USA) i /ili PUFA-2 standarda (Supelco Inc., Belleforte, PA, USA) i identifikovani su metil-estri pojedinačnih masnih kiselina (Folch, 1957).

### 3.12.2. Priprema tkiva jetre za analizu parametara oksidativnog stresa

Posle delimičnog odmrzavanja jetra je homogenizovana na ledu u puferu: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1M NaCl, 20 mM EDTA i 1% Triton X-100. Odnos između tkiva i pufera bio je 1:10 (w/v). Homogenizacija je izvedena na homogenizeru Ultra Turex (Janke Kinkel), (Krummer et al 2002). Homogenizovano tkivo je centrifugirano na 10000 g, 10 min, na +4°C. Aktivnost CAT, SOD, PON1 i LPO, sadržaj ukupnih SH grupa i koncentracija nitrita je određivana u supernatantu.

#### 3.12.2.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa u jetri

Ukupni sadržaj proteina u tkivnom homogenatu određivan je metodom po Lowry-iju. (Lowry, 1951). Aktivnost katalaze (CAT) određivana je po metodi Aebi i sar. (1984) i izražena u  $\mu\text{M}$  vodonik-peroksida/min/g proteina. Aktivnost ukupne superoksid-dismutaze (SOD) je određena po metodi Beauchamp and Fridovich (1971) primenom Calbiochem Superoxide Assay kit-a. SOD aktivnost je izražena u U/g proteina.

Lipidna peroksidacija (LPO) u jetri određena je spektrofotometrijskim merenjem boje nastalog proizvoda između TBA i MDA na 535nm,  $a=1.56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Stock and Dormandy, 1971) i izražena u nM MDA/g proteina.

Koncentracija nitrita je određena ELISA testom korišćenjem Grisovog reagensa (Guevara, 1998). Koncentracija je izražena u  $\mu\text{M}$ /mg proteina. Sadržaj ukupnih tiolnih grupa u jetri određivan je metodom po Elmanu i njihova koncentracija izražena u  $\mu\text{M}$ /mg proteina (Ellman, 1959).

PON1 aktivnost je određivana modifikovanom metodom zasnovanoj na hidrolizi paraoksiona (Sciavon et al, 1996). Homogenat jetre je dodat u 0.1M Tris-HCl pufer, pH 8.0 koji sadrži 2.0 mM paraoxon (*o,o*-dietil-*o-p*-nitrofenil-fosfat, Sigma Chemical Co, London, UK) kao supstrat, 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$  i 1mM NaCl. Stvaranje p-nitrofenola praćeno je

merenjem apsorbance na 480nm na 37°C na CECIL CE 2021 UV/VIS spektrofotometru. PON1 aktivnost je izražena u internacionalnim jedinicama (U/L) kao količina ( $\mu\text{mol}$ ) supstrata hidrolizovanog u minuti, na litar supernatanta ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{L}$ ).

Enzimске aktivnosti (CAT, SOD, PON1) određivane su na CECIL CE 2021 UV/VIS spektrofotometru (BMG Labtech GmbH, offenburg, Germany)

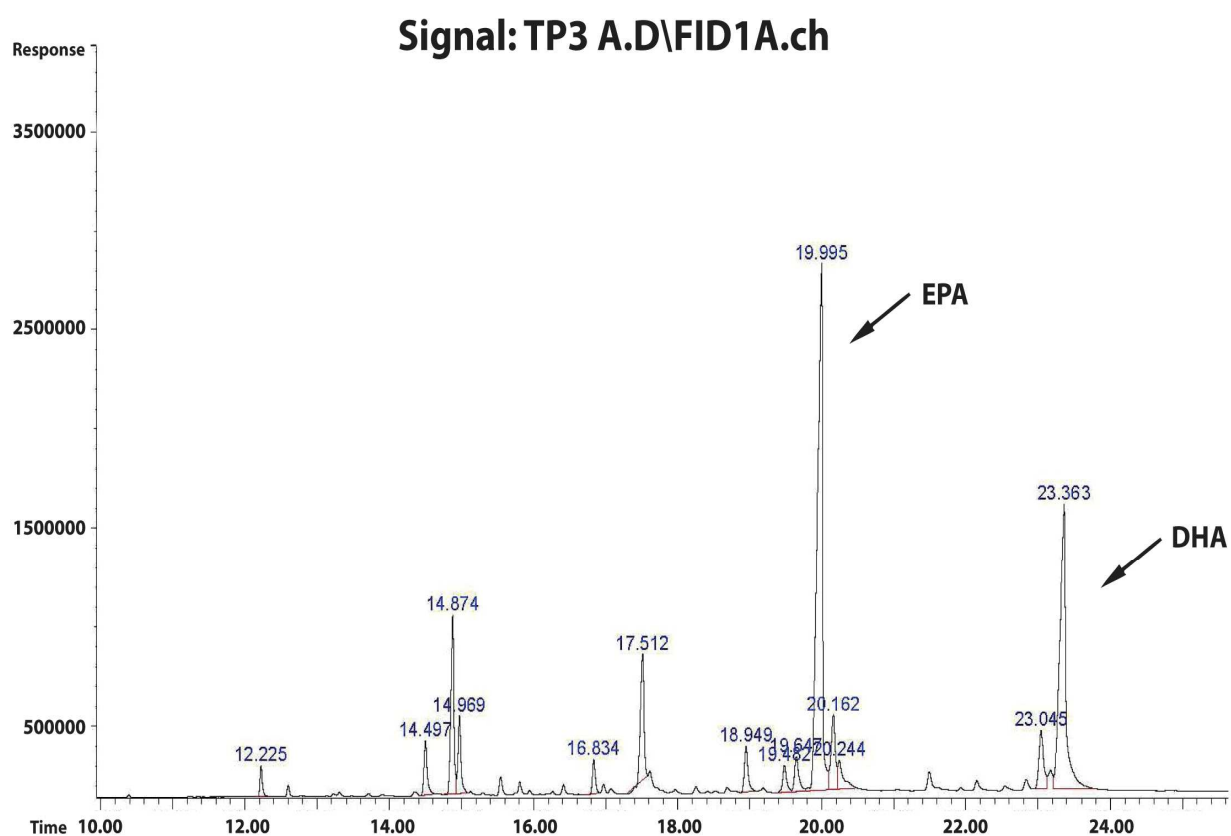
### **3.13. Statistička obrada podataka**

Podaci su izraženi kao srednje vrednosti  $\pm$  SD. Normalna distribucija varijabli testirana je korišćenjem Kolmogorov-Smirnov testa. S obzirom na to da su rezultati dobijeni za sve parametre pokazali normalnu distribuciju, ispitivanje statističke značajne razlike između vrednosti dve grupe vršeno je pomoću Student-ovog t-testa, dok je za ispitivanje statističke značajne razlike između više grupa korišćen ANOVA test primenom Tukey-testa. Minimalni nivo statističke značajnosti bio je  $p < 0.05$ .

## IV REZULTATI

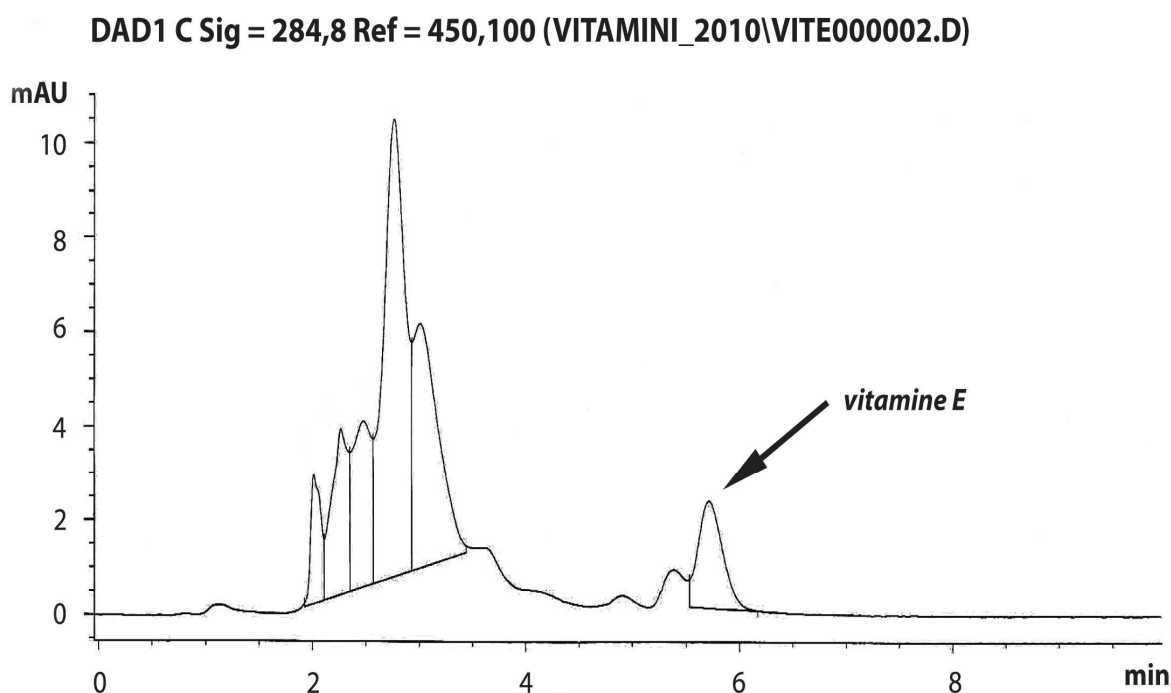
### 4.1. Analiza sastojaka ribljeg ulja

GC/MS analiza sastojaka ribljeg ulja primenjenog kao dodatak ishrani pacova Wistar soja pokazala je prisustvo više od 50% n-3 masnih kiselina, a dva najizrazitija pika (slika 11) predstavljaju eikozapentaensku kiselinu (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA).



Slika 11. GC/MS analiza sastojaka ribljeg ulja

HPLC analiza ribljeg ulja (slika12) pokazala je prisustvo vitamina E (pretežno  $\alpha$ -tokoferola) u smeši masnih kiselina koji ima uloga stabilizatora i antioksidanta.



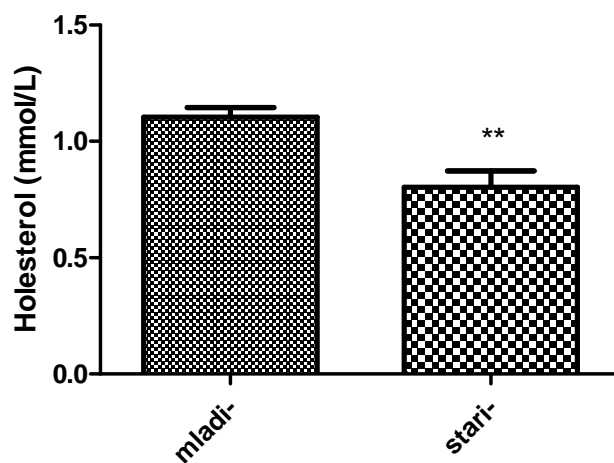
Slika 12. Prikaz vitaminskog sadržaja ribljeg ulja HPLC hromatografijom

#### 4.2. Biohemijski parametri pacova Wistar soja različite starosne dobi

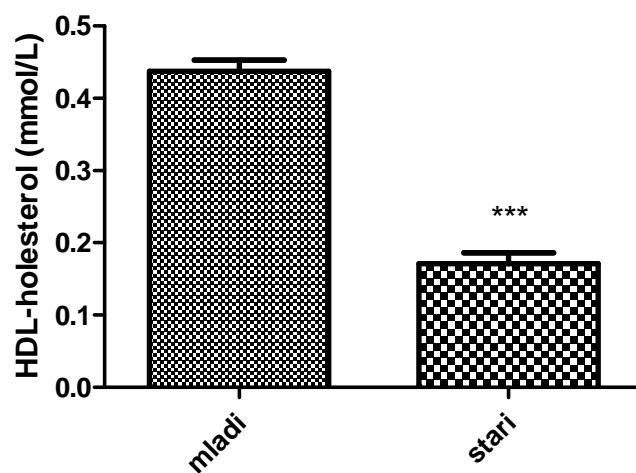
Potreba za poređenjem biohemijskih parametara kontrolnih grupa životinja starih 3 i 22 meseca neophodna je kako bismo bolje razumeli metabolizam mladih i starih životinja, proces starenja i njegove posledice.

Vrednosti holesterola, HDL-holesterola i triglicerida u plazmi pacova obe kontrolne grupe prikazane su na slikama 13, 14, 15. Dobijene srednje vrednosti koncentracija holesterola, HDL-holesterola i triglicerida u kontrolnoj grupi mladih pacova su statistički značajno više ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova.

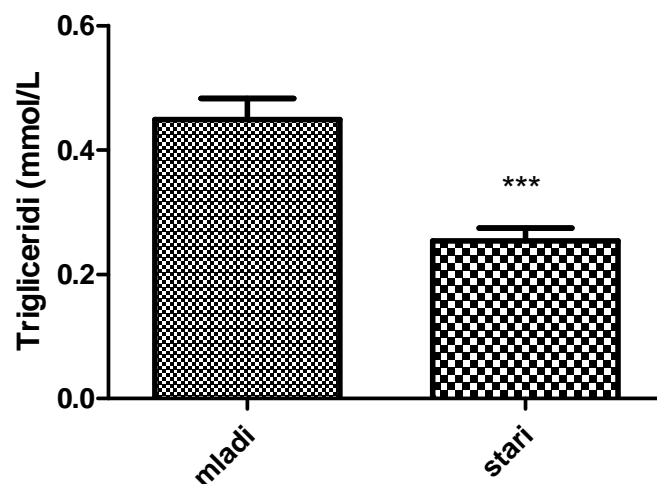




**Slika 13.** Koncentracija holesterola u plazmi kontrolnih grupa životinja različite starosne dobi. Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti: \*\* $p < 0.01$



**Slika 14.** Koncentracija HDL-holesterola u plazmi kontrolnih grupa životinja različite starosne dobi. Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti: \*\*\* $p < 0.001$



**Slika15.** Koncentracija triglicerida u plazmi kontrolnih grupa životinja različite starosne dobi. Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti: \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.2.1. Biohemijski parametri plazme kod mladih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem

Rezultati analize biohemijskih parametara (holesterol, trigliceridi, HDL-holesterol, LDL-holesterol, urea, kreatinin, mokraćna kiselina) u plazmi pacova (starih 3 meseca) kontrolne grupe i grupe tretiranih ribljim uljem, na početku eksperimenta i posle šest nedelja prikazani su u Tabeli 2.

Vrednosti dobijene za gotovo sve parametre u plazmi mladih pacova se značajno razlikuju nakon šestonedelnog tretmana ribljim uljem. Koncentracija triglicerida je značajno smanjena ( $p < 0.05$ ) posle tretmana. Koncentracija HDL-holesterola se značajno povećala ( $p < 0.01$ ) kako posle tretmana, tako i u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ). Koncentracija LDL-holesterola je značajno snižena posle tretmana u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ). Koncentracija mokraćne kiseline se značajno povećala posle tretmana ( $p < 0.001$ ), kao i u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ).

**Tabela 2.** Rezultati analize biokemijskih parametara plazme mladih (3 meseca starih) pacova Wistar soja kontrolne grupe i grupe tretirane ribljim uljem u toku 6 nedelja

	Holesterol (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)	HDL- holesterol (mmol/L)	LDL- holesterol (mmol/L)	Urea (mmol/L)	Kreatinin (μmol/L)	Mokraćna kiselina (mmol/L)
Kontrolna grupa - početak eksperimenta	1.10±0.11	0.45±0.09	0.44±0.04	0.46±0.11	5.91±0.47	56.29±5.31	33.14±13.5
Kontrolna grupa - kraj eksperimenta	1.14±0.12	0.45±0.04	0.44±0.06	0.49±0.16	5.93±0.33	54.12±5.27	32.0±12.03
Tretirana grupa- početak tretmana	1.11±0.11	0.52±0.19	0.50±0.07	0.45±0.09	6.21±0.87	57.33±13.2	34.33±7.21
Tretirana grupa- kraj tretmana	1.15±0.11	0.43±0.03*	0.60±0.06** ###	0.35±0.12###	5.61±0.46	56.55±7.47	50.67±2.74*** ###

Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti dobijenih: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 tretiranih početak-kraj; ###p<0.001 između tretirane grupe i kontrolne grupe na kraju eksperimenta.

Kardiovaskularni rizik kod mladih Wistar pacova (Tabela 3) je snižen (p<0.05) posle tretmana ribljim uljem, kao i u odnosu na kontrolnu grupu (p<0.001). Rizik od nastanka ateroskleroze značajno je snižen u odnosu na kontrolnu grupu pacova (p<0.001). Non-HDL-holesterol je značajno snižen u odnosu na kontrolnu grupu (p<0.05), kao i odnos nonHDL/HDL (p<0.001).

**Tabela 3.** Kardiovaskularni i rizik od ateroskleroze u tretiranoj (početak-kraj) i kontrolnoj grupi mladih pacova Wistar soja

	Kontrolna grupa	Tretirana grupa	
		početak	kraj
“non” HDL	0.67 ± 0.10	0.60 ± 0.09	0.54 ± 0.13 #
CHOL/HDL kardiovaskularni rizik	2.54 ± 0.27	2.23 ± 0.32	1.92 ± 0.27 * ###
LDL/HDL rizik nastanka ateroskleroze	1.06 ± 0.27	0.72 ± 0.16	0.59 ± 0.26 ###
“non”HDL/HDL	1.54 ± 0.27	1.23 ± 0.32	0.95 ± 0.26 ###

Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti dobijenih: \* p<0.05, tretman (početak-kraj); # p<0.05, ###p<0.001, poredjenje u odnosu na kontrolnu grupu.

#### 4.2.2. Biohemijski parametri plazme kod starih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem

Koncentracija holesterola u plazmi (starih 22 meseca) značajno se smanjila (p<0.05) posle tretmana ribljim uljem i takođe se smanjila u odnosu na kontrolnu grupu (p<0.01) (Tabela 4). Koncentracija HDL-holesterola značajno se povećala posle tretmana (p<0.01), i u odnosu na kontrolnu grupu (p<0.05). Koncentracija LDL-holesterola se statistički značajno smanjila (p<0.001) i u odnosu na početni nivo kod tretirane grupe i u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Koncentracija mokraćne kiseline se značajno povećala (p<0.001) u poredenju sa početkom tretmana, kao i u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Tabela 4).

**Tabela 4.** Rezultati određivanja biohemijskih parametara plazme u kontrolnoj grupi i grupi tretiranih pacova (22 meseca starih) na početku i posle 6 nedelja tretmana ribljim uljem

	Holesterol (mmol/L)	Trigliceridi (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	Urea (mmol/L)	Kreatinin (μmol/L)	Mokraćna kiselina (mmol/L)
Kontrolna grupa-početak tretmana	0.803±0.22	0.254±0.06	0.171±0.04	0.517±0.19	5.34±0.29	56.4±1.45	34.67±1.62
Tretirana grupa-početak tretmana	0.74±0.21	0.31±0.08	0.16±0.04	0.45±0.17	5.59±0.46	56.29±1.91	36.06±0.86
Tretirana grupa-kraj	0.54±0.14 * ##	0.25±0.06	0.23±0.07 ** #	0.17±0.13 *** ###	5.63±0.53	56.16±1.22	43.51±2.09 *** ###

Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti dobijenih u istoj grupi na početku i na kraju tretmana ribljim uljem: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, kao i između tretirane i kontrolne grupe: # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001.

Na osnovu dobijenih rezultata izračunati su kardiovaskularni faktor rizika i faktor rizika od ateroskleroze i prikazani u Tabeli 5.

Odnos ukupnog holesterola i HDL-holesterola značajno je snižen kod tretirane grupe (p<0.001) kao i u odnosu na kontrolnu grupu (p<0.01). Odnos LDL-holesterola i HDL-holesterola značajno je snižen i u tretiranoj grupi i u odnosu na kontrolnu grupu, (p<0.001), što predstavlja značajno smanjenje rizika od ateroskleroze (Tabela 5). Non-HDL holesterol značajno je smanjen (p<0.001), kako u tretiranoj grupi tako i u odnosu na kontrolnu grupu (p<0.01), kao i odnos non-HDL i HDL-holesterola (p<0.001).

**Tabela 5.** Kardiovaskularni faktor rizika i rizik od ateroskleroze u tretiranoj (početak i kraj) i kontrolnoj grupi starih pacova Wistar soja

	“non”-HDL	CHOL/HDL	LDL/HDL	“non”HDL/HDL
Kontrolna grupa-početak	0.65±0.10	4.89±1.53	2.80±0.85	3.89±1.53
Tretirna grupa- početak	0.60±0.14	5.73±1.96	2.81±0.94	3.39±1.04
Tretirna grupa- kraj	0.31±0.13 <sup>***###</sup>	2.31±0.61 <sup>***##</sup>	0.82±0.38 <sup>***###</sup>	1.15±0.48 <sup>***###</sup>

Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti dobijenih: na početku i kraju tretmana ribljim uljem <sup>\*\*</sup>p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>p<0.001, i u odnosu na kontrolnu grupu <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001.

#### 4.3. Profili masnih kiselina fosfolipida plazme i jetre kod pacova Wistar soja različite starosne dobi

Profili masnih kiselina u fosfolipidima plazme i fosfolipidima jetre razlikovali su se u kontrolnim grupama pacova Wistar soja različite životne dobi: mladih (3 meseca) i starih (22 meseca).

##### 4.3.1. Sadržaj masnih kiselina u fosfolipidima plazme, u kontrolnim grupama pacova Wistar soja različite starosne dobi

U kontrolnoj grupi mladih pacova u odnosu na stare pacove nađene su statistički značajno više vrednosti sledećih masnih kiselina: oleinske (18:1, n9, p<0.01), vascenske (18:1, n-7; p<0.05), MUFA (p<0.01). Sa druge strane, smanjio se sadržaj sledećih masnih kiselina: stearinske (18:0, p<0.01), linolne (18:2,n-6; p<0.05), arahidonske (20:4, n-6, p<0.05) kao i ukupnih PUFA (p<0.01) i n-6 (p<0.01) masnih kiselina (Tabela 6).

**Tabela 6.** Sadržaj masnih kiselina u fosfolipidima plazme u kontrolnim grupama pacova Wistar soja različite starosne dobi

MK	Zastupljenost MK (%)	
	Mladi (3 meseca)	Stari (22 meseca)
16:0	29.31 ± 0.62	28.34 ± 1.89
16:1	1.22 ± 0.78	0.73 ± 0.50
18:0	22.55 ± 0.38**	24.36 ± 1.46
18:1,n-9	12.25 ± 0.85**	8.23 ± 3.03
18:1,n-7	2.66 ± 0.24*	2.04 ± 0.60
18:2	12.58 ± 0.82*	14.07 ± 1.41
20:3	0.59 ± 0.06	0.69 ± 0.13
20:4	12.29 ± 0.31*	14.77 ± 2.43
20:5	0.28 ± 0.07	0.41 ± 0.22
22:4	0.27 ± 0.02	0.36 ± 0.19
22:5	0.82 ± 0.15	0.67 ± 0.17
22:6	4.88 ± 0.18	5.34 ± 1.39
SFA	51.88 ± 0.73	52.70 ± 1.18
MUFA	16.13 ± 1.43**	10.99 ± 3.94
PUFA	31.45 ± 0.94**	36.32 ± 3.65
n-3	5.97 ± 0.23	6.42 ± 1.46
n-6	25.75 ± 0.94**	29.89 ± 3.02
n-6/n-3	4.32 ± 0.25	4.65 ± 2.34

\*p<0.05, \*\*p<0.01 statistička značajnost razlike srednjih vrednosti kontrolnih grupa životinja

#### 4.3.2. Sadržaj masnih kiselina u fosfolipidima jetre u kontrolnim grupama pacova Wistar soja različite starosne dobi

Sadržaj masnih kiselina u fosfolipidima jetre razlikovali su se kod pacova Wistar soja različite životne dobi: mladih (3 meseca) i starih (22 meseca) (Tabela 7).

U kontrolnoj grupi mladih pacova u odnosu na stare pacove nađene su statistički značajno niže vrednosti u sadržaju sledećih masnih kiselina: Linolne (18:2, n-6, p<0.01),  $\gamma$ -linolenske (18:3, n-6, p<0.001), dihomo-  $\gamma$ -linolenske kiseline (20:3, n-6, p<0.05). Sadržaj ukupnih n-6 MK kao i odnos n-6/n-3 bili su takođe sniženi (p<0.05, p<0.001). S druge

strane kod mladih pacova nađene su statistički značajno više vrednosti u sadržaju: palmitinske kiseline (16:0,  $p < 0.001$ ), palmitoleinske (16:1,  $p < 0.05$ ), eikosaheksaenske (22:6, n-3,  $p < 0.001$ ) kao i ukupnih n-3 masnih kiselina ( $p < 0.001$ ).

**Tabela 7.** Profili masnih kiselina u fosfolipidima jetre u kontrolnim grupama pacova Wistar soja različite starosne dobi

MK	Zastupljenost MK (%)	
	Mladi (3 meseca)	Stari (22 meseca)
16:0	21.36 ± 1.55 ***	18.15 ± 1.17
16:1	0.71 ± 0.11 *	0.65 ± 0.32
18:0	23.49 ± 2.03	26.38 ± 1.87
18:1,n-9	5.15 ± 0.44	5.37 ± 1.11
18:1,n-7	1.78 ± 0.15	2.02 ± 0.34
18:2	12.34 ± 0.74 **	14.43 ± 1.37
18:3	0.033 ± 0.005 ***	0.05 ± 0.01
20:3	1.24 ± 0.34 *	1.67 ± 0.36
20:4	22.16 ± 1.36	23.02 ± 3.26
20:5	0.42 ± 0.07	0.50 ± 0.09
22:4	0.29 ± 0.04	0.21 ± 0.10
22:5	1.03 ± 0.08	0.97 ± 0.10
22:6	8.43 ± 0.71 ***	4.90 ± 1.04
SFA	44.85 ± 3.45	44.54 ± 1.03
MUFA	7.65 ± 0.46	8.05 ± 1.09
PUFA	45.97 ± 1.20	45.79 ± 3.30
n-3	9.92 ± 0.64 ***	6.44 ± 1.10
n-6	36.04 ± 1.51 *	39.35 ± 3.72
n-6/n-3	3.65 ± 0.36 ***	6.30 ± 1.46

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti kontrolne grupe mladih i starih životinja

#### 4.4. Masnokiselinski profili fosfolipida plazme i jetre, aktivnost desaturaza i elongaza kod mladih i starih pacova tretiranih ribljim uljem

Profili MK u fosfolipidima plazme i jetre, kao i procenjene vrednosti aktivnosti desaturaza i elongaza razlikovale su se posle tretmana ribljim uljem i kod mladih i kod starih pacova u odnosu na kontrolne grupe životinja. Došlo je do promena u procentualnom sadržaju pojedinačnih masnih kiselina, promena u sadržaju ukupnih mononezasićenih (MUFA), polinezasićenih (PUFA), n-3, n-6 kiselina i njihovih međusobnih odnosa.



#### 4.4.1. Uticaj tretmana ribljim uljem na profile masnih kiselina fosfolipida plazme mladih pacova

Zastupljenost masnih kiselina u fosfolipidima plazme kod pacova starih 3 meseca u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj sa ribljim uljem u toku šest nedelja prikazana je u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Profili MK fosfolipida plazme mladih pacova Wistar soja kontrolne grupe i grupe tretirane ribljim uljem u toku šest nedelja

MK	Zastupljenost MK u fosfolipidima (%)	
	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
16:0	29.31 ± 0.51	29.33 ± 0.62
16:1	1.71 ± 0.1	1.22 ± 0.78
18:0	23.04 ± 0.44*	22.55 ± 0.38
18:1, n-9	13.72 ± 0.24***	12.25 ± 0.85
18:1, n-7	2.51 ± 0.05	2.66 ± 0.24
18:2	11.93 ± 0.29*	12.58 ± 0.82
20:3	0.76 ± 0.39	0.59 ± 0.06
20:4	9.25 ± 0.09***	12.29 ± 0.31
20:5	0.65 ± 0.03***	0.28 ± 0.07
22:4	0.52 ± 0.38***	0.27 ± 0.02
22:5	1.37 ± 0.03***	0.82 ± 0.15
22:6	5.03 ± 0.18	4.88 ± 0.18
SFA	52.36 ± 0.38	51.88 ± 0.73
MUFA	17.93 ± 0.22*	16.13 ± 1.43
PUFA	32.97 ± 11.19	31.45 ± 0.94
n-3	7.06 ± 0.18***	5.97 ± 0.23
n-6	26.4 ± 11.20	25.75 ± 0.94
n-6/n-3	3.18 ± 0.12***	4.32 ± 0.25

\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe

U grupi pacova tretiranoj ribljim uljem značajne promene uočene su u sadržaju stearinske kiseline, čiji se procentni udeo povećao ( $p < 0.05$ ). Procenat oleinske kiseline se takođe značajno povećao ( $p < 0.001$ ). Sadržaj linolne kiseline (18:2, n-6) se značajno smanjio ( $p < 0.05$ ) kao i arahidonske kiseline (20:4, n-6), ( $p < 0.001$ ). Suprotno tome, sadržaj eikozapentaenske kiseline (20:5, n-3) se značajno povećao ( $p < 0.001$ ), kao i dokozatetraenske kiseline (22:4, n-6), ( $p < 0.001$ ) i dokozapentaenske (22:5, n-3) ( $p < 0.001$ ). Sadržaj ukupnih mononezasićenih kiselina (MUFA) se značajno povećao ( $p < 0.05$ ), a ukupnih PUFA neznatno promenio. Međutim, procentni udeo ukupnih n-3 masnih kiselina se povećao ( $p < 0.001$ ). Odnos n-6/n-3 se značajno statistički smanjio ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu.

#### **4.4.1.1. Procenjene aktivnosti desaturaza i elongaza kod mladih pacova u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj ribljim uljem u trajanju šest nedelja**

Procenjene aktivnosti desaturaza ( $\Delta 4$ ,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$ ) i elongaza predstavljaju odnos (22:6/22:5, 20:4/20:3, 20:3/18:2, 18:1/18:0 i 18:0/16:0) procentualnih zastupljenosti MK u fosfolipidima plazme. Procenjene enzimske aktivnosti desaturaza i elongaza mladih pacova pokazale su statistički značajne promene posle suplementacije ribljim uljem (Tabela 9). Procenjena enzimska aktivnost  $\Delta 4$ -desaturaze se značajno smanjila ( $p < 0.001$ ), kao i procenjena vrednost aktivnosti  $\Delta 5$ -desaturaze ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Procenjena aktivnost  $\Delta 9$ -desaturaze se značajno povećala ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu, dok se vrednosti elongaze nisu menjale.

**Tabela 9.** Procena aktivnosti desaturaza i elongaza mladih pacova kontrolne grupe i grupe tretirane ribljim uljem u toku šest nedelja

Odnosi MK (enzimi)	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
22:6/22:5 ( $\Delta$ 4)	3.71 $\pm$ 0.07***	6.19 $\pm$ 1.47
20:4/20:3 ( $\Delta$ 5)	15.13 $\pm$ 0.96***	20.83 $\pm$ 2.17
20:3/18:2 ( $\Delta$ 6)	0.059 $\pm$ 0.003	0.04 $\pm$ 0.003
18:1/18:0 ( $\Delta$ 9)	13.82 $\pm$ 0.23***	12.36 $\pm$ 0.84
18:0/16:0 (elongaza)	0.78 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.02

\*\*\*p<0.001 statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe

#### 4.4.2. Uticaj tretmana ribljim uljem na profile masnih kiselina fosfolipida jetre mladih pacova

Ispitali smo procentualnu zastupljenost masnih kiselina u fosfolipidima jetre, kod kontrolne i tretirane grupe kako bismo uočili razlike nastale tretmanom ribljim uljem. Takođe, hteli smo da uočimo do kakvih je promena u profilu MK u fosfolipidima plazme i MK fosfolipida jetre došlo tretmanom ribljim uljem. Promene u ukupnim sadržajima SFA, MUFA, PUFA bile su od posebnog značaja.

Rezultati analize zastupljenosti masnih kiselina u fosfolipidima jetre mladih pacova (3 meseca starosti) u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj ribljim uljem prikazani su u Tabeli 10. Sadržaj linolne kiseline (LA, n-6) se značajno procentualno povećao ( $p < 0.001$ ), kao i  $\gamma$ -linolenske kiseline ( $\gamma$ -LA, n-6), ( $p < 0.01$ ), a takođe i dihomo- $\gamma$ -linolenske kiseline (dihomo- $\gamma$ -LA, n-6) ( $p < 0.05$ ) kod tretiranih pacova u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Sadržaj arahidonske kiseline (AA, n-6) se značajno procentualno smanjio ( $p < 0.001$ ). Procentualni udeo eikozapentaenske kiseline (EPA, n-3), se značajno povećao ( $p < 0.001$ ), kao i dokozatetraenske kiseline (DTA, n-6) ( $p < 0.001$ ), dokozapentaenske (DPA, n-3), ( $p < 0.001$ ) i dokozaheksaenske kiseline (DHA, n-3) ( $p < 0.01$ ) u odnosu na procentualni sadržaj ovih masnih kiselina u kontrolnoj grupi životinja.

Ukupni sadržaj mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) se značajno povećao ( $p < 0.05$ ), kao i sadržaj n-3 masnih kiselina ( $p < 0.001$ ), dok se sadržaj ukupnih n-6 masnih kiselina smanjio ( $p < 0.001$ ), kao i odnos n-6/n-3 kiselina ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Tabela 10).

**Tabela 10.** Profili masnih kiselina fosfolipida jetre mladih pacova Wistar soja u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj ribljim uljem u toku šest nedelja

MK	Zastupljenost MK u fosfolipidima (%)	
	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
16:0	22.23 ± 0.80	21.36 ± 1.55
16:1	0.82 ± 0.12	0.71 ± 0.11
18:0	22.45 ± 1.67	23.49 ± 2.03
18:1, n-9	5.37 ± 0.25	5.16 ± 0.44
18:1, n-7	1.99 ± 0.26	1.79 ± 0.16
18:2	15.89 ± 0.98 <sup>###</sup>	12.34 ± 0.74
18:3	0.07 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.03 ± 0.005
20:3	1.6 ± 0.08 <sup>#</sup>	1.25 ± 0.35
20:4	15.57 ± 0.51 <sup>###</sup>	22.17 ± 1.37
20:5	2.53 ± 0.25 <sup>###</sup>	0.43 ± 0.07
22:4	0.09 ± 0.02 <sup>###</sup>	0.29 ± 0.05
22:5	1.73 ± 0.19 <sup>###</sup>	1.03 ± 0.08
22:6	9.5 ± 0.56 <sup>##</sup>	8.43 ± 0.72
SFA	44.68 ± 1.30	44.85 ± 3.45
MUFA	8.18 ± 0.30 <sup>#</sup>	7.66 ± 0.47
PUFA	46.90 ± 1.05	45.97 ± 1.20
n-3	13.84 ± 0.64 <sup>###</sup>	9.92 ± 0.65
n-6	33.16 ± 0.97 <sup>###</sup>	36.05 ± 1.51
n-6/n-3	2.40 ± 0.15 <sup>###</sup>	3.65 ± 0.36

<sup>#</sup>  $p < 0.05$ , <sup>##</sup>  $p < 0.01$ , <sup>###</sup>  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe.

#### 4.4.2.1. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u jetri pacova Wistar soja

Aktivnosti desaturaza i elongaza procenjene na osnovu odnosa zastupljenosti MK u jetri pacova Wistar soja su se promenile posle tremana ribljim uljem u trajanju od 6 nedelja (Tabela 11).

**Tabela 11.** Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u jetri mladih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem i u kontrolnoj grupi.

Odnosi MK (enzimi)	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
22:6/22:5 ( $\Delta 4$ )	5.52±0.42 <sup>###</sup>	8.24±1.20
20:4/20:3 ( $\Delta 5$ )	9.77±0.74 <sup>###</sup>	16.23±1.50
20:3/18:2 ( $\Delta 6$ )	0.10±0.003	0.10±0.03
18:1/18:0 ( $\Delta 9$ )	0.24±0.025	0.22±0.026
18:0/16:0 (elongaza)	1.01±0.10 <sup>#</sup>	1.099±0.05

<sup>#</sup>p<0.05, <sup>###</sup>p<0.001 statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe

Aktivnosti ( $\Delta 4$ ) kao i  $\Delta$ -5-desaturaze ( $\Delta 5$ ) u tretiranoj grupi su se statistički značajno smanjile (p<0.001), kao i aktivnost elongaze (p<0.05), u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

#### 4.4.3. Uticaj tretmana ribljim uljem na profile masnih kiselina fosfolipida plazme starih pacova

Profili masnih kiselina fosfolipida plazme u grupi starih pacova (22 meseca) tretiranih ribljim uljem značajno su se promenili u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 12). Utvrđeno je statistički značajno povećanje procentualnog udela sledećih masnih kiselina: stearinske (18:0; p<0.05), vakcenske (18:1, n-7; p<0.05), linolne (18:2, n-6; p<0.01), eikozatrienske (20:3, n-6; p<0.01), eikozapentaenske (20:5, n-3; p<0.05) i dokozapentaenske (22:5, n-3; p<0.001) u odnosu na kontrolnu grupu.

**Tabela 12.** Profili masnih kiselina fosfolipida plazme kod starih pacova Wistar soja u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj ribljim uljem u toku 6 nedelja.

MK	Zastupljenost MK u fosfolipidima (%)	
	Kontrolna grupa	Tretirana grupa
16:0	28.34±1.89	26.23±3.75
16:1	0.73±0.50	0.77±0.42
18:0	24.36±1.46	27.91±2.98 <sup>#</sup>
18:1 n9	8.23±3.03	6.89±0.91
18:1 n7	2.04±0.60	2.90±0.50 <sup>#</sup>
18:2	14.07±1.41	17.23±1.66 <sup>###</sup>
20:3	0.69±0.13	1.31±0.46 <sup>###</sup>
20:4	14.77±2.43	8.87±2.21 <sup>###</sup>
20:5	0.41±0.22	0.72±0.21 <sup>#</sup>
22:4	0.36±0.19	0.47±0.23
22:5	0.67±0.17	1.54±0.40 <sup>###</sup>
22:6	5.34±1.39	5.03±1.19
SFA	52.70±1.18	54.13±3.97
MUFA	10.99±3.94	10.56±0.88
PUFA	36.32±3.65	35.18±4.12
n-3	6.42±1.46	7.28±1.61
n-6	29.89±3.02	27.89±3.10
n-6/n-3	4.65± 2.34	3.83 ± 1.92

<sup>#</sup>p<0.05, <sup>##</sup>p<0.01, <sup>###</sup>p<0.001 statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe životinja

Pri tretmanu ribljim uljem samo se smanjila zastupljenost arahidonske kiseline (20:4, n-6; p<0.001) u odnosu na kontrolu.

#### 4.4.3.1. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza na osnovu masnokiselinskih profila fosfolipida starih pacova

Procenjene aktivnosti desaturaza u grupi životinja tretiranih ribljim uljem promenile su se u odnosu na kontrolnu grupu, što je prikazano u Tabeli 13. Aktivnost  $\Delta$ -4-desaturaze se značajno smanjila ( $p < 0.01$ ), kao i  $\Delta$ -5-desaturaze ( $p < 0.001$ ), dok se procenjena vrednost aktivnosti  $\Delta$ -6-desaturaze značajno povećala ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

**Tabela 13.** Procenjene vrednosti desaturaza i elongaza u plazmi u tretiranoj i kontrolnoj grupi starih Wistar pacova

	Kontrolna grupa	Tretirana grupa
22:6/22:5 ( $\Delta$ 4)	8.48 $\pm$ 3.37	3.32 $\pm$ 0.56 <sup>##</sup>
20:4/20:3 ( $\Delta$ 5)	21.57 $\pm$ 4.01	7.48 $\pm$ 3.56 <sup>###</sup>
20:3/18:2 ( $\Delta$ 6)	0.05 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>#</sup>
18:1/18:0 ( $\Delta$ 9)	0.34 $\pm$ 0.14	0.25 $\pm$ 0.05
18:0/16:0 (elongaza)	0.86 $\pm$ 0.10	1.09 $\pm$ 0.22

<sup>#</sup>  $p < 0.05$ , <sup>##</sup>  $p < 0.01$ , <sup>###</sup>  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe životinja

#### 4.4.4. Profili masnih kiselina fosfolipida jetre kod starih Wistar pacova

Masnokiselinski profili fosfolipida jetre kod starih pacova (Tabela 14) promenili su se posle tretmana ribljim uljem u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Statistički značajno, u odnosu na kontrolnu grupu, povećao se procentni udeo palmitinske ( $p < 0.001$ ), i vakcenske kiseline ( $p < 0.01$ ) i linolne kiseline (LA, n-6) ( $p < 0.01$ ), eikozapentaenske (EPA, n-3;  $p < 0.001$ ) i dokozapentaenske kiseline (DPA, n-3,  $p < 0.001$ ).

**Tabela 14.** Profili masnih kiselina fosfolipida jetre pacova starih 22 meseca posle šestonedelnog tretmana ribljim uljem i pacova kontrolne grupe

MK	Zastupljenost MK u fosfolipidima (%)	
	Kontrolna grupa	Tretirana grupa
16:0	18.15±1.18	25.50±2.39 <sup>***</sup>
16:1	0.65±0.32	0.69±0.12
18:0	26.38±1.88	26.27±3.03
18:1 n9	5.38±1.12	4.75±0.49
18:1 n7	2.03±0.34	2.95±0.63 <sup>**</sup>
18:2	14.43±1.37	17.35±1.68 <sup>**</sup>
18:3	0.05±0.01	0.07±0.01
20:3	1.68±0.36	1.73±0.54
20:4	23.02±3.26	10.99±1.42 <sup>***</sup>
20:5	0.50±0.09	2.64±0.67 <sup>***</sup>
22:4	0.22±0.11	0.53±0.44
22:5	0.98±0.11	1.52±0.08 <sup>***</sup>
22:6	4.90±1.04	5.00±0.24
SFA	44.54±1.033	51.77±2.72 <sup>***</sup>
MUFA	8.05±1.09	8.4±0.97
PUFA	22.76±1.06	28.85±1.82 <sup>***</sup>
n-3	6.44±1.10	9.23±0.84 <sup>***</sup>
n-6	39.35±3.73	30.61±2.64 <sup>***</sup>
n-6/n-3	6.30±1.46	3.35±0.51 <sup>***</sup>

\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe životinja



Suplementacija ribljim uljem je dovela do značajnog sniženja ( $p < 0.001$ ) procentualnog udela arahidonske kiseline (AA, n-6). Sadržaj ukupnih zasićenih masnih kiselina se povećao ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Sadržaj polinezasićenih (PUFA) se povećao ( $p < 0.001$ ), kao i sadržaj ukupnih n-3 masnih kiselina ( $p < 0.001$ ), dok se zastupljenost ukupnih n-6 smanjila ( $p < 0.001$ ). Odnos n-6/n-3 masnih kiselina se stoga značajno smanjio ( $p < 0.001$ ) (Tabela 14).

#### 4.4.4.1. Procena aktivnosti elongaza i desaturaza u jetri starih pacova Wistar soja

Procenjene aktivnosti  $\Delta 4$  i  $\Delta 5$  desaturaza i elongaza u jetri starih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem značajno su se smanjile ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  i  $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Tabela 15).

**Tabela 15.** Procenjene aktivnosti desaturaza i elongaza jetre kod starih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem i kod kontrolne grupe životinja

Odnosi MK (enzim)	Kontrolna grupa	Tretirana grupa
22:6/22:5 ( $\Delta 4$ )	$5.07 \pm 1.26$	$3.29 \pm 0.25^{##}$
20:4/20:3 ( $\Delta 5$ )	$14.37 \pm 4.05$	$6.72 \pm 1.59^{###}$
20:3/18:2 ( $\Delta 6$ )	$0.12 \pm 0.03$	$0.099 \pm 0.02$
18:1/18:0 ( $\Delta 9$ )	$0.20 \pm 0.03$	$0.18 \pm 0.04$
18:0/16:0 (elongaza)	$1.46 \pm 0.18$	$1.04 \pm 0.17^{###}$

<sup>##</sup>  $p < 0.01$ , <sup>###</sup>  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe životinja

#### 4.5. Parametri oksidativnog stresa u krvi i jetri pacova različite starosne dobi

Poređenjem parametara oksidativnog stresa u krvi i jetri kod životinja različite starosne dobi, mladih (3 meseca) i starih (22 meseca) uočavaju se statistički značajne razlike u nekim ispitivanim parametrima.

##### 4.5.1. Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima i plazmi pacova različite starosne dobi

Poređenjem vrednosti parametara oksidativnog stresa kod životinja različite starosne dobi uočava se razlika u koncentraciji nitrita i paraoksonaza. Koncentracija nitrita u plazmi statistički je značajno snižena kod životinja starih 3 meseca ( $p < 0.01$ ) u odnosu na životinje stare 22 meseca dok je aktivnost paraoksonaza u plazmi (PON1) statistički značajno povećana ( $p < 0.0001$ ) (Tabela 16).

**Tabela 16.** Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima i plazmi kontrolnih grupa pacova različite starosne dobi

	Kontrolna grupa-mladi	Kontrolna grupa-stari
SOD (U/gHb)	290 ± 18.48	304.74 ± 25.52
CAT (U/gHb)	41.66 ± 4.10	43.55 ± 10.37
MDA (nmol/gHb)	66.04 ± 7.35	56.39 ± 3.51
Nitriti (µmol/L)	63.43 ± 2.75 **	72.69 ± 13.58
SH grupe (µmol/L)	539.45 ± 0.05	599.96 ± 26.48
PON1 (U/L)	141.0 ± 3.91 ***	115.16 ± 9.04

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti kontrolnih grupa životinja

#### 4.5.2. Parametri oksidativnog stresa u jetri kod pacova različite starosne dobi

Poređenjem vrednosti parametara oksidativnog stresa u jetri kod životinja različite starosne dobi razlikuju se značajno u nekim parametrima. Lipidna peroksidacija (MDA) kod mladih pacova je statistički značajno snižena ( $p < 0.001$ ) kod kontrolne grupe mladih pacova u odnosu na grupu starih pacova dok je aktivnost superoksid-dismutaze statistički značajno povišena kao i koncentracija nitrita ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (Tabela 17).

**Tabela 17.** Parametri oksidativnog stresa u jetri kontrolnih grupa pacova Wistar soja različite starosne dobi

	Kontrolna grupa-mladi	Kontrolna grupa-stari
SOD (U/mg proteina)	360.37 ± 24.28367*	333.27 ± 17.03
CAT (μmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg proteina)	154.98 ± 21.11	144.86 ± 3.33
MDA (nmol/ mg proteina)	73.73 ± 7.77***	94.06 ± 7.54
nitriti (μmol/mg proteina)	6.37 ± 0.96**	4.65 ± 0.39
SHgrupe (μmol/mg proteina)	1053.79 ± 88.67	1062.78 ± 22.34
PON1(U//min/mg proteina)	24.48 ± 2.94	28.55 ± 5.02

Statistička značajnost razlike srednjih vrednosti kontrolnih grupa, \* $p < 0.05$ \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

#### 4.6. Parametri oksidativnog stresa kod pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem

Uticaj suplementacije ribljim uljem na parametre oksidativnog stresa (enzimi antioksidativne zaštite, MDA, sadržaj SH, nitriti, PON) ispitivan je kod pacova Wistar soja starih 3 meseca i 22 meseca.

#### 4.6.1. Parametri oksidativnog stresa u krvi mladih pacova tretiranih ribljim uljem

Parametri oksidativnog stresa u krvi mladih pacova analizirani su u eritrocitima (SOD, CAT, MDA) i plazme (nitriti, PON) ispitivanih životinja.

Vrednosti dobijene za parametre oksidativnog stresa, odnosno vrednosti aktivnosti enzima antioksidativnog sistema zaštite (AOS), (AOS eng. Antioxidative defence system) i koncentracije malondialdehida (MDA) i nitrita, statistički se značajno razlikuju u grupi mladih pacova tretiranih ribljim uljem u odnosu na kontrolnu grupu mladih životinja (Tabela 18).

Aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) i aktivnost katalaze (CAT) u eritrocitima su se statistički značajno povećale ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Koncentracija nitrita u plazmi se značajno smanjila ( $p < 0.001$ ), kao i (MDA) ( $p < 0.01$ ), parametra lipidne peroksidacije. Aktivnost paraoksonaznog enzima (PON1) se statistički značajno povećala ( $p < 0.001$ ). Suplementacija ribljim uljem kod mladih pacova Wistar soja u trajanju od šest nedelja dovodi do smanjenja lipidne peroksidacije i povećanja antioksidativne zaštite (povećanja aktivnosti AOS enzima).

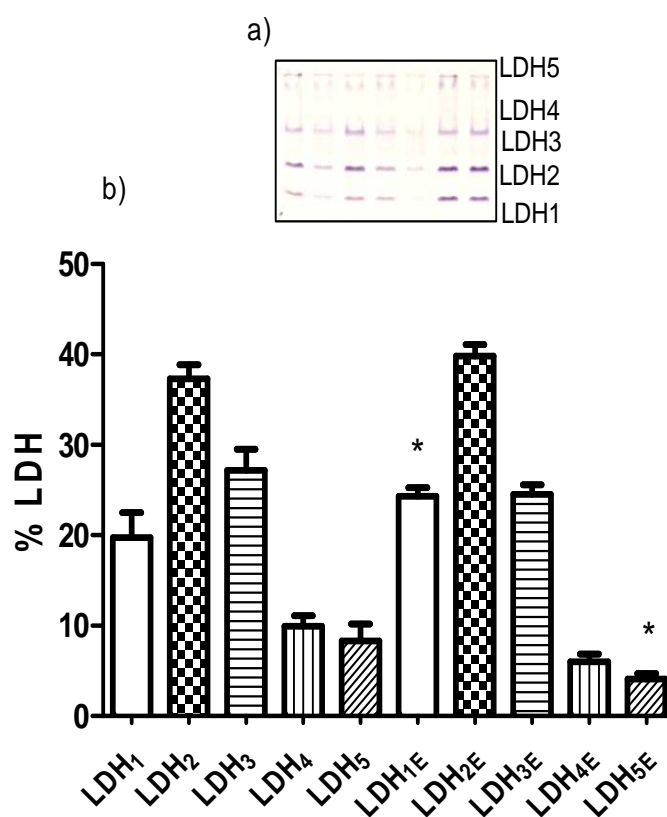
**Tabela 18.** Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima i plazmi mladih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem

	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
SOD (U/ gHb)	321.15 ± 25.32 <sup>##</sup>	290.75 ± 18.5
CAT (μmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /gHb/min)	48.15 ± 5.73 <sup>#</sup>	41.66 ± 4.10
MDA (nmol/gHb)	49.93 ± 11.7 <sup>##</sup>	66.04 ± 7.35
Nitriti (μmol/L)	56.85 ± 3.65 <sup>###</sup>	63.43 ± 2.75
SH grupe (μmol/L)	516.76 ± 72.87	539.45 ± 66.13
PON1 (U/L)	152.67 ± 4.80 <sup>###</sup>	141.10 ± 3.91

<sup>#</sup>  $p < 0.05$  <sup>##</sup>  $p < 0.01$  <sup>###</sup>  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane grupe i kontrolne grupe životinja

#### 4.6.1.2. Relativna aktivnost LDH izoenzimskih oblika kod mladih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem

Tretman mladih pacova Wistar soja ribljim uljem dovodi do promena u relativnoj aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH<sub>1-5</sub>) kod mladih pacova (Slika 16). Procenti relativne aktivnosti izoenzimskih oblika LDH<sub>1-5</sub> kod tretirane grupe pacova pokazuju statistički značajno sniženje LDH<sub>5</sub> izoenzimskog oblika ( $p < 0.01$ ) kao i značajno povišenje relativne zastupljenosti LDH<sub>1</sub> ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.



**Slika 16.** Relativna zastupljenost izoenzimskih oblika LDH u grupi mladih pacova tretiranih ribljim uljem. a) nativna elektroforeza LDH<sub>1-5</sub> b) relativna aktivnost izoenzimskih oblika LDH kod kontrolne grupe (LDH<sub>1-5</sub>) i tretirane grupe (LDH<sub>1E-5E</sub>), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe životinja

#### 4.6.3. Parametri oksidativnog stresa u jetri mladih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem

Dodatak ribljeg ulja u hrani mladih pacova, u trajanju od šest nedelja, dovodi do značajnih promena u parametrima oksidativnog stresa (enzima antioksidativne zaštite, sadržaja MDA, nitrita, SH grupa i aktivnosti PON) u jetri tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Statistički se značajno smanjio stepen lipidne peroksidacije ( $p < 0.001$ ), aktivnost katalaze ( $p < 0.05$ ), koncentracija nitrita ( $p < 0.01$ ), dok se aktivnost paraoksonaze (PON1) statistički značajno povećala ( $p < 0.01$ ) (Tabela 19).

**Tabela 19.** Parametri oksidativnog stresa u jetri mladih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem

	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
SOD (U/mg proteina)	353.87 ± 16.24	360.37 ± 24.28
CAT ( $\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{min}$ )/mg proteina)	138.62 ± 3.41 <sup>#</sup>	154.98 ± 21.11
MDA (nmol/mg proteina)	47.8 ± 10.68 <sup>###</sup>	73.73 ± 7.77
nitriti ( $\mu\text{mol/mg proteina}$ )	4.33 ± 1.61 <sup>##</sup>	6.37 ± 0.96
SH grupe ( $\mu\text{mol/mg proteina}$ )	1070.28 ± 156.43	1053.79 ± 88.67
PON 1 (U/min/ mg proteina)	42.37 ± 4.73 <sup>##</sup>	24.48 ± 2.94

<sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$ , <sup>###</sup> $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane grupe životinja i kontrolne grupe

#### 4.6.4. Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima i plazmi starih Wistar pacova

Suplementacija ribljim uljem starih Wistar pacova, u pomenutoj dozi u trajanju od šest nedelja, dovela je do promena u parametrima oksidativnog stresa u krvi tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) se značajno povećala ( $p < 0.01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu, kao i aktivnost katalaze (CAT) ( $p < 0.05$ ). S druge strane stepen lipidne peroksidacije (MDA) se značajno smanjio ( $p < 0.001$ ), i koncentracija nitrita ( $p < 0.001$ ) u plazmi tretiranih životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija slobodnih SH grupa se povećala ( $p < 0.05$ ), kao i aktivnost paraoksonaze (PON1) u tretiranoj grupi ( $p < 0.05$ ) (Tabela 20).

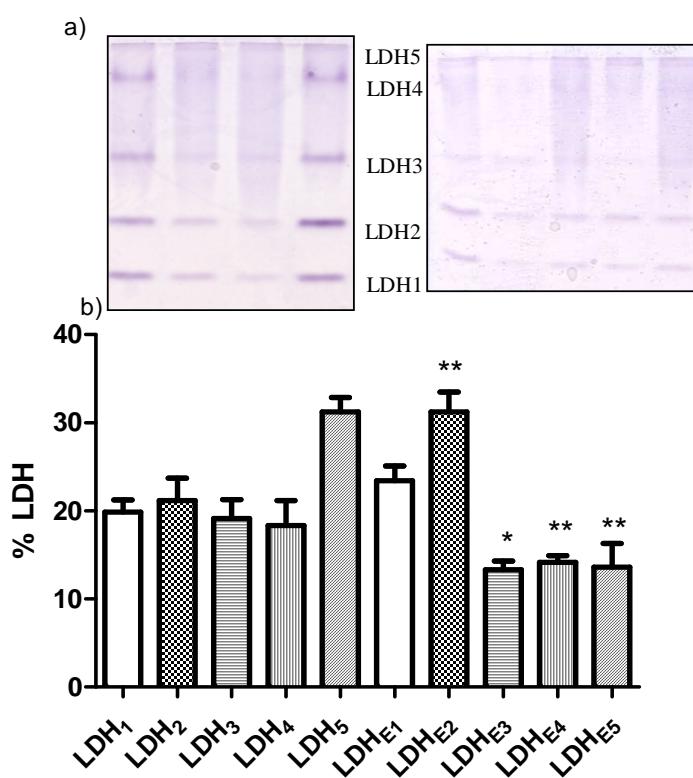
**Tabela 20.** Parametri oksidativnog stresa u eritrocitima i plazmi starih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem

	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
SOD (U/gHb)	350.95±17.30**	304.74±25.52
CAT (U/gHb)	54.64 ± 5.12*	43.55 ± 10.37
MDA (nmol/gHb)	40.31 ± 3.11***	56.39 ± 3.51
Nitriti (µmol/L)	30.77 ± 8.67***	72.69 ± 13.58
SH grupe (µmol/L)	643.86 ± 37.65*	599.96 ± 26.48
PON1(U/L)	126.33±6.74*	115.16 ± 9.04

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane i kontrolne grupe životinja

#### 4.6.4.1. Relativna aktivnost LDH izoenzimskih oblika kod starih pacova Wistar soja tretiranih ribljim uljem

Tretman starih pacova Wistar soja ribljim uljem dovodi do promena u relativnoj aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH<sub>1-5</sub>) (Slika 17). Procenti relativne aktivnosti izoenzimskih oblika LDH<sub>1-5</sub> kod tretirane grupe pacova ribljim uljem pokazuju statistički značajno sniženje LDH<sub>5</sub> ( $p < 0.01$ ) izoenzimskog oblika, kao i LDH<sub>3</sub> ( $p < 0.05$ ), LDH<sub>4</sub> ( $p < 0.01$ ) i LDH<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ ), a statistički značajno povišenje LDH<sub>2</sub> ( $p < 0.01$ ) izoenzimskog oblika u odnosu na kontrolnu grupu.



**Slika 17.** Relativna aktivnost izoenzimskih oblika LDH tretirane grupe ribljim uljem (LDH<sub>E1-E5</sub>) i kontrolne grupe (LDH<sub>1-5</sub>): a) nativna elektroforeza LDH<sub>1-5</sub> b) relativna aktivnost izoenzimskih oblika LDH, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane grupe i kontrolne grupe životinja



#### 4.6.5. Parametri oksidativnog stresa u jetri starih pacova tretiranih ribljim uljem

Parametri oksidativnog stresa u jetri promenili su se posle tretmana starih pacova ribljim uljem u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Tabela 21). Aktivnost superoksid-dismutaze se povećala ( $p < 0.05$ ), kao i aktivnost katalaze ( $p < 0.05$ ) u tretiranoj grupi životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Stepenn lipidne peroksidacije (MDA) u jetri značajno se smanjio ( $p < 0.001$ ), kao i koncentracija nitrita ( $p < 0.01$ ) i aktivnost PON ( $p < 0.01$ ) u tretiranoj grupi ( $p < 0.01$ ), dok se količina SH grupa povećala, ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova (Tabela 21).

**Tabela 21.** Parametri oksidativnog stresa u jetri starih Wistar pacova tretiranih ribljim uljem

	Tretirana grupa	Kontrolna grupa
SOD (U/mg proteina)	394.88 ± 45.45 <sup>*</sup>	333.27 ± 17.03
CAT (μmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /min/mg proteina)	157.24 ± 11.37 <sup>*</sup>	144.86 ± 3.33
MDA (nmol/ mg proteina)	77.37 ± 3.53 <sup>***</sup>	94.06 ± 7.54
nitriti (μmol/mg proteina)	3.89 ± 0.31 <sup>**</sup>	4.65 ± 0.39
SHgrupe (μmol/mg proteina)	1094.09 ± 16.54 <sup>*</sup>	1062.79 ± 22.34
PON1(U//min/mg proteina)	19.20 ± 2.69 <sup>**</sup>	28.55 ± 5.02

<sup>\*</sup>  $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup>  $p < 0.001$  statistička značajnost razlike srednjih vrednosti tretirane grupe životinja i kontrolne grupe

#### **4.7. Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaja masnih kiselina u fosfolipidima plazme i jetre mladih i starih pacova**

Ispitivanjem povezanosti parametara oksidativnog stresa i sadržaja pojedinačnih masnih kiselina u fosfolipidima plazme i jetre uočene su pozitivne i negativne korelacije i kod mladih i starih pacova (Tabela 22 i Tabela 23).

##### **4.7.1. Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaja masnih kiselina u fosfolipidima plazme mladih i starih pacova**

Pri ispitivanju međusobne povezanosti parametara oksidativnog stresa i sadržaja pojedinačnih masnih kiselina u fosfolipidima plazme kod kontrolnih i tretiranih grupa mladih i starih Wistar pacova, uočene su statistički značajne ( $p < 0.05$ ) pozitivne i negativne korelacije (Tabela 22). U kontrolnoj grupi mladih pacova nađena je pozitivna korelacija ( $r = 0.805$ ) između sadržaja palmitoleinske kiseline (16:1,n-7) i sadržaja tiolnih grupa, dok je posle tretmana ribljim uljem između ovih parametara utvrđena negativna korelacija ( $r = -0.717$ ) kao i sadržaja tiolnih grupa i lipidne peroksidacije (MDA) ( $r = -0.748$ ).

U kontrolnoj grupi starih pacova postoji veoma jaka pozitivna korelacija između sadržaja MDA i dokozaheksaenske kiseline (22:6) ( $r = 0.830$ ), kao i između aktivnosti superoksid-dismutaze i sadržaja oleinske kiseline u fosfolipidima ( $r = 0.888$ ). Negativna korelacija nađena je između aktivnosti superoksid-dismutaze i sadržaja dokozaheksaenske kiseline ( $r = -0.877$ ) (Tabela 22).

Posle tretmana ribljim uljem starih pacova Wistar soja, nađena je veoma dobra ( $r = 0.841$ ) pozitivna korelacija između sadržaja tiolnih grupa i aktivnosti superoksid-dismutaze, između koncentracije nitrita i aktivnosti katalaze ( $r = 0.884$ ), kao i negativna korelacija ( $r = -0.829$ ) između aktivnosti superoksid-dismutaze i linolne kiseline.

**Tabela 22.** Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaja MK u fosfolipidima plazme mladih i starih pacova Wistar soja u grupi tretiranoj ribljim uljem i kontrolnoj grupi pacova

<b>Korelacioni parametri</b>	<b>Nivo značajnosti (p)</b>	<b>Korelacioni koeficijent (r)</b>	<b>Kontrola (K) /Tretman(T)</b>	<b>Mladi /Stari</b>
SH/16:1	0.016	0.805	K	Mladi pacovi
SH/16:1	0.045	-0.717	T	Mladi pacovi
SH/MDA	0.033	-0.748	T	Mladi pacovi
MDA/22:6	0.041	0.830	K	Stari pacovi
SOD/18:1, n-9	0.044	0.888	K	Stari pacovi
SOD/22:6	0.051	-0.877	K	Stari pacovi
SH/SOD	0.036	0.841	T	Stari pacovi
Nitriti/CAT	0.004	0.884	T	Stari pacovi
SOD/18:2	0.041	-0.829	T	Stari pacovi

#### **4.7.2. Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaja masnih kiselina u fosfolipidima jetre mladih i starih pacova**

U kontrolnoj grupi mladih pacova uočena je veoma jaka pozitivna korelacija ( $r=0.920$ ) između aktivnosti katalaze u jetri i sadržaja dokozatetraenske kiseline (22:4,n-6) u fosfolipidima jetre (Tabela 23). Posle tretmana ribljim uljem nađena je pozitivna korelacija između količine tiolnih grupa i aktivnosti katalaze ( $r=0.813$ ), između lipidne peroksidacije (MDA) i sadržaja palmitinske kiseline ( $r=0.749$ ), između MDA i sadržaja linolne kiseline ( $r=0.717$ ) u fosfolipidima jetre tretiranih životinja.

Parametri koji koreliraju u jetri starih pacova i kontrolne i tretirane grupe se razlikuju od parametara mladih pacova.

U kontrolnoj grupi starih pacova postoji negativna korelacija između sadržaja SH grupa i sadržaja eikozapentaenske kiseline (20:5) ( $r=-0.850$ ) u fosfolipidima jetre, pozitivna korelacija između lipidne peroksidacije (MDA) i aktivnosti katalaze u jetri ( $r=0.884$ ).

Posle tretmana ribljim uljem starih pacova Wistar soja uočena je pozitivna korelacija nitrita u jetri i sadržaja palmitinske kiseline ( $r=0.810$ ) u fosfolipidima jetre, kao i negativna korelacija nitrita i sadržaja palmitoleinske kiseline ( $r= -0.905$ ). Aktivnost katalaze u jetri negativno korelira sa sadržajem vaskenske kiseline (18:1, n-7) ( $r= -0.834$ ) u fosfolipidima (Tabela 23).

**Tabela 23.** Korelacije parametara oksidativnog stresa i sadržaja MK u fosfolipidima jetre mladih i starih pacova Wistar soja u grupi tretiranoj ribljim uljem i kontrolnoj grupi pacova

<b>Korelacioni parametri</b>	<b>Nivo značajnosti (p)</b>	<b>Korelacioni koeficijent (r)</b>	<b>Kontrola (K)/tretman(T)</b>	<b>Mladi /Stari</b>
CAT/22:4	0.001	0.920	K	Mladi pacovi
SH/CAT	0.014	0.813	T	Mladi pacovi
MDA/16:0	0.033	0.749	T	Mladi pacovi
MDA/18:2	0.045	0.717	T	Mladi pacovi
SH/20:5	0.032	-0.850	K	Stari pacovi
MDA/CAT	0.019	0.884	K	Stari pacovi
Nitriti/16:0	0.05	0.810	T	Stari pacovi
Nitriti/16:1	0.013	-0.905	T	Stari pacovi
CAT/18:1,n-7	0.039	-0.834	T	Stari pacovi

## V DISKUSIJA

Sinteza n-3 masnih kiselina nije moguća u organizmu te ih je neophodno unositi hranom. Nazivaju se esencijalnim. Alfa-linolenska kiselina (ALA) nalazi se u biljkama, uljima, sojinom ulju, lanenom ulju, orasima, ulju repice. Eikozapentaenska i dokozaheksaenska kiselina mogu se naći u algama, ribi (losos, tuna, skuša). Poznato je da unos n-3 masnih kiselina putem hrane bogate ribom i proizvodima od ribe kao i korišćenjem dijetetskih suplemenata koje sadrže n-3 MK doprinosi tzv. „zdravim dijetama“. Antioksidativni efekti n-3 masnih kiselina povezani su sa procesima lipidne peroksidacije. Optimizacija uslova za ispoljavanje antioksidativnih efekata n-3 masnih kiselina iz ribe i dijetetskih suplemenata bila je od velikog značaja (EFSA, 2010). Kad je reč o dijetetskim suplementima neophodni uslovi zadovoljeni su dodatkom smeše tokoferola kao stabilizatora u sastav kapsula ribljeg ulja. Takođe, tokoferoli se dodaju i mnogim proizvodima od ribe kao što su riblji fileti, paštete od ribe kao antioksidanti.

Linolna masna kiselina (LA, n-6) ne može biti sintetisana *de novo* od strane ćelija sisara. Zbog toga se mora unositi i esencijalna je. Glavni izvori LA su cerealije, jaja, životinjska mast, hleb sa celim zrnima, suncokret. Esencijalne masne kiseline su važni sastojci membrana svih ćelija i utiču na membransku pokretljivost i propustljivost kao i ponašanje membranski vezanih enzima i receptora.

Polinezasićene masne kiseline (PUFA) funkcionišu kao endogeni antiinflamatorni molekuli. Studija El-BAdry i sar. je objavila dokaze za te efekte n-3 PUFA u jetri transgenskih fat-1 miševa koji su u stanju da sintetišu n-3 masne kiseline iz n-6 PUFA uz pomoć endogene desaturaze. (El-BAdry, 2007)

### **5.1. Biohemijski parametri u plazmi pacova Wistar soja i uticaj suplementacije ribljim uljem**

Vrednosti biohemijskih parametara plazme kod mladih pacova pokazuju da je tretman sa ribljim uljem doveo do značajnog smanjenja koncentracija triglicerida i LDL holesterola, a do povećanja plazma koncentraciju HDL i mokraćne kiseline. Tretmanom su se smanjile plazma koncentracije non-HDL u odnosu na kontrolnu grupu kao i odnos CHOL/HDL koji predstavlja kardiovaskularni rizik. LDL/HDL odnos, parametar rizika od ateroskleroze tretmanom se takođe značajno smanjio kao i odnos nonHDL/HDL (Tabela 2 i 3).

Kod starih pacova tretiranih ribljim uljem došlo je do značajnog sniženja plazma koncentracija holesterola i LDL-a, do povećanja plazma HDL koncentracije i mokraćne kiseline. Tretmanom su se značajno snizili i kardio (CHOL/HDL) i aterogeni rizici (LDL/HDL), kao i non-HDL i odnos non-HDL/HDL. (Tabela 4 i 5)

Dakle, može se zaključiti da suplementacija ribljim uljem u ishrani mladih i starih pacova dovodi do hipotrigliceridnog i hipoholesterolemijskog efekta kao i do smanjenja faktora kardiovaskularnog rizika i rizika od ateroskleroze.

Poredeći biohemijske parametre u plazmama kontrolnih grupa mladih i starih pacova, uočeno je značajno povećanje koncentracije holesterola ( $p < 0.01$ ), HDL-holesterola ( $p < 0.001$ ), triglicerida ( $p < 0.001$ ), u plazmi kontrolne grupe mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova (slike 13,14,15). Froyland i sar. ispitivali su efekte estara EPA i DHA na lipidni metabolizam kod pacova. Životinje su hranjene gavažno u dozi 1g/kg/dan, 3 meseca. Ova studija je pokazala da tretman estrima EPA (EPA-EE) i estrima DHA (DHA-EE) dovodi do snižavanja nivoa holesterola u plazmi dok tretman samo EPA-EE snižava koncentraciju triglicerida u plazmi. U mikrozomima jetre EPA-EE povećava HMG-CoA holesterol-acil-transferaznu aktivnost. Inhibicija aktivnosti HMG-CoA reduktaze u DHA-EE tretiranim pacovima može doprineti hipoholesterolemijskom delovanju (Froyland 1996). Leigh-Firbank i sar. su konstatovali da riblje ulje može redukovati koncentraciju triglicerida i smanjiti rizik od kardiovaskularnih oboljenja (Leigh, 2002). Berge i sar. su u svojoj studiji *in vitro* zaključili da značajnije EPA nego DHA snižava koncentraciju triglicerida u plazmi (Berge, 1990). Povećani unos ribljeg ulja (n-3 PUFA) redukuje incidencu od kardiovaskularnih bolesti (Mitasikova, 2008). Studija je pokazala da n-3 PUFA značajno snižavaju arterijski krvni pritisak ne samo kod mužjaka i ženki spontano hipertenzivnih (SH) pacova (Mitasikova, 2008), već i kod pacova sa povišenim trigliceridima kod kojih snižavaju i plazma koncentraciju triglicerida (Tribulova 2007).

Dobijeni rezultati studije u kojoj su mladi i stari pacovi tretirani ribljim uljem idu u prilog značajnog sniženja triglicerida kod starih pacova kao i da kontrolna grupa mladih pacova ima viši nivo plazma triglicerida u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova (Chapman, 2000). Rezultati pomenutih studija na animalnim modelima, kad su biohemijski parametri plazme u pitanju, su u skladu sa rezultatima koje smo dobili u našoj studiji .

U humanim studijama dobijeni su gotovo identični rezultati. U studiji McComir i sar, izveden je zaključak da 12 nedeljni tretman sa 3-6g ribljeg ulja dnevno utiče na smanjenje telesne težine i niz patologija povezanih sa metaboličkim sindromom kod ispitivane grupe pacijenata (McComir, 2009). Krajem devedesetih godina u nekoliko studija potvrđeno je hipotrigliceridno dejstvo ribljeg ulja (Harris, 1996). Riblje ulje ima osim hipotrigliceridnog i antiinflamatorno delovanje u reumatoidnom artritisu, ulcerativnom kolitisu i sl. dijagnozama povezanih sa inflamatornim odgovorom, kao što je CVD i dijabetes mellitus tip 2.

## **5.2. Uticaj suplementacije ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida plazme i jetre pacova različitih starosti kao i na aktivnost desaturaza i elongaza**

Tretman ribljim uljem uticao je na promenu profila masnih kiselina fosfolipida i u plazmi i u jetri ispitivanih životinja.

### **5.2.1. Uticaj suplementacije ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida plazme pacova različitih starosti**

Tretman ribljim uljem u našem eksperimentu doveo je do statistički značajnog povećanja ( $p < 0.05$ ) stearinske kiseline (18:0) i kod mladih i kod starih pacova, u odnosu na njihove kontrolne grupe. Prisutno je i povećanje oleinske kiseline (18:1,n-9) ( $p < 0.001$ ) kod tretirane grupe mladih životinja, povećanje vakcenske kiseline (18:1,n-7) ( $p < 0.05$ ) kod tretirane grupe starih životinja u odnosu na njihove kontrolne grupe. Kod mladih pacova tretman je doveo do sniženja ( $p < 0.05$ ) linolne kiseline (18:2), dok je kod starih tretman doveo do povišenja ( $p < 0.01$ ) linolne kiseline u odnosu na kontrolne grupe životinja. Suplementacija je dovela do statistički značajnog sniženja ( $p < 0.001$ ) arahidonske kiseline kod obe grupe tretiranih životinja. Sadržaj EPA procentualno je povišen ( $p < 0.001$ ) kod mladih pacova i starih pacova ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolne grupe životinja. Dokozapentaenska kiselina (DPA) povišena je značajno kod obe grupe tretiranih životinja ( $p < 0.001$ ), dok je kod mladih pacova povišena dokozatetraenska kiselina ( $p < 0.001$ ). Ukupne MUFA su se statistički značajno povećale ( $p < 0.05$ ), kao i n-3 ( $p < 0.001$ ), dok se

odnos n-6/n-3 statistički značajno smanjio ( $p < 0.001$ ), kod mladih pacova posle tretmana ribljim uljem, u odnosu na kontrolnu grupu.

Polinezasićene MK n-3 i n-6 serije se brzo ugrađuju u ćelijske membrane i utiču na mnoge biološke funkcije, membransku fluidnost, aktivaciju intracelularnih puteva produkcijom eikozanoida, gensku ekspresiju i ćelijsku diferencijaciju (Alexander, 1998). Balans između n-6 i n-3 MK u unosu je važan zbog njihove kompetitivne prirode. EPA ima ulogu prekursora za prostaglandin-3, tromboksan-3 i leukotriene-5 serije. Ona ima sposobnost da delimično blokira konverziju n-6 MK do štetnih eikozanoida tako redukujući kardiovaskularni rizik i inhibira nastanak tumora (Bagga, 2003, Arsić, 2009). DHA ima protektivnu ulogu u Alchajmerovoj bolesti i drugih tipova demencije (Arterburn, 2006).

Membranska fluidnost zavisi od masnokiselinskog profila fosfolipida, od dužine lanca masnih kiselina i stepena nezasićenosti. Veća prisutnost zasićenih masnih kiselina u ćelijskoj membrani menja membransku lipidnu fluidnost. (Popovic, 2010). Dijetarni masnokiselinski profil utiče na tkivni masnokiselinski profil kao i na membranski profil MK i membransku proteinsku funkciju (Hynes 2003). U studiji Calviello i sar. u kojoj su Wistar pacovi gavažno primali EPA ili DHA (360mg/kg/dan), tokom 1-4 nedelje, EPA tretman je povećao EPA i DPA procentualni sadržaj u fosfolipidima plazme. DHA tretman povećao je DHA sadržaj u fosfolipidima plazme. Oba tretmana smanjuju sadržaj arahidonske kiseline i n-6/n-3 PUFA odnosa u fosfolipidima plazme i u membranama, bez modifikacije indeksa desaturacije (Calviello, 1997).

U studiji Harris i sar. rađenoj sa Wistar pacovima starih 8 nedelja, nisu postojale značajne promene u ukupnim zasićenim (SFA), mononezasićenim (MUFA) i polinezasićenim (PUFA) koncentracijama posle tretmana ribljim uljem (300mg/kg/dan, 4-6 nedelja) (Harris 1989). Ovi rezultati nisu u skladu sa rezultatima naše studije u kojoj je došlo do promena u MUFA, n-3 i odnosu n-6/n-3 posle suplementacije kod mladih Wistar pacova.

U animalnim modelima pokazano je da PUFA redukuju renalnu inflamaciju i fibrozu, da smanjuju inflamaciju, snižavaju trigliceride, plazma glukozu kod izazvanog dijabetesa. (Lauretani, 2010). *In vitro*, EPA utiče na endotelne ćelije u kulturi da otpuštaju relaksirajuće faktore (EDRF, NO) (Ferrucci, 2006).

Sadržaj masnih kiselina u fosfolipidima seruma/plazme su biohemijski markeri fiziološkog statusa različitih masnih kiselina i predstavljaju indikator nutritivnog unosa n-3 masnih



kiselina uključujući EPA i DHA. Nekoliko studija (Simon, 1995; Holub, 2004; Lemaitre, 2003) su pokazale obrnutu korelaciju između ukupnih n-3 MK u fosfolipidima seruma/plazme i rizika od koronarnog srčanog oboljenja, ateroskleroze. N-6 masne kiseline (arahidonska kiselina, AA između ostalih) koje su prisutne u različitom odnosu u različitim tkivima uključujući serumske/plazma fosfolipide konvertuju se u proinflamatorne eikozanoide i druge produkte povezane sa inflamatornim procesima i nekim hroničnim poremećajima. Odnos AA/EPA serum/plazma fosfolipida koreliraju pozitivno sa kliničkim simptomom depresije, dok se visok odnos AA/DHA povezuju sa neurološkim poremećajima. Odnos ukupnih masnih kiselina u serumu/plazmi fosfolipida i ukupnih n-3 MK također predstavljaju faktor rizika za koronarna srčana oboljenja. Odnosi AA/EPA, AA/DHA, AA/(EPA+DHA) mogu se posmatrati kao nezavisni u odnosu na ukupne MK. Odnos n-6/n-3 koji je <4.5 smatra se da pripada kategoriji „nižeg rizika“ za koronarna oboljenja, dok se za odnos AA/(EPA+DHA) <2.1 može reći da predstavlja „nizak rizik“ kad su fatalni ishodi infarkta miokarda u pitanju (Holub, 2009)

Veliki broj različitih studija izveden je na humanoj populaciji korišćenjem ribljeg ulja ili suplemenata istog u različitim dijagnozama. Pacijentima (hronična bubrežna bolest, dijabetes mellitus 2, depresija, hipertenzija) je na početku studije potvrđen deficit n-3 masnih kiselina u profilima MK plazme. Suplementacijom je došlo do povećanja ukupnih n-3 MK i smanjenja n-6/n-3 odnosa kao i do promena u sadržaju pojedinačnih masnih kiselina u fosfolipidima plazme (Morris, 1993; Percy, 2005; Lauretani, 2010).

### **5.2.2. Uticaj suplementacije ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida jetre pacova različitih starosti**

Tretman ribljim uljem uticao je na masnokiselinski profil fosfolipida jetre kod mladih i starih pacova. Tretmanom je došlo do statistički značajnog povećanja procentnog sadržaja linolne kiseline (18:2) ( $p < 0.001$ ),  $\alpha$ -linolenske kiseline (18:3) ( $p < 0.01$ ) i dihomog-linolenske kiseline (20:3) ( $p < 0.05$ ) kod mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu dok se sadržaj arahidonske kiseline kao i dokozatretraenske kiseline (22:4) fosfolipida jetre tretiranih mladih životinja statistički značajno snizio ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Kod tretiranih životinja procenatna zastupljenost EPA (20:5), DPA (22:5) ( $p < 0.001$ ), i DHA (22:6) ( $p < 0.01$ ) se povećala u fosfolipidima jetre mladih životinja.

MUFA su se statistički značajno povećale ( $p < 0.05$ ), kao i ukupne n-3 ( $p < 0.001$ ), dok se sadržaj n-6 smanjio ( $p < 0.01$ ) kao i odnos n-6/n-3 ( $p < 0.001$ ) u fosfolipidima jetre mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod grupe starih pacova tretiranih ribljim uljem došlo je do povećanja sadržaja palmitinske kiseline (16:0) ( $p < 0.001$ ), vakcenske (18:1,n-7) ( $p < 0.05$ ), linolne kiseline (18:2) ( $p < 0.01$ ), EPA ( $p < 0.001$ ), DPA ( $p < 0.001$ ) i sniženja AA ( $p < 0.001$ ). Ukupne SFA i PUFA i ukupne n-3 ( $p < 0.001$ ) su se povećale ( $p < 0.001$ ), n-6 su se snizile kao i odnos n-6/n-3 ( $p < 0.001$ ), u poredjenju sa kontrolnom grupom.

Dakle, tretman ribljim uljem značajno je kod životinja obe starosne dobi snizio ukupne n-6, snizio odnos n-6/n-3, a od pojedinačnih MK snizio AA, povećao EPA, DPA, i linolnu kiselinu u fosfolipidima jetre.

Jetra je jedan od organa na koje može uticati poremećaj u n-6/ n-3 odnosu. Kod miševa n-3 PUFA ublažava inflamaciju jetre i redukuje sadržaj masti u steatoznim jetrama. Pretretman sa n-3 PUFA značajno smanjuje obim mikrocirkulatornog defekta koji prati ishemia/reperfuzija oštećenja i štiti od hepatocelularnih oštećenja u makrosteatoznoj jetri miša. Slična zaštita prijavljena je kod normalnih jetri miševa koji su bili na pretretmanu farmakološkim supstancama koje menjaju nivo eikozanoida (Iwata, 1999). Nesporno je da PUFA imaju veliki uticaj na funkciju jetre. One smanjuju ekspresiju hepatičnih gena za glikolitičke i lipogenske regulatorne enzime (Giudetti, 2003).

Souza Melo i sar. Ispitali su efekat tretmana n-3 masnim kiselinama posle parcijalne hepatotomije (70%) kod pacova. Posle tretmana, povećava se koncentracija GSH u plazmi i jetri. U tretiranoj grupi životinja dolazi i do značajnog smanjenja lipidne peroksidacije. S obzirom da je hepatotomija *per se* već izvor slobodno radikalskih preocesa, tretman sa n-3 masnim kiselinama doprineo je antioksidativnom efektu i delovao povoljno na regeneraciju jetre (Souza Melo, 2010).

Unos n-3 PUFA rezultuje u normalizaciji n-3/n-6 odnosa, redukovanoj intrahepatičnom sadržaju masti i makrosteatozi. Kod NESHA, masnokiselinski profili fosfolipida u jetri su sadržali viši n-6 i niži n-3 PUFA sa značajno povećanim n-6/n-3 odnosom u poredjenju sa normalnim jetrama. Suplementacijom n-3 u toj studiji, kod nealakoholisane masne jetre, snižavaju se transaminaze i trigliceridi u poredjenju sa kontrolnom grupom dok je sadržaj AA i n-6/n-3 odnos bio niži u poredjenju sa kontrolnom grupom (Araya, 2004).

Neadekvatni unos ALA, neodgovarajući balans sa LA ili poremećaji desaturacija i elongacija su poznati faktori koji utiču na metabolizam n-3 PUFAs. U prisustvu jednog ili više ovakvih faktora, produkcija ALA derivata je smanjena. n-3 PUFA utiču na lipidnu homeostazu jetre preko transkripcionih faktora i enzima koji imaju glavnu ulogu u metabolizmu MK i akumulaciji masti u jetri. n-3 PUFA nishodno regulišu transkripcioni faktor sterol regulatorni element vezujući protein-1 (SREB-1), i smanjuju DNA vezivanje nuklearnog faktora-Y (NF-Y). SREBP-1 ushodno reguliše lipogenične gene, sintazu masnih kiselina (FAS) i sterol-CoA-desaturazu-1 (SCD-1) i zbog toga potenciraju akumulaciju triglicerida u jetri ( Sekiya, 2003). Dostupnost NF-Y je esencijalna za transkripciju FAS. Mutacija NF-Y inhibira SREBP-1 posredovani supresivni efekat n-3 PUFA na FAS. S druge strane, n-3 dugolančane PUFA ushodno regulišu peroksizomalni-proliferišući-aktivirajući-receptor-alfa (PPAR-alfa) koji stimuliše oksidaciju masnih kiselina jetre i povećava transkripciju za mitohondrijalnu karnitin- palmitoil- transferazu-1 (CPT-1) i peroksizomalnu acil-CoA oksidazu (ACO) (Teran-Garcia, 2007). PPAR-alfa povećava sekreciju apolipoproteina B-100, glavnog strukturnog proteina VLDL-a i ushodno reguliše ekspresiju MK vezujućeg proteina jetre (LFABP) koji je esencijalan za sekreciju apo B-100 (Badry, 2007).

Poredeći masnokiselinske profile u fosfolipidima jetre u grupi pacova (starih 8 nedelja) sa fosfolipidima jetre mladih pacova u našem eksperimentu, ukupne n-3 MK procentualno su manje zastupljene, kao i n-6/n-3 odnos koji je viši u masnokiselinskim profilima fosfolipida jetre kod mladih (3 meseca) pacova u našem eksperimentu (Ristić-Medić, 2003).

Pacovi tretirani ribljim uljem u studiji Amusquivar i sar. imaju procentualno viši sadržaj n-3 MK, EPA, DHA u fosfolipidima jetre u odnosu na sadržaj istih masnih kiselina u fosfolipidima plazme. U istoj studiji sadržaj oleinske kiseline viši je u fosfolipidima plazme tretiranih životinja nego u fosfolipidima jetre dok je sadržaj arahidonske kiseline nešto viši u fosfolipidima jetre nego u fosfolipidima plazme (Amusquivar, 2000).

### 5.2.3. Profili MK fosfolipida jetre kontrolnih grupa pacova Wistar soja različite starosne dobi

Sadržaj stearinske kiseline (18:0) u fosfolipidima plazme statistički je značajno niži ( $p < 0.01$ ) u kontrolnoj grupi mladih pacova, dok je procenat oleinske kiseline (18:1,n-9) i vakcenske (18:1,n-7) značajno viši ( $p < 0.01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova. Sadržaj linolne kiseline (18:2) kao i sadržaj arahidonske (20:4) je značajno niži ( $p < 0.05$ ) kod mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova. Ukupne MUFA su značajno više ( $p < 0.01$ ), PUFA značajno niže ( $p < 0.01$ ), kao i ukupne n-6 ( $p < 0.01$ ) u fosfolipidima plazme u kontrolnoj grupi mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova.

Sadržaj palmitinske kiseline (16:0) procentualno je povišen ( $p < 0.001$ ) kao i palmitoleinske kiseline (16:1) ( $p < 0.05$ ) u fosfolipidima jetre u kontrolnoj grupi mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova. Linolna kiselina (18:2) je procentualno snižena kao i  $\alpha$ -linoleinska kiselina ( $p < 0.001$ ) i dihomo- $\gamma$ -linolenska kiselina ( $p < 0.05$ ) u fosfolipidima jetre u kontrolnoj grupi mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova. Dokozaheksaenska kiselina ( $p < 0.001$ ) je procentualno povećana ( $p < 0.001$ ), kao i ukupne n-3 ( $p < 0.001$ ) i odnos n-6/n-3 ( $p < 0.001$ ) u fosfolipidima jetre u kontrolnoj grupi mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova

### 5.2.4. Elongaze i desaturaze

Elongaze i desaturaze katalizuju reakcije sinteze MUFA i PUFA. Procenjene aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi mladih i starih pacova pokazale su statistički značajne promene posle suplementacije ribljim uljem.  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$  i  $\Delta^9$  desaturaze su statistički značajno snižene ( $p < 0.001$ ) u plazmi tretiranih mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu. Kod starih pacova takođe je došlo posle tretmana ribljim uljem do statistički značajnog sniženja u jetri  $\Delta^4$  desaturaze ( $p < 0.01$ ) i  $\Delta^5$  desaturaze ( $p < 0.001$ ) i povišenja  $\Delta^6$  desaturaze ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu pacova.

Dakle, tretman ribljim uljem doveo je do statistički značajnog sniženja  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$  desaturaza u plazmi kod mladih i starih pacova u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Procenjene aktivnosti desaturaza i elongaza u jetri mladih i starih pacova pokazale su statistički značajne promene posle suplementacije ribljim uljem.  $\Delta^4$  i  $\Delta^5$  procenjena desaturazna aktivnost smanjila se ( $p < 0.001$ ) u jetri mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu. Kod starih pacova procenjene desaturazna aktivnost se takođe smanjila,  $\Delta^4$  ( $p < 0.01$ ) i  $\Delta^5$  ( $p < 0.001$ ). Procenjena aktivnost elongaze se statistički značajno smanjila ( $p < 0.05$ ) kod tretiranih mladih pacova, kao i kod tretiranih starih pacova ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Dakle tretman ribljim uljem doveo je do statistički značajnog sniženja procenjenih aktivnosti  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$  desaturaza i sniženja procenjene aktivnosti elongaze u jetri kod mladih i starih pacova u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

LA i ALA se metabolišu do odgovarajućih metabolita desaturazno-elongaznim reakcijama sa istim setom  $\Delta^5$  i  $\Delta^6$ -desaturaza i elongaza. U zavisnosti od inicijalnog supstrata LA ili ALA nastaju različite klase eikozanoida. Kao posledica ishrane, odnos n-6:n-3 PUFA kreće se 15-16:1 u zemljama zapadne Evrope, umesto zdravog odnosa 1-4:1. Ovo se može popraviti unosom EPA i DHA.  $\Delta^5$ -desaturaze imaju ograničenu aktivnost da konvertuju dihomog-linolensku kiselinu u arahidonsku kiselinu. Zbog toga sinteza antiinflamatornih eikozanoida nastalih iz dihomog-linolenske kiseline može prevazići efekte proinflamatornih eikozanoida nastalih iz arahidonske kiseline (AA) (Marra, 1988).

Eikozanoidi nastali iz arahidonske kiseline su biološki aktivni u malim količinama. U većim koncentracijama oni doprinose formiranju tromba i razvoju inflamatornih poremećaja. Unos suplementacijom, EPA i DHA povezan je sa smanjenom produkcijom tromboksana A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), potentnog trombocitnog agregatora i vazokonstriktora, i leukotriena B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Sinclair, 1990). Visok unos n-6 PUFA pomera fiziološki odgovor u proinflamatorni i protrombički sa povećanjem u viskozitetu krvi, vazospazmu i vazokonstrikciji. Suprotno, n-3 PUFA imaju antiinflamatorne, antitrombičke, vazodilatatorne i hipolipemičke osobine. Tako, n-3 PUFAs imaju negativni regulatorni uticaj na hepatičku lipogenezu (Simopoulos, 2003).

Veliki broj faktora je uključen u regulaciju  $\Delta^5$  i  $\Delta^6$  desaturazne aktivnosti. Niska  $\Delta^6$ -desaturazna aktivnost nađena je kod dijabetičnih i hipertenzivnih pacova. Drugi

eksperimenti na pacovima pokazali su da hormoni kao glukagon, epinefrin, glukokortikoidi i tiroksin inhibiraju  $\Delta^5$  i  $\Delta^6$  desaturazne aktivnost dok insulin stimuliše  $\Delta^6$ -desaturaznu aktivnost (Lopez Jimenez, 1993). Hronično konzumiranje alkohola kao i gojaznost povezane su sa redukovanim aktivnostima desaturaza, a studije na životinjama i ljudima su pokazale da je aktivnost desaturaza i polno zavisna što je povezano sa hormonskim statusom. (Medeiros 1995).

Mnoge studije su ispitivale regulaciju elongaza sisara na nivou enzimske aktivnosti. Ispitivanja su bila usmerena na nutritivnu i tkivno-specifičnu regulaciju ekspresije elongaza u novije vreme. U jetri pacova Elovl-5 je predominantna elongaza (Wang, 2005). Aktivnosti pacovskih hepatičnih  $\Delta^5$  i  $\Delta^6$  desaturaza su regulisane i dijetarnim unosom. Elovl-5 je odgovorna za elongaciju masnih kiselina i sposobna je da vrši elongaciju zasićenih masnih kiselina (16:0, 18:0, 20:0, 22:0 i 24:0) pre nego mononezasićenih (18:1, n-9) i polinezasićenih (20:4, n-6) masnih kiselina (Wang, 2005).

Pacovska hepitična Elovl-5 ekspresija je regulisana na pretranslacionom nivou sa dijetarnim n-3 PUFA i PPAR $\alpha$  agonistima. Za razliku od  $\Delta^5$  i  $\Delta^6$  i  $\Delta^9$  desaturaza, elongaze ne pokazuju uniformni odgovor na tretman ribljim uljem (Igarashi, 2008).

### 5.3. Parametri oksidativnog stresa

U oksidativnom metabolizmu u fiziološkim uslovima formiranje slobodnih radikala odvija se kontinuirano, ali u neznatnom obimu. U uslovima poremećene homeostaze u ćeliji nastaje višak slobodnih radikala, što dovodi do oštećenja ćelija i tkiva. Antioksidativni sistem objedinjuje niz reakcija usmerenih na različite aspekte i faze u lancu oksidativnog oštećenja ćelija i tkiva (Lykkesfeldt i Svendsen, 1997).

Superoksid-anjon-radikal je jak oksidans, ali njegova prooksidativna aktivnost se odnosi na njegovu konjugovanu kiselinu, peroksil-radikal (HOO $\cdot$ ), koja inicijalno pokreće proces oštećenja lipida, oduzimanjem protona, čime započinje proces peroksidacije lipida. Autooksidacijom superoksid-anjon-radikala nastaje vodonik-peroksid. Ravnotežna koncentracija vodonik-peroksida u ćeliji se održava uz pomoć katalaze i glutation-peroksidaze (GSH-Px). Katalaza, zbog svoje izuzetno visoke Vmax, vrlo brzo razgrađuje vodonik-peroksid. Osim ovim putem, vodonik-peroksid može biti homolitički razgrađen i u prisustvu jona prelaznih metala kao što su Fe<sup>2+</sup> i Cu<sup>+</sup>. Tada nastaje najpotentniji

kiseonični radikal, hidroksil-radikal. On, veoma neselektivno inicijalno reaguje sa biomakromolekulima, sa DNK, ili nekim drugim molekulima. Najosetljiviji deo ćelije na oksidativno oštećenje su membrane ćelija i ćelijskih organela, zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (PUFA). Sastav membranskih lipida i promenjeni fluiditet utiču i na aktivnost nekih membranskih enzima. U zavisnosti na kojim se subćelijskim membranama odigrava peroksidacija lipida, zavisi i ozbiljnost i obimnost narušenih ćelijskih funkcija. Mitohondrijalne PUFA su pretežno target za peroksidacije koje nastaju delovanjem gvožđa. Kao što je već napomenuto, peroksidacija lipida je višefazni proces koji se odvija kroz fazu inicijacije, propagacije i terminalnu fazu. Malondialdehid je krajnji proizvod peroksidacije lipida polinezasićenih masnih kiselina, koji se preko Shiff-ovih baza unakrsno vezuje za proteine i fosfolipide membrane (Valko 2007, Mukul 2005, Pryor 2006, Rossner, 2007).

### **5.3.1. Parametri oksidativnog stresa u krvi i jetri mladih i starih pacova Wistar soja posle tretmana ribljim uljem**

Posle suplementacije ribljim uljem u trajanju od šest nedelja Wistar pacova došlo je do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD ( $p < 0.01$ ), CAT ( $p < 0.05$ ) i PON1 ( $p < 0.001$ ), kao i statistički značajnog sniženja lipidne peroksidacije (MDA) ( $p < 0.01$ ) i koncentracije nitrita ( $p < 0.001$ ) u krvi mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Tabela 16).

Tretman ribljim uljem doveo je do statistički značajnog sniženja aktivnosti katalaze ( $p < 0.05$ ), lipidne peroksidacije ( $p < 0.001$ ) i koncentracije nitrita ( $p < 0.01$ ), kao i do povećanja aktivnosti PON1 ( $p < 0.01$ ) u jetri mladih pacova u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Tabela 19).

Kod starih pacova suplementacija ribljim uljem u trajanju od 6 nedelja dovela je do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD ( $p < 0.01$ ), CAT ( $p < 0.05$ ) i PON1 ( $p < 0.05$ ) i povećanja količine SH grupa ( $p < 0.05$ ), kao i do statistički značajnog sniženja lipidne peroksidacije ( $p < 0.001$ ) i koncentracije nitrita ( $p < 0.001$ ) u krvi pacova u odnosu na kontrolnu grupu životinja (Tabela 20).

Aktivnosti SOD i CAT su se statistički značajno povećale ( $p < 0.05$ ), kao i količina SH grupa ( $p < 0.05$ ) i aktivnost PON1 ( $p < 0.01$ ), dok se lipidna peroksidacija značajno snizila ( $p < 0.001$ ), kao i koncentracija nitrita ( $p < 0.01$ ), u jetri starih pacova tretiranih ribljim uljem u odnosu na kontrolnu grupu pacova (Tabela 21).

Dakle, tretman ribljim uljem kod mladih pacova u jetri i krvi doveo je do značajnog sniženja lipidne peroksidacije, sniženja koncentracije nitrita, povećanja aktivnosti PON1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Kod starih pacova tretman ribljim uljem doveo je do statistički značajnog sniženja lipidne peroksidacije, koncentracije nitrita, povećanja količine SH grupa, aktivnosti SOD, CAT i PON1 u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Tretman ribljim uljem kod pacova obe starosne dobi i u jetri i u krvi doveo je do sniženja lipidne peroksidacije, koncentracije nitrita i povećanja PON1, dok je uticaj suplementacije na povećanu aktivnost enzima antioksidativne odbrane (SOD i CAT) bio više izražen kod starih pacova.

Poredeći pacove različite starosne dobi u plazmi mladih pacova nađena je snižena koncentracija nitrita ( $p < 0.01$ ), kao i povećana aktivnost PON1 ( $p < 0.001$ ) u odnosu na grupu starih pacova. U jetri, aktivnost SOD je statistički značajno povećana ( $p < 0.05$ ), kao i koncentracija nitrita ( $p < 0.01$ ), dok je lipidna peroksidacija smanjena ( $p < 0.001$ ), kod mladih pacova u odnosu stare pacove.

### **5.3.2. Rezultati drugih studija i povezanost sa dobijenim rezultatima**

#### **5.3.2.1. Starenje i antioksidativna zaštita**

Povećana ekspresija gena za aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i primena neenzimskih antioksidanata može produžiti dužinu života (Melov, 2002). Studije i kliničke i na animalnim modelima pokazale su sniženje sadržaja neenzimskih antioksidanata za vreme starenja. Štaviše, uloga lipofilnih antioksidanata je podržana sa rezultatima da dugoživeće vrste imaju više nivoa vitamina A, E (neenzimskih lipofilnih antioksidanata) i niži nivo endogene SOD (Mecocci, 2000). Dužina života korelira sa nižom produkcijom slobodnih radikala i višim stepenom popravke DNK. Aktivnost AOS igra važnu ulogu u određivanju dužine života vrste. (Ceballos-Picot, 1992).



U toku starenja volumen eritrocita se smanjuje vremenom naročito u drugoj polovini života (Pandey 2010). Ove promene su povezane sa nižim koncentracijama holesterola u plazmi, i gubitkom membranskih konstituenata starenjem (Pandey, 2010). Antioksidantni kapacitet plazme je marker starenja (ukupni antioksidativni potencijal-ORAC, FRAP) (Benzie, 1996). Dugoživeći sisari imaju nizak nivo nezasićenosti u celularnim membranama: ovo vodi smanjenoj lipidnoj peroksidaciji u tim vrstama (Sanz, 2006).

Lipidna peroksidacija indukuje promene u integritetu membrane, fluidnosti i permeabilnosti i modifikovanje LDL-a do proaterogenih i proinflamatornih formi i generisanje potencijalno toksičnih proizvoda (Greenberg, 2007). Proizvodi lipidne peroksidacije su mutageni i karcinogeni, i uključeni su u mehanizme koji vode poremećajima kao što je CHD, kancer, neurološke bolesti i starenje (Lee J, 2004). Povećanje u MDA korelira sa smanjenjem antioksidativnog kapaciteta plazme za vreme starenja, što potvrđuje da se sa godinama smanjuje antioksidativna moć a to je i razlog povećanog oksidativnog stresa u starenju (Rizvi, 2006).

Kod eukariota zastupljene su sledeće superoksid-dismutaze: CuZn-SOD koja je prisutna u citosolu, Mn-SOD u mitohondrijama i EC-SOD, ekstracelularna. EC-SOD su značajne jer regulišu i modifikuju dejstvo NO<sup>•</sup> radikala koji nastaje u makrofagima, endotelnim ćelijama, hepatocitima ili drugim ćelijama (Van Remmen, 2003). SOD je jedan od glavnih enzima koji štite ćeliju od ROS. U jetri konkretno njena aktivnost je vrlo visoka. Ljudi imaju najviši nivo SOD u odnosu na metaboličku potrošnju od svih vrsta (Pandey, 2010). Gianni i sar. su otkrili da u starenju ne postoji razlika u aktivnosti CuZn-SOD, već u promenama aktivnosti Mn-SOD sa starenjem. Naime aktivnost mitohondrijalne Mn-SOD se povećava sa starenjem (Gianni, 2004). Barnett i sar. su pokazali da se aktivnost CAT ne menja sa starenjem, (Barnett,1995). Glutation sistem ima negativnu korelaciju sa starenjem (Pandey, 2010).

Naši rezultati su pokazali da se aktivnost i CAT i SOD u eritrocitima ne menjaju statistički značajno sa starenjem, dok je aktivnost SOD povećana u jetri mladih pacova u odnosu na stare. U jetri je statistički značajno snižena lipidna peroksidacija kod mladih pacova. Ovi rezultati su delimično u skladu sa rezultatima drugih autora (Rizvi, 2006), odnosno našem eksperimentu, tkivni (jetra) antioksidativni status u većoj meri korelira sa starenjem.

### 5.3.2.2. **Tretman ribljim uljem i antioksidativna zaštita**

Rezultati studija Palozza i sar. (1996) i Sekine i sar. (2007) pokazali su da dijetarni unos n-3 PUFA povećava eritrocitnu membransku osetljivost na peroksidaciju i produkciju lipidnih peroksida u jetri i bubregu. S druge strane, ispitivanja Hsu-a (2001) pokazala su da dijetarna suplementacija sa n-3 PUFA nema efekta na lipidnu membransku peroksidaciju ili da ima pozitivan efekat na održavanje nivoa glutaciona i antioksidativne enzimske aktivnosti u krv. Ostaje pitanje da li je povećana osetljivost membrana na peroksidaciju (ili povećana količina produkata peroksidacije) rezultat povećanog dejstva ROS iz fagocita ili disfunkcije antioksidativnog sistema u krvi ili oba ova faktora (Hsu, 2001). Eritrociti nemaju mitohondrije, izloženi su dejstvu ROS, s obzirom na autooksidaciju hemoglobina pod visokim pritiskom kiseonika u arterijskoj krvi. Povećana intraeritrocitna ROS koncentracija dovodi do eritrocitne membranske lipidne peroksidacije, i može oštetiti druge intracelularne proteine (Cimen, 2007). Održavanje prooksidativno-antioksidativnog balansa u eritrocitima je takođe važno za druga tkiva s obzirom da su eritrociti mobilni detoksifikujući elementi u cirkulaciji (Brown, 1989) ili kada ROS difunduju iz njih što može biti razlog tkivnih mikrooštećenja (Johnson, 2005). Osnovni supstrat za oksidativno oštećenja membrana su PUFA u fosfolipidima i glikolipidima, nezasićene MK i holesterol koji se nalaze u jezgru lipoproteina, kao i holesterol i lipoproteini bioloških membrana (Trostchansky, 2006). Tokom LP nastaju primarni visoko reaktivni intermedijeri, čijom razgradnjom se dobijaju aldehidi, koji reaguju sa amino-grupama proteina menjajući tako njihova strukturna i funkcionalna svojstva (Traverso, 2004). LP smanjuje fluidnost bioloških membrana, povećava jonsku propustljivost i dovodi do inaktivacije membranskih enzima. Intenzivna LP dovodi do opadanja membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti za vodonične jone i druge jone, kao i mogućih oštećenja ćelija što je praćeno izlaskom njenog sadržaja. Tkiva poremećene funkcije brže ulaze u lipidnu peroksidaciju. Povećana peroksidabilnost nastaje inaktivacijom, odnosno manjkom antioksidativnih mehanizama, otpuštanjem metalnih jona (Fe, Cu) iz depoa i metaloproteina, koji su hidrolizovani enzimima otpuštenim iz oštećenih lizozoma (Gutteridge 1993).

Naši rezultati su nedvosmisleno pokazali da je nakon tretmana ribljim uljem došlo do statistički značajnog smanjenja LP i kod mladih i kod starih pacova u eritrocitima ( $p < 0.01$ ) i jetri ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Suplementacija n-3 masnih kiselina doprinela je očuvanju ćelijskih membrana eritrocita i hepatocita kod pacova različite starosne dobi, njihove strukture, fluidnosti i funkcionalnosti.

Demoz i sar. (1992) su našli da EPA ima hipotrigliceridni efekat, da ispoljava pojačan antioksidativni odgovor i dovodi do smanjenja lipidne peroksidacije u jetri tretiranih miševa. Takođe je pokazano da tretman sa omega-3 smanjuje lipidnu peroksidaciju u corpus striatumu kod pacova (Sarsilmaz 2003). Dijetarna suplementacija ribljim uljem može svakako pojačati odgovor na slobodno radikalska oštećenja i redukovati lipidnu peroksidaciju. Ovo ide u prilog činjenici da riblje ulje može biti izbor kod velikog broja dijagnoza gde je oksidativna/antioksidativna odbrana narušena. Zanimljivo je pitanje kako se oksidativni potencijal MDA i nekih drugih aldehida generiše. Pretpostavlja se da vezivanje aldehida i proteina može dovesti do produkcije ranih i relativno nestabilnih proizvoda koji su sposobni da interaguju sa jonima metala u autooksidativnom smislu, indukujući stvaranje oksidativnih vrsta i trigerujući oksidaciju. Krajnji (end-stage) proizvodi uzrokuju funkcionalna oštećenja molekula što se povezuje sa molekulskim osnovama procesa starenja. Izučavanja njihove strukture dala bi osnov za evaluaciju aldehidnih modifikacija proteina za vreme starenja i starenjem povezanih procesa razvoja bolesti (Traverso 2004).

GSH/GSSG odnos se često koristi kao indikator celularnog redoks stanja (Wu, 2004). GSH-redoks status u eritrocitima je važan parametar oksidativnog stresa. U našim eksperimentima određivali smo količinu ukupnih tiolnih (SH) grupa posle suplementacije ribljim uljem. Količina tiolnih grupa se povećala posle suplementacije ribljim uljem kako u krvi ( $p < 0.05$ ) tako i u jetri ( $p < 0.05$ ) starih pacova. Ovo povećanje nije uočeno posle suplementacije kod mladih pacova. Dakle, suplementacija ribljim uljem uticala je na redoks status u pravcu smanjene oksidacije, tj. u pravcu povećanja sadržaja slobodnih tiolnih grupa kod starih pacova.

Azot-monoksid (NO) je visoko difuzabilan molekul, brzo prolazi kroz ćelijske membrane i ima ulogu biološkog signala u mnogim fiziološkim procesima, kao što su vazodilatacija, inhibicija agregacije trombocita, neurotransmisija, imuni odgovor. Smatra se da NO deluje

kao antioksidans jer štiti ćeliju od agenasa koji indukuju oksidativni stres. Azot-monoksid može u patofiziološkim procesima reagovati sa kiseonikom i superoksid-anjon-radikalom, pri čemu nastaju reaktivne kiseonično-azotne vrste koje su moćni oksidujućí agensi sa citotoksičnim delovanjem. Na mestima povećane produkcije NO i  $O_2^{\cdot-}$  stvara se peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Pri protonovanju peroksinitrita nastaje peroksinitritna kiselina ( $ONOOH$ ) koja vrlo lako disosuje na  $OH^{\cdot-}$  i  $NO_2^{\cdot-}$  koji su odgovorni za toksične efekte  $ONOO^{\cdot-}$ . Posledice delovanja peroksinitrita su reakcije oksidacije i nitrovanja biomolekula. Joni prelaznih metala katalizuju heterolitičko cepanje  $ONOOH$  pri čemu nastaje  $OH^{\cdot-}$  i  $NO_2^+$  (nitronijum katjon), koji izaziva nitrovanje aromatičnih molekula, a supstrat je često tirozinski ostatak.

U našem eksperimentu određivana je koncentracija nitrita u plazmi i u jetri, koja je indikator količine cirkulišućeg NO. Suplementacija n-3 PUFA dovodi do smanjenja koncentracija cirkulišućih nitrita i u plazmi i u jetri, kod pacova obe ispitivane starosne dobi. Smanjenje koncentracija cirkulišućeg NO, kao i superoksid-anjon-radikala (povećana aktivnost SOD) u plazmi i jetri starih pacova kao i u plazmi mladih pacova, smanjuje verovatnoću nastanka peroksinitrita, kao i pomenutih redoks vrsta koje nastaju po njegovom protonovanju. Poredeći kontrolne grupe životinja značajno niže koncentracije nitrita ( $p < 0.01$ ) prisutne su kod kontrolne grupe starih pacova, dok je aktivnost SOD povišena ( $p < 0.05$ ) kod kontrolne grupe u jetri mladih životinja.

Mnogobrojne studije (Esterbauer 1993, Aviram 1996, Heinecke 2003) bavile su se ulogom oksidativnog stresa u patogenezi ateroskleroze, medju kojima su oksidativna modifikacija LDL, hiperfunkcija trombocita, imunosupresija. Faktori oksidativnog stresa, kao što su povišen nivo holesterola, poremećaj odnosa apolipoproteina, hipertenzija, dijabetes, bubrežna insuficijencija, čine LDL čestice podložnijim za oksidaciju. Nativni LDL podleže oksidativnoj modifikaciji uz pomoć aktiviranih oksigenaza, da bi zatim bio preuzet od strane makrofaga i neutrofilnih ćelija kod kojih oksidativni stres podstiče proces lipidne peroksidacije. To dovodi do poremećaja u metabolizmu holesterola u ćelijama zida arterija, agregaciju oksidovanih lipidnih čestica i pojavu aterosklerotičnih lezija. Proces je kontrolisan sa enzimima antioksidativne zaštite, koji imaju ulogu sprečavanja širenja oksidativnog stresa. HDL molekuli učestvuju u zaštiti od oksidativne modifikacije LDL molekula, koji indukuju ćelije zida arterijskih krvnih sudova na proizvodnju

proinflamatornih molekula. Epidemiološke studije kao i kliničke studije sugerišu da n-3 PUFA kao i unos alfa-linoleinske kiseline kao prekursora n-3 imaju značajnu ulogu u prevenciji CHD i ateroskleroze (Harper and Jacobson 2001).

PUFA unos, takođe, redukuje sintezu triglicerida u jetri (Nestel 1990, Brown 1999), inhibicijom masnokiselinske sinteze *de novo* i stimulacijom oksidacije masnih kiselina (Nestel, 1998). Efekti PUFA na sintezu triglicerida povezani su sa smanjenjem gojaznosti i adipoznog tkiva (Bremer, 2001). Dakle, PUFA ispoljavaju pozitivne efekte na lipidni metabolizam (Vecera, 2003). U skladu sa ovim rezultatima, naši rezultati su pokazali da se kod mladih pacova snižavaju koncentracije plazma triglicerida, dok se kod starih pacova tretmanom ribljim uljem značajno snižavaju vrednosti ukupnog holesterola. LDL-holesterol se snižava kod tretiranih životinja obe starosne dobi.

Rezultati PON1 aktivnosti, po suplementaciji, su pokazali pozitivnu korelaciju PON1 sa HDL-om, negativnu sa LDL-om čime se sprečava oksidacija LDL-holesterola, faktora rizika nastanka ateroskleroze. Kod mladih pacova korelacija PON1 aktivnosti po suplementaciji postojala je i u jetri ( $p < 0.01$ ) i u plazmi ( $p < 0.001$ ), a kod starih u plazmi ( $p < 0.05$ ). U kontrolnim grupama pozitivna korelacija PON1 i sa HDL-om prisutna je u plazmi. Aktivnost PON1 veća je kod kontrolne grupe mladih pacova ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu starih pacova.

U studiji Downer i sar, (2005) koja se bavi matematičkim modelovanjem, konstatovano je da je parametar ukupne LDH aktivnosti više uziman u obzir a ne izoenzimska zastupljenost. Pri određenim brzim promenama u energetsom metabolizmu postoji značajan fiziološki efekat procentualne izoenzimske zastupljenosti određenog tkiva tako da je fiziološki značaj određivanja izoenzimskih oblika i praćenje njihove zastupljenosti pri ovakvim promenama značajan (Quistorff, 2011).

Procentualna zastupljenost izoenzimskih oblika LDH u plazmi mladih i starih pacova tretiranih ribljim uljem pokazuje značajnu promenu. Procentualna zastupljenost LDH<sub>1</sub> oblika je značajno povišena ( $p < 0.05$ ), dok je LDH<sub>5</sub> izoenzimski oblik značajno snižen ( $p < 0.05$ ) kod mladih pacova tretiranih ribljim uljem u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Procentualna zastupljenost LDH<sub>2</sub>, značajno se povećava ( $p < 0.001$ ), posle tretmana ribljim uljem kod starih pacova, dok se procentualna zastupljenost LDH<sub>3</sub> ( $p < 0.05$ ), LDH<sub>4</sub> ( $p < 0.01$ ) i LDH<sub>5</sub> ( $p < 0.001$ ) smanjuje u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

Usled oštećenja ćelijske membrane u procesu peroksidacije lipida i promene u njenoj permeabilnosti dolazi do „curenja“ mnogih enzima citosola u ekstracelularni prostor. Na osnovu aktivnosti enzima može se utvrditi stepen oštećenja pojedinih organa. Jedan od takvih enzima je i laktat dehidrogenaza (LDH). Nalazi se u citoplazmi a prilikom oštećenja lako prelazi u ekstracelularni prostor tako da se njena aktivnost povećava u krvnoj plazmi. LDH katalizuje reakciju pretvaranja piruvata u laktata uz pomoć NADH/NAD<sup>+</sup>. Pri niskim koncentracijama kiseonika piruvat se u mišićima prevodi u laktat, koji preuzima jetra. Smanjenje LDH<sub>5</sub> izoenzimskog oblika ide u prilog činjenici da riblje ulje dovodi do smanjenja oštećenja ćelijskih membrana hepatocita i kod starih i kod mladih pacova. Sniženje LDH<sub>5</sub> predstavlja adaptaciju hepatocita na nove uslove prolongirane suplementacije ribljim uljem.

Sumarno, kao što je pomenuto ROS predominantno uzrokuju ćelijska oštećenja, imaju i ulogu signalnih molekula i učestvuju u intracelularnoj regulaciji. ROS interferiraju sa ekspresijom gena i signalnim transdukcionim putevima. Oni utiču na redoks status i mogu izazvati pozitivne odgovore (ćelijska proliferacija), ali i negativne (ćelijska smrt). Igraju ulogu sekundarnih mesindžera, kao što je regulacija Ca<sup>2+</sup> citosolne koncentracije, regulacija proteinske fosforilacije, aktivacija određenih transkripcionih faktora kao što su NF-κB i AP-1 familija faktora. ROS inhibiraju fosfolipidne fosfataze, interaguju sa sulfhidrilnim grupama na cisteinskim ostatcima. Ove strukturne promene menjaju proteinsku konformaciju koja vodi ushodnoj regulaciji nekoliko signalnih kaskada, kao što su scr7abl kinaza, MAPK i PI3 kinaza zavisni signalni putevi. Ove signalne kaskade vode aktivaciji nekoliko redoks-regulišućih transkripcionih faktora (AP-1, NF-κB, p53, HIF-1, NFAT).

## VI ZAKLJUČAK

Efekat tretmana ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida i parametre oksidativnog stresa u krvi i jetri ispitan je na pacovima Wistar soja različite starosne dobi (mladim pacovima od tri meseca i starim pacovima od 22 meseca). U grupi mladih pacova sadržaj holesterola, HDL-holesterola i triglicerida u plazmi bio je značajno viši u odnosu na grupu starih pacova. Dobijene vrednosti mogu biti posledica bržeg metaboličkog "turnover-a" kod grupe mladih u odnosu na grupu starih pacova. Ostali biohemijski parametri nisu se razlikovali između ove dve kontrolne grupe.

Tretman pacova ribljim uljem, koje je sadržalo eikozapentaensku (EPA, 20:5 n-3) i dokozeheksaensku kiselinu (DHA, 22:6 n-3) u iznosu od 32,85 % i 20,70 %, respektivno, trajao je od šest nedelja.

### ***Efekat suplementacije ribljim uljem kod pacova različite starosne dobi na biohemijske parametre krvi***

Kod *obe starosne grupe* životinja tretman ribljim uljem doveo je do povećanja sadržaja HDL-holesterola i mokraćne kiseline, a do smanjenja sadržaja LDL-holesterola u plazmi, kako u odnosu na početak tretmana, tako i u odnosu na kontrolnu grupu. *Kod mladih pacova* tretman je doveo je do smanjenja koncentracije triglicerida u odnosu na početak tretmana, a kod starih pacova je doveo do sniženja holesterola i u odnosu na početak tretmana i u odnosu na kontrolnu grupu. Može se zaključiti da tretman ribljim uljem smanjuje rizik od ateroskleroze i ima kardioprotektivni efekat. Kod mladih pacova ispoljava hipotrigliceridni efekat, a kod starih hipoholesterolemijski. Povećanje koncentracije mokraćne kiseline, kao endogenog antioksidanta, kod pacova obe starosne dobi ide u prilog antioksidativnog delovanja ribljeg ulja.

### ***Efekti suplementacije ribljim uljem na masnokiselinske profile fosfolipida plazme kod pacova različite starosne dobi***

U netretiranim grupama pacova različite starosne dobi utvrđene su razlike u masnokiselinskim profilima fosfolipida plazme. Starenjem se povećava sadržaj stearinske, linolne kiseline, arahidonske i ukupnih n-6 masnih kiselina, a opada nivo MUFA i oleinske kiseline.

Tretman ribljim uljem kod pacova *obe starosne dobi*, u odnosu na kontrolne grupe, dovodi da se u fosfolipidima plazme povećava sadržaj stearinske kiseline, eikozapentaenske kiseline i dokozaheksaenske kiseline, a smanjuju sadržaj arahidonske kiseline i procenjene vrednosti aktivnosti  $\Delta 4$  i  $\Delta 5$  desaturaza. Dakle, kod obe starosne grupe povećanje zastupljenosti EPA i DHA u fosfolipidima su direktno posledica suplementacije ribljim uljem.

U fosfolipidima plazme *mladih pacova* (u odnosu na kontrolnu grupu) pri tretmanu ribljim uljem smanjuje se procentna zastupljenost linolne kiseline, a povećava zastupljenost oleinske kiseline, MUFA i ukupnih n-3 masnih kiselina, što za posledicu ima snižavanje odnosa n-6/n-3 masnih kiselina. Dodatno povećanje sadržaja oleinske kiseline kod mladih tretiranih pacova (u odnosu na kontrolnu grupu) može se smatrati pozitivnim efektom imajući u vidu njena kardioprotektivna svojstva, pozitivne efekte na stanje krvnih sudova i endotela.

Kod *starih Wistar pacova* u fosfolipidima plazme pri tretmanu ribljim uljem povećava se sadržaj linolne kiseline i dihomo- $\gamma$ -linolenske kiseline. Promena u sadržaju dihomo- $\gamma$ -linolenske kiseline, koja je prekursor PGA1 prostaglandin-familije, može uticati na sprečavanje agregacije trombocita, snižavanje krvnog pritiska, smanjenje zapaljenskih procesa i utiče na balans između zastupljenosti PGA1 i PGA2 familije eikozanoida.

### ***Efekti suplementacije ribljim uljem kod pacova različite starosne dobi na masnokiselinske profile fosfolipida jetre***

Značajne promene u masnokiselinskim profilima fosfolipida jetre nađene su kod netretiranih starih u odnosu na mlade pacove Wistar soja. Procentna zastupljenost linolne,  $\alpha$ -linolenske, dihomo- $\gamma$ -linolenske i ukupnih n-6 masnih kiselina bila je povećana, dok je zastupljenost palmitinske kiseline, dokozaheksaenske kiseline i ukupnih n-3 masnih kiselina bila smanjena. Dakle, starenjem se smanjuje ukupni sadržaj n-3 masnih kiselina, a time i značajno povećava odnos n-6/n-3, što je za organizam nepovoljno.

Tretman ribljim uljem kod pacova *obe starosne dobi*, u odnosu na kontrolne grupe, doveo je do povećanja sadržaja linolne, eikozapentaenske, dokozaheksaenske i ukupnih n-3 masnih kiselina u fosfolipidima jetre. Sa druge strane, sadržaj arahidonske i ukupnih n-6 masnih kiselina je smanjen, kao i odnos n-6/n-3. Suplementacija je dovela i do smanjenja



procenjenih vrednosti aktivnosti  $\Delta 4$  i  $\Delta 5$  desaturaza i elongaza. Sve navedeno dokazuje da tretman ribljim uljem dovodi do poboljšanja masnokiselinskih profila fosfolipida jetre.

Razlike u odgovoru na tretman starih i mladih pacova ribljim uljem odnose se na zastupljenost pojedinačnih masnih kiselina u fosfolipidima jetre, ali i na zastupljenost ukupnih masnih kiselina. Tako je kod *mladih pacova* došlo do povećanja zastupljenosti  $\alpha$ -linolenske i dihomogama-linolenske kiseline, a kod *starih* palmitinske i vakcenske kiseline, u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe. Sadržaj ukupnih MUFA u fosfolipidima jetre se povećao pri tretmanu mladih pacova, dok kod starih dolazi do povećanja zastupljenosti SFA i PUFA. Ovakve razlike samo dopunjavaju u manjoj ili većoj meri već pomenuto protektivno delovanje ribljeg ulja.

### ***Efekat suplementacije ribljim uljem na parametre oksidativnog stresa u krvi pacova različite starosne dobi***

Analiza parametara oksidativnog stresa u krvi *kontrolnih grupa različite starosne dobi* pokazala je da se srednje vrednosti aktivnosti SOD, CAT i sadržaja MDA u eritrocitima ne menjaju sa starenjem. Razlika između starosnih kontrolnih grupa nađena je za sadržaj nitrita u plazmi, koji je kod *mladih pacova* bio niži u odnosu na grupu starih pacova, i paraoksonaze čija je aktivnost bila povećana.

Veće razlike u parametrima oksidativnog stresa kod kontrolnih grupa pacova različite starosne dobi dobijene su pri njihovom određivanju u tkivu jetre. U ćelijama jetre starih pacova niža je aktivnost SOD (kao i koncentracija nitrita), i veći je nivo lipidne peroksidacije u odnosu na grupu mladih pacova.

Tretman ribljim uljem kod pacova *obe starosne dobi* doveo je do značajnog povećanja aktivnosti SOD, CAT i paraoksonaza u krvi, u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe, kao i do smanjene lipidne peroksidacije i koncentracije plazma cirkulišućih nitrita. Samo kod *starih pacova* došlo je i do povećanja količine slobodnih tiol-grupa, u odnosu na kontrolnu grupu, čime je antioksidativni kapacitet plazme u tretmanu značajno povećan.

Studije sa animalnim modelima omogućavaju ispitivanja efekata suplementacije u organima. Efekat tretmana ribljim uljem na parametre oksidativnog stresa u jetri pacova *obe starosne dobi* bio je sličan postignutom u krvi za stepen lipidne peroksidacije i sadržaj

nitrita, koji su značajno sniženi u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe. Bolji tkivni antioksidativni odgovor u tretmanu nađen je kod starih pacova, jer je došlo do značajnog povećanja aktivnosti CAT, SOD i količine tiol-grupa, dok se aktivnost paraoksonaza statistički značajno smanjila u odnosu na kontrolnu grupu. Može se zaključiti da riblje ulje ima protektivni antioksidativni efekat, odnosno da se tretmanom ribljim uljem mogu izbjeći oksidativna oštećenja koja doprinose starenju.

## VII LITERATURA

**Aguiló A**, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav.* 2005; 31; 84(1):1-7.

**Aebi H**. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-6.

**Alexander J. W.** Immunonutrition: the role of omega 3 fatty acids. *Nutrition.* 1998; 14, 627–633.

**Alexeyev MF**. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *FEBS J.* 2009; 276(20):5768-87.

**Ames B.N.**, Schigenaga, M.K. and Park, E.M. DNA damage by endogenous oxidants as a cause of aging and cancer. In “oxidative damage and repair: chemical, biological and medical aspects”, ed. (K.J.A.Davies), Pergamon Press, New York, 1991; 181-187.

**Amusquivar E**, Rupérez FJ, Barbas C, Herrera E. Low arachidonic acid rather than alphatocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. *J Nutr.* 2000; 130(11):2855-65.

**Anderson BM** and Ma D WL. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal. *Lipids in Health and Disease* 2009; 8:33

**Araya J**, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond).* 2004; 106 (6):635-43.

**Archer S**. Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB J.* 1993; 7:349-360.

**Arsić A.**, Prekajski N, Vučić V, Tepšić J, Popović T, Vrvic M, Glibetić M. Milk in human nutrition: comparison of fatty acid profiles. *Acta Veterinaria.* 2009; 59: 569–578.

**Arterburn, L. M.**, Hall E. B, Oken, H. Distribution, interconversion, and dose response of n–3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 1467S–1476S.

**Atessahin A**, Karahan I, Pirincci I. Effects of phenobarbital on serum and liver paraoxonase and arylesterase activities in rats. *Turk J Vet Anim Sci.* 2004; 28: 363-367.

**Aviram M**. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *Eur Clin Chem Clin Biochem.* 1996; 34(8):599-608. Review.

- Barbosa DS**, Cecchini R, El Kadri MZ, Rodríguez MA, Burini RC, Dichi I. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition*. 2003; 19(10):837-42.
- Badry A M E**, Fraf R, Clavien P A. Omega3-omega 6: What is right for the liver? *J Hepatol*. 2007; 47:718-725.
- Baroni G S** (14) A Model of Insulin Resistance and Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Treatment on Liver Injury. *The American Journal of Pathology*, 2006; 169: 3
- Bauer JH**, Morris SN, Chang C, Flatt T, Wood JG, Helfand SL. dSir2 and Dmp53 interact to mediate aspects of CR $\square$ dependent life span extension in *D. melanogaster*. *Aging*. 2009; 1: 38 $\square$ 48.
- Bagga D.**, Wang, L, Farias-Eisner R, Glaspy J, A Reddy S. T.: Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 2003; 100: 1751–1756.
- Barnett YA**, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat Res*. 1995; 338(1-6):115-28.
- Beauchamp C**, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971;44(1):276-87.
- Beckman J S**, Beckman T W, Chen J, Marshall P A, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(4):1620-4.
- Benatti P**, Peluso G, Nicolai R, Calvani M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23(4):281-302. Review.
- Benzie IF**, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;15,239(1):70-6.
- Berge R. K**, Madsen L, Vaagenes H, Tronstad K J, Gottlicher M, and. Rustan A. C, *BJ* 1990; 343: 191–197.
- Bergendi, L**, Benes L, Durackov ,Ferencik, M. Chemistry,physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*. 1999; 65: 1965-1974.

- Berger NA.** Polly (ADP-ribose) in the cellular responses to DNA damage. *Radiat.Res.* 1985; 101:4-15.
- Blagosklonny M.V et al.** (36). Impact papers on aging in 2009. *Aging.* 2010; 2(3):111-121. Review.
- Bloom M,** Evans E, Mouritsen OG. Physical properties of the fluid lipid- bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q Rev Biophys.* 1991; 24(3):293-397. Review.
- Bonkowski MS,** Dominici FP, Arum O, Rocha JS, Al Regaiey KA, Westbrook R, Spong A, Panici J, Masternak MM, Kopchick JJ, Bartke A. Disruption of growth hormone receptor prevents calorie restriction from improving insulin action and longevity. *PLoS One* 2009; 4: e4567.
- Borges F,** Fernandes E, Roleira, F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Cun. Med. Chem.* 2002; 9:195-217.
- Bremer J.** The biochemistry of hypo- and hyperlipidemic fatty acid derivatives: metabolism and metabolic effects. *Prog Lipid Res.* 2001;40(4):231-68.
- Breslow J I.** Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation. *Ann. Rev. Biochem.* 1985; 54: 699-727.
- Breslow J L** n-3 Fatty acids and cardiovascular disease *Am J Clin Nutr* 2006; 8:1477S–82S
- Brigelius R.** Mixed disulfides: biological functions and increase in oxidative stress, In : „Oxidative stress“ ed. (H. Sies). Academic Press, New York 1985; 243-271.
- Brindle N P,** Zammit VA, Pogson C. I. Regulation of carnitine palmitoyltransferase activity by malonyl-CoA in mitochondria from sheep liver, a tissue with a low capacity for fatty acid synthesis. *Biochem J.* 1985; 232: 177–182.
- Brown AM,** Castle J, Hebbachi AM, Gibbons GF. Administration of n-3 fatty acids in the diets of rats or directly to hepatocyte cultures results in different effects on hepatocellular ApoB metabolism and secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(1):106-14.
- Brown JM,** Grosso MA, Terada LS, Beehler CJ, Toth KM, Whitman GJ, Harken AH, Repine JE. Erythrocytes decrease myocardial hydrogen peroxide levels and reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989; 256(2 Pt 2):H584-8.

**Brown DA**, London E: Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000, 275(23):17221-17224.

**Brown, M S** and Goldstein J L, How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci.Am.* 1984; 251(5):58-66.

**Butterfield A**, Miranda L, Lange B, Sultana R, involvements of lipid peroxidation product HNE in the pathogenesis and progression of Alzheimer disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010; 1801(8): 924-9. Review.

**Cadenas E**. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 1989; 58: 79-110.

**Calviello G**, Palozza P, Franceschelli P, and Bartoli G. M, *Lipids*. 1997; 32: 1075–1083.

**Carr A**, McCall M R, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1716-1723.

**Carrano AC**, Liu Z, Dillin A, Hunter T. A conserved ubiquitination pathway determines longevity in response to diet restriction. *Nature* 2009; 460: 396-399.

**Caramori PR**, Zago AJ. Endothelial dysfunction and coronary artery disease. *Erq Bras Cardiol* 2000; 75: 173-182.

**Caro AA**, Cederbaum AI. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2- and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2006; 1,40(3):364-75.

**Carpetier Y**, Portois L, Sener A, and Malaisse W Y. Correlation between liver and plasma fatty acids profile of phospholipids and triglycerides in rats. *Int J Mol Med.* 2008; 22: 255–262.

**Ceballos-Picot I**, Trivier J M, Nicole A, Sinet P M, Thevenin M. Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem.* 1992; 38(1):66-70.

**Chapman C**, Maternal and early dietary FA intake: Changes in lipid metabolism and liver enzymes in adult rats. *J.Nutr.* 2000; 130:146-151.

**Charlton –menys** and Durrington. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol.* 2008; 93(1): 27-42.

- Chiueh**, C C. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 1999; 890: 301-311.
- Christopherson** SW, Glass RL. Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in a essentially nonalcoholic solution. *Journal of dairy science* 1969; 52:1289-1290.
- Cimen**, M Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.*2007, 390: 1-11.
- Close** G L, Ashton T, McArdle A, Maclaren D P. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2005;142 (3):257-66.
- Cohen**, G. Monoamine oxidase, hydrogen peroxide and Parkinson's disease, In „Advances in Neurology“, eds. (M. D. Yahr and K. J. Bergman), Raven Press, New York, 1986; 119-125.
- Cohen D E**, Supinski A M, Bonkowski M S, Donmez G, Guarente LP. Neuronal SIRT1 regulates endocrine and behavioral responses to calorie restriction. *Genes Dev.* 2009; 23: 2812-2817.
- Colavitti** R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T J. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *Biol Chem.* 2002. 1, 277(5):3101-8.
- Cotgreave I A**, Moldeus P. and Orrenius S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1988; 28, 189-212.
- Cross A R** and Jones OTG. Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta Bio- Energetics*, 1991; 1057: 281-298.
- Cynamon** HA, Isenberg JN, Nguyen CH. A rapid method for erythrocyte membrane phospholipid determination. *Clin Chim Acta.* 1984; 144(1):65-70.
- Dargel R**, Lipid peroxidation- a common pathogenic mechanism. *Exp. Toxicol. Pathol.* 1991; 44: 169-181.
- Davidson MH**: Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* 2006; 98: 27i-33i.

- De Coursey TE**, and Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life.* 2005; 62:2173-2193.
- De Grey A D N J.** HO<sub>2</sub><sup>·</sup>-The forgotten radical. *DNA Cell Biol.* 2002; 21: 251-257.
- Dement E J**, Richieri G V, and Kleinfeld A M. *Biochem. J.* 2002; 63:809– 815.
- Demoz A**, Willumsen N, Berge RK. Eicosapentaenoic acid at hypotriglyceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defense in mice. *Lipids.* 1992; 27(12):968-71.
- Devchand PR**, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384(6604):39-43.
- Dowhan, W**, Bogdanov M. Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes* (4th edition Elsevier Science, Vance D.E and Vance J.E, 2002; 1-35.
- Downer J**, Sevinsky JR, Ahn NG, Resing KA, Betterton MD. Incorporating expression data in metabolic modeling: a case study of lactate dehydrogenase. *J Theor Biol.* 2006; 7,240(3):464-74.
- Droge W.** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiol.Rev.* 2002; 82: 47-95.
- Edman U**, Garcia AM, Busuttill RA, Sorensen D, Lundell M, Kapahi P, Vijg J. Lifespan extension by dietary restriction is not linked to protection against somatic DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2009; 8: 331-338.
- Ehringer W**, Belcher D, Wassall SR, Stillwell W. A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega-3) and docosahexaenoic (22:6 omega-3) acids on phospholipid bilayers. *Chem Phys Lipids* 1990; 54(2):79-88.
- El-Badry AM**, Graf R, Clavien PA. Omega 3 – Omega 6: What is right for the liver? *Journal of Hepatology* 2007; 47: 718–725.
- Ellman GL.** Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82(1):70-7.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergens (NDA).** Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal* 2010; 8:1461.



**Epel ES**, Merkin SS, Cawthon R, Blackburn EH, Adler NE, M.J. P, Seeman TE. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. *Aging*. 2009; 1: 81-88.

**Erdogan H**, Fadillioglu E, Ozgocmen S, Sogut S, Ozyurt B, Akyol O, Ardicoglu O. Effect of fish oil supplementation on plasma oxidant/antioxidant status in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004; 71(3):149-52.

**Esterbauer H**, Wäg G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*. 1993; 49(3): 566-76. Review.

**Evereklioglu C**, Er H, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otlu B, Ozerol E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol*. 2003; 106 (2):129-36.

**Fan YY**, McMurray DN, Ly LH, Chapkin RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr*. 2003; 133(6):1913-1920.

**Fan YY**, Ly LH, Barhoumi R, McMurray DN, Chapkin RS: Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production. *J Immunol* 2004; 173(10):6151-6160.

**Farzaneh-Far R**, Lin J, Epel E S., Harris W S., Blackburn E H, P, and. Whooley M A. Association of Marine Omega-3 Fatty Acid Levels With Telomeric Aging in Patients With Coronary Heart Disease *JAMA*. 2010; 20, 303(3): 250.

**Fenton H J H**. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.* 1984; 65, 899-910.

**Finkel T**. Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology*. 2003; 15: 247-54.

**Folch J**, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226(1):497-509.

**Friedewald WT**, Levy RI, Fredrickson DS Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18(6): 499-502.

**Fridovich I.** The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-880.

**Fridovich I.** Superoxide dismutase: an adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem.* 1989; 264: 7761-4.

**Froyland L**, Vaagenes H, Asiedu D K, Garras A, Lie O, and Berge R K, *Lipids.*1996; 31:169–178.

**Gianni P**, Jan K J, Douglas M J, Stuart P M, Tarnopolsky M A. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol.* 2004;39 (9):1391-400.

**Giudetti A M**, Beynen A C, Lemmens A G, Gnoni G V, Geelen M J. Hepatic fatty acid metabolism in rats fed diets with different contents of C18:0, C18:1 cis and C18:1 trans isomers. *Br J Nutr.* 2003; 90(5):887-93.

**Giudetti AM**, Sabetta S, di Summa R, Leo M, Damiano F, Siculella L, Gnoni GV. Differential effects of coconut oil- and fish oil-enriched diets on tricarboxylate carrier in rat liver mitochondria. *J Lipid Res.* 2003; 44(11):2135-41.

**Ghfourifar P**, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26(4): 190-195.

**Goldstein IM**, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res.* 1996; 36(18):2979-94.

**Grandison R C**, Piper M D, Partridge L. Amino acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 2009; 462: 1061-1064.

**Greenberg M E**, Li X M, Gugiu B G, Gu X, Qin J, Salomon R G, Hazen S L. The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J Biol Chem.* 2008; 283(4):2385-96.

**Guachalla L M**, Ju Z, Koziel R, von Figura G, Song Z, Fusser M, Epe B, Jansen □ Dirr P, Rudolph K L. Sod2 haploinsufficiency does not accelerate aging of telomere dysfunctional mice. *Aging* 2009; 1: 303 □ 315.

**Guevara I**, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gołabek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*. 1998; 22,274(2):177-88.

**Gunstone F D**. Fatty Acid Structure. In: *The Lipid Handbook*. London: Chapman and Hall. 1994; 1-19.

**Gunstone F D**. High resolution <sup>13</sup>C NMR. A technique for the study of lipid structure and composition. *Prog Lipid Res*. 1994; 33(1-2):19-28.

**Gutteridge J M**, Quinlan G J. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidizing proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1156(2):144-50.

**Halliwell B**, Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, New York. 1999.

**Halliwell B** and Gutteridge, J M C. *Free radicals in biology and medicine*, New York, Oxford University Press, 1989; 1-543.

**Halliwell B**. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comms*. 1990; 9: 1-32,

**Halliwell B**, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57, (5):715 S -724S

**Harman D**. "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol*. 1956; 11(3): 298-300.

**Harper CR** and Jacobson T A: The fats of life. The role of omega-3 fatty acids in the prevention of CHD. *Arch Intern Med*. 2001; 161: 2185-2191.

**Harrison D E**, Strong R, Sharp Z D, Nelson J F, Astle C M, Flurkey K, Nadon N L, Wilkinson J E, Frenkel K, Carter C S, Pahor M, Javors M A, Fernandez E, Miller R A. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009; 460:392-396.

**Harth S**, Dreyfus H, Urban PF, Mandel P. Direct thin-layer chromatography of gangliosides of total lipid extracts. *Anal Biochem.* 1978; 86: 543-551.

**Heinecke J W**. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2003; 6, 91(3A):12A-16A.

**Hegardt F G**. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl- CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis. *Biochemical Journal.* 1999; 338 (Pt 3): 569–582.

**Holub DJ**, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem.* 2004 Aug;263(1-2):217-25. Review.

**Hsu H C**, Lee Y T, Chen M F. Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001; 66(2):99-108.

**Hynes G R**, Heshka J, Chadee K, and Jones P J, J. *Lipid Res.* 2003; 44: 893–901.

**Igarashi M**, Ma L K, Chang J, Bell M, and Rapoport S I, J. *Lipid. Res.* 2008; 49: 1735–1745.

**Isenberg T**, Knauer H, Schauer A, Buttner S, Ruckenstuhl C, Carmona Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, Fussi H, Deszcz L, Hartl R, Schraml E, Criollo A, Megalou E, Weiskopf D, Laun P, Heeren G, Breitenbach M, Grubeck-Loebenstien B, Herker E, Fahrenkrog B, Frohlich KU, Sinner F, Tavernarakis N, Minois N, Kroemer G, Madeo F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 1305-1314.

**Iwata K**, Shimazu M, Wakabayashi G, Ohshima A, Yoshida M, Kitajima M. Intraportal perfusion of prostaglandin E1 attenuates hepatic postischaemic microcirculatory impairments in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14:634–641.

**Jackson M J**, Edwards R H, Symons M C. Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 20,847(2):185-90.

**Jackson M J**, O'Farrell S. Free radicals and muscle damage. *Br Med Bull.* 1993;49(3):630-41.

**Jang YC**, Remmen V H. The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp Gerontol.* 2009; 44(4): 256-60.

**Jen C**, Buisson A, Pellizzon M, Ordiz F, Santa Ana L, and Brown J. *Exp. Biol. Med.* 2003;228: 843–849.

**Jenkins R R.** Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 1988; 5(3):156-70.

**Johnson R M**, Goyette G J, Ravindranath Y, Ho Y S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free Radic Biol Med.* 2005; 1,39 (11):1407-17.

**Kakhlon O. and Cabantchik**, Z L. The labile iron pool: Characteization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 33,1037-1046.

**Kawai Y**, Fujii H, Okada M. Tsuchie Y, Uchida K, and Osawa T, J. *Lipid. Res.* 2006; 47: 1387–95.

**Kent C.** Eukaryotic phospholipids biosynthesis. *Annual Review Biochemistry.* 1995; 64, 315-343,

**Kerner J**, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000; 1486. 1–17.

**Klemola P**, Freese R, Jauhiainen M, Pahlman R, Alftan G, Mutanen M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis.* 2002; 160: 425-432.

**Kim H J**, Miyazaki M, Man W C, Ntambi J M. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol-mediated induction of SREBP-1 maturation. *Annals of New York Academy of Sciences* 2002; 967: 34–42.

**Kim K H**, López-Casillas F, Bai D H, Luo X, Pape M E. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J.* 1989;3(11):2250-6. Review

**Koshland D E.** The molecule of the year. *Science*. 1992; 258:1861.

**Krummer S,** Thiermann H, Worek, F, Eyer, P. Equipotent cholinesterase reactivation in vitro by the nerve agent antidotes HI 6 dichloride and HI 6 dimethanesulfonate. *Arch Toxicol*. 2002;76: 589–595.

**Kume N,** Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 1998; 83(3): 322-7.

**Lansing M W,** Mansour E, Ahmed A, Cortes A, Garcia L, Lauredo I T, Wanner A, Abraham W M. Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 144(6):1291-6.

**Larsson K,** Quinn P J. Occurrence and Characteristics of Oils and Fats. In: *The Lipid Handbook*. London: Chapman and Hall. 1994; 47-223.

**Lauretani F,** Maggio M, Pizzarelli F, Michelassi S, Ruggiero C, Ceda G P, Bandinelli S, Ferrucci L. Omega-3 and renal function in older adults. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(36):4149-56.

**Lee J,** Koo N, Min D B. ROS, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehens Rev Food Sci Food Safety*. 2004; 3:21-33.

**Lee S,** Gura K M, Puder M. Omega-3 fatty acids and liver disease. *Hepatology* 2007;45:841–845.

**Leigh-Firbank EC,** Minihane A M, Leake, D S Wright, J W, Murphy M C Griffin B A, and Wiliams C M. *BJN*. 2002; 87: 435–445.

**Lemaitre R N,** King I B, Mozaffarian D, Kuller L H, Tracy R P, Siscovick D S. n-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77(2): 319-25.

**Leonarduzzi G,** Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49(11):1044-9.

**Levitan E B**, Wolk A, and Murray A. Mittleman Fatty fish, marine omega-3 fatty acids, and incidence of heart failure. *Eur J Clin Nutr.* 201 ; 64(6): 587–594

**Li Li Ji**. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *P.S.E.B.M.* 1999; 222: 283-292.

**Lykkesfeldt J**, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 2007; 173 (3): 502-511. Review.

**Lo C J**, Terasaki M, Garcia R, Helton S. Fish oil-supplemented feeding does not attenuate warm liver ischemia and reperfusion injury in the rat. *J Surg Res.* 1997; 7 1:54–60.

**Lopez Jimenez J A**, Bordoni A, Hrelia S, Rossi C A, Turchetto E, Zamora Navarro S, et al. Evidence for a detectable delta-6-desaturase activity in rat heart microsomes: aging influence on enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 192:1037–1041.

**Lowry N. J**, Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Folin-phenol protein quantification method of O. H.. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.

**Lukiw W J**. and. Bazan N G. Docosahexaenoic Acid and the Aging Brain *J. Nutr.* 2008; 138: 2510–2514.

**Ma D W**. Lipid mediators in membrane rafts are important determinants of human health and disease. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007; 32(3): 341-350.

**Macfarlane D P**, Forbes S, Walker B R. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 2008; 197(2):189-204.

**Maidt M L**. and Floyd R A. Measurement of products of free radical attack on nucleic acids. In: “Free Radicals: A practical approach “, eds. (N.A. PUNCHARD and F.J. KELLY), I.R.L. press and Oxford University. 1996 ; 201-209.

**Mackness M**, Arrol S, Abbot C, Durrington P N: Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993; 104: 129-135.

**Marra C A**, de Alaniz M J, Brenner R R. Effect of various steroids on the biosynthesis of arachidonic acid in isolated hepatocytes and HTC cells. *Lipids*. 1988; 23:1053–1058.

**Margaritis I**, Palazzetti S, Rousseau A S, Richard M J, Favier A. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr*. 2003; 22(2): 147-56.

**Marklund S L**, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta*. 1982; 126(1): 41-51.

**McGarry J D**, Woeltje K F, Kuwajima M, Foster D W. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1989; 5: 271–284.

**McIntyre M**, Bohr D F, Dominiczak A F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999;34(4 Pt 1): 539-45.

**Mead J F**. The metabolism of the essential fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1958; 6:656-61.

**Mead J F**. The metabolism of polyunsaturated fatty acids. In: Holman RT, editor. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. Oxford: Pergamon Press. 1971; 161-89.

**Mecocci P**, Polidori M C, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(8):1243-8.

**Melo José Ulisses de Souza**, TCBC-CE<sup>I</sup>; Jefferson Menezes Viana Santos<sup>II</sup>; samu de Sandes Kimura<sup>II</sup>; ManoelMessias Campos Júnior<sup>III</sup>; Radamés Bezerra Melo<sup>IV</sup>; Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.<sup>V</sup> Effects of fatty acids on liver regeneration in rats. *Rev. Col. Bras Cir*. 2010; 37: 5.

**Melov S**. Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(11):1395-400. Review.

**Miller W L**, Bose H S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res*. 2011; 52(12): 2111-35. Review.



**Mitasikova M**, Smidova S, Mascaliova A, Knezi V, Dlugosova K, Okruhlicova B, Weismann P, Tribulova N. Aged Male and Female Spontaneously hypertensive rats benefit from n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation. *Physiol.Res.* 2008; 57(2),S39-48.

**Movat H Z**. The inflammatory reaction, Amsterdam, Oxford: Elsevier Scientific Publication. 1985.

**Morris D**, Kisly A, Stoyka C G, Provenzano R. Spontaneous bilateral renal artery occlusion associated with chronic atrial fibrillation. *Clin Nephrol.*1993; 39(5):257-9.

**Mukul D**, Ansari K M., Dhawan A, Shukla Y, Khanna, S K: Correlation of DNA damage in epidemic dropsy patients to carcinogenic potential of argemone oil and isolated sanguinarine alkaloid in mice. *Int J Cancer.* 2005; 117(5):709-17

**Muller F L**, Lustgarten M S, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43(4):477-503.

**Medeiros L C**, Liu Y W, Park S, Chang P H, Smith AM. Insulin, but not estrogen, correlated with indexes of desaturase function in obese women. *Horm Metab Res.* 1995; 27:235–238.

**Nelson D L**, Cox M M. Lipid Biosynthesis. In: *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company. 2005;787-815.

**Nelson D L**, Cox M M. Biological Membranes and Transport. In: *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company. 2005; 369-420.

**Nestel P J**. Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism: *Annu Rev Nutr.* 1990; 10; 149-167.

**Nestel P J**. Fish oils, lipids and coronary artery disease. In: *Atherosclerosis XI*. B Jacotot, D Mathe, J C Fruchart, Elsevier science Singapore. 1998; 195-200.

**Oram J F**. HDL- apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 1;23(5):720-7.Review.

**Palozza P**, Sgarlata E, Luberto C, Piccioni E, Anti M, Marra G, Armelao F, Franceschelli P, Bartoli GM. n-3 fatty acids induce oxidative modifications in human erythrocytes depending on dose and duration of dietary supplementation. *Am J Clin Nutr.* 1996; 64(3):297-304.

**Pan D A**, and Storlien L H, *J. Nutr.* 1993; 123: 512–519.

**Pandey K B**, Rizvi S I, Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2010; 3(1): 2-12.

**Peet M**, Brind J, Ramchand CN, Shah S, Vankar GK. Two double-blind placebo-controlled pilot studies of eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001;49:243-251.

**Pérez V I**, Van Remmen H, Bokov A, Epstein C J, Vijg J, Richardson A. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell.* 2009; 8: 73-75.

**Percy C**, Pat B, Poronnik P, Gobe G. Role of oxidative stress in age-associated chronic kidney pathologies. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005; 12(1):78-83. Review.

**Perica MM**, Delas I. Essential fatty acids and psychiatric disorders. *Nutr Clin Pract.* 2011;26:409-425.

**Petkau A**. Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutases. *Cancer Treatment.* 1986; 13: 17-44.

**Petrowsky H**, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien P A. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg.* 2006; 244:921–928.

**Pizato N**, Bonatto S, Yamazaki R K, Aikawa J, Nogata C, Mund R C, Nunes E A, Piconcelli M, Naliwaiko K, Curi R, Calder P C, Fernandes L C. Ratio of n6 to n-3 fatty

acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. *Nutr Cancer*. 2005; 53(2):194-201.

**Prinz W A.** Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog Lipid Res*. 2007; 46(6): 297-314.

**Pristerá A,** Okuse K. Building excitable membranes: lipid rafts and multiple controls on trafficking of electrogenic molecules. *Neuroscientist*. 2012 ;18(1):70-81.

**Popović T,** Ranić M, Predrag Bulajić,P, Milićević M Arsić A Vučić V, and Glibetić M. Effects of n-3 Fatty Acids Supplementation on Plasma Phospholipids Fatty Acid Composition in Patients with Obstructive Jaundice- a Pilot Study. 2009; 49 (3): 370-375.

**Popović T,** Borozan S, Arsić , Debeljak-Martačić J,Vučić V, de Luka S, Milovanović I, Trbović A, and Glibetić M. Effects of *n*-3 Supplementation on Plasma and Liver Phospholipid Fatty Acids Profile in Aged Wistar Rats. *Croat. Chem. Acta*. 2011; 84 (1): 73-79.

**Pryor W A,** Houk K N, Foote C S, Fukuto J M, Ignarro L, Squadrito G L, Davies K J. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 291(3): R491-511. Review.

**Pullen D L,** Liesman J S, Emery R S. A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *Journal of Animal Science*. 1990; 68: 1395-1399.

**Quistorff B,** Grunnet N, The isoenzyme pattern of LDH does not play a physiological role except perhaps during fast transitions in energy metabolism. *Aging*. 2011; 3( 5): 457-460.

**Rasler M** and Lehrach H. Building a new bridge between metabolism, free radicals and longevity. *Aging*; 2009; 1(10): 836-838.

**Reeves E P,** Lu H, Jacobs H L, Messina C G, Bolsover S, Gabella G, Potma E O, Warley A, Roes J, Segal A W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*. 2002; 21, 416(6878):291-7.

**Ridnour L A,** Thomas, D D, Mancardi D, Espey M G, Miranda K M, Paolocci N.; The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem*. 2004; 385: 1-10.

**Ristić-Medić D**, Ristić G, Tepsić V, and Ristić G N. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2003; 49: 367–374.

**Ristić V**, Uticaj diazepama i alkohola na lipide krvne plazme i jetre kod pacova. Doktorska disertacija. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja, 1991; 3-35.

**Rizvi S I**, Jha R, Maurya P K. Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging. *Rejuvenation Res.* 2006; 9(4):470-4.

**Rojas C**, Cadenas S, Pérez-Campo R, López-Torres M, Pamplona R, Prat J, Barja G. Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 306(1):59-64.

**Rossner P J**, Terry M B, Gammon M D, Agrawal M, Zhang F F, Ferris J S, Teitelbaum S L, Eng S M, Gaudet M M, Neugut A I, Santella R M. Plasma protein carbonyl levels and breast cancer risk. *J Cell Mol Med.* 2007;11 (5):1138-48.

**Ruiz-Gutierrez V**, Perez-Espinosa A, Maria Vazquez C and Santa-Maria C. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *British Journal of Nutrition.* 1999; 82: 233-241.

**SACN** (Scientific Advisory Committee on Nutrition) Committee on Toxicity. Advice on fish consumption: benefits and risks. London: The Stationary Office; 2004.

**Sanz A**, Pamplona R, Barja G. Is the mitochondrial free radical theory of aging intact? *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(3-4):582-99. Review.

**Sarsilmaz M**, Songur A, Ozyurt H, Kuş I, Ozen OA, Ozyurt B, Söğüt S, Akyol O. Potential role of dietary omega-3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 69(4):253-9.

**Scion Corp, 2007**: Available at <http://www.scioncorp.com> (accessed June 20, 2007).

- Schiavon R**, De Fanti, E, Giavarina D, Biasioli S, Cavalcanti G, Guidi G. Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clinica Chimica Acta*. 1996; 247:71–80.
- Schmocker C**, Weylandt K H, Kahlke L, Wang J, Lobeck H, Tiegs G. Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology* 2007; 45:864–869.
- Schmitz G**, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2008; 47(2):147-155.
- Schroeder F**, Atshaves B P, McIntosh A L, Gallegos A M, Storey S M, Parr R D, Jefferson J R, Ball J M, Kier A B. Sterol carrier protein-2: new roles in regulating lipid rafts and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(6):700-18. Review.
- Scott G**. Antioxidants the modern elixir? *Chem Britain*. 1995; 31: 879-882.
- Schwartz C J**, Valente A J, Sprague E A. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol*. 1993 ;71(6): 9B-14B. Review.
- Sekine S**, Kubo K, Tadokoro T, Saito M. Effect of Docosahexaenoic Acid Ingestion on Temporal Change in Urinary Excretion of Mercapturic Acid in ODS Rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2007; 41(3):184-90.
- Selman C**, McLaren J S, Meyer C, Duncan J S, Redman P, Collins A R, Duthie G G, Speakman J R. Life-long vitamin C supplementation in combination with cold exposure does not affect oxidative damage or lifespan in mice, but decreases expression of antioxidant protection genes. *Mech Aging Dev*. 2006; 127(12): 897-904.
- Sekiya M**, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*. 2003; 38:1529–1539.
- Sies H**. *Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants*, New York, Academic Press. 1991.
- Sies H**. Oxidative stress: Introductory remarks. In „Oxidative Stress“, ed. (H. Sies), Academic Press, New York. 1-8, 1985.
- Singh A**. Introduction: Interconversing of singlet oxygen and related species. *Photochem. Pathobiol*. 1978; 28: 429-433.

**Singh M.** Essential fatty acids, DHA and human brain. *Indian J Pediatr.* 2005;72:239-242.

**Simon J A,** Hodgkins M L, Browner W S, Neuhaus J M, Bernert J T, Hulley S B. Serum fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.* 1995;142(5): 469-76.

**Simopoulos A P.** Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum Nutr* 2003; 56:67–70.

**Simopoulos A P.** Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1999; 60:421-9.

**Sinclair S,** Levy G. Eicosanoids and the liver. *Ital J Gastroenterol.* 1990; 22:205–213.

**Sigal E.** The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am J Physiol.* 1991 ; 260(2 Pt 1): L13-28. Review.

**Slater T F.** Free radicals and tissue injury: fact and fiction. *Br J Cancer Suppl.* 1987; 8:5-10.

**Sözmen E Y,** Kerry Z, Uysal F, Yetik G, Yasa M, Ustünes L, Onat T. Antioxidant enzyme activities and total nitrite/nitrate levels in the collar model. Effect of nicardipine. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38(1):21-5.

**Stadtman E R.** Role of oxidant species in aging. *Curr. Med.Chem.* 2004; 11:1105-1112.

**Stahl A.** *Pflugers. Arch.* 2004; 447: 722–727.

**Stock T L,** Dormandy T L. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Brit J Haematol.* 1971; 20: 95–111.

**Tauler P,** Sureda A, Cases N, Aguiló A, Rodríguez-Marroyo J A, Villa G, Tur J A, Pons A. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem.* 2006; 17(10): 665-71.

**Tentori L,** Salvati A M. Hemoglobinometry in human blood. *Methods Enzymol.* 1981; 76:707-15.

**Tepšić V,** Pavlović M, Ristić-Medić D, Ristić V, Lekić N, Tepšić J, Debeljak Martačić J, Miličević M, Glibetić M. *Acta Vet- Beograd.* 2008; 58: 33–41.

**Teran-Garcia M**, Adamson AW, Yu G, Rufo C, Suchankova G, Dreesen TD, et al. Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF-Y binding to the Fasn promoter by SREBP-1c. *Biochem J* 2007; 402:591–600.

**Tietz, ,** Textbook of Clinical Chemistry, Third Edition, Amazon, 1996.

**Traverso N**, Menini, S Pesce Maineri E, Patriarca S., Odetti, Cottalasso D., Marinari U M, Adelaide M Pronzato. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived P aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *Journal of Gerontology*. 2004; 59A(9): 890-895.

**Traverso N**, Stefano M, Maineri, E P, Patriarca S, Odetti P, Cottalasso D, Umberto M, Marinari, I Pronzato A. Malodiadehide, a lipid peroxidation-derived aldehyde can bring about secondary oxidative damage to proteins. *Journal of gerontology: biological sciences*. 2004;59A(9): 890-895.

**Tribulova N**, Okruhlicova L, Imanaga I, Hirosawa N, Ogava K, Weismann P. Factors involved in the susceptibility of spontaneously hypertensive rats to low K<sup>+</sup>-induced arrhythmias. *Gen Physiol Biophys*. 2003; 22: 369-382.

**Trostchansky A**, Batthyány C, Botti H, Radi R, Denicola A, Rubbo H. Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 395(2): 225-32.

**Tvrzicka E**, Kremmyda L S, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011; 155 (2):117-30.

**Urena M A**, Ruiz-Delgado F C, Gonzalez E M, Segurola C L, Romero C J, Garcia I G, Gonzalez-Pinto J, Gonez-Sanz R. Assessing risk of the use of livers with macro and microsteatosis in a liver transplant program. *Transplant Proc*. 1998; 30(7): 3288–3291.

**Valko M**, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C J, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004; 266:37-56.

**Valko M**, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T , Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84. Review.

**Valko M**, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1):1-40.

**Van Raamsdonk J M**, Hekimi S. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase *sod2* extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 2009; 5(2): e1000361.

**Van Remmen H**, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe S R, Alderson N L, Baynes J W, Epstein C J, Huang T T, Nelson J, Strong R, Richardson A. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics.* 2003;16 (1):29-37.

**Vaughan J H**.The Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1997; 15,100(12): 2939-40.

**Vecera R**, Skottová N, Vána P, Kazdová L, Chmela Z, Svagera Z, Walterá D, Ulrichová J, Simánek V. *Physiol Res.* Antioxidant status, lipoprotein profile and liver lipids in rats fed on high-cholesterol diet containing currant oil rich in n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. 2003; 52(2):177-87.

**Vorbach C**, Harrisofl R, & Capecchi M R. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2003; 24:512-517.



**Wakutsu M**, Tsunoda N, Shiba S, Muraki E, Kasono K Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)-independent functions of fish oil on glucose and lipid metabolism in diet-induced obese mice. In *Health and Disease* 2010, 9:101.

**Walczevska A**, Dziedzic B, Stepien T, Swiatek E, Nowak D. Effects of dietary fats on oxidative-antioxidative status of blood in rats. *JCBN*. 2010; 47: 18-16.

**Wang Y**, Branicky R, Stepanyan Z, Carroll M, Guimond M P, Hihi A, Hayes S, McBride K, Hekimi S. The anti-neurodegeneration drug clioquinol inhibits the aging associated protein CLK1. *J Biol Chem*. 2009; 284: 314-323.

**Wang Y**, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu J, and. Jump D B, *J. Lipid. Res.* 2005; 46:706–715.

**Weiss S J**. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand.* 1986; 548: 9-37.

**Wiegman C H**, Bandsma R H, Ouwens M, van der Sluijs F H, Havinga R, Boer T, Reijngoud D J, Romijn J A, Kuipers F. Hepatic VLDL production in ob/ob mice is not stimulated by massive de novo lipogenesis but is less sensitive to the suppressive effects of insulin. *Diabetes*. 2003; 52, 1081–1089.

**Wu G**, Fang Y Z, Yang S, Lupton J R, Turner N D. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004; 134(3):489-92.

**Yamamoto T**, Shimano H, Inoue N, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Takahashi A, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N. Protein Kinase A suppresses SREBP-1c expression via phosphorylation of LXR in the liver. *J Biol Chem*. 2007; 282: 11687–11695.

**Yancey P G**, Kawashiri M A, Moore R, Glick J M, Williams D L, Connelly M A, Rader D J, Rothblat G H. In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2004; 45(2):337-46.

**Yang K**, Fang J L, Hemminki K. Abundant lipophilic DNA adducts in human tissues. *Mutat Res.* 1998; 422(2):285-95.

**Yoshida M**, Takakuwa Y. Method for the simultaneous assay of initial velocities of lactate dehydrogenase isoenzymes following gel electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods.* 1997; 34(3):167-75.

**Zuin A**, Castelli D. Living on the edge: stress and activation of stress responses promote lifespan extension. *Aging.* 2010; 2(4), 231-235.

## **BIOGRAFIJA**

Tamara B. Popović rođena je 19.03.1972. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Na Hemijskom fakultetu, odseku biohemija, diplomirala je 1999. godine. Specijalistički rad odbranila je 2002 godine, a magistarsku tezu 2005 godine na Hemijskom fakultetu.

Tamara B. Popović je od januara 2000.godine zaposlena na Institutu za Medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, kao istraživač-saradnik. Koautor je 15 radova u međunarodnim časopisima i većeg broja radova saopštenih na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.