

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Slavica G. Ranković

**UTICAJ RAZLIČITIH VRSTA HRANE NA
PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA I
MASNOKISELINSKI PROFIL
FOSFOLIPIDA JETRE PACOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Slavica G. Ranković

**EFFECTS OF DIFFERENT TYPES OF
DIETS ON THE PARAMETERS OF
OXIDATIVE STRESS AND THE FATTY
ACID PROFILE OF RAT LIVER
PHOSPHOLIPIDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Tamara Popović, mentor, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja

Dr Predrag Vujović, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Jelena Lozo, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

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

Dr Jasmina Debeljak Martačić, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Centru izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Zahvaljujem se,

Dr Tamari Popović, mentoru, na prijateljskoj podršci i pomoći tokom izrade ove disertacije. Posebno na korisnim sugestijama koje je dala tokom pisanja ovog rada.

Dr Predragu Vujoviću i dr Jeleni Lozo na konstruktivnim i dragocenim savetima i sugestijama koji su doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije.

Dr Mariji Glibetić, rukovodiocu na pruženoj prilici, ukazanom poverenju i razumevanju u toku izrade ovog rada. Takođe, na korisnim savetima i prenetim znanjima tokom rada.

Dr Jasmini Debeljak Martačić, koja je pružila neizmernu pomoć u svim fazama izrade ovog rada. Posebno, na prenetim iskustvima i pruženim znanjima.

Koleginici dr Neveni Vidović na učešću u izvođenju dela eksperimentalnog rada, kao i za pomoć u tumačenju rezultata, prijateljske savete i podršku. Kolegama iz Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, dr Mirku Tomiću i dr Đurđici Ignjatović na učešću u izradi eksperimentalnog dela, koji se odnosi na gajenje i žrtvovanje laboratorijskih životinja, takođe pripremu hrane i tretman.

Svim kolegama Centra izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma na podršci, savetima i prenetim znanjima. Posebno, kolegini Biljani Pokimici na iskrenoj podršci i prijateljstvu.

Najveću zahvalnost dugujem, svojoj porodici i prijateljima na bezgraničnoj ljubavi, strpljenju i razumevanju.

Uticaoj različitih vrsta hrane na parametre oksidativnog stresa i masnokiselinski profil fosfolipida jetre pacova

Sažetak

Sastav masnih kiselina lipida, posebno fosfolipida (PL) glavnih konstituenata ćelijskih membrana zavisi od brojnih faktora. U poslednje vreme povećano je interesovanje za istraživanja novih antioksidanasa u ishrani, uključujući omega-3 masne kiseline i bioaktivne proteine prisutne u mleku. Uticaoj različitih vrsta hrane, odnosno njihovog masnokiselinskog sastava na profil masnih kiselina fosfolipida tkiva nije dovoljno ispitivan. Stoga, cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje efekta unosa tri različite vrste hrane (standardne hrane, hrane obogaćene ribljim brašnom i hrane obogaćene mlekom u prahu) na biohemijske parametre u krvi, masnokiselinske profile fosfolipida jetre i na parametre oksidativnog stresa u jetri pacova Wistar soja, starosne dobi četiri meseca u trajanju od četiri nedelje. U okviru ove studije, poređen je manokiselinski profil u hranama različitog sastava, a takođe i u fosfolipidima jetri životinja nakon tretmana. Preciznije, cilj je bio izdvajanje pojedinačnih masnih kiselina, koje su najviše doprinele razlici u sastavu fosfolipida jetre, kao i ispitivanje polno specifičnog odgovora tkiva na primenjene vrste hrane.

Rezultati ove disertacije su pokazali da hrana obogaćena ribljim brašnom i hrana obogaćena mlekom u prahu menja sastav masnih kiselina fosfolipida i njihov odnos u jetri pacova, na polno specifičan način. Primenjene hrane su promenile odnos ukupnih zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), ali su efekti polno specifični. Hrana obogaćena mlekom u prahu je smanjila sadržaj SFA i povećala udeo MUFA kod mužjaka, i PUFA kod ženki, u odnosu na standardnu hranu. Ista vrsta hrane je smanjila procenat ukupnih n-3, povećala procenat ukupnih n-6 i odnos n-6/n-3 kod mužjaka u odnosu na druge vrste hrane. S druge strane, kod ženki, hrana obogaćena ribljim brašnom povećala je procenat ukupnih n-3, smanjila procenat ukupnih n-6 i odnos n-6/n-3 u poređenju sa standardnom hranom i hranom obogaćenom mlekom u prahu. Hrana je na polno specifičan način uticala i na odnos pojedinačnih masnih kiselina u PL jetre. Dok je kod ženki hrana obogaćena ribljim brašnom smanjila sadržaj arahidonske (AA) i povećala udeo eikosapentaenske (EPA), dokosapentaenske

(DPA) i doosaheksaenske kiseline (DHA), ista vrsta hrane je povečala samo udeo DHA kod mužjaka. Grupa pacova koja je hranjena hranom obogaćenom ribljim brašnom imala je veće aktivnosti GPx i CAT u odnosu na kontrolu i grupu koja je hranjena hranom obogaćenom mlekom u prahu. Uprkos nešto nižim vrednostima lipidne peroksidacije u grupi koja je hranjena hranom obogaćenom mlekom u prahu, nisu utvrđene značajne razlike u poređenju sa drugim grupama. Inicijalne polne razlike u sastavu masnih kiselina PL jetre pacova mogu biti modulirane tipom ishrane. Pored toga, modulatorni efekti hrane obogaćene mlekom u prahu i hrane obogaćene ribljim brašnom na profil masnih kiselina PL jetre su polno specifični. Ishrana bogata ribom bi mogla delovati povoljno na oksidativni status preko poboljšanja aktivnosti antioksidativnih enzima jetre.

Ovim je otvoreno značajno polje istraživanja uticaja potencijalno funkcionalne hrane, u eksperimentalnim uslovima, na profil lipida u različitim tkivima. Takođe, veliki značaj bi imala i istraživanja polno-specifičnog odgovora tkiva na promenu hrane.

Ključne reči: Hrana obogaćena ribljim brašnom, hrana obogaćena mlekom u prahu, masne kiseline, pol, antioksidativni enzimi, lipidna peroksidacija, pacovi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Animalna i humana fiziologija

Effects of different types of diets on the parameters of oxidative stress and the fatty acid profile of rat liver phospholipids

Abstract

The composition of fatty acids especially phospholipids (PL) as the main constituents of cell membranes depends on many factors. Recently, there has been an increased interest in novel dietary antioxidants, including omega-3 fatty acids and bioactive proteins present in milk. There is limited data regarding the effects of fatty acid composition of different types of diets on tissue phospholipids fatty acid profile. The aim of this doctoral dissertation was to examine the effects of different types of diets (standard diet, fish based and milk based diets) on plasma biochemical parameters, FA profiles of liver phospholipids, and parameters of oxidative stress in liver, of four months old Wistar rats, during four-weeks. Within this study, fatty acid profile was compared in diets of different composition, as well as in liver phospholipids of animals after treatment. The aim was to detect individual fatty acids mostly contributed to the difference in composition of liver phospholipids, and to explore the association of tissue response with gender.

The results of this dissertation have shown that both, milk- and fish-based diet, changed the composition and ratio of rat liver phospholipids FA, in gender-specific manner. Although, applied diets changed the ratio of total saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA), but the effects were sex specific. Milk-based diet lowered the amount of SFA and elevated the ratio of MUFA in males, and PUFA, in females comparing to standard diet. The same diet decreased n-3, increased n-6 and n-6/n-3 ratio in males comparing to the other type of diets. On the other hand, in females, fish-based diet increased n-3, decreased n-6 and n-6/n-3 ratio comparing to standard and milk-based diet. However, the ratio of individual FA in liver PL was also dietary-influenced, but with gender specific manner. While in females fish-based diet decreased AA (arachidonic acid) increased level of EPA (eicosapentaenoic acid), DPA (docosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid), the same diet elevated only DHA levels in males. Statistically significant higher activities of GPx and CAT were

detected in rats fed with fish-based meal, in comparison to both the control and the group fed with milk-based diet. Despite somewhat lower values of lipid peroxidation in the milk-treated group, no significant differences were detected in comparison to the other groups. Initially present sex differences in FA composition of rat liver PL appear to be dietary modulated. Furthermore, the modulatory effects of milk- and fish-based diets on liver phospholipids FA profiles appeared to be sex-specific. Diet enriched with fish could improve one's oxidative status by enhancing the activities of antioxidant enzymes in liver tissue.

This has opened an important field of research of the potentially functional foods influence, in experimental conditions, on the profile of lipids in various tissues. The research related to sex-specific differences in response of tissues to different types of diets would also be of great importance.

Keywords: Fish based diet, milk based diet, fatty acids, gender, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, Wistar rats

Research area: Biology

Area of special interest: Animal and human physiology

LISTA SKRAĆENICA

AA-arahidonska kiselina

AAS-atomska apsorpciona spektrofotometrija

ACP-protein nosač acil lanca (eng. acil-carrier-protein)

ACS-acetil CoA sintetaza

ALA- α linoleinska kiselina

ALT-alanin transaminaza

ANOVA-analiza varijanse

AOS-antioksidativni zaštitni sistem (eng. antioxidative defence system)

AST-aspartat transaminaza

BCA-eng. bicinchoninic acid

BHT-butilovani hidroksitoluen

CAT-katalaza

cAMP-ciklični adenzin monofosfat

Ch-holesterol

COX-cklooksigenaza

CPT-I-karnitin palmitoil-transferaza I

CPT-II-karnitin palmitoil-transferaza II

DGLA-dihomo gama linolenska kiselina

DHA-dokosaheksaenska kiselina

DPA-dokosapentaenska kiselina

DTA-dokosatetraenska kiselina

EDTA-etilen diamin tetra sirćetna kiselina

EPA-eikosapentaenska kiselina

FAD- flavin-adenin dinukleotid

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

GC-gasna hromatografija (eng. gas chromatography)

GLA-gama linolenska kiselina

GLC-gasno-tečna hromatografija (eng. gas liquid chromatography)

GR-glutation reduktaza

GSH-Px-glutation peroksidaza

GSSG-glutation disulfid

HDL- lipoproteini velike gustine (eng. high density lipoprotein)

HPLC-hromatografija pod visokim pritiskom

HUFA-visoko nezasićene masne kiseline (eng. highly unsaturated fatty acids)

IL-interleukini

LA-linolna kiselina

LDL- lipoproteini male gustine (eng. low density lipoprotein)

LOX-lipooksigenaza

MDA-malondialdehid

MK-masne kiseline

MM-mužjaci na hrani obogaćenoj mlekom u prahu

MRB-mužjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom

MS-mužjaci na standardnoj hrani

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

NAD⁺- nikotinamid adenin dinukleotid (oksidovana forma)

NADPH- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (redukovana forma)

NEFA-neesterifikovane masne kiseline (eng. non-esterified fatty acids, NEFA)

OA-oleinska kiselina

PA-palmitinska kiselina

PG-prostaglandini

PL-fosfolipidi (eng. phospholipids)

PUFA-polinezasićene masne kiseline (eng. polyunsaturated fatty acid)

ROS-reaktivne vrste kiseonika (eng. reactive oxygen species)

SA-stearinska kiselina

SCD-stearoil-CoA desaturaza

SD-standardna devijacija

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

SOD-superoksid dismutaza

SR-slobodni radikali

SREBP-sterol regulatorni element vezujući protein

TBA-tiobarbiturna kiselina

TBARS-tiobarbiturna reagujuće supstance

TG-trigliceridi

TLC-tankoslojna hromatografija (eng. thin liquid chromatography)

TNF-faktor nekroze tumora (eng. tumor necrosis factor)

VA-vakcenska kiselina

ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu

ŽRB- ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom

ŽS-ženke na standardnoj hrani

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Lipidi dostupni u hrani i njihov uticaj na zdravlje ljudi	1
1.2. Fosfolipidi i ćelijske membrane: struktura i uloga	2
1.3. Masne kiseline	5
1.3.1. Biosinteza i biorazgradnja masnih kiselina	7
1.3.2. Zasićene masne kiseline i njihov biološki značaj	10
1.3.2.1. Izvori zasićenih masnih kiselina-mleko i mlečni proizvodi	12
1.3.3. Mononezasićene masne kiseline i njihov biološki značaj	13
1.3.4. Polinezasićene masne kiseline i njihov biološki značaj	14
1.4. Razlike između polova u sastavu fosfolipida ćelijskih membrana i tkiva	18
1.5. Desaturaze i elongaze	20
1.6. Oksidativni stres	21
1.7. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS)	23
1.7.1. Superoksid-dismutaza (SOD)	25
1.7.2. Katalaza (CAT)	25
1.7.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)	26
1.8. Lipidna peroksidacija	26
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	29
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. Laboratorijske životinje	30
3.2. Tretman pacova različitim vrstama hrane	30
3.3. Žrtvovanje životinja i izolovanje organa	31
3.4. Hemijski sastav hrane za eksperimentalne životinje	31
3.5. Metoda za određivanje sadržaja vitamina (A i E) u hrani za pacove	32
3.6. Metode za određivanje količine makro- i mikro-elementa u hrani za pacove	32
3.6.1. Gravimetrijska analiza	32
3.6.2. Metoda atomske apsorpcione spektrofotometrije	32
3.7. Određivanje sastava masnih kiselina u hrani	33
3.7.1. Priprema uzoraka	33
3.7.2. Pripremanje estara masnih kiselina za analizu gasnim hromatografom	33
3.7.3. Određivanje uzoraka gasnom hromatografijom	33
3.8. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara u plazmi	35

3.9. Određivanje profila masnih kiselina u fosfolipidima jetre	35
3.9.1. Izolacija ukupnih lipida jetre modifikovanom metodom po Folch-u	35
3.9.2. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom.....	36
3.9.3. Metilovanje masnih kiselina.....	36
3.9.4. Analiza masnih kiselina jetre gasno-tečnom hromatografijom	36
3.10. Određivanje parametara oksidativnog stresa u jetri	37
3.10.1. Priprema homogenata jetre.....	37
3.10.2. Određivanje sadržaja proteina u homogenatima jetre.....	38
3.10.3. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS).....	38
3.10.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD).....	39
3.10.5. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPx).....	40
3.10.6. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	40
3.11. Statistička analiza	41
4. REZULTATI	42
4.1. Efekat unosa hrane različitog hemijskog sastava na telesnu masu	42
4.2. Analiza hemijskog sastava hrane	43
4.3. Biohemijski parametri u plazmi pacova tretiranih različitim vrstama hrane.....	45
4.4. Masnokiselinski profil fosfolipida u jetri pacova tretiranih različitim vrstama hrane	47
4.4.1. Procenat ukupnih SFA, MUFA i PUFA.....	48
4.4.2. Procenat pojedinačnih masnih kiselina	49
4.4.3. Procentualna zastupljenost ukupnih n-3 i n-6 i odnos n-6/n-3 u jetri	51
4.4.4. Procenjene aktivnosti desaturaza 5, 6 i 9 i elongaze 6.....	52
4.5. Kanonijska diskriminaciona analiza sastava masnih kiselina.....	54
4.6. Koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS) u homogenatima jetre.....	56
4.7. Aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatima jetre	56
4.8. Korelacije među merenim parametrima oksidativnog stresa.....	58
5. DISKUSIJA	60
6. ZAKLJUČCI	74
7. LITERATURA	78

1. UVOD

Lipidi, proteini, nukleinske kiseline i ugeni hidrati su makromolekuli zastupljeni u sastavu živih organizmima. Obuhvataju heterogenu grupu organskih jedinjenja rastvorljivih u organskim rastvaračima, a slabo ili totalno nerastvorljivi u vodi. Lipidi se dele na proste i složene, a po strukturi čine estre masnih kiselina i nelipidne komponente (glicerol, glicerol-3-fosfat, sfingozin, i drugi). Prema biološkoj ulozi dele se na rezervne (trigliceridi), strukturne (holesterol, fosfolipidi i glikolipidi), lipide kao signalne molekule, zaštitne forme na površini mnogih živih sistema, hormone i neke vitamine. Lipidi imaju brojne funkcije u organizmu. Oni predstavljaju barijere, receptore, antigene, električne izolatore, biološke deterdženate, membranske držače za proteine, a takođe su i jedan od izvora energije (1).

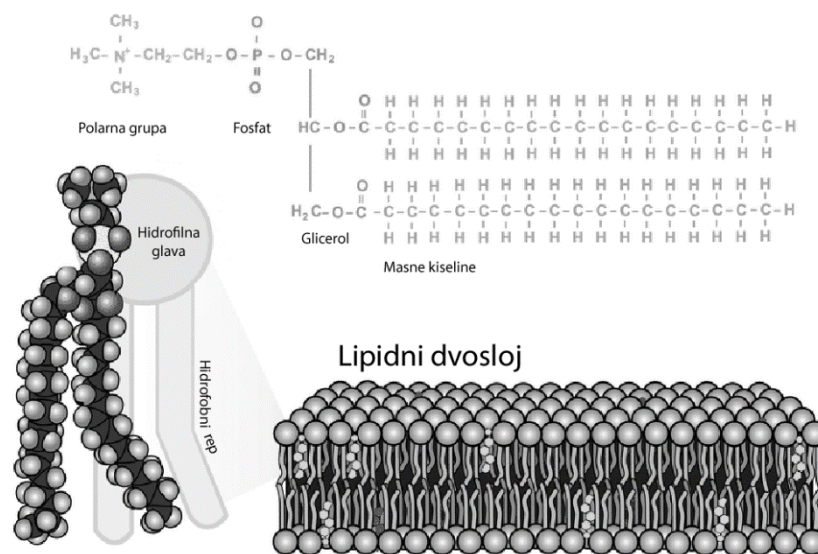
1.1. Lipidi dostupni u hrani i njihov uticaj na zdravlje ljudi

Lipidi iz hrane su opisani kao njen deo koji može da se ekstrahuje organskim rastvaračima (2). Prema ovoj definiciji uključeni su kako nepolarni lipidi kao što su trigliceridi (TG), holesterol i estri holesterola, tako i polarni lipidi kao što su fosfolipidi (PL) i glikolipidi. Iako se različiti tipovi lipida konzumiraju hranom, najveća količina lipida iz hrane je u formi triacilglicerola od kojih većina sadrži pretežno masne kiseline (MK) dugog lanca (dužina lanca od 14 do 20 ugljenika). Triacilgliceroli iz hrane su glavni izvor energije u odnosu na druge makronutrijente (ugljene hidrate, proteine), a takođe su izvor esencijalnih masnih kiselina iz ω -6 i ω -3 klasa, linolne (LA, 18:2 n-6) i alfa linoleinske kiseline (ALA, 18:3 n-3) (1). Ugradnja MK u fosfolipide je tkivno specifična. Zastupljenost MK u fosfolipidima tkiva rezultat je unosa masti hranom, i takođe utiče na efikasnost njihovog metabolizma u organizmu (3). Lipidi iz hrane su važni za zdravlje ljudi, obezbeđuju ne samo kalorijsku energiju, već učestvuju i u vitalnim ćelijskim funkcijama. Visoka stopa potrošnje masti i visok odnos n-6/n-3 polinezasićenih masnih kiselina (eng. polyunsaturated fatty acid, PUFA) u ishrani ljudi zapadnoevropskih zemalja su povezani sa povećanom učestalošću gojaznosti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i razvića različitih malignih bolesti (4).

Za normalno funkcionisanje organizma važan je pravilan odnos n-6 i n-3 PUFA u membranama ćelija. Poremećaj ravnoteže između n-6 i n-3 masnih kiselina uzrokuje pojavu različitih patoloških procesa, što je uzrokovano savremenim načinom ishrane, u kojoj je povećan udeo n-6 PUFA (5). Nizak odnos n-6/n-3 PUFA može biti važniji od ukupne količine n-3 PUFA za održavanje fiziološki optimalnog metabolizma i sveukupnog zdravstvenog stanja organizma (6).

1.2. Fosfolipidi i ćelijske membrane: struktura i uloga

Glicerofosfolipidi predstavljaju strukturnu komponentu bioloških membrana i površine lipoproteinskih čestica, a ujedno su i najzastupljenija klasa membranskih lipida (7). Sastavljeni su od molekula glicerola za koji su estarski vezana dva molekula masnih kiselina (C_1 i C_2 pozicija) i fosforna kiselina (C_3 pozicija). Fosfatna grupa sa supstituentima (polarni alkoholi ili drugi polarni molekuli) čini polarni deo molekula, hidrofilna glava, dok acil lanci masnih kiselina čine nepolarni deo, hidrofobni rep (8) (slika 1). U plazma membranama sisarskih ćelija prisutni su različiti fosfolipidi. Četiri najvažnija fosfolipida su fosfatidilholin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin i sfingomijelin (9). Glicerofosfolipidi su amfipatični molekuli te poseduju specifičnu rastvorljivost u vodi. Amfipatična priroda fosfolipidnih molekula omogućava stvaranje lipidnog dvosloja u ćelijskoj membrani i fosfolipidnom omotaču na površini lipoproteinskih čestica (10).



Slika 1. Struktura lipidnog dvosloja (<https://www.ck12.org/biology/phospholipid-bilayer/lesson/Phospholipid-Bilayers-BIO/>)

Kao esencijalni konstituenti svih membrana, fosfolipidi utiču na niz vitalnih funkcija, tako što:

- određuju fluidnost i propustljivost membrane (11);
- masne kiseline fosfolipida membrane prekursori su za sintezu eikozanoida (12);
- proizvodi degradacije fosfolipida (ceramid, sfingozin, inozitol-3-fosfat, diacilglicerol) su sekundarni glasnici u unutarćelijskoj signalizaciji (13).

Smanjen sadržaj fosfolipida važan je pokazatelj poremećene strukture lipoproteina i manifestuje se aterosklerotskim promenama (14). Masnokiselinski profil fosfolipida odražava tip masti unetih ishranom (15), pa se koristi kao biohemijski parametar za praćenje unosa masnih kiselina. Promene u metabolizmu lipida, kod različitih patoloških i fizioloških stanja, takođe utiču na zastupljenost, tj. kvantitativni i kvalitativni odnos masnih kiselina fosfolipida (16).

Biološke membrane su dvoslojne lipidne strukture u koju su uronjeni različiti membranski proteini od kojih su izgrađene. Lipidni dvosloj mnogih ćelijskih membrana sadrži holesterol i glikolipide, pored fosfolipida. Pokazano je da u dvosloju postoji kretanje molekula fosfolipida, transferzna difuzija kada se fosfolipidi prebacuju iz jednog u drugi sloj lipida (8). Proces koji se još naziva lateralna difuzija, kada molekuli lipida međusobno menjaju mesta u okviru istog sloja. Precizna fluidnost ćelijskih membrana je od izuzetne biološke važnosti. Pokazano je da enzimska aktivnost i neki transportni procesi kroz membranu značajno opadaju kada se smanji njen viskozitet do određene granice. MK kao komponente bioloških membrana snažno utiču na njihovu fluidnost (17). Dužina ugljovodoničnog lanca masnih kiselina koje ulaze u sastav fosfolipida i broj dvogubih veza su faktori koji značajno utiču na fluidnost i funkcionalnost membrana. Sa porastom nezasićenih MK fluidnost membrana se povećava. Razlog za to je što su acil lanci polinezasićenih masnih kiselina izuzetno fleksibilni i mogu brzo promeniti konformaciona stanja (18). Fleksibilnost acil lanca se bitno razlikuje između n-3 i n-6 masnih kiselina i broj dvostrukih veza značajno menja membransku fluidnost (19). Tako n-3 i n-6 masnokiselinski sastav bioloških membrana značajno utiče na fizičke osobine bioloških membrana, čime menja funkcije proteina, stvaranje i fuziju vezikula. PUFA su direktno odgovorne za stvaranje lateralnih membranskih mikrodomena (eng. lipid rafts). Mikrodomeni lipidnih membrana su deterđent-nerastvorljivi lipidni sklopovi koji slobodno plutaju u tečnom neuređenom dvosloju u ćelijskim membranama i mogu da srastu nakon grupisanja njihovih komponenti. Lipidi membranskih mikrodomena uglavnom se sastoje od sfingolipida i holesterola (20). Lipidni raftovi-splavovi omogućavaju ili inhibiraju interakciju sa signalnim proteinima i regulišu nizvodne puteve (21). Tako, n-3 PUFA utiču na fluidnost membrane i takođe modulišu ekspresiju gena putem regulacije transkripcionih faktora, regulaciju ćelijskog ciklusa i diferencijaciju ćelija (22).

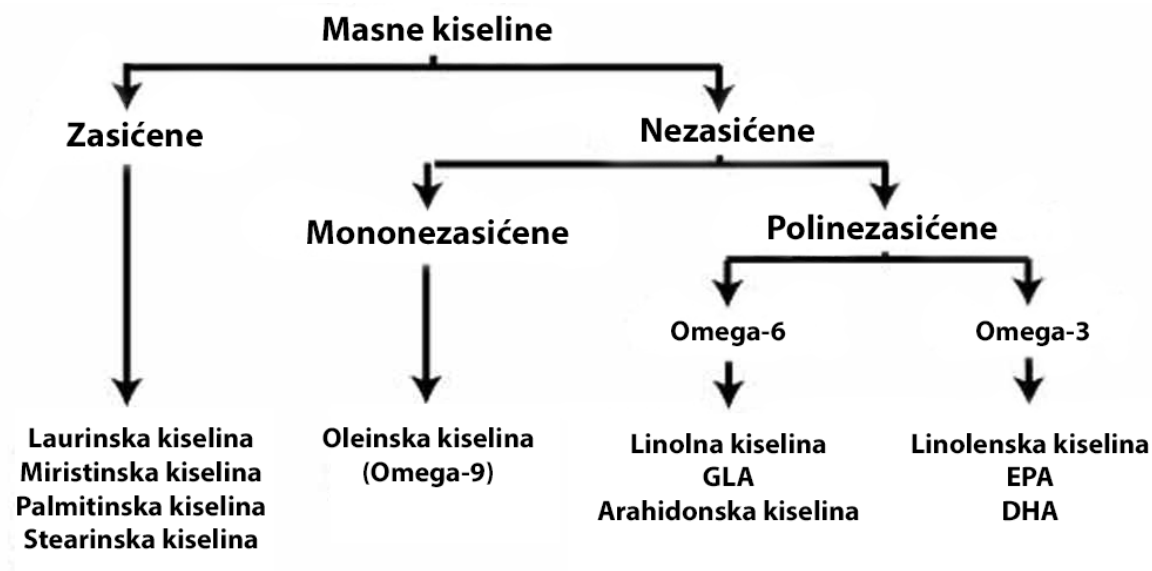
1.3. Masne kiseline

Masne kiseline su monokarboksilne kiseline sastavljene od pravog ugljovodoničnog lanca, sa metil grupom (CH₃) na jednom kraju molekula i karboksilnom grupom (COOH) na drugom kraju. Masnokiselinski lanci sadrže najčešće paran broj ugljenikovih atoma.

Nomenklatura masnih kiselina se oslanja na tri glavne karakteristike: MK se međusobno razlikuju po broju C-atoma od kojih je lanac izgrađen (dužini lanca), po odsustvu ili prisustvu dvogubih veza u lancu (stepen nezasićenosti) i položaju dvostrukih veza u lancu. MK se razlikuju po dužini svojih lanaca, po pravilu imaju između 12 i 24 ugljenikovih atoma.

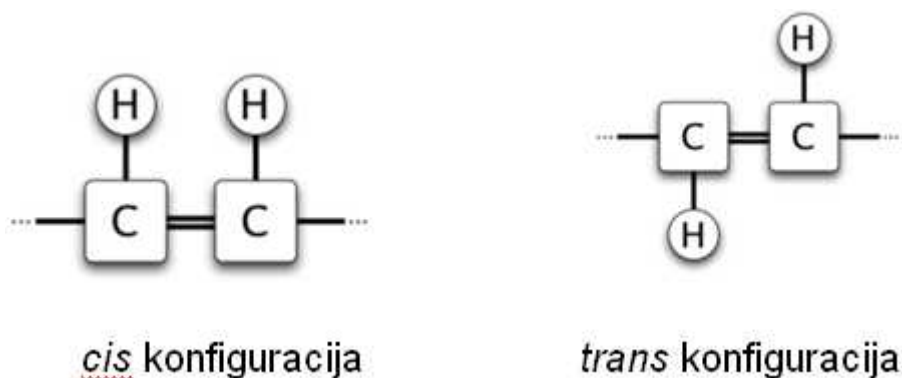
Na osnovu broja atoma ugljenika dele se na masne kiseline kratkog (< 8 ugljenikovih atoma); srednjeg (8-14 ugljenikovih atoma), dugog (≥ 16 ugljenikovih atoma); i veoma dugog lanca (> 22 ugljenikovih atoma).

MK se prema vrsti veze dele na zasićene i nezasićene (slika 2). U zavisnosti da li molekul sadrži dvostruke veze: zasićene masne kiseline (eng. saturated fatty acids, SFA) nemaju dvostrukih veza (dakle atomi ugljenika su „zasićeni“ sa vodonikom). Nezasićene MK mogu biti: mononezasićene masne kiseline (eng. monounsaturated fatty acids, MUFA) imaju samo jednu i (PUFA) imaju više dvostrukih veza.



Slika 2. Podela masnih kiselina (<http://justnaturalplease.weebly.com/last-more-info-mondays/nutrients-to-consider-on-a-vegan-diet-essential-fatty-acids>)

Nezasićene MK mogu se javiti u cis i trans konformacionom obliku (slika 3). Najzastupljenije prirodne MK su pravog niza i imaju cis konformaciju (1).



Slika 3. Konformacija izomera masnih kiselina

(<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/masne-kiseline>)

Pun naziv MK počinje brojem atoma ugljenika, praćenim brojem dvostrukih veza. Za one sa dvostrukim vezama, lokacija prve dvostruke veze (računajući od metil [CH₃] kraja) je takođe definisana u nomenklaturi i kao „n“ ili „omega“ (23, 24). U tkivima životinja najzastupljenije su MK sa 16 i 18 C-atoma, kao što su palmitinska (16:0), stearinska (18:0), oleinska (18:1 n-9) i linolna kiselina (18:2 n-6).

Dug rep dvostrukih veza daje polinezasićenim MK jedinstvene fizičke i hemijske osobine. Dvoguba veza u MK je skoro uvek u cis-konfiguraciji, koja omogućava savijanje ugljenikovog lanca masne kiseline na mestu dvogube veze. To su fleksibilni molekuli sa brzim prelazima između velikog broja konformacija (21). Pored toga, njihove cis veze ograničavaju mogućnost MK da budu blizu upakovane kada su inkorporirane u ćelijskim membranama, čime povećavaju fluidnost takvih lipida, što je značajno za strukturu i funkciju bioloških membrana (21).

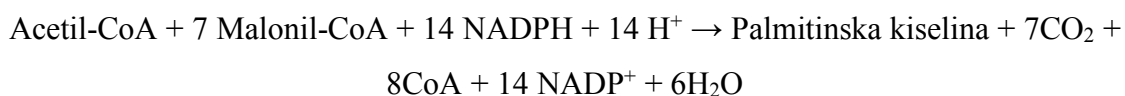
Osobine MK, a samim tim i lipida u čiju građu ulaze, zavisi od dužine C-lanca i stepena njihove nezasićenosti. MK imaju ulogu u modulaciji fluidnosti membrane (25), interakciji sa intracelularnim signalnim putevima i faktorima transkripcije (26) i deluju kao supstrati za proizvodnju signalnih molekula (27, 28). Nezasićene MK su podložnije procesu lipidne peroksidacije, sa povećanjem stepena nezasićenosti (29).

MK su u organizmu organizovane u dva oblika: slobodne (eng. free fatty acids, FFA) ili neesterifikovane (eng. non-esterified fatty acids, NEFA) i esterifikovane. U plazmi slobodne MK (5% od ukupnih MK) su vezane za albumin i u manjoj meri za globuline i lipoproteine. Većina MK u cirkulaciji (95% od ukupnih MK) je u obliku triglicerida, holesterol estara i fosfolipida (30).

1.3.1. Biosinteza i biorazgradnja masnih kiselina

De novo lipogeneza (tj. *de novo* sinteza MK) je ključni metabolički put za održavanje energetske homeostaze kod viših životinja (31). Lipogeni fluks je strogo kontrolisan endokrinim i nutritivnim signalima. Ukratko, visok unos ugljenih hidrata stimuliše, a gladovanje ili ishrana bogata mastima inhibira, *de novo* lipogenezu. Ovo posebno zavisi od koncentracije insulina u krvi i osetljivosti tkiva na insulin (31). Kod viših organizama, najintenzivnija sinteza MK se odigrava u jetri, adipoznom tkivu i mlečnim žlezdama. MK sintetisane u jetri se eksportuju kroz proizvodnju lipoproteina i na taj način obezbeđuju energetske izvor i strukturne komponente za izgradnju membrana. U masnom tkivu *de novo* sinteza MK direktno doprinosi *in situ* deponovanju masti i dugoročnom skladištenju energije. Biosinteza masnih kiselina se odigrava u citoplazmi. Rastuća acil grupa je vezana za jedinicu ACP-nosećeg proteina (eng. Acyl-Carrier-Protein). U procesu sinteze redukciono sredstvo za reakciju je (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) NADPH, koji služi kao donor elektrona. Lipogeneza MK se odvija uz delovanje multienzimskog kompleksa sintaze masnih kiselina (eng. fatty acid synthase, FAS). Ovaj kompleks katalizuje sintezu zasićenih MK, palmitinske (16:0), ali i stearinske (18:0) masne kiseline. Acetil-CoA, malonil-CoA i NADPH su supstrati za FAS. Prekursor za biosintezu MK je acetil-CoA u svim živim sistemima. Ponovljenim kondenzacijama, početnog molekula acetil-CoA sa malonil-CoA, koji donira dva C atoma u svakom ciklusu kondenzacije, masnokiselinski lanac se izdužuje. Malonil-CoA se dobija karboksilacijom acetil-CoA. Sinteza MK zahteva ukupno sedam ciklusa do krajnjeg proizvoda palmitata.

Ovo se može prikazati jednačinom:



Dugolančane i nezasićene masne kiseline sintetišu se polazeći od palmitata (16:0). Delovanjem enzimskog sistema-elongaza, vrši se elongacija masnih kiselina. Elongacija masnih kiselina podrazumeva produžavanje masnokiselinskog lanca uz dodavanje dva ugljenikova atoma. Enzimi desaturaze masnih kiselina uvode dvostruku vezu, između tačno određenih ugljenikovih atoma u masnokiselinskim lancima i odgovorni su za sintezu nezasićenih MK.

Postoji bliska veza između stepena sinteze MK i aktivnosti sintaze masnih kiselina (FAS), glavnog multifunkcionalnog enzima koji katalizuje sveukupan put sinteze palmitata (32). Sintaza masnih kiselina je prisutna u jetri i masnom tkivu (dva glavna mesta proizvodnje MK u telu), ali relativni doprinos ovih lokacija u *de novo* lipogenezi je visoko varijabilan među životinjskim vrstama. Kod ljudi (33), jetra predstavlja glavno mesto *de novo* lipogeneze, dok su kod glodara važni i jetra i masno tkivo (34). Mlečne žlezde preživara aktivno sintetišu masne kiseline (35). Dostupnost insulina i supstrata (citrata) aktivira FAS dok glukagon i kateholamini inhibiraju njegovu aktivnost [preko 3'-5'-ciklične adenzin monofosfat (cAMP)-zavisne fosforilacije]. Povećana koncentracija masnokiselinskog acil-CoA u citoplazmi takođe inhibira acetil-CoA karboksilaciju. Regulacija FAS je u velikoj meri određena intracelularnom koncentracijom masnih kiselina, čije povećanje smanjuje aktivnost FAS (36). Povećana ekspresija sterol regulatorni element vezujućeg proteina SREBP-1a značajno povećava ekspresiju gena uključenih u sintezu holesterola i FAS, i izaziva odgovarajuću akumulaciju holesterola i triglicerida. Povećana ekspresija hepatičnog SREBP-1c izaziva samo selektivnu indukciju lipogenih gena, bez efekta na gene koji sintetišu holesterol (37). Insulin povećava ekspresiju SREBP-1, a glukagon ili cAMP smanjuju.

Neesterifikovani acil-CoA mogu biti oksidovani u matriksu mitohondrija ili u peroksizomima. Proces započinje aktivacijom masnih kiselina u citosolu, nakon čega se prebacuju u mitohondriju. U degradaciju MK su uključeni (flavin-adenin dinukleotid) FAD i (nikotinamid adenin dinukleotid) NAD^+ , kao akceptori elektrona. Intramitohondrijalna β -oksidacija masnokiselinskih acil-CoA rezultira u formiranju acetil-CoA. Tokom ovog procesa, elektroni se prenose na FAD i oksidovani oblik NAD^+ , formirajući redukovane forme ovih koenzima. Oni zauzvrat doniraju elektrone elektron transportnom lancu za sintezu ATP. Acetil-CoA može biti potpuno oksidovan u ugljen dioksid u ciklusu trikarbonskih kiselina (TCA). Mitohondrijalni matriks ne sadrži ACS enzim (acil CoA sintetaza) koji može aktivirati masne kiseline sa 14 ili više ugljenikovih atoma. Ulazak ovih dugolančanih masnih kiselina u mitohondrije je regulisan aktivnošću enzima karnitin palmitoil-transferaze I (CPT-I) (38). CPT-I je integralni protein spoljašnje mitohondrijalne membrane i katalizuje formiranje acil karnitin molekula. Acil karnitin molekuli se transportuju kroz membranu mitohondrije specifičnim proteinskim nosačem i rekonvertuju do acil-CoA u mitohondrijalnom matriksu dejstvom karnitin palmitoil-transferaze II (CPT-II). CPT-II je periferni protein unutrašnje mitohondrijalne membrane. Kratkolančane i srednjelančane masne kiseline (12 ugljenikovih atoma ili manje) prolaze kroz membranu mitohondrije i aktivira ih ACS enzim unutar mitohondrijalnog matriksa. Stoga, oksidaciju ovih MK ne kontroliše CPT-I. Aktivnost CPT-I je inhibirana interakcijom sa malonil-CoA, proizvodom prvog koraka *de novo* sinteze MK katalizovanog sa acetil-CoA karboksilazom (čija je aktivnost stimulisana insulinom) (39). Negativni energetske balans dovodi do smanjenja malonil-CoA i povećanja oksidacije masnih kiselina. Kontrola CPT-I sa malonil-CoA bila bi način da se spreči istovremena (simultana) oksidacija i sinteza MK u okviru ćelija jetre.

Osim mitohondrija, β -oksidacija MK kod eukariota se odigrava i u peroksizomima. U peroksizomima sisara se odigrava β -oksidacija MK sa veoma dugačkim C-lancima (> 22 C-atoma) i svrha te oksidacije je da se ove MK prevedu u masne kiseline sa smanjenim brojem C-atoma (kratkolančane, srednjelančane i dugolančane), koje će kasnije biti oksidovane u mitohondrijama (31).

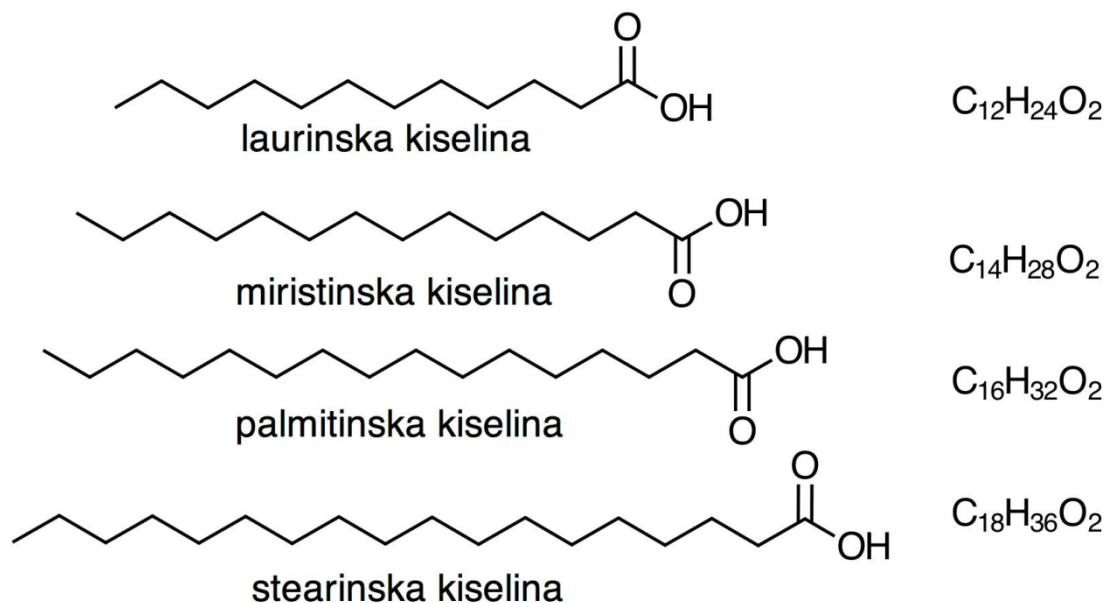
Jetra je složen organ koji obavlja mnoštvo važnih metaboličkih funkcija, uključujući metabolizam ugljenih hidrata, proteina, masti i vitamina; sintezu proteina uključenih u

koagulaciju; sintezu i lučenje žuči; detoksikaciju i izbacivanje potencijalno štetnih supstanci i zaštitu od infekcije (40). U zavisnosti od vrste organizama jetra je, više ili manje središte sinteze masnih kiselina i eksporta lipida kroz sintezu lipoproteina. Akumulacija lipidnih kapi u hepatocitama rezultuje hepatičnom steatozom, koja se može razviti kao posledica višestrukih poremećaja poput promena u β -oksidaciji, sekreciji lipoproteina vrlo niske gustine (VLDL), i procesa uključenih u sintezu MK. Metabolizam lipida uključuje nekoliko puteva koji su barem delimično međusobno zavisni i unakrsno-regulisani. Metabolizam lipida u jetri je visoko koordinisan proces u kome su mnogi putevi regulisani jedarnim receptorima i transkripcionim faktorima. On zavisi od unutarćelijske količine i sastava NEFA, ali i drugih metaboličkih faktora (npr. ugljeni hidrati, alkohol, insulin) (31).

1.3.2. Zasićene masne kiseline i njihov biološki značaj

Zasićene masne kiseline su fleksibilni molekuli, koji mogu zauzimati veliki broj konformacija, zato što postoji veliki stepen slobode rotacije oko bilo koje -C-C- veze u lancu. Međutim, u biološkim sistemima je najčešća linearna, prava forma niza ugljenikovih atoma. To je konformacija sa najnižom energijom, pošto su metilenske grupe (-CH₂) prostorno najudaljenije jedna od druge. Glavne zasićene MK u ishrani su miristinska (14:0), palmitinska (16:0) i stearinska (18:0), a poreklom su uglavnom iz životinjskih masnoća (slika 4). Kada je preovlađujući izvor ukupnih masti iz hrane mleko, opseg SFA se kreće od 4-C do 18-C atoma. SFA sa kraćim lancem kao što su buterna (4:0), kaprilna (8:0), kaprinska (10:0) i laurinska kiselina (12:0) imaju pozitivne efekte na zdravlje što se ispoljava kroz prevenciju raka, virusnih i bakterijskih infekcija (41, 42, 43).

S druge strane, laurinska, miristinska i palmitinska poznato je da imaju trombogeni i aterogeni efekat (44). Dugolančane SFA obiluju u životinjskim mastima. Njihov negativan uticaj se odnosi na povećanje ukupnog holesterola i lipoproteina male gustine (eng. low density lipoprotein, LDL) koji dovodi do gojaznosti ili koronarnih bolesti. Međutim, u slučaju stearinske kiseline nije pokazan nikakav aterogeni efekat. Štaviše, nedavni rezultati ukazuju na proapoptotski efekat stearinske kiseline kod nekih vrsta raka (45).



Slika 4. Najzastupljenije zasićene masne kiseline u ishrani

(<http://www.plantagea.hr/aromaterapija/biljna-ulja-2/kemizam-biljnih-ulja-2/masne-kiseline-2/>)

Dugi niz godina je poznato da ishrana može predstavljati faktor rizika u nastanku nekih hroničnih bolesti. Posebno veliki značaj ima efekat količine i vrste masti koje se unose hranom na rizik od nastanka hroničnih bolesti. Najviše pažnje je usmereno na kardiovaskularne bolesti iako je sada poznato da MK iz hrane mogu imati veliki uticaj, na insulinsku osetljivost (46) i funkcije mozga (47). Postoji dokaz da ishrana bogata SFA povećava koncentraciju LDL u serumu, što povećava rizik za kardiovaskularne i koronarne bolesti srca (48), pa je do nedavno najveća pažnja bila usmerena na LDL holesterol. Međutim, metaanaliza 60 izabranih studija na ljudima ukazala je da je zamena ugljenih hidrata u ishrani izoenergetskom količinom SFA od C12:0 (laurinska kiselina) do C16:0 (palmitinska kiselina) uzrokovala povećanje koncentracije LDL u krvi koje je bilo praćeno porastom koncentracije i zašitnog holesterola, odnosno lipoproteina velike gustine (eng. high density lipoprotein, HDL) (49). Ovi istraživači tvrde da odnos ukupnog holesterola prema HDL holesterolu predstavlja najbolji pokazatelj efekta MK iz hrane na rizik od nastanka koronarne bolesti srca. Ovo tumačenje ukazuje da efekti C12:0 i C14:0 (miristinska kiselina) MK mogu biti korisni jer obe smanjuju odnos ukupnog holesterola prema HDL holesterolu dok je suprotan

slučaj za C16:0. Metaanalize Mensink i sar. su takođe pokazale da ukupni rizik od koronarne bolesti srca će biti najefikasnije smanjen zamenom dijetarnih SFA sa ili cis-MUFA ili PUFA. Zamena SFA sa ili cis-MUFA ili PUFA može imati i druge korisne rezultate. Kao što je prethodno navedeno visok unos SFA može takođe biti povezan sa smanjenom insulinskom osetljivošću, ključnim faktorom u razvoju metaboličkog sindroma (50), dok epidemiološki dokazi podržavaju povezanost između visokog unosa SFA i poremećene tolerancije na glukozu (51).

1.3.2.1. Izvori zasićenih masnih kiselina-mleko i mlečni proizvodi

Mleko i mlečni proizvodi su najveći izvori SFA. Mlečne masti sadrže oko 41% ukupnih SFA. Međutim, poznato je da su ove vrste hrane ključni izvori i drugih hranljivih materija kao što su kalcijum i vitamin B12 (52). Različite klase lipida čine deo ukupnih mlečnih masti u kojima su trigliceridi najzastupljenija klasa 97-98% (53). Pokazano je da ishrana mlekom pokazuje povoljne efekte na terapijske ishode kod različitih gastrointestinalnih bolesti (54). Postoje ubedljivi epidemiološki dokazi da visok unos mleka može da obezbedi dugoročno smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti. Metaanaliza 15 studija o relativnom riziku od moždanog udara i bolesti srca koji je niži kod subjekata sa visokom potrošnjom mleka i mlečnih proizvoda u odnosu na rizik kod onih sa niskom potrošnjom (55). Promena sastava masnih kiselina mlečnih proizvoda, zamenom nekih SFA cis-mononezasićenim masnim kiselinama može da obezbedi koristan način za smanjenje unosa SFA istovremeno zadržavajući kardioprotektivne prednosti mleka (56). MK u mlečnoj masti potiču iz dva izvora, direktna ugradnja iz sistemske cirkulacije ili *de novo* sinteza u mlečnoj žlezdi pomoću kratko-lančanih prekursora (C2:0-sirćetna kiselina i C4:0). Mleko i mlečni proizvodi, koji su najbolji izvor kalcijuma, se preporučuju za zdravu ishranu kod dijabetičara. Nedavne studije su otkrile da konzumiranje mleka i mlečnih proizvoda može da smanji rizik od dijabetesa tipa 2 (55, 57). Tremblay i Gilbert (57) su i objavili da mlečni proizvodi kao i kalcijum i vitamin D, koji ulaze u njihov sastav, mogu odigrati značajnu ulogu u smanjenju rizika od sindroma insulinske rezistencije i dijabetesa tipa 2 regulisanjem apetita, metabolizma masti i gojenja (58). Većina studija koje su ispitivale odnos između unosa mleka ili mlečnih proizvoda i faktora rizika za kardiovaskularne bolesti uključujući metabolizam lipida sprovedene su na zdravoj populaciji (59).

1.3.3. Mononezasićene masne kiseline i njihov biološki značaj

Najzastupljenije mononezasićene masne kiseline (MUFA) u svakodnevnoj ishrani su oleinska kiselina (OA, 18:1 n-9), zatim palmitoleinska (16:1 n-7) i vakcenska kiselina (VA, 18:1 n-7) (60). Osim toga, OA predstavlja najčešću MUFA koja se unosi putem hrane (~90% od svih MUFA) (60). Oleinska kiselina (18:1 n-9) pokazuje veliki spektar bioloških aktivnosti i povezana je sa mnogim zdravstveno korisnim efektima. Na ćelijskom nivou, kao jedinjenje membranskih fosfolipida, oleinska kiselina povećava fluidnost i transport kroz membranu, podstiče enzimsku aktivnost, reguliše aktivnost membranskih receptora, prenos signala i transkripciju nekih gena. Unos oleinske kiseline je povezan sa smanjenjem koncentracije ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida (61) u plazmi, a ima i pozitivan efekat na koronarne arterijske bolesti (62). Smanjen rizik od razvoja kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, što je pronađeno kod mediteranskog tipa ishrane, takođe je povezan sa višim sadržajem oleinske kiseline u ovoj vrsti ishrane. Palmitoleinska kiselina (16:1 n-7) je mnogo manje prisutna u svakodnevnoj ishrani, interesantna je zbog prolipogenih aktivnosti u masnom tkivu. Usled ove aktivnosti, palmitoleinska kiselina može biti korisna u zaštiti drugih tkiva i organa od akumulacije masti i posledične lipotoksičnosti. S druge strane, njena anti-apoptotična aktivnost je nepoželjna kod nekontrolisane proliferacije ćelija raka (44).

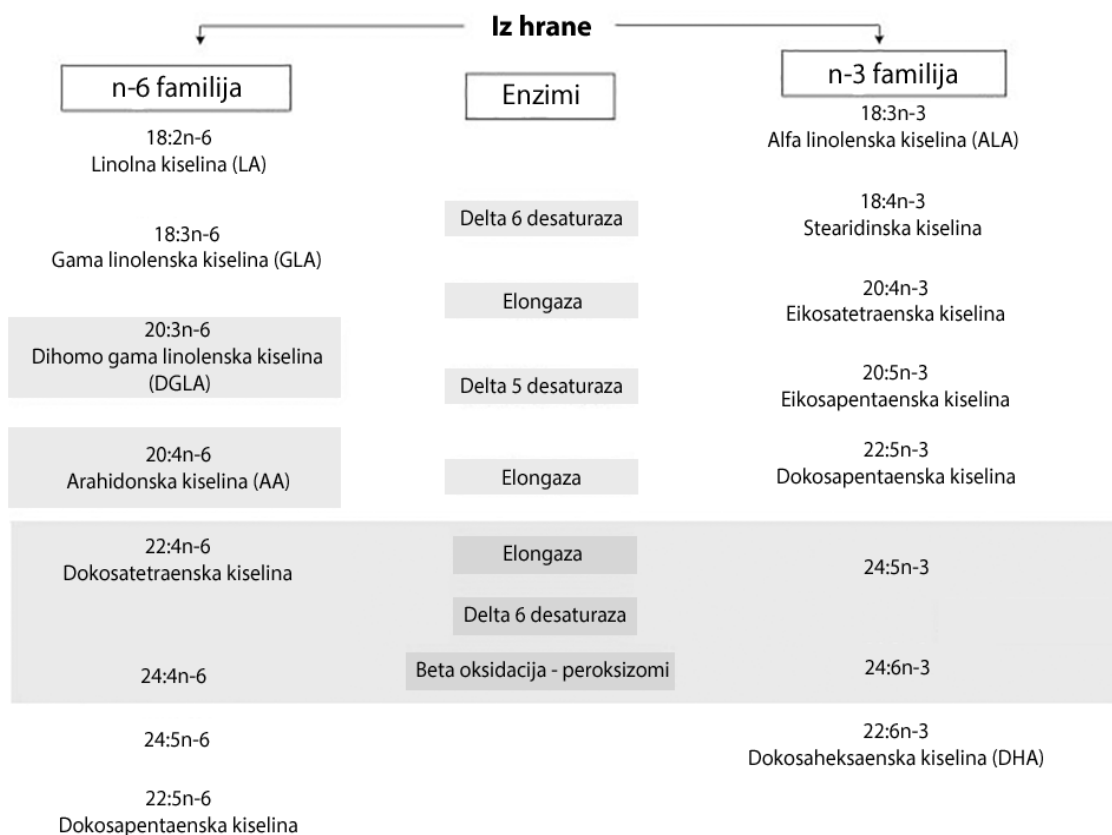
MUFA su generalno korisne za zdravlje, pogotovu kada zamene ugljene hidrate i zasićene masti u ishrani (63). Dok se većina proučavanih efekata odnose na MUFA iz hrane, endogeno sintetisane MUFA su uključene u razvoj gojaznosti i insulinske rezistencije (64).

De novo sintetisane MUFA su poželjan supstrat za sintezu triacilglicerola u hepatocitama (65). Osim sinteze triacilglicerola, poremećaji biosinteze MUFA menjaju PL jetre, sintezu holesterol estara i sadržaj MK (66). Ove smetnje imaju potencijal da utiču na metabolizam lipoproteina i strukturu ćelijske membrane. Polno-zavisne razlike u koncentraciji MUFA su primećene kod ljudi (67) i glodara (68, 69), sa višom koncentracijom 18:1 n-9 u punoj krvi muškaraca (67) i PL jetre pacova (68, 69). MUFA su obično ugrađene u PL i neutralne lipide (70). MUFA se mogu sintetisati iz zasićenih masnih kiselina delovanjem stearoil-CoA desaturaze (SCD), enzima koji ograničava brzinu sinteze MUFA (71). U eksperimentalnim i kliničkim ispitivanjima pokazano je

da je ekspresija i aktivnost SCD povezana sa gojaznošću i razvojem metaboličkog sindroma (72, 73).

1.3.4. Polinezasićene masne kiseline i njihov biološki značaj

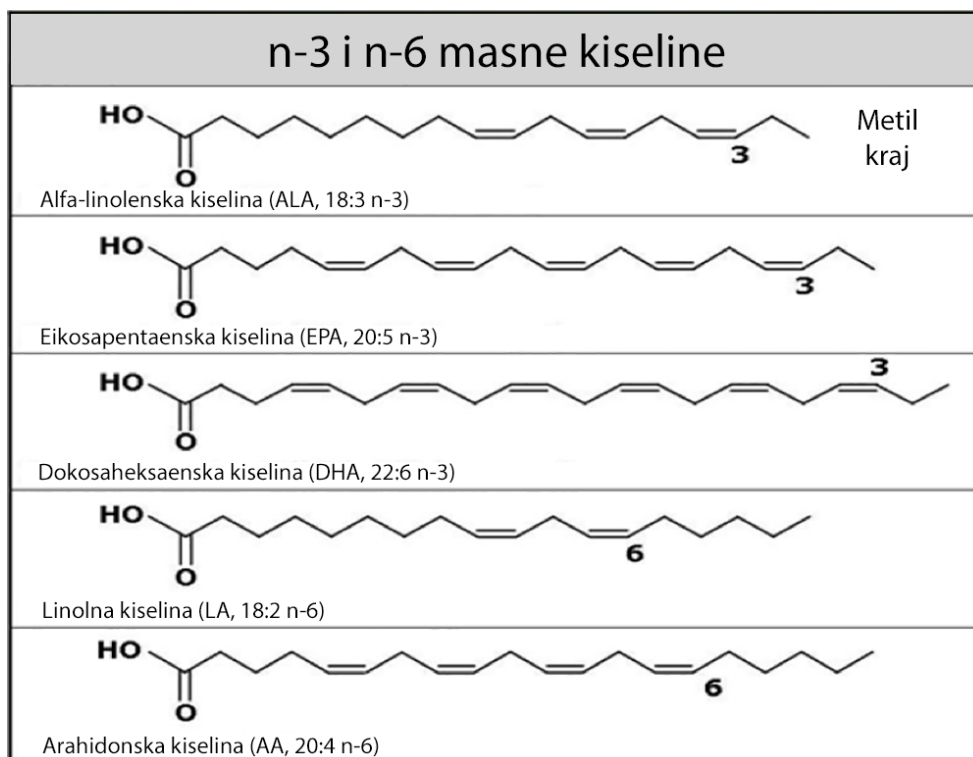
Polinezasićene masne kiseline (PUFA) sadrže dve ili više dvostrukih veza. PUFA se klasifikuju kao n-3 i n-6 na osnovu pozicije poslednje dvostruke veze u odnosu na terminalnu metil grupu u molekulu. Obe vrste masnih kiselina se ishranom unose u organizam. Iako sisari mogu da sintetišu zasićene MK iz nemasnih prekursora i nezasićene masne kiseline n-9 i n-7 serije, oni nemaju enzime $\Delta 12$ i $\Delta 15$ desaturazu (koji se nalaze u većini biljaka) za umetanje dvostruke veze na n-6 ili n-3 poziciji. Stoga, sisari ne mogu sintetisati linolnu (LA, 18:2 n-6) i alfa linoleinsku kiselinu (ALA, 18:3 n-3), zbog čega su one definisane kao esencijalne masne kiseline. Glavni izvori n-6 masnih kiselina su biljna ulja: kukuruza, šafranike i soje, dok su izvori n-3 masnih kiselina ribe kao što su: losos, pastrmka i tuna (74). Ove masne kiseline unete putem hrane se dalje metabolišu u ćelijama sisara (slika 5).



Slika 5. Sinteza n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (preuzeto i prilagođeno iz Plourde i sar., 2007, (75)).

Najzastupljenije PUFA u ishrani su LA, ALA i dugolančane PUFA poput AA, EPA, DPA i DHA (slika 6). LA se obično nalazi u ulju suncokreta i soje i značajna je kao prekursor n-6 familije PUFA, a laneno ulje obiluje sa ALA koja je prekursor n-3 PUFA. Glavne vrste namirnica koje sadrže n-6 PUFA, kao što je AA su meso i jaja, dok su masne ribe i riblja ulja glavni izvori n-3 PUFA, EPA i DHA. N-6 i n-3 PUFA su uključene u različite fiziološke procese. AA je uključena u biosintezu proinflammatory eikozanoida, a ispoljava i proinflammatory aktivnost u stanju stresa kao i kod povreda. Suprotno, eikozanoidi izvedeni iz n-3 PUFA EPA deluju antiinflammatory na bolesti kao što su (lupus, artritis, astma), a takođe i štite organizam od srčanog i moždanog udara (76). Pored toga, EPA deluje kao inhibitor sinteze proinflammatory citokina. EPA redukuje proizvodnju proinflammatory (interleukin, IL) IL-1 i IL-6, kao i faktora

nekroze tumora- α i $-\beta$ (eng. tumor necrosis factor, TNF) TNF- α i $-\beta$ kao odgovor na inflamatorni stimulus (77). DHA je neophodna za razvoj i funkciju centralnog nervnog sistema, uključujući retinu i mozak (78). Ishrana životinja koja je deficitarna sa n-3 PUFA rezultuje u vizuelnim i kognitivnim abnormalnostima, što ukazuje da je adekvatno snabdevanje n-3 PUFA neophodno, posebno predhodno pomenutom DHA (78). Štaviše, n-3 PUFA smanjenjem koncentracije lipida u krvi i krvnog pritiska, poboljšavaju srčanu i endotelnu funkciju, manifestuju antitrombocitna i antiinflamatorna dejstva, imaju ključnu ulogu u kontroli kardiovaskularnih faktora rizika. Uopšteno, efekti PUFA zavise od odnosa n-3 i n-6 PUFA, što je oko 1:10 u savremenim prehranbenim navikama, u poređenju sa preporučenih 1:4 u pogledu zdravstvene koristi (44).



Slika 6. Najzastupljenije PUFA u hrani

(https://www.nasca.com/uploadedFiles/NSCA/Inactive_Content/Program_Books/Saturday%201%20Hertzler.pdf)

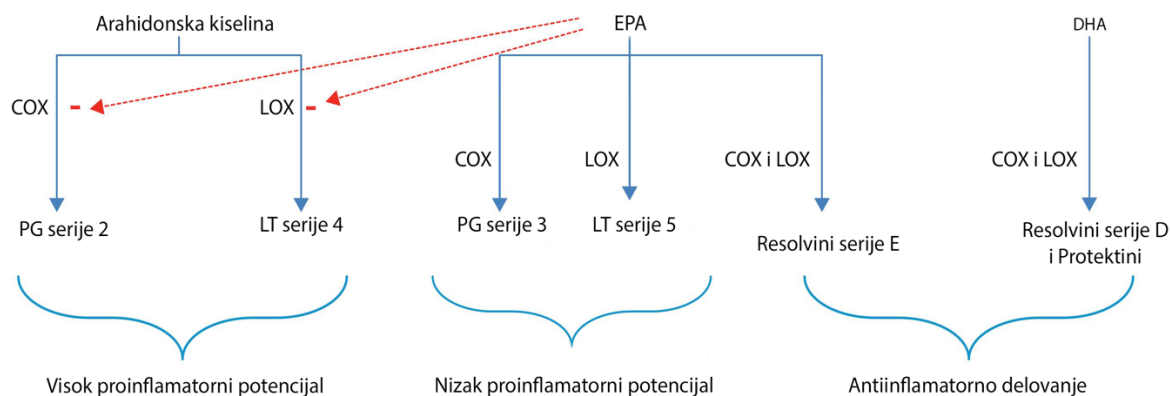
Dugolančane PUFA n-6 serije, posebno AA, koje su češće u našoj svakodnevnoj ishrani dovode se u vezu sa mnogim štetnim efektima po zdravlje ljudi uključujući i razvoj kancera (79). Brojni dokazi ukazuju da se negativne posledice n-6 mogu pripisati AA

(nizvodnim n-6) i metabolitu prostaglandinu E2 (PGE2) koji potiče od ciklooksigenaze (COX)-koja je katalisana lipidnom peroksidacijom (79). Kancerogeni efekat pripisuje se uglavnom AA i nizvodnim n-6 (80, 81, 82, 83). Imajući u vidu ove razlike, bioaktivnosti n-3 su intenzivno proučavane za potrebe unapređenje zdravlja, dok su potencijalni korisni efekti n-6 dobili mnogo manje pažnje istraživača. Sa druge strane dve uzvodne n-6 gama linolenska (18:3 n-6) i DGLA (20:3 n-6) ili eikosatrienoinska (ETA), ispoljavaju anti-kancersko delovanje, uključujući indukciju ćelijske apoptoze i inhibiciju proliferacije ćelija (79). Povećan broj dokaza ukazuje na to da za razliku od nizvodnih n-6 AA, koje su povezane sa razvojem kancera, uzvodne n-6 kao što su linolna kiselina (LA), gama linolenska (GLA) i dihomo gama linolenska (DGLA) mogu da poseduju anti-kancerske efekte i mogu se svrstati u obećavajuće dijetetske izvore za prevenciju raka i terapiju (84, 85, 86, 87).

Ćelijske membrane imaju veću procentualnu zastupljenost AA u odnosu na EPA. AA je dominantni prekursor za sintezu eikozanoida, koji se sintetišu iz PUFA sa 20-ugljenikovih atoma, kao što su AA i EPA. Eikozanoidi su medijatori upalnih procesa, imunološkog odgovora, vazokonstrukcije (regulacije krvnog pritiska), hormonalne regulacije, senzibilizacije neurona na bol, kontrakcije mišića, rasta ćelija (88, 89, 90). Prostaglandini i drugi eikozanoidi (leukotrieni i tromboksani) su lokalni medijatori, zato što su to kratkoživeći molekuli (neki se razlažu za minut ili manje u *in vitro* uslovima). Oni menjaju aktivnosti ćelija koje ih sintetišu kao i u bliskim, okolnim ćelijama. Efekat ovih jedinjenja na aktivnost ćelija razlikuje se od vrste do vrste ćelija.

Enzimi ciklooksigenaze (COX) i lipooksigenaze (LOX) (katalizuju oksidaciju MK i time se formiraju eikozanoidi) konvertuju ove MK u prostaglandine, prostacikline, tromboksane i leukotriene različitih serija (slika 6). Razlika između eikozanoida izvedenih iz n-3 i n-6 masnih kiselina je da većina medijatora formiranih od EPA i DHA su anti-inflamatorni, dok su oni formirani od AA pro-inflamatorni ili na drugi način podstiču nastanak i razvoj bolesti (92, 93). EPA, DHA i AA su konkurentni supstrati za enzime koji učestvuju u biosintezi autakoida. Povećan unos MK kao što su EPA i DHA rezultira većim koncentracijama ovih MK u poređenju sa AA u ćelijskim PL i trigliceridima (94, 95). Tako odnos n-6/n-3 u ishrani snažno utiče na proizvodnju autakoida, povećana potrošnja n-3 MK dovodi do smanjene sinteze inflamatornih

eikozanoida iz AA (n-6 MK) ali povišene proizvodnje anti-inflamatornih autakoida iz n-3 masnih kiselina (17).



Slika 6. Sinteza i delovanje lipidnih medijatora nastalih od AA, EPA i DHA (preuzeto i prilagođeno iz Calder i sar., 2010, (91)). AA-arahidonska kiselina; EPA-eikosapentaenska kiselina; DHA-dosaheksaenska kiselina; COX-ciklooksigenaze; LOX-lipooksigenaze; PG-prostaglandini; LT-leukotrieni.

1.4. Razlike između polova u sastavu fosfolipida ćelijskih membrana i tkiva

Sastav masnih kiselina u membranama je važna determinanta ćelijske funkcije. Odnos zastupljenosti zasićenih, mononezasićenih i dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina, uključujući AA i DHA (96, 97) utiče na biofizička svojstva membrana i tako menja aktivnost integrisanih proteina. Pored toga, varijacije u masnokiselinskom sastavu fosfolipida mogu da izmene funkciju ćelija promenom sastava sekundarnih glasnika izvedenih iz fosfolipida. Iako je većina eksperimenata o uticaju hrane do sada sprovedena na animalnom modelu (miševi i pacovi), moguće je poređenje sa čovekom, budući da i miševi i pacovi poseduju isti sastav desaturaza kao čovek, te moraju uzimati esencijalne n-3 i n-6 hranom (98, 99). Brojne studije na ljudima i životinjskim modelima su pokazale da se mušjaci i ženke razlikuju po sastavu fosfolipida (PL) u membranama i plazmi (100). Pokazano je na odraslim pacovima da se uticaj ishrane sa različitim količinama ukupnih masti ili različitim sadržajem esencijalnih masnih kiselina različito odrazio na sastav lipida plazme i jetre između mužjaka i ženki (101). Tako polne razlike u sastavu PL mogu odražavati dejstvo polnih hormona na sintezu

PL, na specifičnost sinteze MK i na diferencijalnu podelu lipida unetih hranom između ćelijskih klasa lipida (100).

Klinička ispitivanja su pokazala da se muškarci i žene razlikuju u sposobnosti sinteze eikosapentaenske kiseline (EPA) i dosaheksaenske kiseline (DHA) iz alfa linoleinske kiseline (ALA), sa pratećim razlikama u koncentracijama u sistemskoj cirkulaciji (102). Konverzija 18:3 n-3 u 20:5 n-3 i 22:6 n-3 je veoma ograničena kod muškaraca, ali je znatno veća kod žena (103, 104). Na osnovu studija pokazano je da polni hormoni doprinose pojavi ovih razlika. Za istraživanje polnih razlika su korišćeni pacovi u ispitivanju statusa n-3 PUFA, jer ovaj model omogućava veću kontrolu ishrane nego što je to moguće kod ljudi. Poput žena, ženke pacova imaju veću koncentraciju DHA u plazmi, nego suprotni pol (102). Pacovi su takođe odgovorili na povećan unos ALA iz hrane na način koji je uporediv sa raspoloživim podacima kod ljudi. Koncentracije dugolančanih n-3 PUFA u plazmi i tkivima pacova su pozitivno povezane sa koncentracijama estradiola i progesterona u krvi i u negativnoj su korelaciji sa koncentracijama testosterona u krvi. Ovo ukazuje na to da polni hormoni deluju tako da modifikuju sadržaj n-3 PUFA plazme i tkiva, najverovatnije menjanjem ekspresije enzima desaturaza i elongaza u jetri (102).

Koncentracija DHA (22:6 n-3) je viša u krvi i tkivima ženki u odnosu na mužjake. Ženke imaju više koncentracije DHA u ukupnim lipidima jetre, plazme (68, 69, 101), eritrocita (105) i srca u odnosu na mužjake, bez polno-zavisnih razlika u DHA koncentracijama u mozgu. Ekspresija iRNK za $\Delta 5$ -desaturazu, $\Delta 6$ -desaturazu i elongazu 2 je veća u jetri ženki pacova u poređenju sa mužjacima, bez razlika u srcu ili mozgu (106). Sadržaj proteina $\Delta 6$ -desaturaze je veći kod ženki kao i ekspresija iRNK enzima $\Delta 6$ desaturaze, za sintezu 20:4 n-6 i 22:6 n-3, takođe je veća u jetri ženki nego mužjaka (69). Polna razlika u koncentraciji DHA je tkivno specifična i povezana je sa višom ekspresijom $\Delta 6$ -desaturaze kod ženki u odnosu na mužjake, što je ograničeno na jetru. Procene sugerišu da se oko 8% ALA konvertuje u EPA, dok procena proizvodnje DHA iz ALA se kreće u rasponu od 0% do 4% (107). Stopa konverzije je veća u jetri, sa mnogo manjom aktivnošću u srcu i mozgu što odgovara nižoj iRNK za $\Delta 6$ - i $\Delta 5$ -desaturazu, elongazu 2 i elongazu 5 u odnosu na jetru (108, 109, 110).

Procenat 18:0, 20:4 n-6, 22:6 n-3 u fosfolipidima jetre je veći kod ženki nego kod mužjaka, dok se sastav TG u jetri ne razlikuje među polovima (68).

1.5. Desaturaze i elongaze

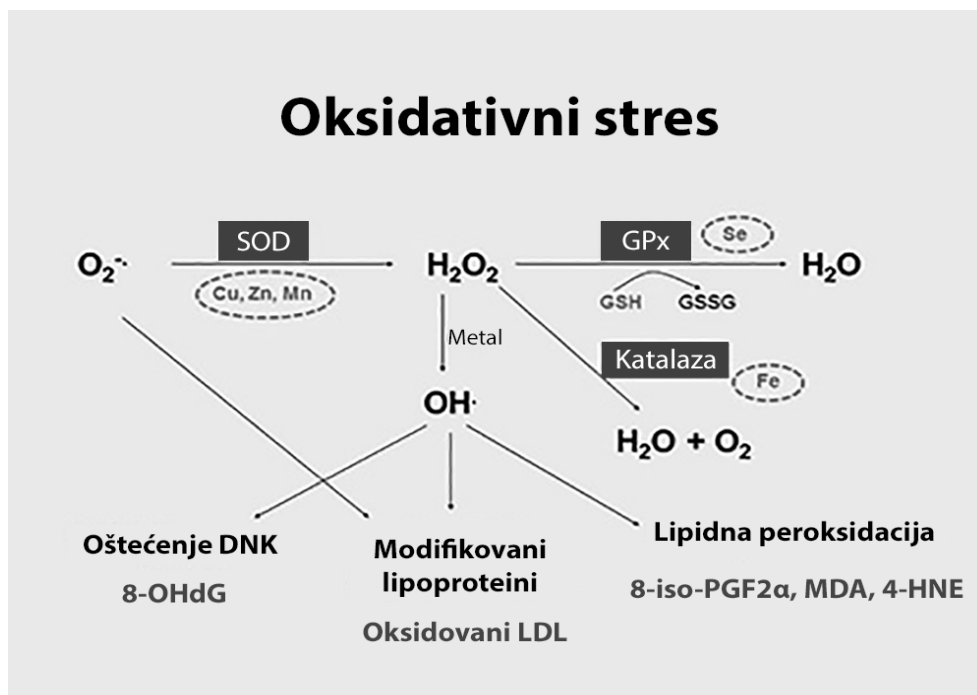
Enzimi desaturaze se razlikuju po mestu gde uvode dvogubu vezu u masnoj kiselini, a kod sisara postoje ($\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$) desaturaze. Desaturaze deluju u tandemu sa enzimima elongazama koji produžavaju masnokiselinske lance, pri čemu nastaju dugolančane PUFA sa 20 ili 22 C-atoma i četiri do šest dvostrukih veza. Identifikovano je sedam vrsta elongaza (Elo 1-7). SFA i MUFA su supstrati za Elo-1, 3, 4, 6, 7, dok su za metabolizam PUFA zadužene Elo-2, 4 i 5.

Dve različite grupe acil-CoA desaturaza su prisutne kod sisara. Jedna grupa sadrži stearoil-CoA desaturaze (SCD), a druga se sastoji od $\Delta 6$ desaturaze i $\Delta 5$ desaturaze. SCD ili $\Delta 9$ desaturaze prevode zasićene masne kiseline u mononezasićene MK. Enzim SCD ima nekoliko izoformi. SCD1 je glavna izoforma ovog enzima u jetri ljudi i glodara. Izoforma SCD2 je identifikovana kod miševa i pacova (111), dok je SCD5 identifikovana kod ljudi (112). SCD1 ima najveći afinitet za stearinsku kiselinu (18:0) (111), koja se dejstvom ovog enzima desaturiše u oleinsku kiselinu (18:1 n-9). Proizvod ove sinteze 18:1 n-9 je uglavnom esterifikovana u triglicerolima kao energetska rezerva (113). Palmitat (16:0) je takođe supstrat za SCD1, ali afinitet za ovu MK nije tako visok (114).

$\Delta 6$ i $\Delta 5$ desaturaze su ključni enzimi za sintezu visoko nezasićenih masnih kiselina (eng. highly unsaturated fatty acids, HUFA). HUFA su ugrađene u fosfolipide (PL) (113, 115) i obavljaju različite fiziološke funkcije, uključujući pinocitozu (116), modulaciju jonskih kanala (117) i regulaciju genske ekspresije (118). $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaze kao početni supstrat koriste PUFA: linolnu i alfa linolensku kiselinu, pa zajedno sa elongazama, koje koriste iste PUFA kao supstrat, deluju na sintezu dugolančanih PUFA, kao što su AA, DHA ili EPA. MK poreklom iz hrane su glavni regulatori ekspresije $\Delta 6$ desaturaze i $\Delta 5$ desaturaze. Ekspresija iRNK za $\Delta 6$ i $\Delta 5$ desaturaze je snižena kada su n-6 i n-3 PUFA obezbeđene hranom, a povećana kada se životinje hrane hranom bez masti ili hranom koja sadrži samo (18:1 n-9) kao izvor masti (119). Pored toga, sintaza MK (FAS) koja sintetiše palmitat *de novo* i elongaza 6 koja izdužuje SFA i MUFA su uključene u sintezu i izduživanje MUFA (120). Elongaza 5 ima relativno manji afinitet prema SFA i MUFA u odnosu na PUFA, ali njen visok nivo ekspresije u jetri (121) ukazuje na to da je verovatno uključena u metabolizam SFA i MUFA (120).

1.6. Oksidativni stres

Oksidativni stres se obično definiše kao poremećaj ravnoteže između nastajanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species, ROS) s jedne i aktivnosti antioksidativnog zaštitnog sistema (eng. antioxidative defence system, AOS) s druge strane (122). Tokom aerobnog metabolizma se neprekidno stvaraju slobodni radikali, koji se moraju i uklanjati, kako bi se održala ravnoteža i izbeglo oštećenje ćelija. Funkciju uklanjanja i inaktiviranja slobodnih radikala u organizmu vrši pomenuti sistem antioksidativne zaštite. Kada prooksidansi nadvladaju mehanizme endogene antioksidativne odbrane organizma, reaktivne kiseonične vrste (ROS) koje se generišu napadaju sve glavne klase bioloških makromolekula (123). Njihov štetan efekat ogleda se u oštećenju bioloških sistema, a označava se kao oksidativni stres (slika 7), (124). Oksidativni stres se odnosi na ćelijska oštećenja i patološke promene koje prate neuravnoteženost oksidanasa (ROS) nad enzimskim i neenzimskim antioksidansima pojedinačnih ćelija, ekstracelularnih tečnosti i tkiva (125). Oksidativno oštećenje, kao rezultat takve neravnoteže, uključuje oksidativnu modifikaciju ćelijskih makromolekula (proteina, DNK, ugljenih hidrata, lipida), (124), kojim se inhibiraju normalne funkcije ćelija. Ovakva oštećenja vode do strukturnih oštećenja tkiva i organa. Oštećujućim biomakromolekulama, oksidativni stres ima ulogu u patogenezi mnogih oboljenja (126).

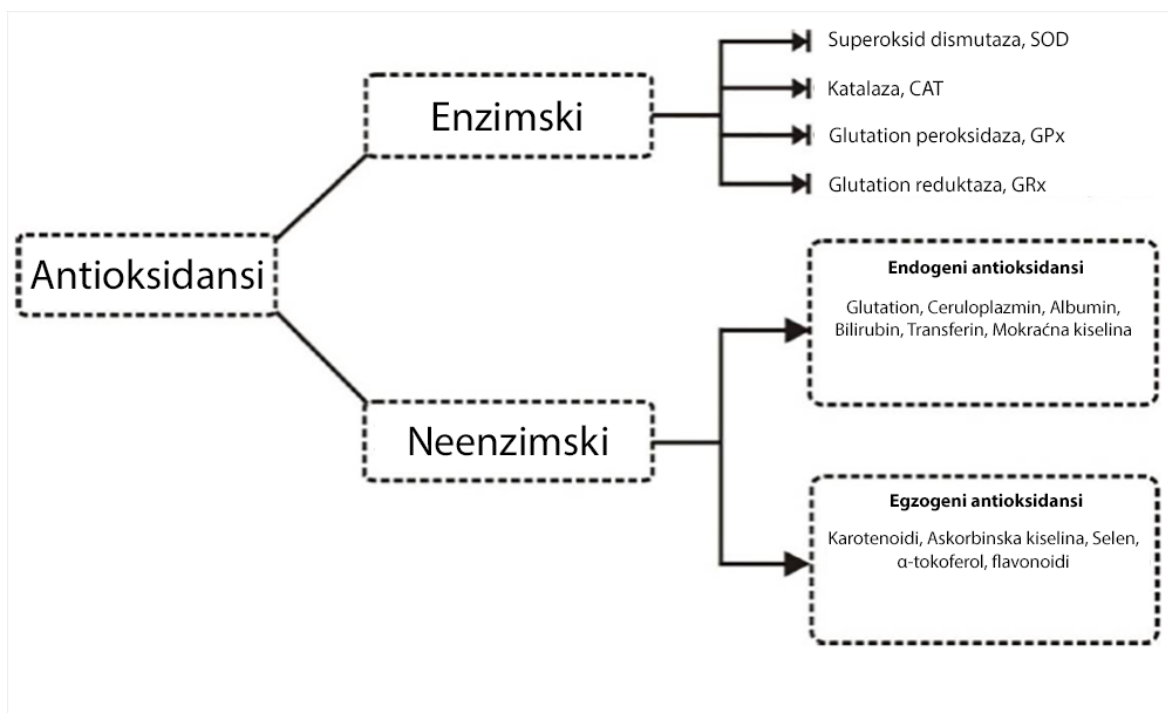


Slika 7. Oštećenja makromolekula izazvana slobodnim radikalima
(<https://www.laboratory-journal.com/science/medicine-diagnostics/diagnostics-micronutrients>)

Slobodni radikali (SR) su atomi, molekuli, joni, grupa atoma ili molekula sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj atomskoj ili molekulskoj orbitali (122). Nespareni elektroni čine slobodne radikale vrlo nestabilnim i reaktivnim (npr. hidroksilni radikal i superoksid-anjon radikal). Najvažniju klasu reaktivnih vrsta koja se stvara u živim sistemima predstavljaju radikali koji nastaju od kiseonika. Molekulski kiseonik, koji je važan za proizvodnju energije, jednovalentnom redukcijom, može proizvesti reaktivne međuproizvode, koji daju kratkoživeće, hemijski vrlo aktivne slobodne radikale. Osim što nastaju tokom niza fizioloških reakcija u organizmu (endogeni izvori SR) i uključeni su u brojne ćelijske funkcije (regulacija signalnih puteva, regulacija tonusa krvnih sudova i prokrvljenosti tkiva, učešće u normalnom ćelijskom rastu, ćelijskom starenju i apoptozi...), slobodni radikali se proizvode i delovanjem najrazličitijih faktora iz okruženja (egzogeni izvori SR), (127). Osim toga, i neadekvatna ishrana, može indirektno da rezultira pojavom oksidativnog stresa, remeteći ćelijske odbrambene mehanizme.

1.7. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS)

Da bi opstali, aerobni organizmi su morali tokom evolutivnog razvoja, da se adaptiraju na neprekidnu borbu protiv oksidativnog stresa (128) i tako razviju brojne mehanizme antioksidativne odbrane (slika 8). Enzimski antioksidativni mehanizmi su prva linija odbrane, u organizmu ljudi i životinja postoji čitav niz enzima antioksidativne odbrane (AOS), koji neprekidno uklanjaju slobodne radikale u težnji da organizmu pruže mogućnost za optimalno funkcionisanje. Najprisutniji antioksidativni enzimi su superoksid-dismutaza, katalaza i glutacion-peroksidaza. Karakteristično je da ih u ćeliji ima puno, specifično su locirani u unutarćelijskim strukturama, aktivnost im se često dopunjuje i preklapa i gotovo da svi za aktivnost zahtevaju prisustvo metala. Uglavnom su specijalizovani, superoksid-dismutaza uklanja superoksid-anjon radikal, dok katalaza i glutacion peroksidaza uklanjaju H_2O_2 .

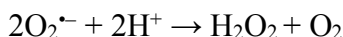


Slika 8. Enzimaska i neenzimska klasifikacija antioksidanata (preuzeto i prilagođeno iz Li i sar., 2016, (129)).

Upotreba antioksidanata se često preporučuje, zbog uloge koju imaju u ublažavanju štetnih efekata reaktivnih vrsta, a i za održavanje opšteg zdravstvenog stanja i za prevenciju stanja poput: metaboličkih poremećaja, kardiovaskularnih bolesti, raka i drugih. Pozitivni efekti namirnica biljnog porekla koje su bogate antioksidativnim vitaminima i fitohemikalijama su detaljno izučavani i potvrđeni u brojnim epidemiološkim i interventnim studijama kod ljudi i životinja (130, 131). S druge strane, trebalo bi da bude više interesovanja za nove antioksidanse poput omega-3 masnih kiselina, bioaktivnih proteina i peptida. Visok unos ribe i suplemenata koji sadrže riblje ulje povezan je nižom stopom oboljevanja od kardiovaskularnih i neuroloških bolesti, raka, kao i stanja koja se dovode u vezu sa oksidativnim stresom (132, 133). Međutim, literaturni podaci o antioksidantskim efektima omega-3 MK još uvek su prilično kontradiktorni i potrebno ih je dodatno ispitati. Neki radovi ukazuju na to da unos HUFAs doprinosi povećanju lipidne peroksidacije i oksidativnog oštećenja (134, 135). Naprotiv, drugi ukazuju na njihovu potencijalnu ulogu u podsticanju endogene antioksidativne odbrane. Antioksidativni efekti ribljeg ulja su pokazani u animalnim modelima za izučavanje astme, dijabetesa, nefrotoksičnosti ali i kod zdravih pacova takođe (134-137). Najnovija studija, ispituje kombinovano dejstvo ribljeg ulja i α -liponske kiseline na oksidaciju masnih kiselina jetre i parametre oksidativnog stresa u trajanju od 21 dan (138). Mleko i mlečni proizvodi sadrže vredne makro- i mikroelemente i imaju jedinstven profil proteina i masnih kiselina koji bi mogao povoljno uticati na oksidativni status. Potencijalna antioksidativna aktivnost mlečnih proteina se povezuje sa njihovom aktivnošću uklanjanja radikala, heliranja metala, kao i jačanja endogenog antioksidativnog kapaciteta. Pored toga, ove studije su otkrile potencijalni uticaj mlečnih proteina na stanja koja se dovode u vezu sa oksidativnim stresom, poput insulinske rezistencije i kardiomiopatije (139, 140). U poređenju sa omega-3 masnim kiselinama, literaturni podaci o intervencijama sa mlekom su daleko manji. Dostupne interventne studije na životinjama prilično se razlikuju u testiranim modelima organa kao i u dizajnu studija i trajanju u rasponu od 14 dana do osam nedelja (139-142). Jedna od najnovijih studija, procenjuje uticaj dijeta koje se baziraju na mleku, bilo sa normalnim sadržajem Fe ili prekomernim Fe-sadržajem, između ostalog, enzimska antioksidativna odbrana u jetri u prijavljenom eksperimentalnom periodu od 30 dana (142).

1.7.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

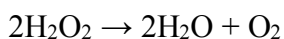
Superoksid-dismutaza (SOD) je metaloprotein, koji katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (143):



Superoksid-dismutaza koja sadrži mangan (Mn SOD) u aktivnom centru (Mn^{3+}), sastoji se iz četiri subjedinice kod eukariota. Nalazi se u matriksu mitohondrija eukariota (144), peroksizomima životinjskih, biljnih i ljudskih ćelija. Superoksid-dismutaza koja sadrži bakar i cink (CuZn SOD) postoji kao intracelularna i ekstracelularna. Intracelularna se nalazi u citosolu, endoplazmatičnom retikulumu i međumembranskom prostoru mitohondrija eukariota. Sastoji se iz dve identične subjedinice od kojih svaka sadrži po jedan atom bakra (Cu) i jedan atom cinka (Zn). Katalitička aktivnost enzima vezana je za Cu^{2+} , dok Zn^{2+} stabilizuje njegovu prostornu konformaciju. Ekstracelularna superoksid-dismutaza (EC SOD) je tetramerni glikoprotein, koji sadrži jedan atom cinka i jedan atom bakra i ima veliki afinitet za neke glikozaminoglikane, kao što su heparin i heparin sulfat (145). Prisutna je u ekstracelularnoj tečnosti: plazmi, limfi i cerebrospinalnom likvoru (146). Pokazuje malu aktivnost i u tkivima.

1.7.2. Katalaza (CAT)

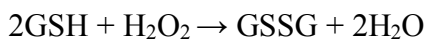
Katalaza (CAT) katalizuje razgradnju vodonik peroksida do vode i molekularnog kiseonika:



Katalaza je strukturno, tetramerni hemoprotein koji se sastoji od četiri identične subjedinice, sadrži hematin (hem- Fe^{3+} protoporfirin). Katalaza vrlo brzo razgrađuje vodonik peroksid prisutan u velikim koncentracijama. CAT je prisutna u svim tkivima sisara (u peroksizomima) (147). Najveću aktivnost ima katalaza koja se nalazi u jetri i eritrocitima (122). Pored lokalizacije u peroksizomima, katalaza se može nalaziti i slobodna u citosolu, kao što je slučaj kod retikulocita i u zrelih eritrocitima.

1.7.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

Glutation-peroksidaza, GSH-Px katalizuje glutacion-zavisnu redukciju vodonik peroksida u vodu i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole:

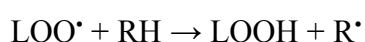
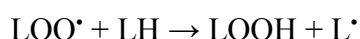
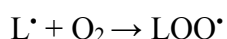
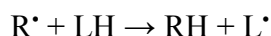


Osim što omogućava razlaganje H_2O_2 kada je prisutan u malim koncentracijama, glutacion-peroksidaza katalizuje i reakcije redukcije velikog broja lipidnih peroksida i organskih hidroperoksida (npr. lipidne hidroperoksidge), uz oksidaciju glutaciona kao kosupstrata. Glutation-peroksidaze mogu biti selen-zavisni i selen-nezavisni enzimi (npr. neke glutacion S-transferaze). Prisutna je u svim ćelijama kičmenjaka. Selen-zavisna GSH-Px je primarno citosolni i mitohondrijalni selenoprotein. To je tetramerni enzim, koji u aktivnom centru ima selen u obliku selenocisteina (148). U selen-zavisne GSH-Px spada i fosfolipid-hidroperoksid glutacion-peroksidaza (PH GSH-Px), koja katalizuje redukciju fosfolipida. U aktivnom centru sadrži selenocistein i predstavlja citosolni monomer, jedina je forma glutacion-peroksidaze koja inhibira procese lipidne peroksidacije u prisustvu fizioloških koncentracija vitamina E (149). Bitan je u zaštiti ćelijskih membrana od peroksidacije. Selen-nezavisna glutacion-peroksidaza koja katalizuje redukciju organskih hidroperoksida, a pretpostavlja se da pripada familiji enzima glutacion-S-transferazne aktivnosti (GST).

1.8. Lipidna peroksidacija

Na delovanje slobodnih radikala su otpornije nezasićene masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu nego polinezasićene masne kiseline. Ćelijske membrane obiluju upravo fosfolipidima sa polinezasićenim masnim kiselinama koje su osetljive na oksidaciju, ROS izazivaju oštećenja njihovih lipidnih komponenti (150) što je praćeno poremećajem ćelijskih funkcija. U organizmu mogu da nastanu i organski radikali, u interakcijama reaktivnih vrsta kiseonika sa biološkim makromolekulima. Jedan od najbolje opisanih mehanizama je proces lipidne peroksidacije. Ovaj proces uključuje stvaranje lipidnih peroksil radikala (ROO^{\bullet}) i lipidnih hidroperoksida (ROOH). Lipidni peroksidi u reakcijama koje su katalizovane metalima stvaraju alkoksi radikale (RO^{\bullet}), holesterol hidroperoksidge, endoperoksidge, epoksidge holesterola i masnih kiselina i druge

aldehide (151). Prvi korak u inicijaciji lipidne peroksidacije predstavlja izdvajanje atoma vodonika iz polinezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav bioloških membrana tako da nastaje lipidni radikal (L^\bullet). U daljim procesima, dolazi do lančanih slobodno-radikalskih reakcija (proces je poznat kao propagacija), koje dovode do stvaranja velikog broja peroksil radikala i organskih hidroperoksida (152).



R^\bullet -radikal, LH-polinezasićena masna kiselina, L^\bullet -lipidni radikal, LOO^\bullet -peroksil radikal, LOOH-organski hidroperoksid

Jedan od produkata lipidne peroksidacije je i malondialdehid (MDA), koji može da reaguje sa slobodnim amino grupama proteina i nukleinskih kiselina i da dovede do još većih oštećenja ćelije (153). Ugljenik u metilen grupi je posebno podložan oduzimanju vodonika (154). Masne kiseline oštećene peroksidacijom, uklanjaju se delovanjem fosfolipaze-A1, A2 i fosfolipaze-C, a uklanjanjem hidroperoksida masne kiseline u membrani nastaje lizofosfolipid. Po hemijskoj prirodi, lizofosfolipid je deterdžent i njegovim nastankom narušava se integritet membrana ukoliko se ne degradira. Osim mogućnosti za proizvodnju novih slobodnih lipidnih radikala, peroksidacija lipida dovodi i do nastanka novih slobodnih masnih kiselina, posebno polinezasićene arahidonske kiseline (155).

Sastav lipida bioloških membrana se značajno razlikuje od vrste do vrste organizma, ali i među ćelijama iste vrste. Fizičke, hemijske i biološke osobine raznih lipida zavise od masnih kiselina, dok masnokiselinski sastav različitih lipida zavisi od načina ishrane. Polarni lipidi, kao što su glikolipidi i fosfolipidi amfipatičnih svojstava, biološki su zanimljiva grupa lipida. Postoji veliko interesovanje za fosfolipide hrane zbog mogućih pozitivnih efekata na zdravlje (156). Poslednjih godina velika pažnja se posvećuje funkcionalnoj hrani, kao i bioaktivnim sastojcima hrane (lipidi, ugljeni hidrati, specifični proteini i peptidi). Funkcionalna hrana je deo uobičajene ishrane koja uz osnovno hranljivo svojstvo ima i raznovrsne fiziološke koristi (157), a može redukovati i rizik od nastanka hroničnih bolesti. Među novim funkcionalnim hranama, mlečni proizvodi i suplementi na bazi mleka su označeni kao potencijalni antioksidanti sa povoljnim uticajem na zdravlje i zdravo starenje (158, 159).

Polinezasićene masne kiseline su veoma važne, jer imaju značajnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima, pa time i u održavanju zdravlja. Esencijalne masne kiseline kao strukturni elementi svih membrana regulišu njihov permeabilitet i predstavljaju prekursore za sintezu prostaglandina i leukotriena. U fiziološkom smislu razlikuje se uticaj n-3 i n-6 familije masnih kiselina. Obe familije konkurišu za isti enzimski sistem desaturaza. Stoga povećanje unosa određene klase PUFA hranom, povećava njihov udeo u ukupnom sastavu PUFA u lipidima membrana. Među polinezasićenim masnim kiselinama n-6 familije za čoveka je najznačajnija linolna kiselina, a među n-3 familijom α linoleinska, odnosno njena dva metabolita eikosapentaenska (EPA) i dokosaheksaenska (DHA) masna kiselina. Poslednjih godina pridaje se veliki značaj oksidativnom stresu, odnosno ulozi slobodnih radikala u nastanku raznih oboljenja, a naročito njihovom delovanju na PUFA, jer sadrže visoko reaktivne dvostruke veze (160, 161). U slučaju njihovog povećanog unosa, ukoliko nije praćen i unosom antioksidanasa, postoji opasnost od povećanog stvaranja slobodnih radikala i lipidne peroksidacije (160, 161). Međutim, literaturni podaci o antioksidantskim efektima omega-3 MK još uvek su prilično kontradiktorni i potrebno ih je dodatno ispitati. Ipak, čvrsti zaključci ne mogu se izvesti, jer se dosadašnje studije razlikuju po dizajnu i trajanju u rasponu od 15 dana do 13 nedelja (134, 135, 162, 163).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje efekta unosa tri različite vrste hrane (standardne, obogaćene ribljim brašnom i hrane obogaćene mlekom u prahu) na biohemijske parametre u krvi, masnokiselinske profile fosfolipida jetre i na parametre oksidativnog stresa u jetri pacova Wistar soja, kao i analitička karakterizacija hrane.

Na osnovu opšteg cilja definisani su sledeći konkretni zadaci istraživanja:

1. Odrediti hemijski sastav i procentualni sadržaj masnih kiselina hrane (standardne, obogaćene ribljim brašnom i hrane obogaćene mlekom u prahu) kojom će životinje biti tretirane tokom četiri nedelje.
 - Odrediti masnokiselinski sastav različitih vrsta hrane metodom gasne hromatografije.
 - Odrediti u različitim vrstama hrane sadržaj makroelemenata gravimetrijskom metodom i mikroelemenata atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom.
 - Odrediti sadržaj vitamina A i E u tri različite vrste hrane tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom.
2. Odrediti biohemijske parametre u plazmi, parametre oksidativnog stresa u jetri i analizirati profile masnih kiselina u jetri, po završetku eksperimenta.
 - Odrediti koncentraciju biohemijskih parametara u plazmi eksperimentalnih životinja nakon tretmana različitim vrstama hrane.
 - Gasnom hromatografijom analizirati masnokiselinske profile fosfolipida jetre na kraju tretmana.
 - Odrediti vrednosti parametara oksidativnog stresa u jetri spektrofotometrijski na kraju eksperimenta.







3. MATERIJAL I METODE

3.1. Laboratorijske životinje

U ovom istraživanju korišćeni su adultni mužjaci i ženke Wistar soja, obezbeđeni iz vivarijuma Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, Beograd, Srbija. Životinje su gajene po četiri u kavezu, pod kontrolisanim uslovima (sobna temperatura 23-25 °C, 12 h ciklus svetlo-tama, neograničen pristup hrani i vodi). Održavanje životinja i eksperimentalni protokoli bili su u skladu sa zvaničnim institucionalnim vodičem za eksperimentalni rad na životinjama, koji je prilagođen Direktivi Saveta Evrope (86/609) i vodiču za negu i upotrebu laboratorijskih životinja, NIH publikacija No. 85-23.

3.2. Tretman pacova različitim vrstama hrane

Životinje oba pola, starosti četiri meseca, težine 250-300 g, su nasumično podeljene u tri grupe. Grupe su formirane na osnovu pola i vrste hrane kojom su životinje hranjene. Prva, kontrolna grupa pacova (MS i ŽS), je hranjena standardnom laboratorijskom hranom (Veterinarski zavod Subotica). Druga grupa pacova (MRB i ŽRB), je hranjena hranom obogaćenom ribljim brašnom i treća grupa (MM i ŽM) je hranjena hranom obogaćenom mlekom u prahu (slika 9). Životinje su dobijale istu količinu hrane tokom četiri nedelje.

	MS	mužjaci na standardnoj hrani
	ŽS	ženke na standardnoj hrani
	MRB	mužjaci na hrani obogaćenju ribljim brašnom
	ŽRB	ženke na hrani obogaćenju ribljim brašnom
	MM	mužjaci na hrani obogaćenju mlekom u prahu
	ŽM	ženke na hrani obogaćenju mlekom u prahu

Slika 9. Eksperimentalne grupe

3.3. Žrtvovanje životinja i izolovanje organa

Telesna masa pacova je merena nedeljno i predstavljena je kao procenat promene telesne mase na kraju studije za svaku eksperimentalnu grupu. Pacovi su žrtvovani brzom dekapitacijom 24 h nakon izgladnjivanja. Tkivo jetre je izolovano i čuvano na -80 °C do početka eksperimenta. Uzorci krvi pacova svih eksperimentalnih grupa sakupljeni su po završetku eksperimenta u kivete sa Na-citratom (3,8% w/v) kao antikoagulantom. Krv je centrifugirana 3000 obrtaja/min 15 minuta. Nakon centrifugiranja plazma je skladištena na -80 °C za kasnije korišćenje u biohemijskim analizama.

3.4. Hemijski sastav hrane za eksperimentalne životinje

Hrana za pacove je napravljena na osnovu recepture odeljenja za ishranu životinja i botaniku (Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu). Hrana za pacove je u celini pripremljena u laboratoriji mešanjem dobijenih komponenti od komercijalnih dobavljača ("Farmkomerc", Čantavir, Srbija; "Graneksport", Pančevo, Srbija). Smeša je napravljena od samlevenih žitarica: ječam (30%), kukuruz (13%) i pšenica (20%); osušene iseckane pulpe šećerne repe (10%), 1% mineralne smeše (20% $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30% CaCO_3 , 50% NaCl), i 1% smeše vitamina (sadržaj po kg vitaminske smeše: retinol 186 mg, holekalciferol 20 µg, alfa-tokoferol acetat 10 g, menahinon 4 g, tiamin 1,2 g, riboflavin 0,6 g, piridoksin 1,5 mg, ciankobalamin 4 mg, niacin 3,6 g, pantotenska kiselina 1,9 g, biotin 12 mg, holin 101,2 g, inozitol 93 g; pripremljeno po zahtevu Veterinarskog zavoda, Subotica, Srbija). Glavni izvori proteina u hrani bili su ili 9% riblje brašno (I), (inćun, "Centry-Light Industrija Co.", Vejfan, Kina; 65% proteina) ili 10% sušeno mleko u prahu (II), ("AD Mlekara", Subotica, Srbija; 25% protein) i 16% i 15% od sojine sačme ("Sojaprotein", Bečej, Srbija; 44% protein). Konačna čvrsta hrana za pacove je pripremana jednom nedeljno mešanjem smeše za hranu sa tekućom vodom (odnos 5:3 m/m) u odgovarajućem električnom blenderu. Testo je razvučeno u tankom sloju (1 cm), isečeno (3 cm x 3 cm) i sušeno 30 sati na 50 °C. Suvi komadi čvrste hrane imali su do 10% vlage.

3.5. Metoda za određivanje sadržaja vitamina (A i E) u hrani za pacove

Sadržaj vitamina određivan je tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC), korišćenjem QuEChERS Kita. Uslovi tečnehromatografskog određivanja: Određivanje je izvršeno na tečnom hromatografu: Agilent Technologies 1200 Series uz DAD detektor. Kolona: Agilent ZORBAX C18 (2,1 x 100) 1,8 μm . Mobilna faza: metanol (100%) HPLC čistoće. Odmereno je 1g uzorka i dodata smeša rastvarača aceton:hloroform (30:70, v/v). Sadržaj je mešan na vorteksu, a zatim centrifugiran na 4000 rpm. Nakon centrifugiranja supernatant je dekantovan u čašu i profiltriran kroz mikrofilter PTFE 0,45 μm . Filtrat je uparavan skoro do suva u struji azota, a ostatak rastvoren u metanolu (HPLC čistoće). Tako pripremljen uzorak prebačen je u vijalu i analiziran tečnom hromatografijom.

3.6. Metode za određivanje količine makro- i mikro-elementa u hrani za pacove

3.6.1. Gravimetrijska analiza

Gravimetrijska analiza podrazumeva kvantitativno određivanje količine sastojaka na osnovu mase uzorka. Ovom metodom je određivan sadržaj sledećih elemenata: vlage, proteina, masti, sirove celuloze, skroba, pepela i šećera. Količina energije dobijena je preračunavanjem.

3.6.2. Metoda atomske apsorpcione spektrofotometrije

Sadržaj minerala određivan je metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS). Ovom metodom kalcijum (Ca) i fosfor (P) su određivani procentualnom zastupljenošću, a natrijum (Na), magnezijum (Mg), gvožđe (Fe) i cink (Zn) količinom (mg/kg), korišćenjem Atomskog apsorpcionog spektrofotometra, Varian spectra AA-10.

3.7. Određivanje sastava masnih kiselina u hrani

3.7.1. Priprema uzoraka

Za analizu masnokiselinskog sastava, masti su iz uzoraka ekstrahirane superkričnom ekstrakcijom pomoću CO₂ na FAT analyzer-u 2000 (Leco, St. Joseph, MI, USA), kako bi se sprečila degradacija masnih kiselina hemikalijama, ili agresivnim uslovima ekstrakcije. Kao rastvarač korišćen je superkrični CO₂, čistoće 99,995% i konstantnog protoka od 2 l/min. Sastav infuzorijske zemlje bio je: do 54% kristalne silike, manje od 50% kristobalita i manje od 4% kvarcnog peska. Infuzorijska zemlja upotrebljavana je kao adsorbens za vezivanje tragova vode iz uzoraka, a dodavana je direktno u uzorak u količini od 2 g/g uzorka.

Ovako dobijeni ekstrakti dalje su upotrebljavani za pripremu metil-estara masnih kiselina i masnokiselinsku analizu.

3.7.2. Pripremanje estara masnih kiselina za analizu gasnim hromatografom

Metil-estri masnih kiselina pripremani su procesom transmetilacije 14% metanolnim rastvorom bortrifluorida (164). Kao rastvarač upotrebljen je n-heptan, a za inertizaciju i oslobađanje metil estara masnih kiselina od ostataka rastvarača primenjivano je uparavanje u struji azota.

3.7.3. Određivanje uzoraka gasnom hromatografijom

Pripremljeni uzorci analizirani su na gasnom hromatografu GC (eng. Gas chromatography) Agilent 7890A system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sa plameno-jonizujućim detektorom (eng. FID – Flame Ionization Detector) i autoinjektujućim sistemom za tečnosti, na kapilarnoj koloni od mešane silike DB WAX 30 m, 0,25 mm, 0,50 um. Kao gas nosač upotrebljen je helijum čistoće 99,9997%, pri protoku od 1,5 ml/min i pritisku od 1,092 bara. Uzorci su ubrizgavani u kolonu u split režimu, čiji je odnos iznosio 30:1. Primenjeni temperaturni režim prikazan je na slici 10. Ukupno vreme jedne analize iznosilo je 41,311 minuta.

	Rate °C/min	Value °C	Hold Time min	Run Time min
▶ (Initial)		40	0.5	0.5
Ramp 1	25	195	5	11.7
Ramp 2	3	205	8.5	23.533
Ramp 3	9	230	15	41.311
*				

Slika 10. Temperaturni režim rada GC-FID pri analizi sastava masnih kiselina uzoraka

Pikovi metil estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena iz uzoraka sa retencionim vremenima iz standarda “Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix” kao i sa internim podacima dobijenim u prethodnim ispitivanjima masnih kiselina na gasnom hromatografu sa masenim detektorom.

Dobijeni rezultati izražavani su kao masa pojedinačne masne kiseline, ili grupe masnih kiselina (g) u 100 grama masnih kiselina iz uzorka, tj. kao relativni maseni sadržaji ($m_{u,i}$), određeni prema formuli :

$$m_{u,i} = \frac{A_{u,i} \times F'_i}{\sum A_{u,i} \times F'_i} \times 100 \quad (1)$$

Gde je: F'_i - relativni korekcionni faktor date masne kiseline

$A_{u,i}$ - površina zahvaćena pikom metil estara masne kiseline i u uzorku

Konstante metil-estara masnih kiselina nisu jednake, jer odziv detektora nije isti za sve metil-estre masnih kiselina, te površine zahvaćene pikovima ne odgovaraju masama masnih kiselina u standardu. Zbog toga se određuju korekcionni faktori F_i , a zatim i relativni korekcionni faktori, F'_i , svedeni na najzastupljeniju masnu kiselinu (u ovom slučaju α -linolensku kiselinu), za svaku masnu kiselinu i analizu odvojeno, nakon čega se računa srednja vrednost rezultata svih analiza.

Izračunavanja su izvođena na sledeći način:

$$F_i = \frac{m_{s,i}}{a_{s,i}} \quad (2)$$

gde je: F_i – korekcionni factor

$m_{s,i}$ - maseni udeli komponenti u standardnoj smeši dati na priloženom sertifikatu proizvođača

$a_{s,i}$ – površinski udeo komponente u standardu

$$F'_i = \frac{F_i}{F_{18:3n3}} \quad (3)$$

gde je: $F_{18:3n3}$ - korekcionni faktor za α -linolensku kiselinu

3.8. Određivanje koncentracije biohemijskih parametara u plazmi

Nakon završenog četvoronedeljnog konzumiranja različitih vrsta hrane određivani su biohemijskih parametari u plazmi. Korišćenjem standardnog laboratorijskog kita (Roche) na biohemijskom analajzeru (Cobas c-111, Roche, Basel, Switzerland) određivana je koncentracija alanin transaminaze (ALT), aspartat transaminaze (AST), glukoze (GLU), holesterola (Ch), triglicerida (TG), lipoproteina velike gustine (HDL), lipoproteina male gustine (LDL) u plazmi.

3.9. Određivanje profila masnih kiselina u fosfolipidima jetre

3.9.1. Izolacija ukupnih lipida jetre modifikovanom metodom po Folch-u

Ukupni lipidni ekstrakt je izolovan modifikovanom metodom po Folch-u (165). Tkivo jetre (1 g) je homogenizovano smešom 2:1 hloroform/metanola (10 ml), u koju je dodato 50 mg 2,6-bi-tercbutil-hidroksi-toluena (BHT) kao antioksidanta. Nakon toga, uzorci su inkubirani preko noći na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sledećeg dana, uzorci su filtrirani, u njih je dodavano dva puta po 10 ml, pa potom 5 ml 2:1 hloroform/metanola. Zatim su uzorci uparavani u vakuum uparivaču na temperaturi od $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i resuspendovani u 10 ml 2:1 hloroform/metanola i 2 ml destilovane vode. Uzorci su prenošeni u epruvete i inkubirani preko noći na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sledećeg dana uzorci su centrifugirani na 3000 obrtaja/min tokom 15 minuta. Vodena faza je odlivena, dodavano je 1,5 ml destilovane vode, pa su uzorci pod istim uslovima ponovo centrifugirani. Dobijena smeša razdvajana je u dve faze. Donja faza predstavlja ukupni čist lipidni ekstrakt. Nakon centrifugiranja gornja faza je uklonjena. Uzorci su inkubirani na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći. Narednog dana, uzorci su uparavani do suva u vakuum uparivaču. U suvi ekstrakt sukcesivno je dodavano po 2 ml metanola, acetona i alkohol/benzen smeše (1:1). Posle dodavanja svake od smeša uzorci su uparavani na vakuum-uparivaču; nakon toga uzorci su inkubirani na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći. Dodavanjem 4 ml hloroforma i njegovim uparavanjem i nakon dodavanja 250 μl

heksana u suvi ekstrakt, uzorak je spreman za hromatografsko (eng. thin liquid chromatography, TLC) razdvajanje lipidnih klasa.

3.9.2. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom

Frakcija fosfolipida jetre izolovana je jednodimenzionalnom tankoslojnom hromatografijom (TLC) na pločama sa silika gelom debljine 0,5 mm. Na ploču koja je aktivirana na 110 °C u toku sat vremena, nanošen je totalni lipidni ekstrakt u vidu linije dužine oko 3 cm, na visini 2 cm od donje ivice ploče. Za razdvajanje korišćena je smeša petroletar-dietiletar-sirćetna kiselina (87:12:1 v/v/v).

3.9.3. Metilovanje masnih kiselina

Masne kiseline su esterifikovane po modifikovanoj metodi transesterifikacije (166). Frakcija fosfolipida je oguljena u staklene epruvete i ekstrahovana sa 1,5 ml heksana. Metil estri masnih kiselina fosfolipida jetre su dobijeni transmetilacijom sa 0,2 mL 2 mol/L NaOH u metanolu. Epruvete su inkubirane u termostatu na 85 °C u toku jednog sata. Nakon toga, u hidrolizat je dodato 0,2 mL 1mol/L H₂SO₄ u metanolu i epruvete su inkubirane na 85 °C dva sata. Nakon hlađenja smeša je centrifugirana na 3000 obrtaja/min 10 minuta nakon čega je heksanski sloj uparen do suva u struji azota.

3.9.4. Analiza masnih kiselina jetre gasno-tečnom hromatografijom

Metil estri masnih kiselina formirani iz izolovanih fosfolipidnih frakcija jetre analizirani su gasno-tečnom hromatografijom (eng. gas liquid chromatography, GLC), korišćenjem gasnog hromatografa Shimadzu GC 2014, opremljenog sa plamenojonizujućim detektorom na Rtx 2330 koloni (dimenzija 60 m x 0,25 mmID, debljina 0,2 µm; Restek, PA, USA). Protok nosećeg gasa helijuma iznosio je 5 ml/min, protok vazduha 320 ml/min, a vodonika 30 ml/min. Temperatura plamenojonizujućeg detektora je postavljena na 260 °C, a injekcionog ulaza na 220 °C. Adekvatno razdvajanje postignuto je nakon 50 minuta, pri čemu je inicijalna temperatura kolone od 140 °C održavana 5 minuta, a potom podignuta do 220 °C brzinom zagrevanja od 3 °C/min i održavana na finalnoj temperaturi 20 minuta. Metil-estri pojedinačnih masnih kiselina su

identifikovani poređenjem sa hromatogramom standarda masnih kiselina (Sigma, Chemical Co, St.Louis, MO, USA) i/ili PUFA-2 standardnim mešavinama (Supelco Inc., Belleforte, PA, USA). Sadržaji pojedinačnih masnih kiselina, uključujući masne kiseline od 16:0 do 22:6 n-3, izražavani su u procentima od ukupno detektovanih masnih kiselina na osnovu površine njihovih pikova.

Sadržaj ukupnih SFA određivan je kao zbir relativnih sadržaja palmitinske (16:0) i stearinske (18:0) masne kiseline, dok je sadržaj ukupnih MUFA izračunavan kao zbir relativnih sadržaja palmitoleinske (16:1 n-7), oleinske (18:1 n-9) i vakcenske (18:1 n-7) masne kiseline. Sadržaj ukupnih PUFA predstavljan je zbirom pojedinačnih sadržaja (18:2 n-6), (20:3 n-6), (20:4 n-6), (22:4 n-6), (20:5 n-3), (22:5 n-3) i (22:6 n-3). Sadržaj n-3 i n-6 PUFA izražavan je zbirom pojedinačnih PUFA.

3.10. Određivanje parametara oksidativnog stresa u jetri

3.10.1. Priprema homogenata jetre

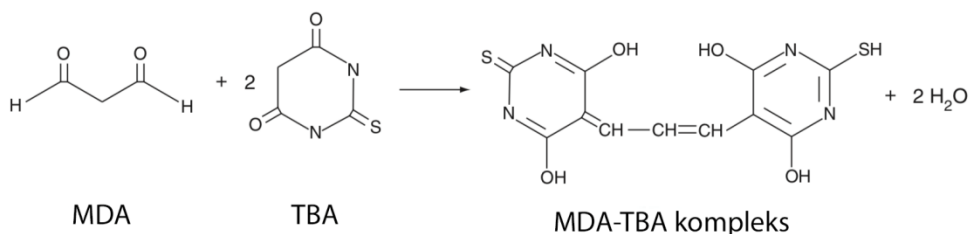
Odmrznuti uzorci tkiva jetre su najpre macerirani na ledu. Dobijenom maceratu je dodavan pufer pH 7,4, koji je sadržao: 50 mM Tris, 150 mM (NaCl), 2 mM etilendiamintetrasirćetnu kiselinu (EDTA) i 1% Igepal® (Sigma Aldrich®, Darmstadt, Germany), u odnosu 1:10. Zatim su macerati tri puta homogenizovani korišćenjem homogenizera (Ika® T10 basic, Ultra-Turrax®) u trajanju od po 10 sekundi, sa pauzama između homogenizovanja iste dužine (10 sekundi). Nakon toga su pomoću aparata (Bandelin electronic, Berlin, Germany) tri puta uzastopno sonifikovani pri frekvenciji od 10 KHz. Trajanje pojedinačnih sonifikacija, kao i pauza između njih je iznosilo 15 sekundi. Ovako obrađeni uzorci su zatim centrifugirani, korišćenjem ultracentrifuge (Beckman L7-55), tokom 90 minuta na 37500 obrtaja/min, pri temperaturi od 4 °C. Nakon toga, dobijeni supernatanti (gornji slojevi) homogenata su korišćeni za analizu parametara oksidativnog stresa.

3.10.2. Određivanje sadržaja proteina u homogenatima jetre

Sadržaj proteina u homogenatima tkiva određivan je upotrebom komercijalno dostupnog testa (BCA Protein Assay Macro Kit, SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany), prema datim uputstvima. Preciznije, metoda se zasniva na kombinaciji biuretske reakcije i redukcije Cu^{+2} u Cu^{+1} u prisustvu proteina u baznoj sredini. Potom nastali katjoni (Cu^{+1}) reaguju sa dva molekula BCA kiseline (eng. Bicinchoninic acid, BCA) pri čemu nastaje ljubičasto obojen proizvod sa apsorcionim maksimumom na 562 nm. U reakcionu smešu dodati su uzorci (50 puta razblaženi homogenati jetre) i radni reagens koji je sadržao BCA i bakar (II) sulfat, a potom inkubirani u vodenom kupatilu na 37 °C u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije, smeše su ohlađene i apsorbance nastalih obojenih jedinjenja su očitane na 562 nm korišćenjem spektrofotometra Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation Kyoto, Japan). Sadržaj proteina u uzorcima izračunat je na osnovu kalibracione krive konstruisane upotrebom standarda goveđeg serum albumina (eng. bovine serum albumine, BSA) koncentracije 25-1000 mg/L.

3.10.3. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS)

Koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS), kao pokazatelj inteziteta lipidne peroksidacije, merena je upotrebom komercijalno dostupnog testa (TBARS Assay Kit, Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA). Test se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malondialdehidom (MDA) u kiseljoj sredini na visokoj temperaturi.



Preciznije, homogenati su najpre razblaženi 50 puta, a potom inkubirani sa TBA reagensom u vodenom kupatilu na 100 °C. Nakon jednočasovnog ključanja smeše su

ohlađene, a zatim centrifugirane (10 min, 1600 x g, 4 °C). Absorbance dobijenih ružičastih proizvoda merene su na 540 nm prema slepoj probi (destilovana voda umesto homogenata), korišćenjem ELISA čitača (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Finland). Za izračunavanje nivoa TBARS korišćena je kalibraciona kriva konstruisana upotrebom standarda malondialdehida (MDA) koncentracije 0-50 µmol/L. Rezultati su izraženi kao MDA ekvivalenti po mg proteina.

3.10.4. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u homogenatima jetre je određivana primenom komercijalno dostupnog testa (Randox-Ransod, kat. br. SD125, Crumlin, UK).

Preciznije, određivanje SOD aktivnosti ovom metodom zasniva se na merenju stepena inhibicije produkcije superoksid-anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) u sistemu ksantin-ksantin oksidaza. Ksantin oksidaza katalizuje stvaranje $O_2^{\cdot-}$ koji potom reaguje sa 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-feniltetrazolijum hloridom (INT), što dovodi do formiranja crvene formazon boje, sa apsorpcionim maksimumom na talasnoj dužini od 505 nm. Nasuprot tome, SOD prisutna u uzorcima homogenata katalizuje razlaganje $O_2^{\cdot-}$ čime se smanjuje intezitet nastale formazon boje. Nastanak formazon (obojenog) jedinjenja praćen je kinetički, merenjem apsorbance 3 min na 505 nm i 37 °C korišćenjem spektrofotometra Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation Kyoto, Japan) da bi se odredila promena apsorbance po minuti. Aktivnost SOD određena je kao stepen inhibicije stvaranja ovog jedinjenja, pri čemu su homogenati (uzorci) najpre razblaženi 150 do 200 puta da bi se dobio stepen (%) inhibicije od 30 do 60%. Za izračunavanje je korišćena kalibraciona kriva zavisnosti procenta inhibicije od logaritmovane koncentracije konstruisana upotrebom standardnih rastvora enzima poznate aktivnosti. Jedna jedinica aktivnosti SOD je definisana kao količina enzima koja dovodi do 50% inhibicije. Na osnovu kalibracione krive i izračunatog procenta inhibicije određena je aktivnost SOD u uzorcima, a krajnji rezultat izražen je u jedinicama po mg proteina.

3.10.5. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPx)

Aktivnost glutation-peroksidaze (GPx) u homogenatima jetre merena je primenom komercijalno dostupnog testa (Randox-Ransel, kat. br. RS 505, Crumlin, UK) prema ranije opisanom postupku koji su ustanovili Paglia i Valentine (167). Preciznije, ova metoda se bazira na oksidaciji redukovanog glutationa (GSH) u prisustvu organskih hidroperoksida, pri čemu se formirani glutation-disulfid (GSSG) dalje redukuje dejstvom glutation reduktaze (GR) u prisustvu NADPH kao koenzima. U reakcionu smešu dodati su 100 puta razblaženi uzorci homogenata, rastvor organskog kumen-hidroperoksida, i radni reagens

koji je sadržao glutation, GR, NADPH, fosfatni pufer i EDTA. Nakon inkubacije od 1 min, praćena je oksidacija NADPH u NADP^+ , odnosno pad apsorbance NADPH na 340 nm i 37 °C korišćenjem spektrofotometra Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation Kyoto, Japan) u toku dva minuta. Aktivnost GPx u uzorcima izračunata je na osnovu izmerene promene apsorbance po minuti ($\Delta A/\text{min}$) umanjene za vrednost slepe probe (koja je umesto uzoraka sadržala destilovanu vodu), uz upotrebu NADPH molarnog apsorpcionog koeficijenta. Jedna jedinica enzimske aktivnosti GPx definisana je kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min), a aktivnost u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina.

3.10.6. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima jetre je određivana po modifikovanoj metodi, koju je opisao Aebi (168), a zasniva se na sposobnosti ovog enzima da razgrađuje vodonik-peroksid (H_2O_2) (Sigma Aldrich®, Darmstadt, Germany), do vode i molekuskog kiseonika. Preciznije, smanjenje koncentracije H_2O_2 praćeno je spektrofotometrijski direktnim merenjem pada apsorbance na 240 nm. Homogenati jetre su najpre razblaženi 100 do 150 puta, a potom dodati u 1 M fosfatni pufer (pH 7,0). Reakcija je započeta dodavanjem 10 mM H_2O_2 , nakon čega je pad apsorbance praćen 3 min na 240 nm uz upotrebu spektrofotometra Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation Kyoto, Japan) i 25 °C, da bi se odredila promena apsorbance po minuti. Aktivnost CAT u uzorcima izračunata je na osnovu izmerene promene apsorbance po minuti ($\Delta A/\text{min}$), uz upotrebu milimolarnog apsorpcionog koeficijenta H_2O_2 . Jedna

jedinica aktivnosti CAT je definisana kao količina enzima potrebna za razgradnju 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ u minuti, a aktivnost u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina.

3.11. Statistička analiza

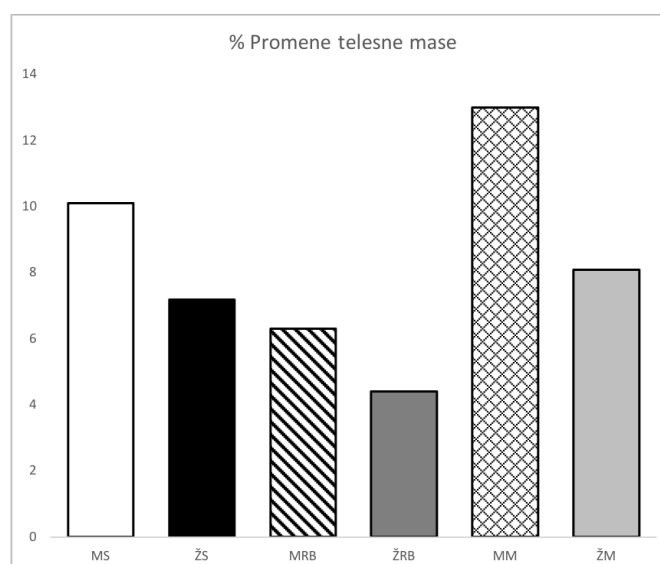
Statistički značaj promena procentualnog udela masnih kiselina u PL jetre pacova i vrednosti biohemijskih parametara je testiran dvofaktorskom analizom varijanse (eng. two-way ANOVA) i Tukey post hoc testom, primenom pola životinja i različitih hrana kao faktora na logaritamski i trigonometrijski transformisanim podacima (169, 170). Podaci su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (SD). Uticaj različitih vrsta hrane (njihovog masnokiselinskog profila) na sveukupni profil masnih kiselina u jetri pacova dalje je analiziran primenom kanonijske diskriminacione analize.

Statistički značaj parametara oksidativnog stresa, testiran je jednofaktorskom analizom varijanse (eng. one-way ANOVA) i Tukey post hoc testom. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm SD. Za ispitivanje normalne distribucije podataka korišćen je Šapiro-Vilkov test. Zbog odsustva normalne distribucije, SOD vrednosti su poređene Kruskal-Wallis neparametrijskim testom i podaci su predstavljani kao medijane i interkvartilni interval (25-ti i 75-ti percentil). Za utvrđivanje povezanosti između merenih parametara korišćen je Pirsonov koeficijent korelacije. Minimalan uslov za postojanje statističke značajnosti definisan je p vrednošću (nivoom značajnosti) manjom ili jednakom 0,05 ($p \leq 0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Efekat unosa hrane različitog hemijskog sastava na telesnu masu

Unos hrane je bio isti u svim eksperimentalnim grupama (MS, ŽS, MRB, ŽRB, MM i ŽM) i nije bilo statistički značajnih promena u dnevnoj potrošnji hrane. Dnevno je merena grupna potrošnja po kavezu (četiri životinje). Preciznije, merena je količina hrane koja je stavljena po kavezu svaki dan, da bi naredni dan pre ponde, bila merena težina hrane koja je preostala u kavezu. Stoga, individualni unos hrane je kalkulisan kao srednja vrednost ukupne dnevne potrošnje po kavezu. Uzimana je prosečna nedeljna potrošnja, po životinji za svaku grupu, pošto su nedeljno praćene i promene telesne težine. Telesna masa pacova je merena nedeljno i predstavljena je kao procenat promene telesne mase na kraju studije za svaku eksperimentalnu grupu (slika 11). Vrednosti su bile sledeće: mušjaci hranjeni standardnom hranom (MS), mušjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom (MRB), mušjaci na hrani obogaćenoj mlekom u prahu (MM): ($10,1 \pm 0,7$; $6,3 \pm 0,2$; $13,0 \pm 1,5$) i ženke na standardnoj hrani (ŽS), ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom (ŽRB), ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu (ŽM): ($7,2 \pm 0,8$; $4,4 \pm 0,1$; $8,1 \pm 0,7$).



Slika 11. Procenat promene telesne mase

4.2. Analiza hemijskog sastava hrane

Hemijski je analiziran procentualni sadržaj vlage, proteina, masti, celuloze, skroba, pepela, šećera, kao i energetska vrednost hrane koju su konzumirale sve tri grupe životinja. Metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS) određen je sadržaj kalcijuma, fosfora, natrijuma, magnezijuma, gvožđa i cinka u uzorcima tri različite vrste hrane. Tečnom hromatografijom visokih performansi je određena koncentracija vitamina A i E u različitim vrstama hrane. Sastav masnih kiselina u hrani, odnosno procentualni sadržaj pojedinačnih masnih kiselina kao i ukupnih (SFA, MUFA, PUFA) u sve tri vrste hrane, određen je metodom gasne hromatografije. Analize hemijskog sastava hrane prikazane su u tabelama 1, 2, 3, 4 i 5.

Tabela 1. Hemijski sastav različitih vrsta hrane za pacove

	Standardna hrana	Hrana obogaćena ribljim brašnom	Hrana obogaćena mlekom u prahu
Vlaga (%)	13,5	7,11	7,22
Proteini (%)	20	21,15	16,35
Masti (%)	4,2	2,42	4,07
Celuloza (%)	8	4,44	3,51
Skrob (%)	38	40,31	36,86
Pepeo (%)	10	5,54	4,16
Energija (KJ/100g)	1100	1128,51	1105,5
Šećeri (%)	3,3	1,49	4,43

Tabela 2. Atomska apsorpciona analiza mikroelemenata u različitim vrstama hrane

	Standardna hrana	Hrana obogaćena ribljim brašnom	Hrana obogaćena mlekom u prahu
Kalcijum (%)	1	1,25	0,98
Fosfor (%)	0,5	0,12	0,07
Natrijum (mg/kg)	0,25	0,3242	0,2503
Magnezijum (mg/kg)	1000	1673	1586
Gvožđe (mg/kg)	100	126,2	88,12
Cink (mg/kg)	100	35,2	27,11

Tabela 3. Profili masnih kiselina u različitim vrstama hrane

Masne kislone (%)	Standardna hrana	Hrana obogaćena ribljim brašnom	Hrana obogaćena mlekom u prahu
C6:0		2,769	1,627
C8:0			0,656
C10:0			1,5109
C11:0			0,173
C12:0	0,05	0,0417	1,813
C14:0	0,51	1,5030	6,344
C14:1			0,539
C15:0	0,08	0,1846	0,724
C16:0	13,55	15,555	25,36
C16:1	1,04	1,5731	1,585
C17:0		0,0356	0,543
C17:1		0,092	0,197
C18:0	2,30	3,394	7,028
C18:1n-9	24,95	20,798	
C18:1n-9t			1,34
C18:1n-9c			21,54
C18:2n-6	49,93	38,955	23,458
C20:0		0,414	0,451
C18:3n-3	1,17	1,434	2,012
C18:3n-6	0,19		
C20:1	3,25	1,548	
C21:0		3,249	0,33
C20:2	0,13	0,5935	0,036
C20:4n-6			1,00
C22:0		0,2835	0,198
C22:1n-9		1,8511	0,233
C20:3n-3	0,72		
C20:3n-6	0,12		0,995
C23:0		0,322	0,289
C24:0	1,38		
C20:5n-3	0,06	2,4738	
C22:6n-3	0,58	2,928	

Tabela 4. Koncentracije vitamina A i E u različitim vrstama hrane

	Standardna hrana	Hrana obogaćena ribljim brašnom	Hrana obogaćena mlekome u prahu
Vitamin A (IU/kg)	10	29,86	24,25
Vitamin E (mg/kg)	25	54,96	23,1

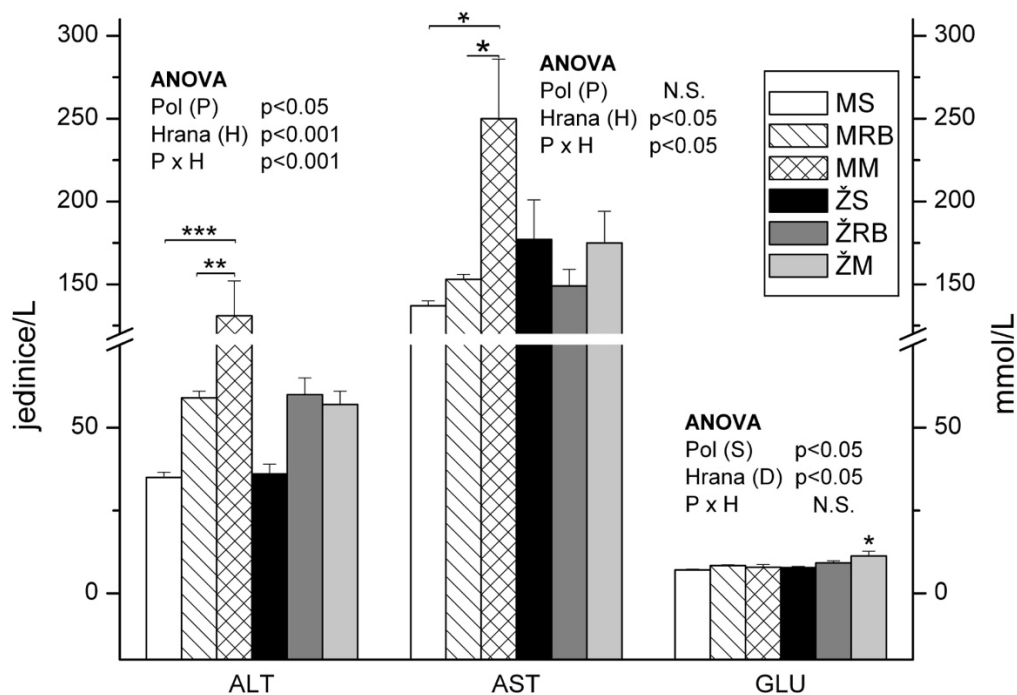
Tabela 5. Ukupne SFA, MUFA, PUFA u različitim vrstama hrane

Masne kiseline (%)	Standardna hrana	Hrana obogaćena ribljim brašnom	Hrana obogaćena mlekome u prahu
SFA	18,91	27,75	47,05
MUFA	29,24	25,86	25,43
PUFA	52,9	46,38	27,50

4.3. Biohemijski parametri u plazmi pacova tretiranih različitim vrstama hrane

Efekat tri različite vrste hrane na aktivnost ALT i AST u plazmi pacova, prikazan je na grafiku 1.

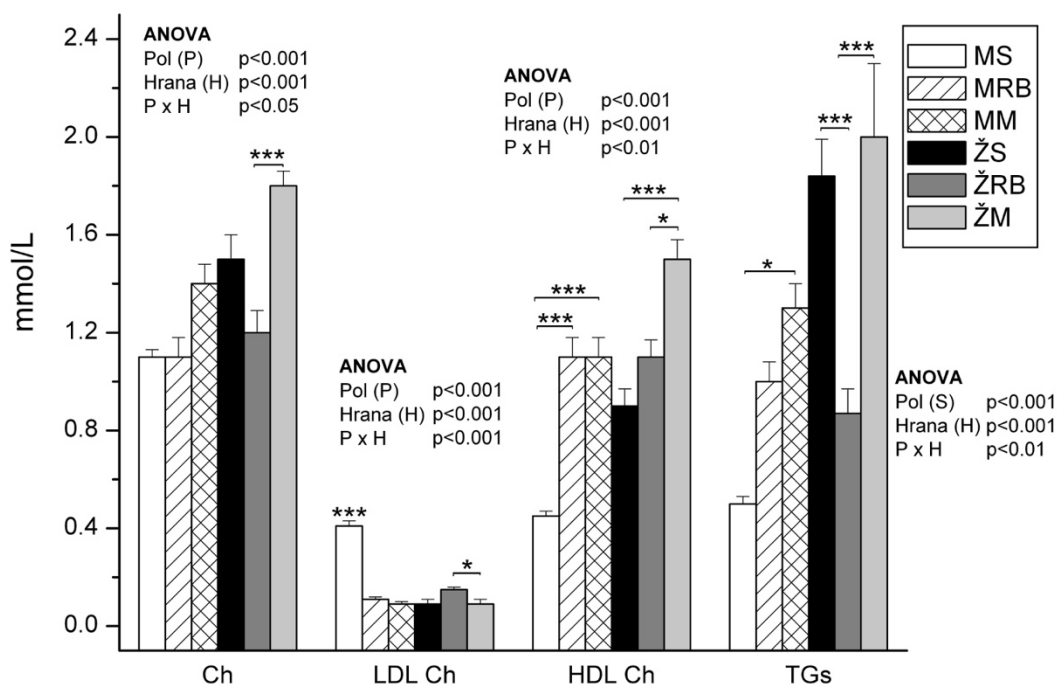
Unos hrane obogaćene mlekome u prahu značajno povećava aktivnost ALT ($p < 0,001$) i AST ($p < 0,05$) kod mužjaka u odnosu na standardnu hranu. Hrana obogaćena ribljim brašnom nema značajne efekte na aktivnost ALT i AST, kao i koncentraciju glukoze kod oba pola (grafik 1).



Grafik 1. Aktivnost ALT, AST i koncentracija glukoze u plazmi ženki i mužjaka pacova. Podaci su dati kao srednja vrednost \pm SD ($n=6$). Rezultati su testirani dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa faktorima pola (P) i hrane (H) (pokazana je p značajnost) i Tukey's post hoc testirani. MS-mušjaci na standardnoj hrani, MRB-mušjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, MM-mušjaci na hrani obogaćenoj mlekom u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

Koncentracija ukupnog holesterola Ch, LDL i HDL holesterola i TG u plazmi pacova prikazana je na grafiku 2. Kod ženki, hrana obogaćena mlekom u prahu povećava koncentraciju HDL holesterola ($p < 0,001$) (grafik 2) u odnosu na kontrolu, dok hrana obogaćena ribljim brašnom snižava TG ($p < 0,001$). Kod mužjaka, oba tipa hrane snižavaju koncentraciju LDL ($p < 0,001$) i povećavaju koncentraciju HDL ($p < 0,001$) holesterola u plazmi u odnosu na standarnu hranu. Hrana obogaćena mlekom u prahu povećava TG kod mužjaka ($p < 0,05$).

Iz rezultata prikazanih na grafiku 2 proizlazi da svaki ispitivani tip hrane menja sastav lipida i njihov odnos u jetri pacova. Međutim, efekti nisu bili isti za oba pola. Određen tip hrane doveo je do različitih promena u sastavu lipida kod različitih polova.



Grafik 2. Koncentracija holesterola (Ch), LDL holesterola (LDL Ch), HDL holesterola (HDL Ch) i triglicerida (TG) u krvnoj plazmi. Podaci su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=6). Rezultati su testirani dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa faktorima pola (P) i hrane (H) (pokazana je p značajnost) i Tukey's post hoc testirani. *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05. MS-mužjaci na standardnoj hrani, MRB-mužjaci na hrani obogaćenom ribljim brašnom, MM-mužjaci na hrani obogaćenom mlekom u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenom ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenom mlekom u prahu.

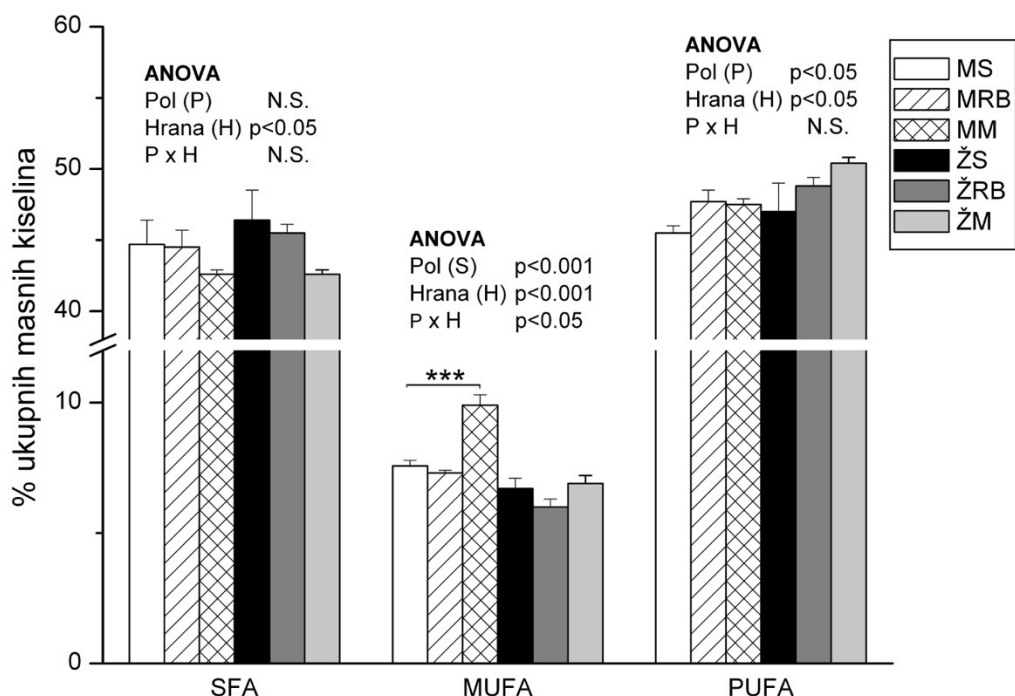
4.4. Masnokiselinski profil fosfolipida u jetri pacova tretiranih različitim vrstama hrane

Profil masnih kiselina u fosfolipidima jetre pacova određivan je nakon završenog četvoronedeljnog konzumiranja različitih vrsta hrane. Određivana je procentualna zastupljenost pojedinačnih i ukupnih zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), kao i procenat ukupnih n-3 i n-6 i odnos n-6/n-3.

4.4.1. Procenat ukupnih SFA, MUFA i PUFA

Procenat ukupnih zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u jetri pacova prikazan je na grafiku 3.

Ishrana menja odnos SFA, MUFA i PUFA (grafik 3, ANOVA značajnost efekta hrane), ali su efekti polno specifični. Hrana obogaćena mlekom u prahu snižava sadržaj SFA ($p < 0,05$) i povećava udeo MUFA (ANOVA efekat hrane, $p < 0,001$) kod mužjaka (ANOVA efekat pola $p < 0,001$, i interakcija $P \times H$, $p < 0,05$), i PUFA, kod ženki (ANOVA efekat pola $p < 0,05$, i efekat hrane $p < 0,05$) u odnosu na standardnu hranu.



Grafik 3. Procenat ukupnih SFA, MUFA i PUFA u jetri ženki i mužjaka pacova. Podaci su dati kao srednja vrednost \pm SD ($n=6$). Rezultati su testirani dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa faktorima pola (P) i hrane (H) (pokazana je p značajnost) i Tukey's post hoc testirani. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. MS-mušjaci na standardnoj hrani, MRB-mušjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, MM-mušjaci na hrani obogaćenoj mlekom u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

4.4.2. Procenat pojedinačnih masnih kiselina

Procentualna zastupljenost pojedinačnih masnih kiselina u jetri pacova prikazana je na graficima 4 i 5. Procenat palmitinske (16:0) palmitoleinske (16:1), stearinske (18:0), oleinske (18:1 n-9), vakcenske (18:1 n-7) i linolne (18:2), prikazan je na grafiku 4. Procenat dihomo gama linolenske (DGLA, 20:3), arahidonske (AA, 20:4), eikosapentaenske (EPA, 20:5), dokosatetraenske (DTA, 22:4), dokosapentaenske (DPA, 22:5) i dosaheksaenske (DHA, 22:6), prikazan je na grafiku 5.

U fosfolipidima jetre ženke imaju nižu procentualnu zastupljenost palmitinske, palmitoleinske i oleinske kiseline i DGLA kao i povećan udeo stearinske kiseline u odnosu na mužjake (grafici 4 i 5, ANOVA značajnost efekta pola). Manipulacija tipom ishrane je dovela do različitih promena kod oba pola (ANOVA, efekat $P \times H$, $p < 0,001$).

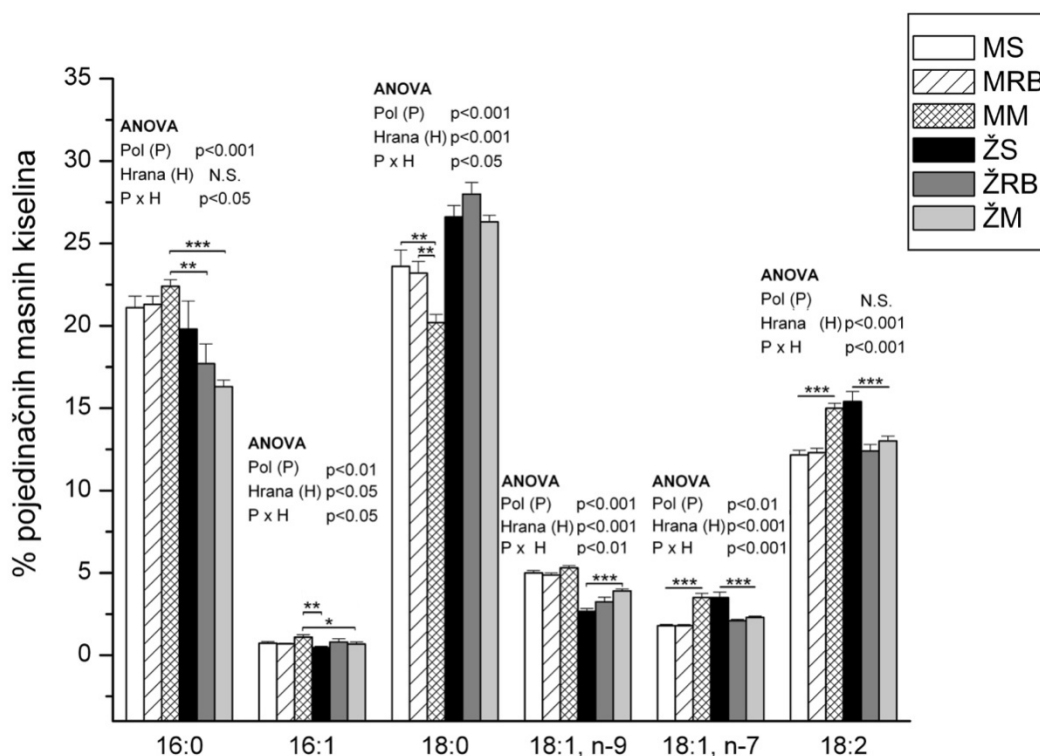
Hrana obogaćena ribljim brašnom i mlekom smanjuje procentualnu zastupljenost vakcenske ($p < 0,001$) i linolne kiseline ($p < 0,001$) u fosfolipidima jetre ženki (grafik 4). Kod ženki, hrana obogaćena mlekom u prahu povećava sadržaj oleinske kiseline u fosfolipidima jetre ($p < 0,001$) (ANOVA značajnost efekta hrane i interakcija $P \times H$, Tukey's post hoc t-test).

Sa druge strane, kod mužjaka, hrana obogaćena mlekom u prahu podiže udeo vakcenske ($p < 0,001$) i linolne kiseline ($p < 0,001$) u odnosu na druge dve vrste hrane (grafik 4). Hrana obogaćena mlekom takođe snižava procentualnu zastupljenost stearinske kiseline u fosfolipidima jetre mužjaka ($p < 0,01$) (ANOVA značajnost efekta hrane i interakcija $P \times H$, Tukey's post hoc t-test).

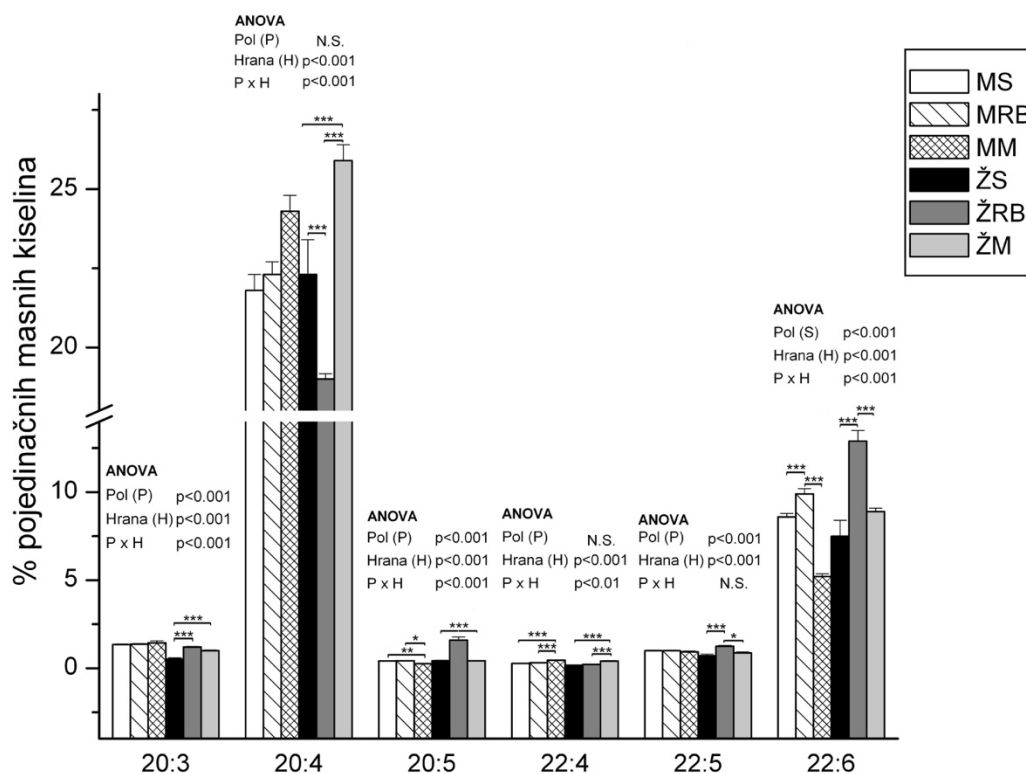
Kod ženki, hrana obogaćena ribljim brašnom i mlekom u prahu povećava sadržaj DGLA ($p < 0,001$) u poređenju sa standardnom hranom (grafik 5). Hrana obogaćena ribljim brašnom snižava sadržaj AA ($p < 0,001$) i povećava procentualnu zastupljenost EPA ($p < 0,001$), DPA ($p < 0,001$) i DHA ($p < 0,001$) u odnosu na standardnu hranu. Kod istog pola hrana obogaćena mlekom povećava sadržaj AA ($p < 0,001$) i DTA ($p < 0,001$) u fosfolipidima jetre .

U fosfolipidima jetre mužjaka, hrana obogaćena mlekom snižava procentualnu zastupljenost EPA ($p < 0,01$) i DHA ($p < 0,001$) i povećava procentualnu zastupljenost

DTA ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu (grafik 5). Sa druge strane, kod istog pola hrana obogaćena ribljim brašnom povećava samo udeo DHA u fosfolipidima jetre ($p < 0,001$) u odnosu na standardnu hranu ($p < 0,001$).



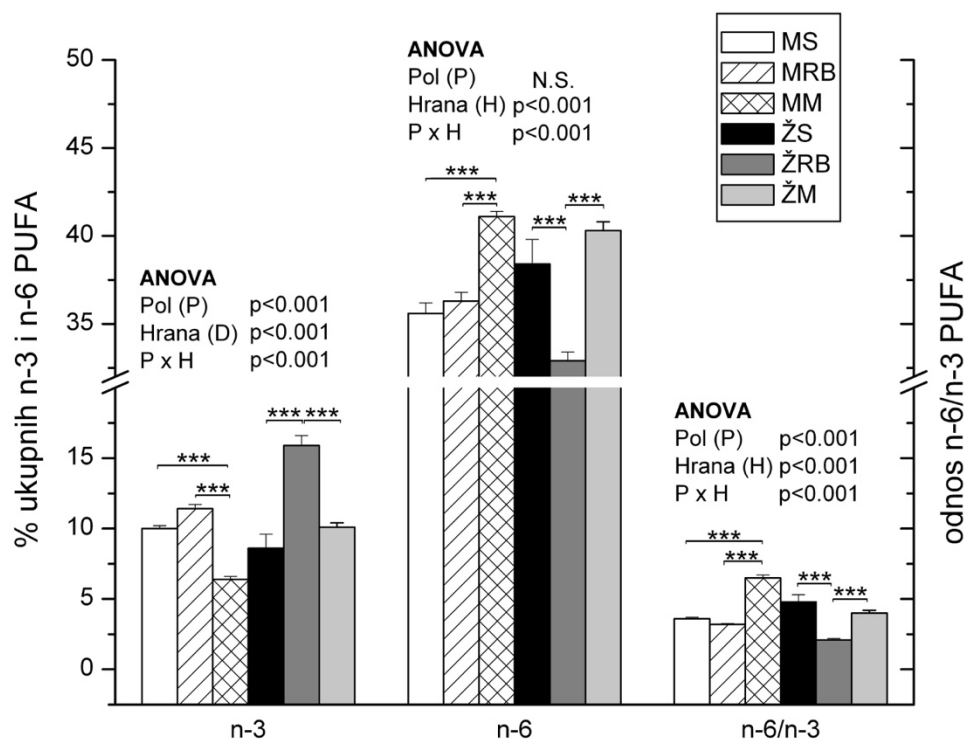
Grafik 4. Procenat palmitinske kiseline (16:0), palmitoleinske (16:1), stearinske (18:0), oleinske (18:1 n-9), vakkenske (18:1 n-7) i linolne (18:2) u jetri ženki i mužjaka pacova. Podaci su dati kao srednja vrednost \pm SD ($n=6$). Rezultati su testirani dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa faktorima pola (P) i hrane (H) (pokazana je p značajnost) i Tukey's post hoc testirani. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. MS-mušjaci na standardnoj hrani, MRB-mušjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, MM-mušjaci na hrani obogaćenoj mlekem u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekem u prahu.



Grafik 5. Procenat DGLA (20:3), AA (20:4), EPA (20:5), DTA (22:4), DPA (22:5) i DHA (22:6) u jetri ženki i mužjaka pacova. Rezultati su testirani dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa faktorima pola (P) i hrane (H) (pokazana je p značajnost) i Tukey's post hoc testirani. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. MS-mužjaci na standardnoj hrani, MRB-mužjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, MM-mužjaci na hrani obogaćenoj mlekom u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

4.4.3. Procentualna zastupljenost ukupnih n-3 i n-6 i odnos n-6/n-3 u jetri

Procenat ukupnih n-3 i n-6, kao i odnosa n-6/n-3 u jetri pacova prikazan je na grafiku 6. Hrana obogaćena mlekom u prahu smanjuje procenat ukupnih n-3 ($p < 0,001$), i povećava procenat ukupnih n-6 ($p < 0,001$) i odnos n-6/n-3 ($p < 0,001$) kod mužjaka u odnosu na druge vrste hrane. S druge strane, kod ženki, hrana obogaćena ribljim brašnom povećava procenat ukupnih n-3 ($p < 0,001$), smanjuje procenat ukupnih n-6 ($p < 0,001$) i odnos n-6/n-3 ($p < 0,001$) u poređenju sa standardnom i hranom koja je obogaćena mlekom (grafik 6, ANOVA efekat hrane, $p < 0,001$, P x H efekat, $p < 0,001$, Tukey's post hoc).



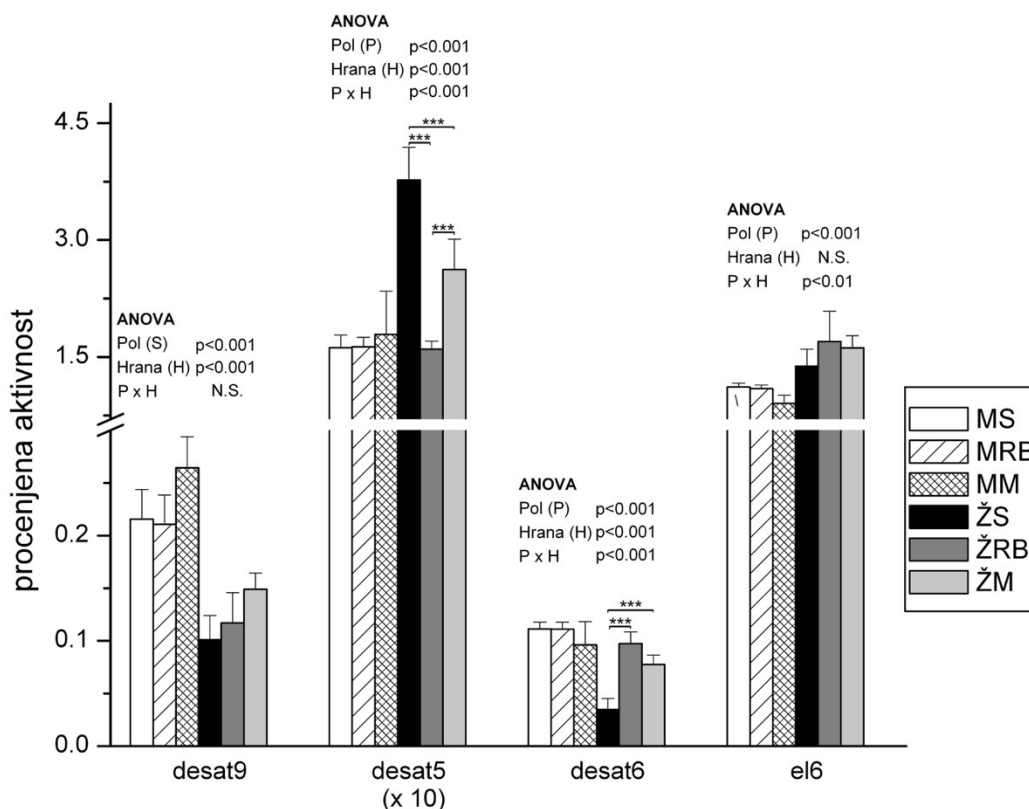
Grafik 6. Procenat ukupnih n-3, n-6 i odnosa (n-6/n-3) masnih kiselina u jetri ženki i mušjaka pacova. Podaci su dati kao srednja vrednost \pm SD (n=6). Rezultati su testirani dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa faktorima pola (P) i hrane (H) (pokazana je p značajnost) i Tukey's post hoc testirani. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. MS-mušjaci na standardnoj hrani, MRB-mušjaci na hrani obogaćenom ribljim brašnom, MM-mušjaci na hrani obogaćenom mlekem u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenom ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenom mlekem u prahu.

4.4.4. Procenjene aktivnosti desaturaza 5, 6 i 9 i elongaze 6

Aktivnost desaturaza 5, 6 i 9 i elongaze 6 u jetrama pacova prikazane su na grafiku 7. Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) pokazuje da je aktivnost desaturaze 9 veća kod mušjaka nego kod ženki (efekat pola ANOVA, $p < 0,001$) (grafik 7). Kod životinja oba pola hranjenih hranom obogaćenom mlekem u prahu, njena aktivnost je povećana u poređenju sa drugim grupama (efekat hrane ANOVA, $p < 0,001$). Tip hrane menja aktivnost desaturaze 9 ispod nivoa značajnosti, uglavnom kod ženki hranjenih hranom obogaćenom mlekem u prahu, odnosno ribljim brašnom u poređenju sa standardnom hranom. Sa druge strane, ženke imaju višu aktivnost desaturaze 5 u poređenju sa

mužjacima (efekat pola ANOVA, $p < 0,001$), kada su hranjene standardnom i hranom obogaćenom mlekom u prahu (efekat hrane, $p < 0,001$ i $P \times H$ efekat, $p < 0,001$).

Unos hrane različitog hemijskog sastava nije menjao aktivnost desaturaze 6 kod mužjaka, ali je uticao na njenu aktivnost kod ženki (efekat hrane ANOVA, $p < 0,001$, interakcija $P \times H$, $p < 0,001$). Ženke hranjene standardnom hranom imaju najnižu aktivnost desaturaze 6 (pos hoc Tukey's, $p < 0,001$), ali hrana obogaćena mlekom, kao i hrana obogaćenom ribljim brašnom povećava njenu aktivnost skoro do vrednosti izmerenih kod mužjaka. Ženke imaju značajno višu aktivnost elongaze 6 u poređenju sa mužjacima (efekat pola ANOVA, $p < 0,001$). Nema značajnog efekta hrane na aktivnost elongaze 6 u ispitivanim grupama.

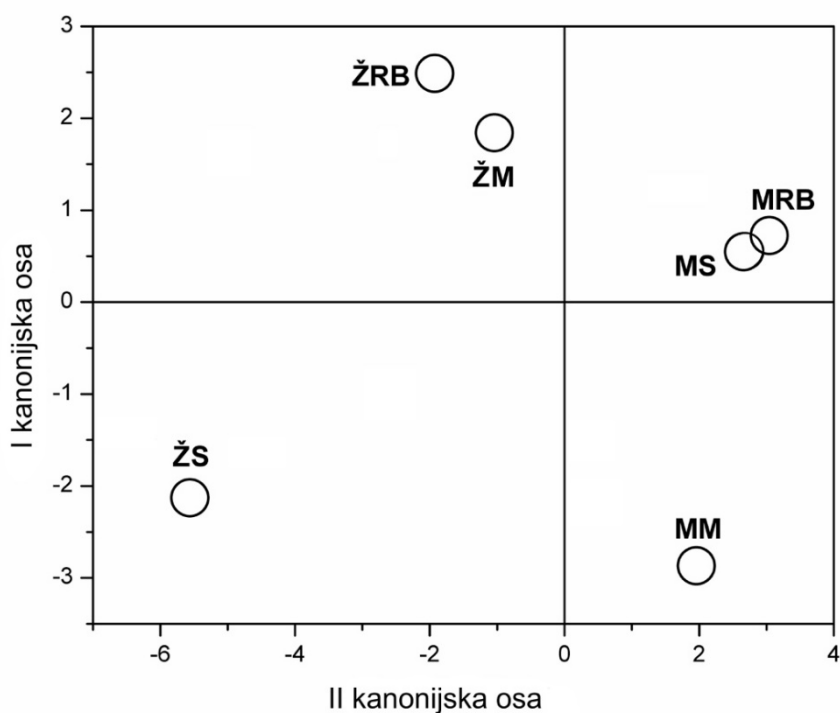


Grafik 7. Procenjene aktivnosti desaturaza 5, 6 i 9 i elongaze 6 u jetrama pacova oba pola. Podaci su dati kao srednja vrednost \pm SD. Rezultati su testirani dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa faktorima pola (P) i hrane (H) (pokazana je vrednost F i p značajnost) i Tukey's post hoc testirani. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. MS-mužjaci na standardnoj hrani, MRB-mužjaci na hrani obogaćenom ribljim brašnom, MM-mužjaci na hrani obogaćenom mlekom u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenom ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenom mlekom u prahu.

4.5. Kanonijska diskriminaciona analiza sastava masnih kiselina

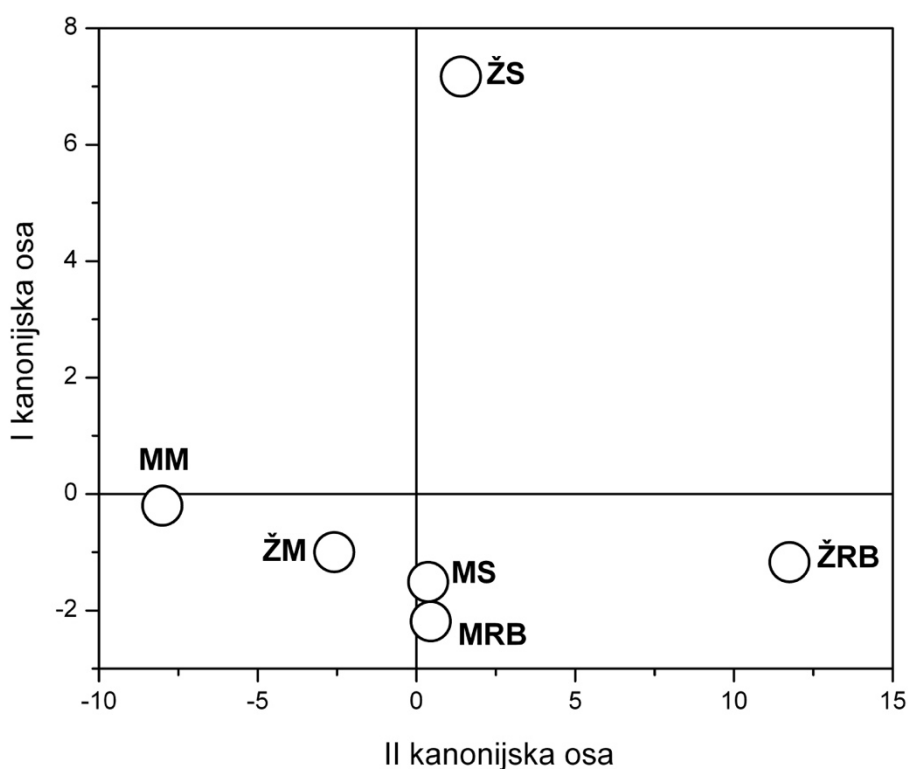
Budući da tip ishrane bitno menja procenatualnu zastupljenost individualnih masnih kiselina u ukupnom profilu masnih kiselina, značaj ovih promena testiran je kanonijskom diskriminacionom analizom. Kanonijska diskriminaciona analiza poredi ukupni sastav masnih kiselina i individualni odnos varijabli i kanonijskom diskriminacionom funkcijom procenjuje značaj posmatranih razlika u ukupnom zbiru masnih kiselina i njihovim odnosima.

Kanonijska diskriminaciona analiza je pokazala, na osnovu procenjenog ukupnog zbira masnih kiselina u fosfolipidima jetre, da su masne kiseline koje su najviše doprinele razlici između pojedinih grupa: palmitinska kiselina ($p < 0,01$), oleinska kiselina ($p < 0,05$), DGLA ($p < 0,01$), AA ($p < 0,01$), EPA ($p < 0,001$), DTA ($p < 0,001$), DPA ($p < 0,05$) i DHA ($p < 0,01$), što je prikazano na graficima 8 i 9.



Grafik 8. Kanonijska diskriminaciona analiza sastava SFA i MUFA kod mužjaka i ženki pacova. Podaci su izraženi kao srednja vrednost kanonijskih varijabli \pm SD. MS-mušjaci na standardnoj hrani, MRB-mušjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, MM-mušjaci na hrani obogaćenoj mlekom u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

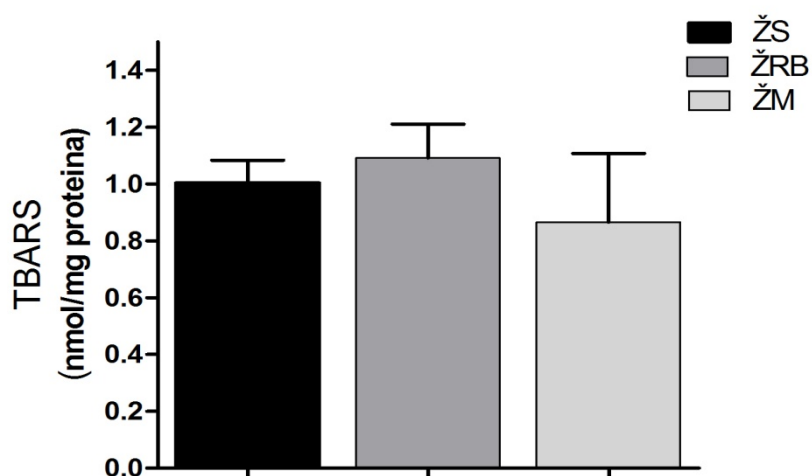
Za dalje analize, masne kiseline su podeljene na: 1) SFA i MUFA, i 2) PUFA. Kada su SFA i MUFA razmotrene (grafik 8), razlici u sastavu doprinele su sve analizirane masne kiseline. Analizirane grupe su značajno udaljene u kanonijskom prostoru osim MS i MRB. To znači da dva ispitivana tipa hrane nisu značajno uticala na razliku u pogledu sastava masnih kiselina mužjaka pacova. Nadalje, sastav masnih kiselina u fosfolipidima jetre ženki razlikuje se od masnokiselinskog profila mužjaka. Slični rezultati su dobijeni kada su PUFA uzete u obzir, iako razlika između mužjaka i ženki nije toliko očigledna u pogledu položaja u kanonijskom prostoru (grafik 9).



Grafik 9. Kanonijska diskriminaciona analiza sastava PUFA kod mužjaka i ženki pacova. Podaci su izraženi kao srednja vrednost kanonijskih varijabli \pm SD. MS-mužjaci na standardnoj hrani, MRB-mužjaci na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, MM-mužjaci na hrani obogaćenoj mlekom u prahu, ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

4.6. Koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS) u homogenatima jetre

Uticaj različitih vrsta hrane na koncentraciju TBARS u homogenatima jetre pacova prikazan je na grafiku 10. Uprkos nešto nižim vrednostima TBARS u grupi koja je hranjena hranom obogaćenom mlekom u prahu ($0,88 \pm 0,23$ nmol/mg), nisu detektovane statistički značajne razlike u poređenju sa drugim grupama (kontrolna grupa: $1 \pm 0,08$ nmol/mg; hrana obogaćena ribljim brašnom: $1,13 \pm 0,15$ nmol/mg).

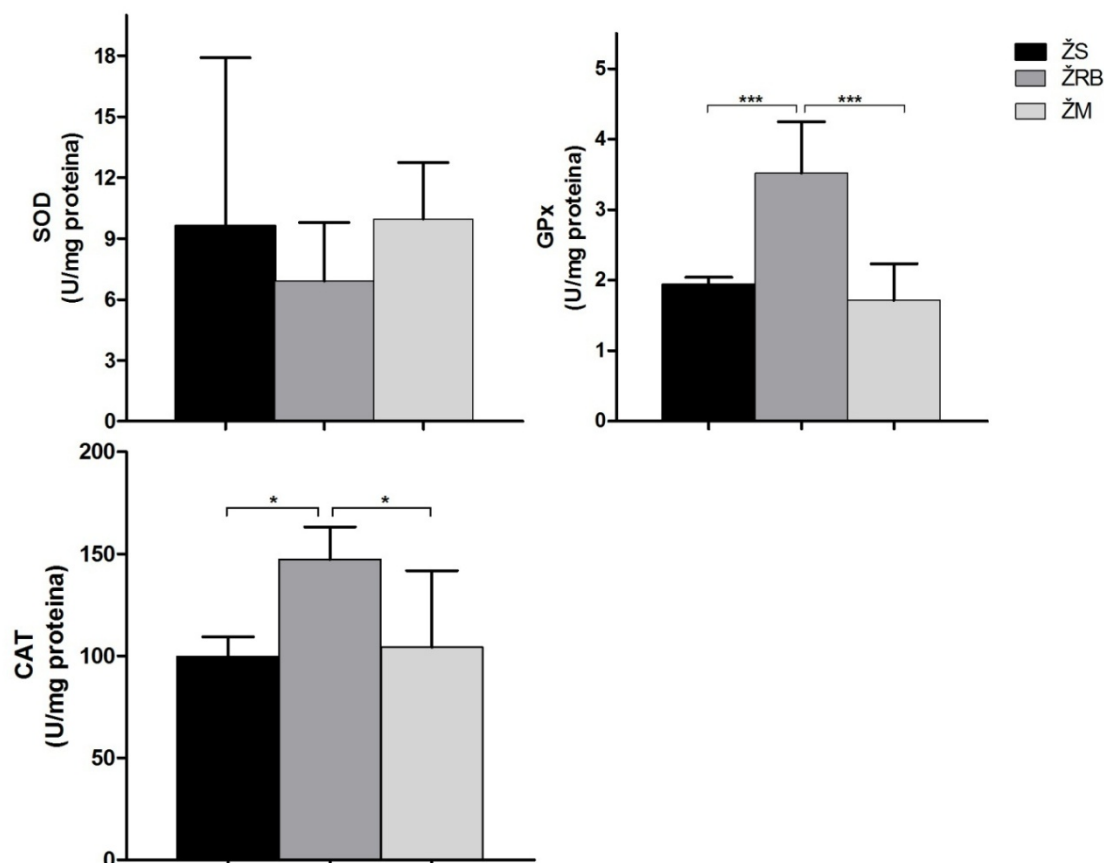


Grafik 10. Koncentracija tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS) u homogenatima jetre pacova. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu

4.7. Aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatima jetre

Rezultati određivanja aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, GPx i CAT predstavljeni su na grafiku 11. Kao što je prikazano, uočene su značajno veće aktivnosti GPx ($3,52 \pm 0,73$ U/mg) i CAT ($147,25 \pm 15,93$ U/mg) u tkivima pacova koji su hranjeni hranom obogaćenom ribljim brašnom (ŽRB) u odnosu na kontrolnu (ŽS) (GPx: $1,93 \pm 0,11$ U/mg, $p < 0,001$; CAT: $99,37 \pm 10,03$ U/mg, $p < 0,05$) i grupu hranjenu hranom obogaćenom mlekom u prahu (ŽM) (GPx: $1,72 \pm 0,52$ U/mg, $p < 0,001$; CAT: $104,18 \pm 37,49$ U/mg, $p < 0,05$).

U slučaju SOD, nisu uočene značajne razlike u aktivnosti ovog enzima između grupa ($p = 0,093$). Takođe, aktivnosti antioksidativnih enzima u tkivima pacova hranjenih hranom obogaćenom mlekom u prahu nisu se značajno razlikovale u odnosu na aktivnosti enzima u kontrolnoj grupi.



Grafik 11. Aktivnosti enzima superoksid-dismutaze (SOD), glutation-peroksidaze (GPx) i katalaze (CAT) u homogenatima jetre pacova. Za SOD podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni interval, a za GPx i CAT kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. ŽS-ženke na standardnoj hrani, ŽRB-ženke na hrani obogaćenoj ribljim brašnom, ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

4.8. Korelacije među merenim parametrima oksidativnog stresa

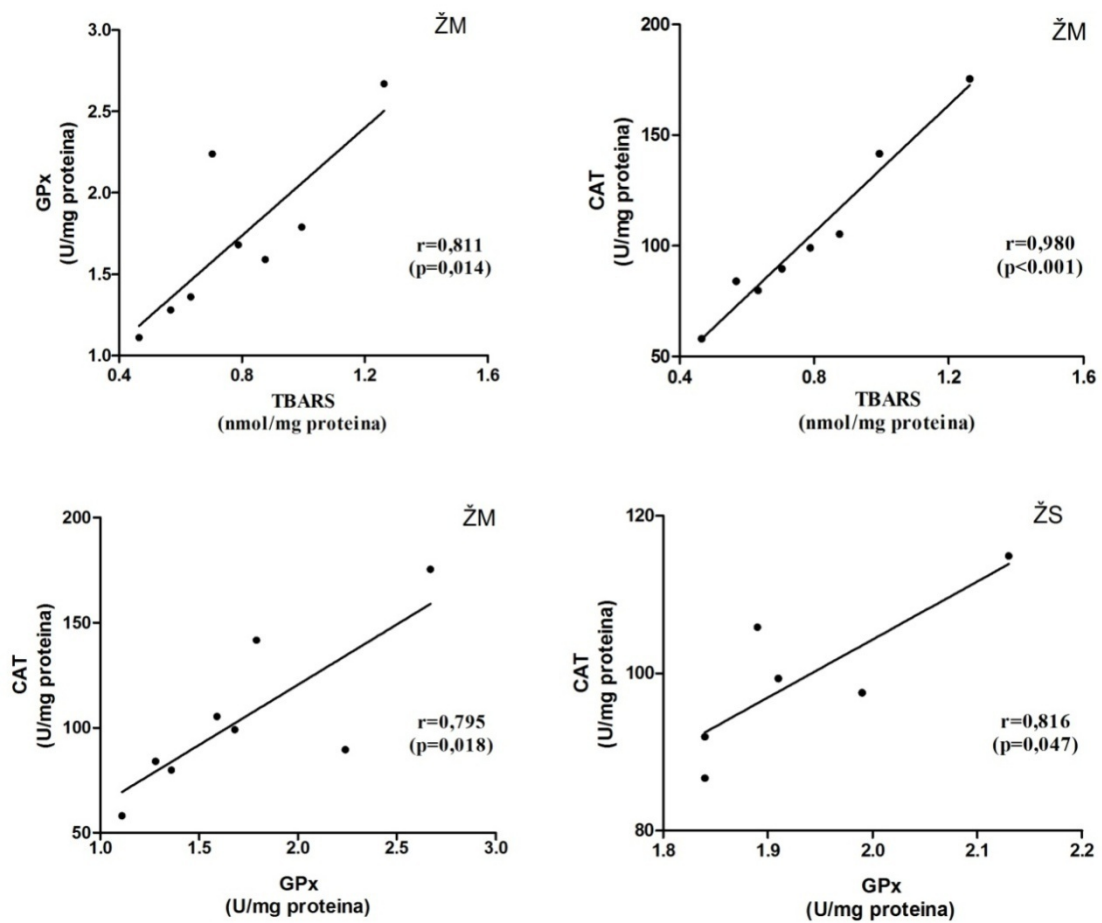
Osim parametara oksidativnog stresa, analizirane su i korelacije ovih parametara u pojedinačnim grupama. Ovi rezultati prikazani su u tabeli 6 i na slici 12.

Tabela 6. Korelacije između parametara oksidativnog stresa

ŽM		
Parameteri	r	P vrednost
TBARS/GPx	0,811	0,014
TBARS/CAT	0,980	<0,001
TBARS/SOD	0,681	0,062
GPx/CAT	0,795	0,018
GPx/SOD	0,668	0,070
CAT/SOD	0,670	0,069
ŽS		
Parameteri	r	P vrednost
GPx/CAT	0,816	0,047

r- Pirsonov korelacioni koeficijent; ŽS-ženke na standardnoj hrani; ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

Većina značajnih korelacija uočena je u grupi životinja koje su hranjene hranom obogaćenom mlekom u prahu. Preciznije, u ovoj grupi životinja, koncentracija TBARS je bila u pozitivnoj korelaciji sa aktivnostima svih analiziranih enzima, iako korelacija nije bila značajna u slučaju SOD ($p = 0,06$). Pored toga, pronađena je značajna korelacija između aktivnosti GPx i CAT ($p = 0,018$; $r = 0,795$), dok je aktivnost SOD bila u pozitivnoj korelaciji i sa aktivnošću GPx i aktivnošću CAT, iako ne statistički značajno. Dodatno, u kontrolnoj grupi uočena je statistički značajna korelacija između GPx i CAT aktivnosti ($p = 0,047$).



Slika 12. Korelacije između parametara oksidativnog stresa. r-Pirsonov korelacioni koeficijent; ŽS-ženke na standardnoj hrani; ŽM-ženke na hrani obogaćenoj mlekom u prahu.

5. DISKUSIJA

Istraživanja su pokazala da ishrana utiče na promenu profila masnih kiselina u cirkulaciji i tkivima, kao i na metabolizam MK u različitim tkivima. Različita hrana utiče na sastav masnih kiselina, posebno PL kao glavnih konstituenata ćelijskih membrana. U ovom istraživanju je pokazano da različite hrane (obogaćena ribljim brašnom i mlekom u prahu), povećavaju stepen nezasićenosti masnih kiselina fosfolipida u membranama, čime pozitivno utiču na fluidnost membrana. Odgovarajući odnos između ukupnih n-6 i n-3 MK u ishrani je važan zbog njihove kompetitivne prirode. Enzimi, desaturaze i elongaze ne prave razliku između n-3 i n-6 PUFA, kao supstrata koje sintetišu. Pošto masne kiseline n-6 i n-3 serije dele isti niz enzima, postoji kompeticija između ove dve familije masnih kiselina, te povećanje jedne izaziva značajan pad u konverziji druge grupe (17). Povećan unos ribljeg mesa bogatog mastima ili uzimanje suplemenata ribljeg ulja dokazano je da povećava koncentracije EPA i DHA u plazmi i tkivima kod ljudi, što je povezano sa korisnim efektima na zdravlje. Utvrđena svojstva n-3 PUFA su njihovo antiinflamatorno dejstvo i snižavanje triglicerida (171). U poređenju sa omega-3 masnim kiselinama, literaturni podaci o intervencijama sa mlekom su daleko oskudniji. Mleko je jedna od najvažnijih namirnica u ishrani mladunaca sisara, jer je to prvi oblik hrane koja obezbeđuje energiju i hranljive materije. Mnoga istraživanja su pokazala da mleko sa brojnim biološki aktivnim sastojcima, kao što su oligosaharidi i lipidi, imunoglobulini, antibakterijski peptidi, antimikrobni proteini, štiti novorođenčad i odrasle od uzročnika bolesti. U poslednjih nekoliko godina, lipidi iz mleka su privukli pažnju istraživača zbog prisustva različitih bioaktivnih komponenti (172). Lipidna frakcija mleka i mlečnih proizvoda sadrži nekoliko nutritivno značajnih komponenti, kao što su n-3 i n-6 PUFA, konjugovana LA, MK kratkih lanaca, gangliozi i PL (172). Ishrana na bazi mlečnih masti ima dva značajna doprinosa, jer povećava ukupan sadržaj zasićenih masnih kiselina (SFA) i snižava sadržaj PUFA u masnokiselinskom profilu fosfolipida plazme i tkiva pacova (173). Ovim istraživanjem smo pokazali da i hrana obogaćena mlekom u prahu ima povoljan uticaj na profil lipida u plazmi i jetri, obzirom na različit masnokiselinski sastav u odnosu na hranu obogaćenu ribljim brašnom.

U ovom radu, poređenjem analiziranih masnokiselinskih sastava različitih vrsta hrane, smo pokazali različitu procentualnu zastupljenost zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. U skladu sa tim, hrana obogaćena mlekom u prahu obiluje zasićenim kratkolančanim i srednjelančanim masnim kiselinama (SFA), ali i dugolančanim od kojih su najzastupljenije palmitinska (16:0) i stearinska kiselina (18:0). Zatim, slede mononezasićene (MUFA), među kojima je najzastupljenija oleinska kiselina (18:1 n-9). Predominantne PUFA u hrani obogaćenoj mlekom u prahu su linolna (18:2 n-6) i alfa linoleinska kiselina (18:3 n-3). Ovo potvrđuju i rezultati drugih studija (174). Takođe je primetno niži sadržaj SFA u standardnoj i hrani obogaćenoj ribljim brašnom, u odnosu na hranu obogaćenu mlekom u prahu. U sve tri vrste hrane primećuje se visoka procentualna zastupljenost linolne kiseline. Suprotno, analiza masnokiselinskog sastava hrane obogaćene ribljim brašnom je pokazala da ova vrsta hrane ima visok sadržaj PUFA, kao što su EPA i DHA, koje nisu prisutne u hrani obogaćenoj mlekom u prahu, a u standardnoj hrani su zastupljene u veoma niskom procentu. Poznato je da su dugolančane n-3 PUFA (EPA i DHA) zastupljene u masnoj ribi i preparatima ribljeg ulja (175).

Aspartat transaminaza (AST) i alanin transaminaza (ALT) su dva enzima koja se nalaze u jetri (176). AST je prisutan i u mitohondrijama i u citoplazmi ćelija jetre, dok se ALT nalazi samo u citoplazmi. Međutim, treba napomenuti da se ALT češće koristi kao marker oštećenja jetre ili promena na jetri, dok se aktivnost AST takođe može povećati kao rezultat nedostatka ili bolesti u drugim organima (177). Naši rezultati pokazuju da hrana obogaćena ribljim brašnom nije imala efekte na aktivnost ALT i AST kod ženki i mužjaka, u odnosu na standardnu hranu. Što se tiče hrane obogaćene ribljim brašnom, naši rezultati su u skladu sa rezultatima Popović i sar. (178), koji su pokazali da tretman ribljim uljem nije promenio ALT i AST aktivnosti kod mužjaka Wistar pacova tokom šest nedelja. U skladu sa našim rezultatima, su i rezultati drugih istraživača, bez pronađenih efekata na aktivnost ovih enzima kod zdravih albino ženki pacova tretiranih kravljim i kamiljim mlekom (179). Sa druge strane unos hrane obogaćene mlekom u prahu značajno povećava aktivnost ALT i AST kod mužjaka u odnosu na standardnu hranu. Hrana obogaćena ribljim brašnom i pol nisu dali efekat na aktivnost enzima jetre. Povećanje aktivnosti ALT i AST enzima kod mužjaka može biti posledica adaptacije na promenu hrane.

Holesterol (Ch) je najrasprostranjeniji steroid u organizmu. Značajan je za normalno funkcionisanje svake ćelije, jer je jedan od strukturnih elemenata svih membrana. Trigliceridi (TG) su estri trohidroksilnog alkohola glicerola i masnih kiselina. U trigliceridima najčešće je esterifikovana oleinska kiselina. Štetni efekti Ch i TG se ispoljavaju ukoliko dođe do hroničnog povećanja njihove koncentracije u krvi. Transport lipida između pojedinih tkiva i organa omogućavaju lipoproteini. Rezultati ove studije pokazuju da kod ženki, hrana obogaćena mlekom u prahu povećava koncentraciju HDL holesterola u plazmi, u odnosu na kontrolu, dok hrana obogaćena ribljim brašnom snižava koncentraciju TG. U plazmi mužjaka, oba tipa hrane snižavaju koncentraciju LDL holesterola i povećavaju koncentraciju HDL holesterola u odnosu na standardnu hranu. Kod Wistar pacova tretman ribljim uljem je smanjio koncentraciju triglicerida i LDL holesterola u plazmi i povećao koncentraciju HDL holesterola, što je u skladu sa našim rezultatima (178). Berge i sar. (180) su u svojoj *in vitro* studiji pokazali da EPA snižava koncentraciju TG u plazmi više nego DHA. U ovom istraživanju nismo pokazali uticaj različite hrane na koncentraciju ukupnog holesterola, ali postoje studije koje govore u prilog hipoholesterolemičnom efektu n-3 PUFA i mleka. Pacovi tretirani estrima EPA i DHA tokom tri meseca imali su na kraju studije smanjenu koncentraciju holesterola u plazmi. Inhibicija 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) aktivnosti kod DHA-EE tretiranih pacova može imati hipoholesterolemični efekat (181). Alabdulkarim B. (179) je otkrio smanjenje koncentracije ukupnog holesterola i triglicerida u serumu pacova hranjenih 100% kravljim mlekom. Tendencija smanjenja serumskih TG, sa pratećim povećanjem HDL i smanjenjem odnosa LDL/HDL je takođe pronađena kod zdravih ljudi hranjenih kravljim mlekom, ali samo kada je sadržaj mlečne masti modifikovan ka nižim SFA i višim nezasićenim masnim kiselinama. Postoje studije koje identifikuju mlečne masti kao potencijalne podizače-holesterola, uglavnom zbog SFA i holesterola u njihovom sadržaju (182). U studiji Bar Yamin i sar., je pokazano da u grupi koja je konzumirala punomasno mleko došlo je do povećanja telesne mase i kalorijskog unosa. U grupi koja je konzumirala mleko niske masnoće holesterol, HDL-holesterol, trigliceridi, leptin, grelin, insulin, kortikosteron i glukagon nisu značajno različiti u odnosu na kontrolnu grupu. Nasuprot tome, u grupi sa punomasnim mlekom, holesterol, HDL-holesterol, trigliceridi i glukagon su visoki u poređenju sa kontrolnom grupom (183). U studiji

JaeHee Kim i sar., pokazano je da mleko i mlečni proizvodi kao dobar izvor kalcijuma, imaju pozitivnu ulogu u lipidnim profilima kod pacijenata sa dijabetesom tipa 2. Nivo serumskog HDL-holesterola je bio značajno veći kod osoba koje su konzumirale > 200 g/dan mleka i mlečnih proizvoda nego kod osoba u druge dve grupe, koje su konzumirale manju količinu istih proizvoda (184). Prema našim saznanjima ne postoji dovoljno podataka iz literature za ženke Wistar pacova koji se odnose na profil lipida u krvi nakon tretmana mlekom. Rezultati ove studije ukazuju da su oba tipa hrane (obogaćena ribljim brašnom i mlekom u prahu) uticala na povećanje koncentracije HDL kod oba pola, nezavisno od startnih razlika. Takođe, oba tipa hrane su imala pozitivan efekat na profil lipida plazme, kod mužjaka jer snižavaju koncentraciju LDL. Dodatno, kod ženki hrana obogaćena ribljim brašnom snižava TG.

Fluidnost ćelijske membrane zavisi od profila masnih kiselina u fosfolipidima, kao i dužine i nezasićenosti MK. Veća zastupljenost SFA u ćelijskim membranama smanjuje njihovu fluidnost (77). Hrana utiče na profil masnih kiselina u membranama i funkciju membranskih proteina (185). Različita procentualna zastupljenost masnih kiselina u hrani uticala je na promenu sastava masnih kiselina fosfolipida u jetri.

Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da svaki od primenjenih tipova hrane menja sastav MK u fosfolipidima i njihov odnos u jetri pacova, kao i da efekti nisu bili isti za oba pola. Pojedinačne vrste hrane dovele su do različitih promena u sastavu MK u fosfolipidima jetre kod različitih polova. Rezultati ovog rada pokazuju da ishrana menja odnos ukupnih SFA, MUFA i PUFA, ali i da su efekti polno specifični. U ovoj studiji je pokazano da hrana obogaćena mlekom u prahu u fosfolipidima jetre snižava sadržaj SFA, povećava udeo MUFA kod mužjaka i PUFA kod ženki, u odnosu na standardnu hranu. Razmatrajući SFA ženke imaju niži sadržaj PA (16:0), ali povećan sadržaj SA (18:0) u odnosu na mužjake. U skladu sa našim rezultatima ženke pacova su imale niže koncentracije 16:0, a povećanu 18:0 u PL jetre u poređenju sa mužjacima (186). Takođe, naš rezultat pokazuje da su ženke imale značajno višu vrednost procenjene aktivnosti elongaze 6 u odnosu na mužjake, što je dosledno literaturnim podacima. Naime, Marks i sar., navode da ženke imaju povećanu ekspresiju jetrine elongaze 6 u odnosu na mužjake, koja je izgleda posredovana polnim hormonima, a što je povezano sa polnim razlikama u sastavu MUFA. Kao posledica toga koncentracija PA je bila niža, a koncentracija SA je bila viša u PL jetre kod ženki pacova u poređenju sa mužjacima.

Takođe, Marks i sar., su pokazali da tretman progesteronom i 17 β -estradiolom povećava, dok testosteron smanjuje aktivost elongaze 6 (186). Uopšteno, rezultat ovog istraživanja pokazuje da primenjene hrane (obogaćena ribljim brašnom i mlekom u prahu) povećavaju stepen nezasićenosti masnih kiselina fosfolipida u membranama. Ujedno, time pozitivno utiču na fluidnost membrana.

Polne razlike u ekspresiji elongaze 6 i dokaz da je njena ekspresija regulisana estradiolom može imati implikacije na zdravlje ljudi i progresiju gojaznosti (186). Naši rezultati su pokazali da je kod mužjaka pacova hrana obogaćena mlekom u prahu smanjila procenat SFA, uglavnom zbog smanjenja SA (18:0). Isti rezultat je zabeležen u interventnoj studiji na zdravim muškarcima, gde je ishrana obogaćena visoko zasićenim MK u mlečnim mastima izmenila zastupljenost svih merenih SFA u membranama eritrocita, a samo je SA bila znatno niža (187). Različite studije su pokazale da dolazi do pomeranja ka nižoj 18:0, a višim 16:0, 16:1 n-7, 18:1 n-7, 18:1 n-9 kod mužjaka u odnosu na ženke (68, 69). Povećane koncentracije n-7 familije MUFA kod mužjaka takođe mogu biti povezane sa smanjenom ekspresijom elongaze 6 kod mužjaka kao i višim koncentracijama 16:0 i nižim 18:0 što može rezultirati u većem broju desaturacija 16:0 nego elongacija (111, 114). Elongaza 5 je obično uključena u elongaciju PUFA, ali je takođe poznato da ima afinitet za elongaciju 16:1 n-7 i viša ekspresija iRNK za elongazu 5 može biti objašnjenje za povećane nivoe n-7 MUFA primećene kod mužjaka. Marks i sar., su pretpostavili da mužjaci imaju veću ekspresiju SCD1 i posledično veće koncentracije MUFA u krvi i jetri nego ženke (186). Naši rezultati su pokazali da je aktivnost desaturaze 9 generalno veća kod mužjaka nego kod ženki. Ovo je u skladu sa rezultatima koji pre dijetarne intervencije pokazuju da ženke pacova imaju značajno niži procenat palmitoleinske (16:1 n-7) i oleinske (18:1 n-9) MUFA. Slično tome, Marks i sar. (186) su pokazali da ženke imaju značajno niže koncentracije MUFA u PL jetre i plazme što se može u velikoj meri pripisati razlikama u koncentracijama OA, ali ženke takođe pokazuju nižu palmitoleinsku kiselinu u fosfolipidima plazme kao i nižu VA (18:1 n-7) u fosfolipidima jetre. U našoj studiji, kod ženki hrana obogaćena mlekom u prahu podiže sadržaj OA, dok kod mužjaka ista hrana podiže ukupne MUFA. U studiji Poppitt i sar. (187) ishrana obogaćena visoko nezasićenim MK u mlečnim mastima podiže MUFA OA (18:1 n-9), što je u skladu sa našim rezultatima. Osim toga, nivo OA u krvi i tkivu više zavisi od endogenog

metabolizma nego od unosa hranom (188). Mnogi geni uključeni u biosintezu masnih kiselina, uključujući SCD1 i elongazu 6 su snažno regulisani gladovanjem i ponovnom ishranom. Glavni enzimski sistem koji reguliše nivo oleinske kiseline je delta 9 desturaza, i njena aktivnost zavisi od sledećih faktora: dijetarnih (unosa ugljenih hidrata), hormonskih (insulin) i načina života (fizička aktivnost). Ishrana bogata ugljenim hidratima i ishrana siromašna mastima može dovesti do povećanog uticaja endogene sinteze masnih kiselina na sastav MK u tkivima (186). Konkretno, proizvodnja palmitata je povećana što rezultira povećanom ugradnjom palmitata u lipide tkiva i povećanoj desaturaciji palmitata pomoću SCD1 uz nastajanje n-7 masnih kiselina. Sadržaj n-7 masnih kiselina u složenim lipidima raste sa potencijalnim smanjenjem masnih kiselina dobijenih isključivo iz ishrane (186).

Eksperimentalni dokazi ukazuju da hepatična *de novo* lipogeneza utiče na homeostazu insulina putem sinteze zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina. Unos SFA i MUFA hranom nije povezan sa rizikom od dijabetesa. Pokazano je kod životinja i *in vitro* modela da glavna SFA-palmitinska kiselina indukuje inflamaciju, stres endoplazmatičnog retikuluma i insulinsku rezistenciju. Slično, stearinska kiselina može podstaći gojaznost i insulinsku rezistenciju. Suprotno, oleinska kiselina može sprečiti palmitatom-izazvana metabolička oštećenja (189). Hrana obogaćena mlekom u prahu, podiže procentualni sadržaj OA kod ženki i procenat ukupnih MUFA kod mužjaka i time može da deluje protektivno. Konkretno, eksperimentalna i klinička ispitivanja su pokazala da OA dovodi do snižavanja ukupnog i LDL holesterola, kao i do porasta HDL holesterola (190). Takođe, smanjuje oksidaciju LDL čestica, delujući tako na izvestan način i kao antioksidativno sredstvo (191). Osim toga, kao jedinjenje membranskih fosfolipida, oleinska kiselina povećava fluidnost i transport kroz membranu.

U poređenju sa palmitinskom i stearinskom kiselinom, relativno malo se zna o metaboličkim efektima vakkenske kiseline (VA). Naši rezultati pokazuju da obe vrste hrane (obogaćena ribljim brašnom, odnosno mlekom u prahu) smanjuju procenat VA u fosfolipidima jetre kod ženki, dok kod mužjaka hrana obogaćena mlekom u prahu podiže sadržaj VA. Fiziološka uloga VA tek treba da bude rasvetljena.

Skorašnje studije su pokazale da VA može predstavljati potencijalni marker nekih oboljenja kao što je hronična bolest bubrega, hipertenzija ili srčana insuficijencija (192).

Ma i sar., (189) su pokazali da je VA u pozitivnoj korelaciji sa manjim rizikom od dijabetesa, za razliku od palmitinske i stearinske kiseline. Eksperimentalni dokazi sugerišu da VA može da posreduje u supresiji hepatične glukoneogenetske ekspresije gena i poboljša metabolizam glukoze (193). Elongaza 5 je glavni enzim za endogenu sintezu VA iz palmitoleinske kiseline (193).

Prema našim rezultatima, ženke pacova su imale niži udeo DGLA (20:3 n-6) u fosfolipidima jetre nego mušjaci na početku studije. Niža procentualna zastupljenost DGLA u fosfolipidima jetre ženki pacova je u saglasnosti sa rezultatima Onozato i sar., (194), koji ukazuju da mogu postojati polno-zasnovane razlike u proizvodnji ili metaboličkim procesima γ -linolenske kiseline (GLA, 18:3 n-6) i DGLA (20:3 n-6) kod ljudi. Na osnovu naših rezultata, kod ženki, hrana obogaćena ribljim brašnom i hrana obogaćena mlekom u prahu povećavaju sadržaj DGLA u odnosu na standardnu hranu. Ženke hranjene standardnom hranom imaju najnižu aktivnost desaturaze 6, ali unos hrane obogaćene ribljim brašnom i mlekom u prahu povećavao je njenu aktivnost skoro do nivoa izmerenih kod mužjaka. Jedan od najzanimljivijih, ali kontroverznih dijetetskih pristupa fokusiran je na raznolikoj funkciji DGLA (masna kiselina n-6 serije) kod antiinflamatornih i antiproliferativnih bolesti (195). DGLA je n-6 PUFA sa 20 ugljenikovih atoma, koja se *in vivo* sintetiše iz linolne kiseline, a zatim i metaboliše u različitim tkivima delta 6 desaturazom do GLA, koja se brzo elongira u DGLA. DGLA može biti konvertovana u AA, drugu n-6 PUFA sa 20 ugljenikovih atoma, dejstvom delta 5 desaturaze (195). Samo određena količina DGLA se konvertuje u AA, zbog ograničene aktivnosti delta 5 desaturaze kod glodara i ljudi (196). Ovi podaci pokazuju da se u mnogim tipovima ćelija, DGLA proizvod elongacije GLA, ali ne AA, akumulira posle suplementacije sa GLA. Povećanje DGLA u odnosu na AA može da ublaži biosintezu metabolita AA, tj. PG serije-2, LT serije-4 i faktora aktivacije trombocita (eng. platelet-activating factor, PAF) i ispoljava antiinflamatorno dejstvo kod ljudi (196). Istraživanja su potvrdila da je smanjen kapacitet konvertovanja LA u DGLA povezan sa različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima, uključujući starenje, dijabetes, alkoholizam, atopijski dermatitis, reumatoidni artritis, rak i kardiovaskularna oboljenja (197). Promene u sadržaju MK u ishrani mogu dovesti do modulacije funkcije membranskih receptora, interakcije između ćelija, aktivnosti pojedinih enzima, ćelijske signalizacije i proizvodnje eikozanoida (198). DGLA i AA su supstrati COX enzima.

Kroz niz slobodno radikalnih reakcija, COX metaboliše ETA i AA da formiraju različite biološki aktivne metabolite, prostaglandine serije 1 i 2 (PG1 i PG2). Za razliku od PG2, koje se generalno smatraju proinflatornim, PG1 ustvari poseduju antiinflamatorne i antikancerogene aktivnosti (199). PGE1, jedan oblik PG1, može da inhibira proliferaciju glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, smanji vaskularnu adheziju ćelija i ublaži razvoj ateroskleroze (200). Literaturni podaci ukazuju na to da bi viši udeo DGLA u fosfolipidima plazme mogao biti koristan za zdravlje ljudi. Naime, DGLA može biti konvertovana u prostaglandine iz serije-1 (PGE1) koji posreduju u procesima suzbijanja hronične inflamacije, vazodilatacije i snižavanja krvnog pritiska (200). Generalno, ovaj rezultat je pokazao da unos hrane obogaćene ribljim brašnom i mlekom u prahu povećava aktivnost desaturaze 6. Posledično povećana je procentualna zastupljenost DGLA u fosfolipidima jetre, što može imati pozitivne efekte na zdravlje.

Profil MK u tkivima delimično odražava ne samo unos masti putem hrane, već i metabolizam MK u organizmu (201). Najčešće konzumirane PUFA su linolna kiselina (LA) i α -linolenska kiselina (ALA) (175). Ove MK mogu biti konvertovane u više nezasićene masne kiseline dužeg lanca (175). Dugolančane PUFA (EPA i DHA) su uključene u regulaciju metabolizma lipida i transport lipida iz jetre ka tkivima (175). PUFA pokazuju imunomodulatornu aktivnost, a među njima je n-3 MK EPA iz ribljeg ulja najpotentnija (77). EPA inhibira oksidaciju AA ciklooksigenazom (COX). Riblja ulja koja su bogata n-3 PUFA preveniraju nekoliko bolesti uključujući aterosklerozu, hipertenziju i artritis (202). Proporcija sadržaja zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i PUFA masnih kiselina može uticati ne samo na konvertovanje ALA u EPA i DHA, već i na koncentracije inflamatornih markera i na profil lipida u plazmi (203). Literaturni podaci govore da su posebno PUFA iz hrane primetno efikasne u inhibiciji lipogeneze u jetri i snižavanju hipertrigliceridemije, n-3 MK su potentnije od n-6 lipida u ovom pogledu. Osim toga, PUFA iz hrane smanjuju ekspresiju gena koji kodiraju glikolitičke i lipogene regulatorne enzime u jetri (204). Deluju tako što ushodno regulišu ekspresiju gena koji kodiraju proteine uključene u oksidaciju MK, dok nishodno regulišu gene koji kodiraju proteine sinteze lipida (205). Sa druge strane, oleat (18:1 n-9) ili palmitat (16:0) i MK srednjeg lanca ne inhibiraju ni aktivnost niti ekspresiju lipogenih enzima (206). Promene u profilu MK u tretmanu hranom zavise od vrste ishrane, što ukazuje na to da količina masti ima veći uticaj na gojaznost i profil

MK od vrste konzumirane masti (181). Međutim, faktori kao što su starost i pol mogu takođe uticati na nivoe inkorporacije EPA i DHA (102).

U našoj studiji generalno, najizraženiji uticaj različitih vrsta hrane je zabeležen kod PUFA. Preciznije, hrane obogaćene mlekom u prahu i ribljim brašnom izazivaju uglavnom suprotan efekat. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na, značajan modulatorni uticaj hrane obogaćene mlekom u prahu na procentualnu zastupljenost pojedinačnih PUFA u fosfolipidima jetre. Kod mužjaka, standardna hrana obogaćena mlekom u prahu snižava EPA (20:5 n-3), DHA (22:6 n-3) i ukupne n-3, a povećava LA (18:2 n-6), DTA (22:4 n-6), n-6 i odnos n-6/n-3 u poređenju sa standardnom i hranom obogaćenom ribljim brašnom. Za razliku od hrane obogaćene mlekom u prahu, hrana obogaćena ribljim brašnom povećava procentualnu zastupljenost DHA samo kod mužjaka. Slično našim rezultatima Poppitt i sar. (187), su zabeležili smanjenje procenta ukupnih n-3, EPA i DHA u fosfolipidima eritrocita kod ljudi na ishrani obogaćenoj mlečnim mastima. Sa druge strane, u studiji Oarada i sar. (207) nakon unosa EPA i DHA, zastupljenost ovih masnih kiselina se povećala u fosfolipidima plazme kod mužjaka miševa, dok su AA (20:4 n-6) i odnos n-6/n-3 bili smanjeni. Takođe, tretman ribljim uljem povećava procenat ukupnih n-3, EPA, DPA (22:5 n-3) i LA, a smanjuje ukupne n-6, AA i odnos n-6/n-3 u fosfolipidima jetre kod mladih i starih pacova Wistar soja (178, 208). Naše ženke pacova hranjene hranom obogaćenom ribljim brašnom pokazuju povećanje procenta ukupnih n-3 PUFA i smanjenje procenta ukupnih n-6 PUFA i odnosa n-6/n-3 u fosfolipidima jetre. U pogledu individualnih masnih kiselina, primećeno je smanjenje sadržaja n-6 PUFA LA i AA i povećanje sadržaja n-3, EPA, DPA i DHA u fosfolipidima jetre. Povećanje sadržaja EPA uprkos smanjenoj aktivnosti $\Delta 5$ desaturaze kod ženki hranjenih standardnom hranom obogaćenom ribljim brašnom, najverovatnije dolazi zbog značajne količine EPA u hrani koja sadrži riblje brašno. Značajne polno zavisne promene su primećene u koncentracijama LA, EPA, DPA i ukupnih dugolančanih n-3 PUFA fosfatidil holina u plazmi nakon tretmana ribljim uljem ljudi sa značajnim doznim odgovorom na riblje ulje koji je evidentiran samo kod žena (209). Zanimljivo Walker i sar. (210) su identifikovali male polne razlike u inkorporaciji EPA i DHA, nakon suplementacije, u različitim klasama lipida plazme, ćelija i tkiva. Studija Poudyal i sar., je isptivala nezavisne efekte ALA, EPA i DHA na tkiva kod pacova hranjenih visokokaloričnom dijetom i svaka pojedinačna n-3 PUFA

smanjuje inflamaciju u srcu i jetri, kao i srčanu fibrozu i steatozu jetre. Ovi efekti su povezani sa kompletnom supresijom aktivnosti (Scd-1), markera koji je umešan u kardiovaskularne bolesti, insulinsku rezistenciju i gojaznost (211). Efekti pola na sastav MK tkiva mogu biti delom zbog razlika u specifičnosti metabolizma lipida u pojedinačnim tkivima kao i usled različitog snabdevanja MK iz ishrane. Efekti pola menjaju uticaj dijetarnog unosa MK i količine konzumirane masti na sastav PL i triacilglicerola jetre (101).

Uopšteno, poznato je da n-6 PUFA uzrokuju zapaljenske procese, tako što deluju kao prekursori inflamatornih faktora i ushodni regulatori različitih gena koji su uključeni u inflamatornu signalizaciju (17). Tačnije, arahidonska kiselina (AA), prisutna u različitim tkivima, može biti konvertovana u proinflamatorne eikozanoide koji su povezani sa inflamatornim procesima i nekim hroničnim bolestima. Takođe, veći odnos n-6/n-3 ometa strukturu i funkcionisane ćelijskih membrana (17). Linolna kiselina može da smanji desaturaciju n-3 PUFA, i samim tim redukuje njihov sadržaj u PL membrane (212). Nasuprot tome, n-3, a posebno EPA i DHA su kompetitivni supstrati za iste enzime kao i AA, oni anagonizuju proinflamatorne efekte n-6 (17). Osim što je prekursor antiinflamatornih faktora, EPA delimično blokira konvertovanje AA i DTA do štetnih eikozanoida i smanjuje kardiovaskularni rizik i rast tumora (92). DHA deluje preventivno kod Alchajmerove bolesti i nekih vrsta demencije (213). Nekoliko studija je pokazalo obrnutu korelaciju između ukupnih n-3 u fosfolipidima seruma ili plazme i kardiovaskularnog rizika i ateroskleroze (214, 215). Uzimajući u obzir sve navedeno, smanjena procentualna zastupljenost EPA i DHA i povišen odnos n-6/n-3 u fosfolipidima jetre mužjaka hranjenih hranom obogaćenom mlekom u prahu, navelo je na pretpostavku o eventualnoj većoj podložnosti upalama i ranjivosti ćelija mužjaka na pomenutoj ishrani. Obrnuto, povišen udeo dugolančanih n-3 PUFA i snižen odnos n-6/n-3 kod ženki hranjenih hranom obogaćenom ribljim brašnom govori u prilog poboljšanom profilu masnih kiselina i mogućim zdravstvenim benefitima na pomenutoj ishrani.

Budući da hemijski sastav hrane bitno menja procenat individualnih masnih kiselina u PL jetre, značaj ovih promena za sastav masnih kiselina za različite vrste hrane testiran je kanonijskom diskriminacionom analizom. Kanonijska diskriminaciona analiza poredi ukupan sastav i individualni odnos varijabli i kanonijskom diskriminacionom funkcijom

procenjuje značaj posmatranih razlika u ukupnom zbiru masnih kiselina i njihovim odnosima. Kanonijska diskriminaciona analiza je pokazala da masne kiseline koje su najviše doprinele razlici su palmitinska, oleinska, DGLA, AA, EPA, DTA, DPA i DHA. Za dalje analize, masne kiseline su podeljene na: 1) SFA i MUFA, i 2) PUFA. Kada su SFA i MUFA razmotrene (grafik 8), sve analizirane masne kiseline doprinele su razlici u sastavu. U kanonijskom prostoru analizirane grupe su značajno udaljene osim MS i MRB. To znači da efekti ove dve vrste hrane nisu značajno različite u pogledu sastava masnih kiselina kod mužjaka. Nadalje, sastav masnih kiselina kod ženki razlikuje se od onog kod mužjaka. Slični rezultati su dobijeni kada su PUFA uzete u obzir, iako razlika između mužjaka i ženki nije toliko očigledna u pogledu položaja u kanonijskom prostoru.

Primećene su polne razlike u sastavu masnih kiselina PL u jetri pacova, a rezultati su pokazali da ove početne razlike mogu biti značajno modulirane vrstom hrane. Osim toga, modulatorni efekti hrane obogaćene mlekom u prahu i ribljim brašnom na profil masnih kiselina fosfolipida jetre su polno specifični. Kada se posmatraju MK fosfolipida jetre, MK koje najviše doprinose razlici su: PA, OA, DGLA, AA, EPA, DTA, DPA i DHA. S obzirom na vrstu hrane, hrana obogaćena ribljim brašnom ispoljava povoljniji odgovor u vezi sastava individualnih masnih kiselina, sa izraženijim efektima kod ženki koji ukazuju da bi polne razlike trebalo uzeti u obzir za preporuke u ljudskoj ishrani.

U ovoj studiji, ispitivani su i efekti standardne hrane, hrane obogaćene ribljim brašnom i hrane obogaćene mlekom u prahu na lipidnu peroksidaciju i aktivnost antioksidativnih enzima u jetri ženki Wistar pacova. Kao rezultat toga, nađene su značajno veće aktivnosti GPx i CAT u grupi koja je tretirana hranom obogaćenom ribljim brašnom, u odnosu na druge dve, kontrolnu grupu i grupu koja je konzumirala hranu obogaćenu mlekom u prahu. Iako u poređenju sa kontrolnom grupom, hrana obogaćena mlekom u prahu nije pokazala efekte na merene parametre, primećene su neke značajne korelacije u ovoj grupi. Endogena antioksidativna odbrana uključuje neenzimske molekule niske i visoke molekulske mase i enzimska jedinjenja kao što su SOD, CAT i GPx, koja vrše neutralizaciju reaktivnih vrsta kiseonika: superoksid anjon radikala i vodonik peroksida. Naši rezultati idu u prilog sugestijama da bi omega-3 masne kiseline mogle da unaprede enzimsku antioksidativnu odbranu (216). Studija koja je istraživala efekte dodatka

ribljeg ulja ishrani tokom 30 dana kod mužjaka Wistar pacova otkrila je značajno povećanje aktivnosti CAT u eritrocitima tretiranih životinja (136). Takođe, suplementacija ribljim uljem povećala je aktivnost GPx i SOD kod astmatičnih pacova (163), i podigla CAT aktivnost u animalnom modelu nefrotoksičnosti (162). Nadalje, tretman omega-3 MK doveo do povećanja količine glutationa i aktivnosti GPx u mrežnjači kod pacova kojima je streptozotocinom indukovana dijabetes (137). Iako konzumiranje ribe i hrane obogaćene ribljim brašnom kao dijetetskih antioksidanasa tek treba da bude uspostavljeno, prijavljena je njihova uloga u hvatanju slobodnih radikala, smanjenju aktivnosti NADPH oksidaze (217) kao i u procesima povećanja ekspresije iRNK antioksidantnih enzima (218).

U poređenju sa drugim hranljivim uljima, suplementacija uljima bogatim omega-3 MK EPA i DHA povećava aktivnost SOD i GPx kod zdravih ženki pacova (219). U našoj studiji, pored ispitivanja aktivnosti antioksidativnih enzima, takođe je izmerena stopa lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija dovodi do formiranja različitih proizvoda, među kojima se izoprostani i aldehidi najčešće koriste kao pokazatelji oksidativnog oštećenja lipida (220). Izmerena koncentracija tiobarbiturna kiselina reaktivnih supstanci (TBARS) je direktno proporcionalna stepenu oštećenja lipida (221).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da unos hrane obogaćene ribljim brašnom, odnosno mlekom u prahu, nema značajnog uticaja na količinu TBARS, stepen lipidne peroksidacije. Slično, pojedini autori su prijavili nedostatak efekta omega-3 PUFA na lipidnu peroksidaciju kod pacova (219). Suplementacija ribljim uljem u trajanju od 13 nedelja nije izazvala nikakve značajne promene u nivou lipidne peroksidacije u jetri kod ženki pacova, u odnosu na ishranu obogaćenu uljem soje i lana (219). Međutim, ovo nije iznenađujuće s obzirom na dvosmislene podatke iz literature, posebno o uticaju unosa ribe na lipidnu peroksidaciju (134, 135, 136, 137, 162). Pošto su dvostruke veze glavne mete napada slobodnih radikala, PUFA su najviše sklone lipidnoj peroksidaciji. Prema tome, može se očekivati da veći unos ribe i ribljih proizvoda, koji su bogati omega-3 PUFA može dovesti do povećanja nivoa lipidne peroksidacije (134, 135). S tim u vezi, neki autori su pokazali povećanje količine TBARS u plazmi kod ljudi posle dugotrajnog konzumiranja omega-3 MK (134, 135). Suprotno, redukujući efekat omega-3 MK i ribljeg ulja na povećanje nivoa TBARS je prijavljen kod dijabetičnih pacova i modela pacova uranil nitrat indukovane nefrotoksičnosti (137, 162).

Pored toga, 30 dana duga suplementacija sa ribljim uljem smanjila je serumski nivo lipidne peroksidacije kod zdravih mužjaka Wistar pacova (136).

Suplementacija ribljim uljem je smanjila stopu lipidne peroksidacije (MDA) kod mladih i starih pacova. Sarsilmaz i sar., su pokazali da je tretman n-3 MK smanjio lipidnu peroksidaciju u *corpus striatum* kod pacova (222). Ispitivanja Hsu i sar., su pokazala da suplementacija n-3 PUFA nije imala efekte na lipidnu peroksidaciju membrane, ali je imala pozitivan uticaj na koncentraciju glutationa i aktivnost antioksidativnih enzima (223). Visoko reaktivni primarni intermedijeri se javljaju tokom lipidne peroksidacije. Njihova degradacija dovodi do nastanka aldehida, koji reaguju sa amino grupama proteina menjajući njihove strukturne i funkcionalne osobine (224, 222). Suplementacija ribljim uljem može povećati antioksidativnu odbranu i smanjiti lipidnu peroksidaciju (224).

U našoj studiji primećeno je smanjenje količine TBARS u tkivu jetre, kod pacova hranjenih hranom obogaćenom mlekom u prahu u poređenju sa kontrolnom grupom i grupom koja je konzumirala hranu obogaćenu ribljim brašnom. Razlike nisu bile statistički značajne. Osim toga, nije nađen značajan uticaj hrane obogaćene mlekom u prahu na aktivnost antioksidativnih enzima u jetri pacova.

Iako nismo našli nikakav uticaj hrane obogaćene mlekom u prahu na oksidativni status, zabeležili smo značajne pozitivne korelacije između količine TBARS i aktivnosti oba i GPx i CAT, što ukazuje da niža stopa lipidne peroksidacije je praćena smanjenom aktivnošću antioksidativnih enzima. To je u skladu sa rezultatima koji se odnose na smanjenje aktivnosti GPx i CAT u grupi koja je hranjena hranom obogaćenom mlekom u prahu u odnosu na grupu koja je hranjena hranom obogaćenom ribljim brašnom. Upoređujući količinu TBARS u ove dve grupe, lipidna peroksidacija je viša u grupi koja je hranjena hranom obogaćenom ribljim brašnom. Povećana stopa lipidne peroksidacije može poslužiti kao okidač za poboljšanu antioksidativnu odbranu organizma, uključujući i antioksidativne enzime. S druge strane, nedostatak efekta antioksidativnih enzima u grupi koja je hranjena mlekom u prahu može se objasniti nižim nivoom lipidne peroksidacije u ovoj grupi. U skladu sa prethodnim nalazima, takođe su pronađene značajne korelacije između aktivnosti GPx i CAT kod kontrolne i grupe hranjene standardnom hranom obogaćenom mlekom u prahu.

Pored toga što je veoma hranljiva, novije studije pokazuju da mleko i mlečni proizvodi takođe služe kao dodaci ishrani sa pozitivnim efektima na zdravlje. Ovo se uglanom odnosi na njihove sastojke, MK, proteine i mikroelemente, kao što su vitamin A i E, koji su poznati po svojim antioksidativnim svojstvima (159). Pored toga, novi nalazi ukazuju da mlečni proteini i njihovi proizvodi razlaganja skupljaju slobodne radikale i heliraju metale, i tako učestvuju u zaštiti od oksidativnog stresa (225, 226). Antioksidativna svojstva mleka i mlečnih proizvoda tek treba da budu dalje evaluirna *in vivo* kod životinja i ljudi. Jedna od retkih studija koje su sprovedene na pacovima ispitala je uticaj unosa hlebova obogaćenih mlekom u prahu tokom dve nedelje. Tom prilikom je ustanovljena veća aktivnost CAT u grupama hranjenim hlebovima koji sadrže, između ostalih jedinjenja, mleko u prahu, u odnosu na grupu koja je hranjena samo belim hlebom (141). Osim toga, ishrana obogaćena proteinima surutke, značajno povećava ukupni antioksidativni kapacitet u plazmi, koncentraciju SOD i glutation i smanjuje lipidnu peroksidaciju kod negojaznih insulin rezistentnih pacova (139). Proteini surutke takođe ublažavaju posledice opterećenja gvoždem na oksidativna oštećenja kod mužjaka pacova, što je ispoljeno kao povećanje ukupne antioksidativne odbrane i smanjenje nivoa lipidne peroksidacije (140).

Na osnovu predstavljenih rezultata koji su podržani dostupnim podacima iz literature, možemo zaključiti da unos ribe i hrane obogaćene ribom može da poboljša oksidativni status povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima jetre. Suprotno tome, nismo dobili nikakve efekte u korist tvrdnje da mleko može poslužiti kao dobar izvor novih antioksidanata.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije ukazuju na efekte hrane obogaćene ribljim brašnom, odnosno mlekom u prahu, na biohemijske parametre u krvi, masnokiselinske profile fosfolipida jetre i parametre oksidativnog stresa u jetri pacova Wistar soja. U skladu sa postavljenim ciljevima i na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- **Efekti ispitivane hrane na biohemijske parametre**

1. Efekti različitih vrsta hrane na biohemijske parametare krvi, pokazali su sledeće:

Unos hrane obogaćene ribljim brašnom nema značajne efekte na aktivnost ALT i AST u plazmi kod oba pola. Sa druge strane, unos hrane obogaćene mlekom u prahu značajno povećava aktivnost ALT i AST u plazmi kod mužjaka u odnosu na standardnu hranu.

Uopšteno, hrana obogaćena ribljim brašnom i pol nisu dali efekat na aktivnost enzima jetre. Povećanje aktivnosti ALT i AST enzima kod mužjaka može biti posledica adaptacije na promenu hrane.

Kod ženki, hrana obogaćena mlekom u prahu povećava koncentraciju HDL holesterola u plazmi, u odnosu na kontrolu. Standardna hrana obogaćena ribljim brašnom snižava koncentraciju TG plazme.

Kod mužjaka, oba tipa hrane snižavaju koncentraciju LDL i povećavaju koncentraciju HDL holesterola u plazmi, u odnosu na standardnu hranu. Standardna hrana obogaćena mlekom u prahu povećava koncentraciju TG plazme.

Oba tipa hrane (obogaćena ribljim brašnom i mlekom u prahu) su uticala na povećanje koncentracije HDL holesterola kod oba pola, nezavisno od startnih razlika. Takođe, oba tipa hrane su imala pozitivan efekat na profil lipida plazme, kod mužjaka jer snižavaju koncentraciju LDL. Dodatno, kod ženki hrana obogaćena ribljim brašnom snižava TG.

- **Efekti ispitivane hrane na masnokiselinske profile fosfolipida jetre**

2. *Uticao na profile ukupnih masnih kiselina u fosfolipidima jetre:*

Hrana obogaćena mlekom u prahu u fosfolipidima jetre snižava sadržaj SFA i povećava udeo MUFA (efekat hrane) kod mužjaka (efekat pola i interakcija P x H), i PUFA, kod ženki (efekat pola i efekat hrane) u odnosu na standardnu hranu. Uopšteno, ovaj rezultat pokazuje da primenjene hrane (obogaćena ribljim brašnom i mlekom u prahu) povećavaju stepen nezasićenosti masnih kiselina fosfolipida u membranama. Ujedno, time pozitivno utiču na fluidnost membrana.

3. *Uticao na profile pojedinačnih masnih kiselina, na ukupne n-3 i n-6 i n-6/n-3 odnos u fosfolipidima jetre:*

Inicijalno u fosfolipidima jetre, ženke imaju nižu procentualnu zastupljenost palmitinske, palmitoleinske i oleinske kiseline i DGLA kao i povećan udeo stearinske kiseline u odnosu na mužjake (značajnost efekta pola). Međutim, manipulacija tipom hrane je dovela do različitih promena kod oba pola (efekat P x H).

Kod ženki hrana obogaćena mlekom u prahu povećava sadržaj oleinske kiseline, u fosfolipidima jetre (značajnost efekta hrane i interakcija P x H). Hrana obogaćena mlekom u prahu, podiže aktivnost desaturaze 9 u poređenju sa drugim vrstama hrane (efekat hrane). Takođe, hrana obogaćena mlekom u prahu, podiže sadržaj OA time može da deluje protektivno. Tačnije, oleinska kiselina kao jedinjenje membranskih fosfolipida, povećava fluidnost i transport kroz membranu.

Sa druge strane, u fosfolipidima jetre mužjaka, hrana obogaćena mlekom u prahu podiže udeo vakcenske i linolne kiseline u odnosu na druge dve vrste hrane. Takođe, standardna hrana obogaćena mlekom snižava procentualnu zastupljenost stearinske kiseline kod mužjaka (značajnost efekta hrane i interakcija P x H). Hrana obogaćena mlekom u prahu, podiže udeo ukupnih MUFA i time može da deluje protektivno. Dvofaktorska analiza varijanse pokazuje da je aktivnost desaturaze 9 veća kod mužjaka nego kod ženki (efekat pola). Kao i kod suprotnog pola, hrana obogaćena mlekom u prahu, podiže njenu aktivnost u poređenju sa drugim vrstama hrane (efekat hrane). Takođe, hrana obogaćena mlekom u prahu svojim masnokoselinskim sastavom, tačnije

visokom procentualnom zastupljenošću linolne kiseline, utiče na povećan udeo ove MK u jetri mužjaka.

U fosfolipidima jetre ženki, standardna hrana obogaćena ribljim brašnom i mlekom u prahu povećava sadržaj DGLA u poređenju sa standardnom hranom. Standardna hrana obogaćena ribljim brašnom snižava sadržaj AA i povećava procentualnu zastupljenost EPA, DPA i DHA u odnosu na standardnu hranu. Kod istog pola u fosfolipidima jetre, hrana obogaćena ribljim brašnom povećava procenat ukupnih n-3, smanjuje procenat ukupnih n-6 i odnos n-6/n-3 u poređenju sa standardnom i hranom koja je obogaćena mlekom (efekat ishrane, i P x H efekat).

Generalno, ovaj rezultat je pokazao da unos hrane obogaćene ribljim brašnom i mlekom u prahu povećava aktivnost desaturaze 6. Posledično povećana je procentualna zastupljenost DGLA u fosfolipidima jetre, što može imati pozitivne efekte na zdravlje. Takođe, povišen udeo dugolančanih n-3 PUFA i snižen odnos n-6/n-3 kod ženki hranjenih hranom obogaćenom ribljim brašnom govori u prilog poboljšanom profilu masnih kiselina u fosfolipidima jetre i mogućim zdravstvenim benefitima na pomenutoj ishrani.

U fosfolipidima jetre mužjaka, standardna hrana obogaćena mlekom snižava procenat EPA i DHA i povećava procenat DTA u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, standardna hrana obogaćena ribljim brašnom povećava samo procenat DHA u fosfolipidima jetre u odnosu na standardnu hranu. Hrana obogaćena mlekom smanjuje procenat ukupnih n-3, i povećava procenat ukupnih n-6 i odnos n-6/n-3 kod mužjaka u odnosu na druge vrste hrane. Uzimajući u obzir sve navedeno, smanjena procentualna zastupljenost EPA i DHA i povišen odnos n-6/n-3 u fosfolipidima jetre mužjaka hranjenih hranom obogaćenom mlekom u prahu, navodi na pretpostavku o eventualnoj većoj podložnosti upalama i ranjivosti ćelija mužjaka na pomenutoj ishrani.

- **Efekti različitih vrsta hrane na aktivnost antioksidativnih enzima u tkivu jetre kod ženki pacova:**

4. Efekti na aktivnosti antioksidativnih enzima

Otkrivene su statistički značajno veće aktivnosti GPx i CAT u tkivima pacova koji su hranjeni standardnom hranom obogaćenom ribljim brašnom u odnosu na kontrolnu i grupu koja je hranjena standardnom hranom obogaćenom mlekom u prahu.

5. Korelacija između merenih parametara

Većina značajnih korelacija je pronađena u grupi životinja koje su hranjene hranom obogaćenom mlekom u prahu. U ovoj grupi, značajna je korelacija između TBARS i enzima GPx i CAT. Pored toga, pronađena je značajna korelacija između aktivnosti GPx i CAT. Takođe u kontrolnoj grupi postoji značajna korelaciju između GPx i CAT aktivnosti.

7. LITERATURA

1. Stipanuk MH. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. W.B. Saunders Company 2000.
2. Borgstrom B. Luminal digestion of fats. In: The Exocrine Pancreas. Raven Press, New York 1986.
3. Zec M, Debeljak Martačić J, Ranković S, Pokimica B, Tomić M, Ignjatović Đ, Glibetić M, Popović T. Effects of aronia melanocarpa juice on plasma and liver phospholipid fatty acid composition in Wistar rats. *Acta Veterinaria-Beograd*. 2017;67(1):107-120.
4. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, Haldorssoni T, Riserus U, Uusitupa M, Becker W. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food Nutr Res*. 2014;58:10.3402/fnr.v58.25145
5. Siddiqui RA, Shaikh SR, Sech LA, Yount HR, Stillwell W, Zaloga GP. Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev Med Chem*. 2004;4(8):859-71.
6. Taha AY, Cheon Y, Faurot KF, Macintosh B, Majchrzak-Hong SF, Mann JD, Hibbeln JR, Ringel A, Ramsden CE. Dietary omega-6 fatty acid lowering increases bioavailability of omega-3 polyunsaturated fatty acids in human plasma lipid pools. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2014;90:151–157.
7. Futerman AH, Ghidoni R, and van Meer G. Lipids: regulatory functions in membrane traffic and cell development. Kfar Blum Kibbutz Guest House, Galilee, Israel, May 10-15, 1998. *EMBO J*. 1998;17(23):6772-5.
8. Topisirović Lj, Fira Đ, Lozo J. Dinamička biohemija. 2-izd.-Beograd: Biološki fakultet, 2016 (Beograd: Alta Nova).
9. Da Costa THM, Ito MK. Phospholipids Physiology. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second edition)*, 2003. Academic Press. Elsevier Science Ltd.
10. Mayers PA. Fosfolipidi. U: Harperov pregled biohemije (Martin DW, Mayers P, Rodwelev V, Gronner D, et al.) Savremena administracija, Beograd. 1989;226-228.

11. Lapasata M. Fatty acids—Biochemistry to clinical significant. *Am J Clin Pathol.* 1995;104:172-179.
12. Yerram NR, Moore SA, Spector AA. Eicosapentaenoic acid metabolism in brain microvesel endothelium. Effect on prostaglandin formation. *J Lipid Res.* 1989;30:1747-1757.
13. Ghosh S, Strum JC, Bell RM. Lipid biochemistry. Function of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *FASEB J.* 1997;11:45-50.
14. Avorago DA, Bitoldo G, Gazzolato G. Phospholipids in Human Atherosclerosis. In: *Drugs affecting lipid metabolism* (Paoletti R, ed) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1987;407-409.
15. Nikkari T, Luukkainen P, Pietinen P, Puska P. Fatty acids composition of serum lipid fraction in relation to gender and quality of dietaty fat. *Ann Med.* 1995;27:491-498.
16. Clifton PM, Nestel PJ. Relationship between plasma insulin and erythrocyte fatty composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998;59:191-194.
17. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008;47:147–155.
18. Feller SE, Gawrisch K. Properties of docosahexaenoic-acid-containing lipids and their influence on the function of rhodopsin. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(4):416–22.
19. Rajamoorthi K, Petrache HI, McIntosh TJ, Brown MF. Packing and viscoelasticity of polyunsaturated omega-3 and omega-6 lipid bilayers as seen by (2)H NMR and X-ray diffraction. *J Am Chem Soc.* 2005;127(5):1576–88.
20. Simons K, Vaz WL. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2004;33:269–95.
21. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 2010;327:46–50.
22. Johnson ML, Lalia AZ, Dasari S, Pallauf M, Fitch M, Hellerstein MK, Lanza IR. Eicosapentaenoic acid but not docosahexaenoic acid restores skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity in old mice. *Aging Cell.* 2015;14:734–743.

23. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The nomenclature of lipids: recommendations, 1976. *Eur J Biochem* 1977;79:11–21.
24. Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem*. 2010;21(9):781–92.
25. Stubbs CD & Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta*. 1984;779:89–137.
26. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr Rev*. 2004;62:333–339.
27. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1505s–1519s.
28. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*. 2001;2:612–619.
29. Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, Ames BN. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem*. 1997;245:161–166.
30. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acid in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:438–63.
31. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B and Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2008;92(3):272–83.
32. Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res*. 2003;42:289–317.
33. Patel MS, Owen OE, Goldman LI, Hanson RW. Fatty acid synthesis by human adipose tissue. *Metabolism*. 1975;24:161–173.
34. Pullen DL, Liesman JS, Emery RS. A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *J Anim Sci*. 1990;68:1395–1399.
35. Bergen WG, Mersmann HJ. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *J Nutr*. 2005;135:2499–2502.

36. Wiegman CH, Bandsma RH, Ouwens M, van der Sluijs FH, Havinga R, Boer T, Reijngoud DJ, Romijn JA, 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.
37. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004;86:839–848.
38. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486:1–17.
39. Brindle NP, Zammit VA, Pogson CI. Regulation of carnitinepalmitoyltransferase 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.
40. Rege RV. Adverse effects of biliary obstruction: Implications for treatment of patients with obstructive jaundice. *AJR*. 1995;164:287-293.
41. German JB. Butyric acid: a role in cancer prevention. *Nurt Bull*. 1999; 24:293-299.
42. Thormar H, Isaacs CE, Kim KS, Brown HR. Inactivation of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;724: 465-471.
43. Sun CQ, O'Connor CJ, Robertson AM. The antimicrobial properties of milk fat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chem Biol Interact*. 2002;140:185-198.
44. Petrovic S, Arsic A. Fatty Acids: Fatty Acids. In: Caballero B, Finglas P, and Toldrá F. (eds.) *The Encyclopedia of Food and Health* vol. 2, 2016; pp. 623-631. Oxford: Academic Press.
45. Evans LM, Cowey SL, Siegal GP, Hardy RW. Stearate preferentially induces apoptosis in human breast cancer cells. *Nutr Cancer*. 2009;61:746-753.
46. Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nälsén C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson L-B, Storlien LH. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women. *Diabetologia*. 2001;44:312-319.

47. van Gelder BM, Tijhuis M, Kalmijn S, Kromhout D. Fish consumption, n-3 fatty acids, and subsequent 5-y cognitive decline in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:1142-1147.
48. Zock PL: Health problems associated with saturated and trans fatty acids intake. In *Improving the Fat Content of Foods*; Williams, C.M., Buttriss, J., Eds.; Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, UK, 2006; pp. 3-24.
49. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1146-1155.
50. Nugent AP. The metabolic syndrome. *Nutr Bull.* 2004;29:36-43.
51. Feskens EJM, Virtanen SM, Rasanen L, Tuomilehto J, Stengard J, Pekkanen J, Nissinen A, Kromhout DA. 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care.* 1995;18:1104-1112.
52. Givens DI, Kliem KE: Improving the nutritional quality of milk. In *Functional and Speciality Beverage Technology*; Paquin, P., Ed.; Woodhead Publishing Ltd.: Cambridge, UK, 2009; p. 135.
53. Parodi PW. Milk fat in human nutrition. *Aust J Dairy Technol.* 2004;59:3-59.
54. Kergoat M, C Gespach, G Rosselin and B Portha. Evaluation of in Vivo Insulin Action and Glucose Metabolism in Milk-Fed Rats. *Bioscience Reports.* 1992;12:273-280.
55. Elwood PC, Givens DI, Beswick AD, Fehily AM, Pickering JE, Gallacher J. The survival advantage of milk and dairy consumption: An overview of evidence from cohort studies of vascular diseases, diabetes and cancer. *J Am Coll Nutr.* 2008;27:723S-734S.
56. Givens DI, Minihane AM: Dairy products: their role in the diet and effects on cardiovascular disease. In *Fatty Acids in Health Promotion and Disease Causation*; Watson, R.R., Ed.; AOCS Publications: Urbana, USA, 2009; p. 865.
57. Tremblay A, Gilbert JA. Milk products, insulin resistance syndrome and type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr.* 2009;28Suppl 1:91S-102S.
58. Fumeron F, Lamri A, Abi Khalil C, Jaziri R, Porchay-Baldérelli I, Lantieri O, et al. Dairy consumption and the incidence of hyperglycemia and the metabolic syndrome:

results from a french prospective study, Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care*. 2011;34:813-7.

59. Kwon HT, Lee CM, Park JH, Ko JA, Seong EJ, Park MS, et al. Milk intake and its association with metabolic syndrome in Korean: analysis of the third Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES III). *J Korean Med Sci*. 2010;25:1473-9.

60. Schwingshackl L, Hoffmann G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis*. 2014;13:154.

61. Haug A, Hallaq H, Leaf A. Potential antiatherogenic effect of omega-3 fatty acids In: Neri Seneri SS, Gensini GF, Abbate R, Prisco D, editors, *Thrombosis, an update*, Scientific press, Florence, 1992;361-372.

62. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2003;77:1146-1155.

63. Baum SJ, Kris-Etherton PM, Willett WC, Lichtenstein AH, Rudel LL, Maki KC, Whelan J, Ramsden CE, Block RC. Fatty acids in cardiovascular health and disease: a comprehensive update. *J Clin Lipidol*. 2012;6:216–234.

64. Flowers MT, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:85–91.

65. Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi J. Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. *J Lipid Res*. 2006;47:1928–1939.

66. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J Lipid Res*. 2001;42:1018–1024.

67. Marangoni F, Colombo C, Martiello A, Negri E, Galli C. The fatty acid profiles in a drop of blood from a fingertip correlate with physiological, dietary and lifestyle parameters in volunteers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007;76:87–92.

68. Burdge GC, Slater-Jefferies JL, Grant RA, Chung WS, West AL, Lillycrop KA, Hanson MA, Calder PC. Sex, but not maternal protein or folic acid intake, determines

the fatty acid composition of hepatic phospholipids, but not of triacylglycerol, in adult rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008;78:73–79.

69. Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Lavielle M, Alessandri JM. Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion. *J Nutr Biochem*. 2010;21(3):180–187.

70. Paton CM, Ntambi JM: Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E28–E37.

71. Miyazaki M, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;68:113–121.

72. Garcia-Serrano S, Moreno-Santos I, Garrido-Sanchez L, Gutierrez-Repiso C, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Rivas-Marin J, Gallego-Perales JL, Garcia-Escobar E, Rojo-Martinez G, Tinahones F, Soriguer F, Macias-Gonzalez M, Garcia-Fuentes E. Stearoyl-CoA desaturase-1 is associated with insulin resistance in morbidly obese subjects. *Mol Med*. 2011;17:273–280.

73. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:11482–11486.

74. Marszalek JR, Lodish HF. Docosahexaenoic acid, fatty acid–interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:633–57.

75. Plourde M, Cunnane SC. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(4):619–34.

76. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*. 2003; 38:343–352.

77. Popovic T, Ranic M, Bulajic P, Milicevic M, Arsic A, Vucic V, Glibetic M. Effects of n-3 fatty acids supplementation on plasma phospholipids fatty acid composition in patients with obstructive jaundice- a pilot study. *J Clin Biochem Nutr*. 2009;45:370–5.

78. Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH & Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*. 2001;40:1–94.

79. Yi Xu, Steven Y. Qian. Anti-cancer activities of ω -6 polyunsaturated fatty acids. *Biomed J.* 2014;37:112-119.
80. Li S, Zhao X, Wu Z, Li Y, Zhu L, Cui B, et al. Polymorphisms in arachidonic acid metabolism-related genes and the risk and prognosis of colorectal cancer. *Fam Cancer.* 2013;12:755-65.
81. Pender-Cudlip MC, Krag KJ, Martini D, Yu J, Guidi A, Skinner SS, et al. Delta-6-desaturase activity and arachidonic acid synthesis are increased in human breast cancer tissue. *Cancer Sci.* 2013;104:760-4.
82. Sakai M, Kakutani S, Horikawa C, Tokuda H, Kawashima H, Shibata H, et al. Arachidonic acid and cancer risk: A systematic review of observational studies. *BMC Cancer.* 2012;12:606.
83. Yang P, Cartwright CA, Li J, Wen S, Prokhorova IN, Shureiqi I, et al. Arachidonic acid metabolism in human prostate cancer. *Int J Oncol.* 2012;41:1495-503.
84. Leaver HA, Bell HS, Rizzo MT, Ironside JW, Gregor A, Wharton SB, et al. Antitumour and pro-apoptotic actions of highly unsaturated fatty acids in glioma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66:19-29.
85. Das UN. Tumoricidal and anti-angiogenic actions of gamma-linolenic acid and its derivatives. *Curr Pharm Biotech.* 2006;7:457-66.
86. Sangeetha P, Das UN. Cytotoxic action of cis-unsaturated fatty acids on human cervical carcinoma (HeLa) cells in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995;53:287-99.
87. Das UN, Madhavi N. Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids Health Dis.* 2011;10:159.
88. Stulnig TM. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003;132(4): p. 310-21.
89. Epanand RM. Recognition of polyunsaturated acyl chains by enzymes acting on membrane lipids. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(4):957-62.
90. Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503(2):161-74.
91. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients.* 2010;2:355-74.

92. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(4):1751–6.
93. Robinson JG, Stone NJ. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*. 2006;98(4A):39i–49i.
94. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids*. 2000;35(7):763–8.
95. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, et al. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *New Engl J Med*. 1985;312(19):1217–24.
96. Salem NJr, Niebylski CD. The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function. *Mol Membr Biol*. 1995;12:131–134.
97. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008;79:101–108.
98. Weldon KA and Whelan J. Allometric scaling of dietary linoleic acid on changes in tissue arachidonic acid using human equivalent diets in mice. *Nutr Metab (Lond)* 2011;8(1):43.
99. Whelan J and Jones L. Allometric scaling: Determining human equivalent doses for n-3 PUFA in rodent diets. *Faseb Journal*. 2006;20(4):A550-A550.
100. Slater-Jefferies JL, Hoile SP, Lillycrop KA, Townsend PA, Hanson MA, Burdge GC. Effect of sex and dietary fat intake on the fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerol in rat heart. *Prostaglandins Leukot Essen Fatty Acids*. 2010;83:219–223.
101. Childs CE, Romeu-Nadal M, Burdge GC, Calder PC. The polyunsaturated fatty acid composition of hepatic and plasma lipids differ by both sex and dietary fat intake in rats. *J Nutr*. 2010;140:245–250.
102. Childs CE, Romeu-Nadal M, Burdge GC and Calder PC. Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. *Proc Nutr Soc*. 2008;67:19–27.

103. Burdge GC, Jones AE, Wootton SA. Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of alpha-linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr.* 2002;88:355–363.
104. Burdge GC, Wootton SA. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr.* 2002;88:411–420.
105. McNamara RK, Able J, Jandacek R, Rider T, Tso P. Gender differences in rat erythrocyte and brain docosahexaenoic acid composition: role of ovarian hormones and dietary omega-3 fatty acid composition. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34:532–539.
106. Kitson AP, Smith TL, Marks KA, and Stark KD. Tissue-specific sex differences in docosahexaenoic acid and 6-desaturase in rats fed a standard chow diet. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012;37:1200–1211.
107. Burdge GC, Calder PC. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* 2005;45(5):581–597.
108. Igarashi M, Ma K, Chang L, Bell JM, and Rapoport SI. Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain. *J Lipid Res.* 2007;48(11):2463–2470.
109. Igarashi M, Ma K, Chang L, Bell JM, and Rapoport SI. Rat heart cannot synthesize docosahexaenoic acid from circulating α -linolenic acid because it lacks elongase-2. *J Lipid Res.* 2008;49(8):1735–1745.
110. Rapoport SI, Igarashi M, Gao F. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;82(4–6):273–276.
111. Miyazaki M, Bruggink SM, Ntambi JM. Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Delta 9-desaturase. *J Lipid Res.* 2006;47:700–704.
112. Wang J, Yu L, Schmidt RE, Su C, Huang X, Gould K, Cao G. Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005a;332:735–742.
113. Nakamura MT, Phinney SD, Tang AB, Oberbauer AM, German JB, Murray JD. Increased hepatic delta 6-desaturase activity with growth hormone expression in the MG101 transgenic mouse. *Lipids.* 1996;31(2):139–43.

114. Hudgins LC, Hellerstein M, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsch J. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Invest.* 1996;97:2081–2091.
115. Zhou L, Nilsson A. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res.* 2001;42(10):1521-42.
116. Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Söling HD. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature.* 1999;401(6749):133-41.
117. Kang JX, Leaf A. Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids. Recent studies. *Circulation.* 1996;94(7):1774-80.
118. Clarke SD, Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:83-98.
119. Cho HP, Nakamura M, Clarke SD. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem.* 1999; 274(52):37335-9.
120. Green CD, Ozguden-Akkoc CG, Wang Y, Jump DB, Olson LK. Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species. *J Lipid Res.* 2010;51:1871–1877.
121. Wang Y, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu J, Jump DB. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J Lipid Res.* 2005b;46:706–715.
122. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine* 3rd ed., New York: Oxford University Press, Oxford 1999; 140-84.
123. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I. Antioksidativna odbrana. *Vet glasnik.* 2011;58(3-4):247-56.
124. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
125. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991;91:31S-8S.
126. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:247-54.
127. Pejčić Z, Dobrić S, Čupić V, Borozan S. Uticaj peroralne primene diklofenaka na koncentraciju azotnog oksida u plazmi pacova. *Arhiv za farmaciju.* 2006;56(4):394-395.

128. Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*. 1997;6(4):391-7.
129. Li JK, Liu XD, Shen L, Zeng WM and Qiu GZ. Natural plant polyphenols for alleviating oxidative damage in man: Current status and future perspectives. *Trop J Pharm Res*. 2016;15(5):1089-1098.
130. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18:1818-1892.
131. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(1):38-50.
132. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015;39:18S-32S.
133. Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(20):2047-2067.
134. Wander RC, Du SH. Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:731-737.
135. Tsuduki T, Honma T, Nakagawa K, Ikeda I, Miyazawa T. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition*. 2011;27(3):334-337.
136. Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, Ozugurlu F, Ozgocmen S, Fadillioglu E. Brief communication: omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. *Ann Clin Lab Sci*. 2005;35:169-73.
137. Arnal E, Miranda M, Johnsen-Soriano S, Alvarez-Nolting R, Diaz-Llopis M, Araiz J, et al. Beneficial effect of docosahexanoic acid and lutein on retinal structural, metabolic, and functional abnormalities in diabetic rats. *Curr Eye Res*. 2009;34:928-38.
138. Ide T. Physiological activities of the combination of fish oil and α -lipoic acid affecting hepatic lipogenesis and parameters related to oxidative stress in rats. *Eur J Nutr*. 2017; DOI: 10.1007/s00394-017-1440-0.

139. Tong X, Li W, Xu JY, Han S, Qin LQ. Effects of whey protein and leucine supplementation on insulin resistance in non-obese insulin-resistant model rats. *Nutrition*. 2014;30:1076-80.
140. Kim J, Paik HD, Yoon YC, Park E. Whey protein inhibits iron overload-induced oxidative stress in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;59:198-205.
141. Świeca M, Reguła J, Suliburska J, Złotek U, Gawlik-Dziki U. Effects of gluten-free breads, with varying functional supplements, on the biochemical parameters and antioxidant status of rat serum. *Food Chem*. 2015;182:268-274.
142. Alférez MJ, Rivas E, Díaz-Castro J, Hijano S, Nestares T, Moreno M, et al. Folic acid supplemented goat milk has beneficial effects on hepatic physiology, haematological status and antioxidant defence during chronic Fe repletion. *J Dairy Res*. 2015;82:86-94.
143. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte peroxidase (hemocuperin). *J Biol Chem*. 1969;244(22):6049-55.
144. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF Jr, Hallewell RA, Tainer JA. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*. 1992;71(1):107-18.
145. Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(2):157-70.
146. Antonyuk SV, Strange RW, Marklund SL, Hasnain SS. The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding. *J Mol Biol*. 2009;388(2):310-26.
147. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine* 1st ed., Clarendon Press, Oxford 1985.
148. Cotgreave IA, Moldéus P, Orrenius S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1988;28:189-212.
149. Marinho HS, Antunes F, Pinto RE. Role of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the reduction of lysophospholipid hydroperoxides. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(5):871-83.
150. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):361-70.
151. Halliwell B. Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:670S-677S.

152. Dargel R. Lipid peroxidation-a common pathogenic mechanism? *Exp Toxicol Pathol.* 1992;44:169-81.
153. Scott G. Antioxidants the modern elixir? *Chem Britain.* 1995;31:879-882.
154. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. In: "C.R.C., *Critical Reviews in Toxicology*", ed. (L.Goldberg), Boca Rton, C.R.C. Press, 1987, pp. 27-29.
155. 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.
156. Kullenberg D, Taylor LA, Schneider M, Massing U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* 2012;11:3.
157. Pravst I. Health claims: An opportunity for science. *Agro Food Industry Hi-Tech.* 2012;23(5):2-3.
158. Power-Grant O, McCormack WG, Ramia De Cap M, Amigo-Benavent M, Fitzgerald RJ, Jakeman P. Evaluation of the antioxidant capacity of a milk protein matrix in vitro and in vivo in women aged 50-70 years. *Int J Food Sci Nutr.* 2016;67(3): 325-34.
159. Da Silva MS, Rudkowska I. Novel functional foods for optimal oxidative status in healthy ageing. *Maturitas.* 2016;93:100-107.
160. Suzukawa M, Abbey M, Clifton P, Nestel PJ. Enhanced capacity of n-3 fatty acid-enriched macrophages to oxidize low-density lipoprotein mechanisms and effects of antioxidant vitamins. *Atherosclerosis* 1996;124:157-69.
161. Lepšanović Lj, Djerić M. Lipidski peroksidi i njihova uloga u organizmu. U: Lepšanović L (ured). *Metabolizam lipoproteina i njegovi poremećaji.* Hemofarm DD, Vršac. 1992;31-43.
162. Priyamvada S, Khan SA, Khan MW, Khan S, Farooq N, Khan F, et al. Studies on the protective effect of dietary fish oil on uranyl-nitrate-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009;82:35-44.

163. Zanatta AL, Miranda DT, Dias BC, Campos RM, Massaro MC, Michelotto PV Jr, et al. Fish oil supplementation decreases oxidative stress but does not affect platelet-activating factor bioactivity in lungs of asthmatic rats. *Lipids*. 2014;49:665-675.
164. Park PW, Goins RE. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J Food Sci*. 1994; 59(6):1262-1266.
165. 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.
166. Cristopherson SW, Glass RL. Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *J Dairy Sci*. 1969;52:1289-90.
167. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158-69.
168. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
169. Hinkle ED, Wiersma W, Jurs GS. *Applied Statistics for Behavioral Sciences*. 5th ed. Hampshire: Cengage Learning EMEA, 2003.
170. Manly BFJ. 1986. *Multivariate statistical methods: a primer*. Chapman and Hall, New York, NY.
171. British-Nutrition-Foundation. *Unsaturated Fatty Acids: Nutritional and Physiological Significance: The Report of the British Nutrition Foundation's Task Force*; Chapman & Hall: London, UK, 1992.
172. Verardo V, Gómez-Caravaca AM, Arráez-Román D, Hettinga K. Recent advances in phospholipids from colostrum, milk and dairy by-products. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):173.
173. Zhou AL, Hintze KJ, Jimenez-Flores R, Ward RE. Dietary fat composition influences tissue lipid profile and gene expression in Fischer-344 rats. *Lipids*. 2012;47:1119-30.
174. 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 (Beograd)*. 2009;59(5-6):569-578.
175. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(4):433-46.

176. Al Humaid AI, Mousa HM, El-Mergawi RA, Abdel Salam AM. Chemical composition and antioxidant activity of dates and dates-camel-milk mixtures as a protective meal against lipid peroxidation in rats. *Am J Food Technol.* 2010;5:22-30.
177. Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, García-Urkia N, Sarasqueta C, Cosme A, Irastorza B, Gonzalez A, Arenas JI Jr. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol.* 2008;8:40-48.
178. Popović T, Borozan S, Arsić A, Martačić JD, Vučić V, Trbović A, Mandić L, Glibetić M. Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male Wistar rats. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2012;96:1020–9.
179. Alabdulkarim B. Effect of camel milk on blood glucose, cholesterol, triglyceride and liver enzymes activities in female albino rats. *World App Sci J.* 2012;17:1394–7.
180. Berge RK, Madsen L, Vaagenes H, Tronstad KJ, Gottlicher M, Rustan AC. In contrast with docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid and hypolipidaemic derivatives decrease hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreased diacylglycerol acyltransferase activity and stimulation of fatty acid oxidation. *Biochem J.* 1999;343:191–7.
181. Froyland L, Vaagenes H, Asiedu DK, Garras A, Lie O, Berge RK. Chronic administration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid as ethyl esters reduced plasma cholesterol and changed the fatty acid composition in rat blood and organs. *Lipids.* 1996;31:169–78.
182. Ney DM. Potential for enhancing the nutritional properties of milk fat. *J Dairy Sci.* 1991;74:4002–12.
183. Bar Yamin H, Barnea M, Genzer Y, Chapnik N, Froy O. Long-term commercial cow's milk consumption and its effects on metabolic parameters associated with obesity in young mice. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(5):1061-8.
184. Kim JH, Hwang JY, Kim KN, Choi YJ, Chang N, Huh KB. Relationship between milk and calcium intake and lipid metabolism in female patients with type 2 diabetes. *Yonsei Med J.* 2013;54(3):626-636.
185. Hynes GR, Heshka J, Chadee K, Jones PJ. Effects of dietary fat type and energy restriction on adipose tissue fatty acid composition and leptin production in rats. *J Lipid Res.* 2003;44:893–901.

186. Marks KA, Kitson AP, Stark KD. Hepatic and plasma sex differences in saturated and monounsaturated fatty acids are associated with differences in expression of elongase 6, but not stearyl-CoA desaturase in Sprague-Dawley rats. *Genes Nutr.* 2013;8:317–27.
187. Poppitt SD, Kilmartin P, Butler P, Keogh GF. Assessment of erythrocyte phospholipid fatty acid composition as a biomarker for dietary MUFA, PUFA or saturated fatty acid intake in a controlled cross-over intervention trial. *Lipids Health Dis.* 2005;4:1–10.
188. de Lorgeril M, Salen P. New insights into the health effects of dietary saturated and omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *BMC Med.* 2012;10:1–5.
189. Ma W, Wu JH, Wang Q, Lemaitre RN, Mukamal KJ, Djoussé L, King IB, Song X, Biggs ML, Delaney JA, et al. Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the cardiovascular health study. *Am J Clin Nutr.* 2015;101:153–63.
190. Mensink RP. Dietary monounsaturated fatty acids and serum lipoprotein levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 1994;110(suppl):65-8.
191. Parthasarathy S, Khoo J, Miller E et al. Low-density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3994-8.
192. Pédrone F, Boulrier-Monthéan N, Catheline D, Legrand P. Impact of a standard rodent chow diet on tissue n-6 fatty acids, $\Delta 9$ -Desaturation index, and Plasmalogen mass in rats fed for one year. *Lipids.* 2015;50:1069–82.
193. Tripathy S, Jump DB. Elovl5 regulates the mTORC2-Akt-FOXO1 pathway by controlling hepatic cis-vaccenic acid synthesis in diet-induced obese mice. *J Lipid Res.* 2013;54:71–84.
194. Onozato M, Nishikiori M, Iizuka H, Ichiba H, Sadamoto K, Fukushima T. Determination of sex-based differences in serum α -linoleic acid and dihomo- α -linoleic acid using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015;997:116–21.
195. Ruan KH, Cervantes V, So SP. Engineering of a novel hybrid enzyme: an anti-inflammatory drug target with triple catalytic activities directly converting arachidonic acid into the inflammatory prostaglandin E2. *Protein Eng Des Sel.* 2009;22:733-740.

196. de Goede J, Verschuren WM, Boer JM, Kromhout D, Geleijnse JM. Alpha-linolenic acid intake and 10-year incidence of coronary heart disease and stroke in 20,000 middle-aged men and women in the Netherlands. *PLoS One*. 2011;6:e17967.
197. Shen X, Dannenberger D, Nuernberg K, Nuernberg G, Zhao R. Trans-18:1 and CLA isomers in rumen and duodenal digesta of bulls fed n-3 and n-6 PUFA-based diets. *Lipids*. 2011;46:831-841.
198. McNamara RK, Jandacek R, Rider T, Tso P, Cole-Strauss A, Lipton JW. Differential effects of antipsychotic medications on polyunsaturated fatty acid biosynthesis in rats: Relationship with liver delta6-desaturase expression. *Schizophr Res*. 2011;129:57-65.
199. Tabolacci C, Lentini A, Provenzano B, Gismondi A, Rossi S, Beninati S. Similar antineoplastic effects of nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, and prostaglandin E1 on B16-F10 murine melanoma cells. *Melanoma Res*. 2010;20:273-279.
200. Wang X, Lin H, Gu Y. Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids Health Dis*. 2012;11:25.
201. Mougios V, Kotzamanidis C, Koutsari C, Atsopardis S. Exercise-induced changes in the concentration of individual fatty acids and triacylglycerols of human plasma. *Metabolism*. 1995;44:681-688.
202. Chapman C, Morgan LM, Murphy MC. Maternal and early dietary fatty acid intake: changes in lipid metabolism and liver enzymes in adult rats. *J Nutr*. 2000;130:146-151.
203. Paschos GK, Rallidis LS, Liakos GK, Panagiotakos D, Anastasiadis G, Votteas V, Zampelas A. Background diet influences the anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid in dyslipidaemic subjects. *Br J Nutr*. 2004;92:649-655.
204. 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;44:2135-2141.
205. Shrago E, Spennetta T, Gordon E. Fatty acid synthesis in human adipose tissue. *J Biol Chem*. 1969;244(10):2761-6.
206. Mittendorfer B, Sidossis LS. Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term, high-carbohydrate diets. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(5):892-9.

207. Oarada M, Furukawa H, Majima T, Miyazawa T. Fish oil diet affects on oxidative senescence of red blood cells linked to degeneration of spleen cells in mice. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1487:1–14.
208. Popović TB, Borozan SZ, Takić MM, Kojadinović MJ, Rankovic S, Ranić M, de Luka SR. Fatty acid composition and oxidative stress parameters in plasma after fish oil supplementation in aging. *Croat Chem Acta*. 2014;87:207–12.
209. Caslake MJ, Miles EA, Kofler BM, Lietz G, Curtis P, Armah CK, Kimber AC, Grew JP, Farrell L, Stannard J, et al. Effect of sex and genotype on cardiovascular biomarker response to fish oils: the FINGEN study. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:618–29.
210. Walker CG, Browning LM, Mander AP, Madden J, West AL, Calder PC, Jebb SA. Age and sex differences in the incorporation of EPA and DHA into plasma fractions, cells and adipose tissue in humans. *Br J Nutr*. 2014;111:679–89.
211. Poudyal H, Panchal SK, Ward LC, Brown L. Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr Biochem*. 2013;24:1041–1052.
212. Petrović S, Arsić A, Debeljak-Martačić J, Đurendić-Brenesel M, Pilija V, Milić N, Popović T. Effects of dietary supplementation with a mixture of buckwheat leaf and flower on fatty acid composition of rat brain phospholipids. *Acta Vet*. 2015;65:390–403.
213. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:1467S–76S.
214. Lemaitre RN, King IB, Mozaffarian D, Kuller LH, Tracy RP, Siscovick DS. 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;77:319–25.
215. Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem*. 2004;263:217–25.
216. Bu J, Dou Y, Tian X, Wang Z, Chen G. The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Stroke. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:6906712.
217. An WS, Kim HJ, Cho KH, Vaziri ND. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;297:F895-F903.

218. Venkatraman JT, Chandrasekar B, Kim JD, Fernandes G. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the activities and expression on hepatic antioxidant enzymes in autoimmune-prone NZBxNZW F mice. *Lipids*. 1994;29:561-568.
219. Lluís L, Taltavull N, Muñoz-Cortés M, Sánchez-Martos V, Romeu M, Giralt M, et al. Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids Health Dis*. 2013;12:140.
220. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res*. 2004;43:200-227.
221. Moore K, Roberts LJ 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 1998;28:659-671.
222. Sarsilmaz M, Songur A, Ozyurt H, Kus I, Ozen OA, Ozyurt B, Sogut S, and 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;69:253–259.
223. Hsu HC, Lee YT, and Chen MF. Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostag Oth Lipid M*. 2001;66:99–108.
224. Trostchansky A, Batthyany C, Botti H, Radi R, Denicola A, and 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;395:225–232.
225. Hernández-Ledesma B, Da'valos A, Bartolome' B, Amigo L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem*. 2005;53(3):588-593.
226. Pan D, Guo Y, Jiang X. Anti-fatigue and antioxidative activities of peptides isolated from milk proteins. *J Food Biochem*. 2011;35:1130-1144.

BIOGRAFIJA

Slavica Ranković rođena je 02.10.1982. godine u Lazarevcu, gde je završila osnovnu školu. Srednju medicinsku školu „dr Miša Pantić” je završila u Valjevu. Na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu, na grupi biologija i ekologija, diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,11 (devet 11/100), i ocenom 10 na diplomskom ispitu sa temom „Vodni balans biljaka” i stekla zvanje diplomirani biolog-master. Doktorske poslediplomske studije upisala je školske 2011/12 godine, na modulu Animalna i humana fiziologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od januara 2012. godine zaposlena na Institutu za medicinska istraživanja, u Centru izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma, kao istraživač pripravnik. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u februaru 2015. godine, a reizabrana u novembru 2017 godine. Dosadašnji naučno-istraživački rad Slavice Ranković se odvijao u okviru projekata: „Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji“, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, (III 41030). Takođe je učestvovala u dva FP7 projekta finansirana od strane Evropske komisije, pod nazivom: Povoljni efekti dijetarnih bioaktivnih peptida i polifenola na kardiovaskularno zdravlje ljudi (Bacchus) i Jeftine tehnologije i tradicionalni sastojci za proizvodnju priuštive, hrane korektne sa stanovišta nutritivne vrednosti u smislu unapređenja zdravlja, kod siromašnih populacionih grupa (Chance). Autor je i koautor šest radova publikovanih u međunarodnim časopisima, od kojih dva rada čine deo doktorske disertacije. Autor je i koautor 29 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova i skupova nacionalnog značaja.

Slavica Ranković je član Društva fiziologa Srbije, Društva za ishranu Srbije, Biohemijskog društva Srbije, Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Славица Ранковић

број индекса Б3010/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај различитих врста хране на параметре оксидативног стреса и

маснокиселински профил фосфолипида јетре пацова

- 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, 01.10.2018.

Славица Ранковић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Славица Ранковић _____

Број индекса _____ Б3010/2011 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада Утицај различитих врста хране на параметре оксидативног стреса и
маснокиселински профил фосфолипида јетре пацова _____

Ментор др Тамара Половић _____

Потписани/а _____ Славица Ранковић _____

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
зачења 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, 01.10.2018.

Славица Ранковић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај различитих врста хране на параметре оксидативног стреса и

маснокиселински профил фосфолипида јетре пацова

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, 01.10.2018.

Славица Ранковић