APP NOTE-11/2020GCMS





Определение Омега-3 и Омега-6/Омега-3 индексов в крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии с помощью системы **«Маэстро-αMS»**.

Колунтаев Д. А. *к. б. н., научный сотрудник отдела исследований и разработок,* ***ООО Интерлаб****, Россия, Москва*

Ключевые слова

Газовая хромато-масс-спектрометрия, метиловые эфиры жирных кислот, кровь, Омега-3 индекс, Омега-6 индекс, SIM Wizard®, iDwellTime.

Резюме

Продемонстрированы возможности хромато-масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC в определение статусов Омега-3 и Омега-6/Омега-3 индексов в крови человека. Работа апробирована на образцах крови 62 пациентов.

Введение

За последнее время метаболомика получила новое и интенсивное развитие в современной науке, особенно в направлении клинических исследований, подразумевая всеобъемлющий анализ (идентификацию и количественное измерение) метаболитов маркеров физиологического состояния человека. Среди распространенных подходов, используемых в метаболомике, выделяется метаболическое профилирование, представляющее собой количественный анализ метаболитов, относящихся к одному химическому классу веществ или определенному биохимическому пути [1]. Метаболическое профилирование проводится с целью выявления биомаркеров заболеваний с последующим анализом целевых групп метаболитов и их диагностикой. Особое внимание в метаболическом профилировании уделяется **липидомике** – идентификации и количественному измерению липидов биологического объекта.

Как известно, липиды входят в набор основных «молекул жизни». Во-первых, они служат каркасом для всех клеточных мембран, выполняя барьерную или структурно-регуляторную функцию, что позволяет клеткам сохранять постоянство внутренней среды. Во-вторых, многие жиры или их производные являются важнейшими участниками цепей переноса регуляторных сигналов, определяя так называемую регуляторно-сигнальную функцию липидов в организме [2].

Основными представителями обширной группы липидов являются жирные кислоты, определяющие жидкокристаллические свойства и проницаемость клеточных мембран. Состав жирных кислот имеет большое разнообразие и свою классификацию, которая основана на степени их насыщения: выделяют насыщенные, мононенасыщенные (МНЖК) и полиненасыщенные (ПНЖК) жирные кислоты. Степень насыщения жирной кислоты определяется числом двойных связей между атомами углерода в ее молекуле. Соответственно, если все связи в молекуле единичны, то жирная кислота классифицируется как насыщенная. Мононенасыщенные жирные кислоты содержат одну двойную связь; полиненасыщенные жирные кислоты содержат две или более двойных связей соответственно.

Полиненасыщенные жирные кислоты играют важную роль в поддержании текучести биомембран. Кроме того, как уже было отмечено ранее, ряд полиненасыщенных жирных кислот являются предшественниками эйкозаноидов (простагландинов и лейкотриенов), которые участвуют в сигнальных биохимических путях практически во всех органах и тканях человека [3].

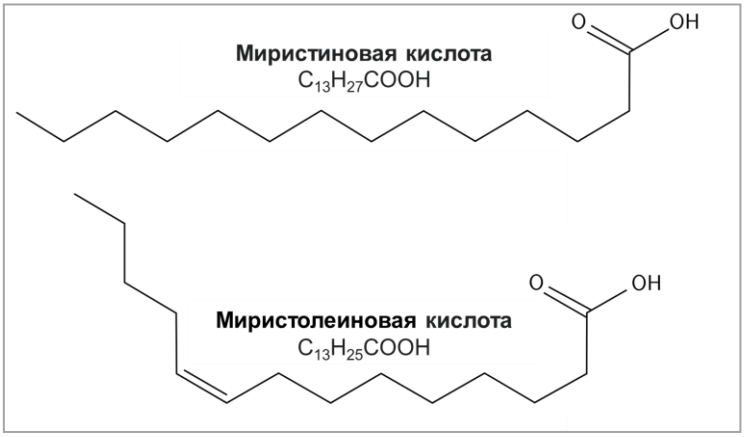


Рис. 1. Миристиновая (насыщенная жирная кислота) и миристолеиновая (мононенасыщенная кислота).

В зависимости от номера атома углерода (*отсчет - от концевой метильной группы*), участвующего в образовании последней двойной связи, выделяют три группы *ненасыщенных жирных кислот,* которые в свою очередь подразделяются на подгруппы: *мононенасыщенные жирные кислоты*, в частности **Омега-9** кислоты (эти кислоты не

относятся к группе незаменимых кислот и наиболее ярким представителем является олеиновая кислота (C18:1)) и подгруппа *полиненасыщенных жирных кислот*: **Омега-6** (гамма-линоленовая (C18:3), ди-гомо-гамма-линолевая (C20:3) и арахидоновая (C20:4) кислоты), а также **Омега-3** кислоты (эйкозапентаеновая (EPA) (C20:5), докозапентаеновая (C22:5) и докозагексаеновая (DHA) (C22:6) кислоты [3, 4].

Полиненасыщенные жирные кислоты являются одним из очень важных базовых элементов здоровья человека. Только часть их может синтезироваться в клетке из насыщенных жирных кислот, однако в связи с отсутствием в организме человека ферментов, способных формировать двойные связи дальше 9-го атома углерода (от карбоксильного остатка), большинство полиненасыщенных жирных кислот являются незаменимыми [4].

Основными источниками полиненасыщенных жирных кислот являются различные растительные масла, рыба, морепродукты, яичный желток и другие продукты питания. [5, 6]. Например, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты (представители Омега-3 группы кислот) лишь в небольшом количестве (8% и 0,1-9% соответственно) могут образовываться в организме человека из альфа-линоленовой кислоты, максимальная концентрация которой содержится в льняном масле, рапсе канола, негидрогенизированном соевом масле [7]. Поэтому на сегодняшний день эти кислоты оправданно считать незаменимыми компонентами рациона человека [8, 9].

Измерение уровня Омега-3 кислот является предпочтительным подходом в качестве биомаркера риска сердечно-сосудистых заболеваний [10]. Лабораторным показателем статуса Омега-3 кислот является Омега-3 индекс, который рассчитывается как процент содержания эйкозапентаеновой и докозагексаеновой полиненасыщенных жирных кислот от общего количества жирных кислот в крови. Референсные значения индекса характеризуются следующими условиями: если уровень Омега-3 индекса <4%, то показатель ассоциируют с наибольшим риском сердечно-сосудистых заболеваний, при уровне >8% — с наименьшим риском.

Для оценки нутриентного статуса организма человека, необходимо контролировать основные ненасыщенные жирные кислоты семейства Омега-6 кислот, которые также являются дополнительными маркерами прогноза сердечно-сосудистых заболеваний. Основная кислота группы Омега-6 - линоленовая, которая поступает с пищей, преимущественно с растительными маслами. Линолевая кислота затем может быть преобразована в другие ненасыщенные жирные кислоты, например, гамма-линоленовую кислоту или ди-гомо-гамма-линоленовую кислоту, которые, в свою очередь, могут быть превращены в арахидоновую кислоту – хорошо известный предшественник многих метаболически активных соединений (простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов и др.). Арахидоновая кислота также относится к семейству Омега-6 кислот. Стоит также отметить, что в многочисленных исследованиях было доказано, что Омега-6 кислоты обладают и холестерин снижающим эффектом, за счёт чего снижают риск сердечно-сосудистых заболеваний.

Для оценки баланса Омега-6 жирных кислот в рационе человека используют метод оценки их отношения к Омега-3 кислотам. Согласно литературным данным, рекомендуемые пропорции должны лежать в пределах от 1:1 до 4:1. Однако, после индустриальной революции, состав рациона человека стремительно изменился: стали преобладать насыщенные жирные кислоты, и таким образом соотношение Омега-6/Омега-3 кислот также возросло до 20-30:1. По мнению многих экспертов, это изменение рациона играет огромную роль в резком росте количества сердечно-сосудистых заболеваний в наше время. На

основании этих представлений многие диетологи рекомендуют соблюдать диету с соотношением Омега-6/Омега-3 жирных кислот около 2:1, причем достигать этого соотношения не столько путем снижения Омега-6, сколько путем увеличения Омега-3 жирных кислот.

Газовая хромато-масс-спектрометрия является одним из наиболее распространенных инструментов для анализа количественного статуса жирных кислот в крови человека. Чувствительность и селективность метода делают его применение особенно выгодным при работе со сложными биологическими образцами, где желательно исключение сильного влияния матричных интерферирующих компонентов.

Экспериментальная часть

Материалы и методы

Гексан, метанол, концентрированная соляная кислота (37%), тридекановая кислота - все используемые в эксперименте реагенты имели классификацию, как особо чистые или марку качества «HPLC grade». В качестве процедуры дериватизации использовали реакцию этерификации (метанолиз) с образованием метиловых эфиров жирных кислот с помощью подкисленного раствора метанола (1,2M HCl/MeOH). В качестве внутреннего стандарта использовали изотопно-меченный по углероду стандарт тридекановой кислоты (^{13}C). В качестве набора стандартных веществ использовали коммерческую смесь метиловых эфиров жирных кислот *(Nu-Check-Prep GLC-Nestle36, USA*), чистота каждого индивидуального вещества не менее 99%.

Для исследования и апробации методики использовали образцы крови, полученные из аккредитованной лаборатории института аналитической токсикологии[1]. Отбор проб проводился специалистами в соответствии с регламентом процедуры отбора крови. В случае, когда немедленный анализ был невозможен, образцы крови замораживали или хранили при температуре -5°C ÷ -18°C. Кровь в качестве объекта исследования является наилучшим биомонитором для анализа жирных кислот из-за их меньшей биологической вариабельности. В частности, в отличие от плазмы, содержание EPA и DHA кислот в крови не разбавляется после того, как человек принимает пищу, которая их не содержит. Также преимуществом является то, что образцы крови для исследования стабильны в течение семи дней при комнатной температуре при заборе в пробирку с ЭДТА [11].

Параметры работы хромато-масс-спектрометрической системы и параметры инструментального метода представлены в таблице 1.

Табл. 1. *Параметры инструментального метода.*

Оборудование	
ГХ-МС система	Interlab «Маэстро-αMS»
Испаритель	Split/Splitless (liner: Restek 4 mm x 6,3 x 78,5)
Хроматографическая колонка	HP-5MS (30m x 0,25mm; 250um)
Параметры хроматографического разделения	
Объём пробы	1,0 мкл

[1] *Основан в 2010 году; независимая клинико-диагностическая лаборатория, ключевым направлением деятельности которой является разработка и внедрение новых методов масс-спектрометрии в медицине и диагностике.*

Режим испарителя	Split 10:1
T° испарителя	270°C
Режим работы испарителя	Режим Constant Flow
Градиент t° печи	60°C в течение 3,0 мин; 30,0°C/мин до 190°C, удержание 0,0 мин; 2,0°C/мин до 250°C, удержание 0,0 мин; 30,0°C/мин до 300°C, удержание 0,0 мин;
Скорость газа-носителя	(He) 1,0 мл/мин
T° интерфейса МС	270°C
Параметры детектирования	
Источник ионизации	*ЭИ (EI)*
T° источника	230°C
Задержка растворителя	6,8 мин
Режимы сканирования	SIM (параметры указаны ниже)
Параметр Dwell Time	Принцип расчёта согласно методу iDwell® Time

Общая процедура измерения ЖК в биологических образцах

Основным этапом подготовки пробы является отделение липидов от других составляющих компонентов биологического образца. Для анализа отбирали 100 мкл крови, которую помещали в хроматографическую виалу на 2 мл и добавляли 400 мкл подкисленного метанола, содержащего в своём составе внутренний стандарт. Полученную смесь интенсивно встряхивали на шейкере в течение 1 минуты, после чего образец помещали в термостат и подвергали кислому метанолизу (80°C, 45 мин). Согласно литературным данным, данный способ дериватизации относительно «мягкий» и не подвергает разрушению жирные кислоты, а также обеспечивает высокий процент их количественного выхода [12].

На втором этапе, высвобожденные компоненты отделяли от матрицы образца экстракцией гексаном. К дериватизированной смеси добавляли 400 мкл гексана, смесь встряхивали на шейкере и после 5 минут расслаивания верхний слой смеси отбирали для анализа на хромато-масс-спектрометрической системе. Перечень целевых соединений и структурно-характеристические ионы представлены в таблице 2.

Табл. 2. Времена элюирования искомых пиков целевых ионов и параметры их сканирования.

№	*Перечень метиловых эфиров жирных кислот*	*Главный ион (Quant)*	*Подтв. ион (Qual-1)*	*Подтв. ион (Qual-2)*	*Время элюирования, мин*
1	C10:0 Methyl Decanoate	***87.0***	***74.0***	***143.0***	***7.48***
2	C11:0 Methyl Undecanoate	***87.0***	***74.0***	***143.0***	***7.99***
3	C12:0 Methyl Laurate	***87.0***	***74.0***	***171.0***	***8.56***
4	C13:0 Methyl Tridecanoate	***143.0***	***74.0***	***87.0***	***9.25***
5	C14:1 Methyl Myristoleate	***69.0***	***55.0***	***166.0***	***10.0***
6	C14:0 Methyl Myristate	***87.0***	***64.0***	***143.0***	***10.1***
7	C15:1 Methyl 10-Pentadecanoate	***222.1***	***180.0***	***69.0***	***11.1***
8	C15:0 Methyl Pentadecanoate	***74.0***	***87.0***	***213.0***	***11.2***
9	C16:1 Methyl Palmitoleate	***74.0***	***194.1***	***236.1***	***12.3***
10	C16:0 Methyl Palmitate	***143.0***	***227.1***	***270.0***	***12.60***
11	C17:1 Methyl 10-Heptadecanoate	***250.1***	***74.0***	***166.0***	***13.93***

12	C17:0 Methyl Heptadecanoate	***74.0***	***87.0***	***241.1***	***14.34***
13	C18:3 Methyl Linolenate (ϒ)	***150.0***	***194.0***	***79.0***	***15.45***
14	C18:2 Methyl Linolenate	***164.0***	***263.1***	***294.1***	***15.77***
15	C18:1 Methyl Oleate	***264.1***	***296.1***	***222.1***	***15.9***
16	C18:3 Methyl Linolenate (α)	***261.1***	***292.1***	-	***15.92***
17	C18:2-trans Methyl Linoelaidate	***263.1***	***294.1***	-	***15.9***
18	C18:1-trans Methyl Elaidate	***222.1***	***264.1***	***74.0***	***16.0***
19	C18:0 Methyl Stearate	***143.0***	***298.1***	***255.1***	***16.44***
20	C20:4 Methyl Arachidonate	***79.0***	***150.0***	***91.0***	***19.745***
21	C20:5 Methyl Eicosapentaenoate **(EPA)**	***79.0***	***201.0***	***105.0***	***19.93***
22	C20:3 Methyl di-homo-ϒ Linolenate	***222.1***	***79.0***	***320.1***	***20.23***
23	C20:2 Methyl 11-14 Eicosadienoate	***291.1***	***322.1***	***81.0***	***20.74***
24	C20:1 Methyl 11-Eicosenoate	***250.1***	***292.1***	***83.0***	***20.88***
25	C20:3 Methyl 11-14-17 Eicosatrienoate	***289.1***	***320.1***	***79.0***	***20.91***
26	C20:0 Methyl Arachidate	***74.0***	***87.0***	***326.1***	***21.61***
27	C21:0 Methyl Heneicosanoate	***340.1***	***87.0***	***74.0***	***24.563***
28	C22:6 Methyl Docosahexaenoate **(DHA)**	***79.0***	***91.0***	***67.0***	***25.240***
29	C22:2 Methyl Docosadienoate	***95.0***	***350.1***	***67.0***	***26.71***
30	C22:1 Methyl Erucate	***320.1***	***278.1***	***69.0***	***26.84***
31	C22:0 Methyl Behenate	***74.0***	***87.0***	***311.1***	***27.66***
32	C24:1 Methyl Nervonate	***264.1***	***348.1***	***69.0***	***33.25***
33	C24:0 Methyl Lignocerate	***382.1***	***87.0***	***74.0***	***34.068***
34	C22:5 Methyl Docosapentaenoate **(DPA)**	***79.0***	***91.0***	***67.0***	***25.44***
35	ISTD (*внутренний стандарт*)	***145.0***	***76.0***	***89.0***	***9.25***

Обсуждение процедуры анализа

Смесь стандартов метиловых эфиров жирных кислот с концентрацией не менее 10 ppm использовали для идентификации и расчёта временной сетки их элюирования в режиме полного сканирования ионов (диапазон от 50 до 450 Да). Далее использовали алгоритм автоматического построения временных сегментов iDwell®Time[2] для оптимизации сканирования целевых структурно-характеристических ионов жирных кислот в режиме SIM. Результаты работы алгоритма представлены на рисунке 2.

Алгоритм iDwell®Time позволяет аналитику получить оптимальную чувствительность инструментального метода за счёт оптимизации времени селекции каждого иона. Пик правильной геометрической формы является следствием работы данного алгоритма и тем самым исключает возможные потери ионных токов в ходе эксперимента. Пример полученной масс-хроматограммы представлен на рисунке 3.

[2] Инновационный алгоритм **iDwell®Time**, разработанный компанией ООО «*Интерлаб»,* позволяет автоматически разделять хроматограмму на оптимальные временные сегменты сканирования индивидуальных пиков с обязательным требованием постоянного наличия не менее 5 точек данных в секунду.

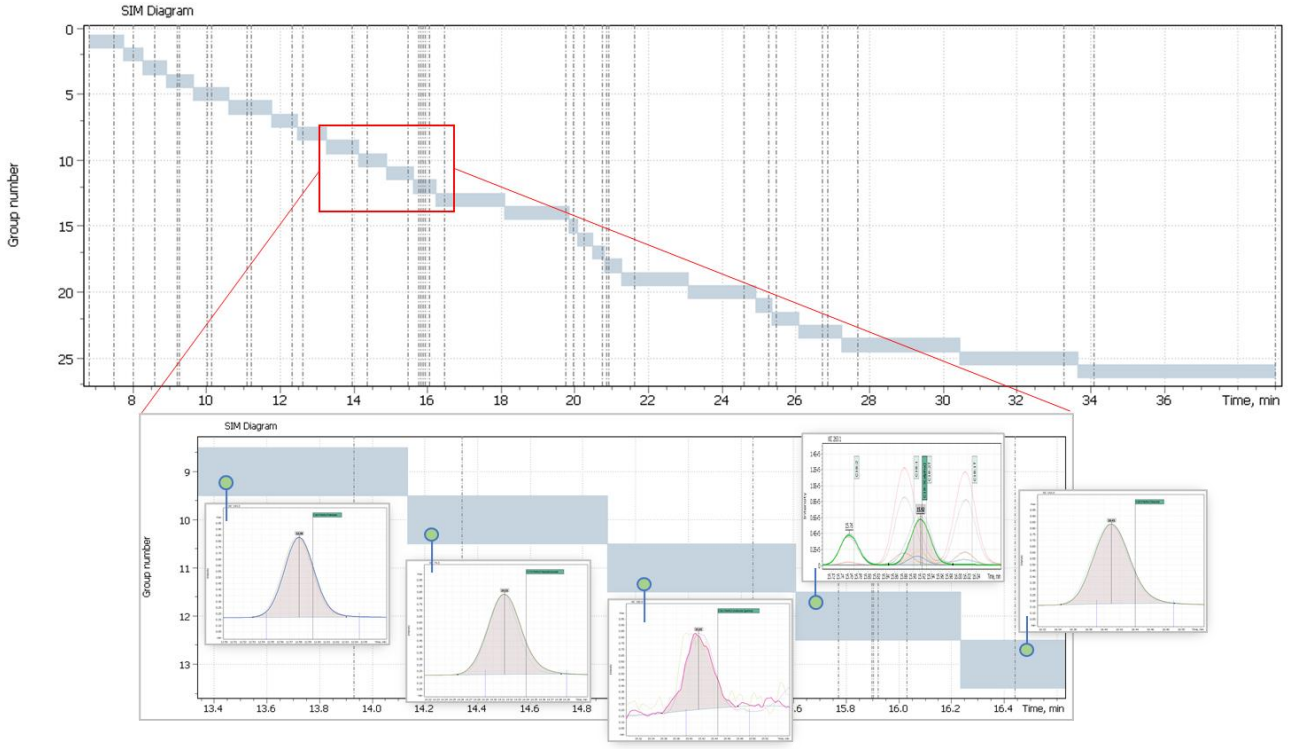


Рис. 2. Результаты работы алгоритма iDwellTime.

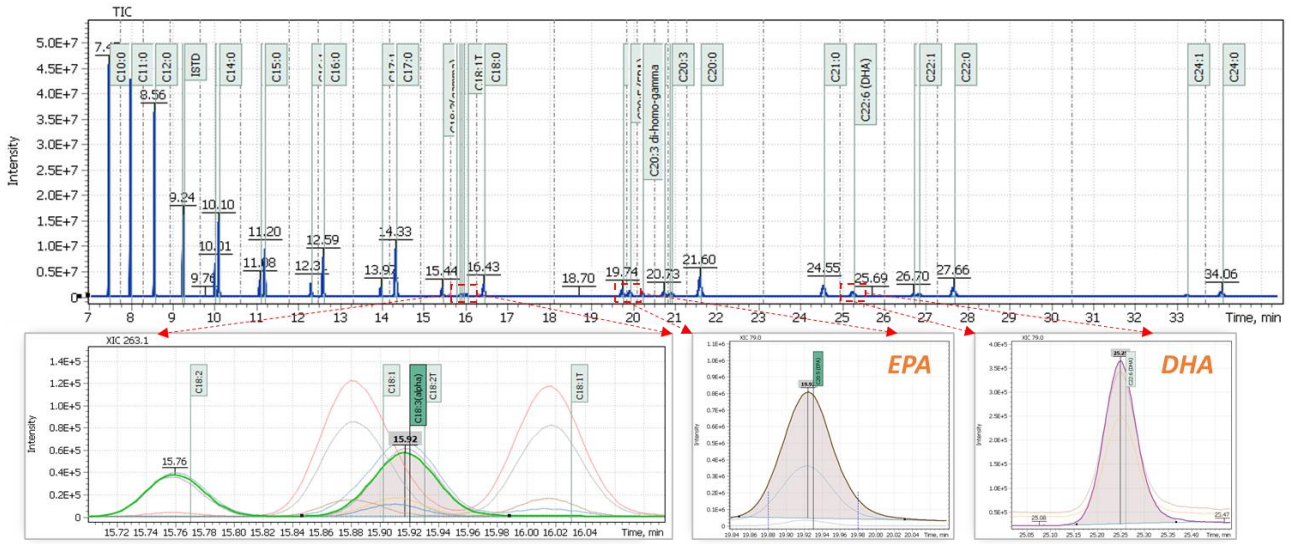


Рис. 3. Хроматограмма смеси действующих веществ метиловых эфиров жирных кислот, концентрация ≈ 1 ppm (SIM). Все масс-пики целевых соединений имеют правильную форму за счёт оптимизации времени их сканирования алгоритмом iDwell®Time.

Возможность детального подхода к детектированию каждого иона обеспечивает высокую количественную характеристику инструментального метода. Это выражается интегральной оценкой не только основных целевых Омега-3 кислот (EPA (20:5 n-3) и DHA (22:6 n-3)), но и возможностью расчёта всех 32 жирных кислот в течение одного хроматографического анализа (рис. 4): насыщенные (10:0, 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 21:0, 22:0, 22:0, 24:0); цис-мононенасыщенные (14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 20:1, 22:1, 24:1); транс-ненасыщенные (18:1T, 18:2T); цис-н-6 полиненасыщенные (18:2, 18:3(n-6), 20:2, 20:3, 20:4, 22:4, 22:5); цис-н-3 полиненасыщенные (18:3(n-3)).

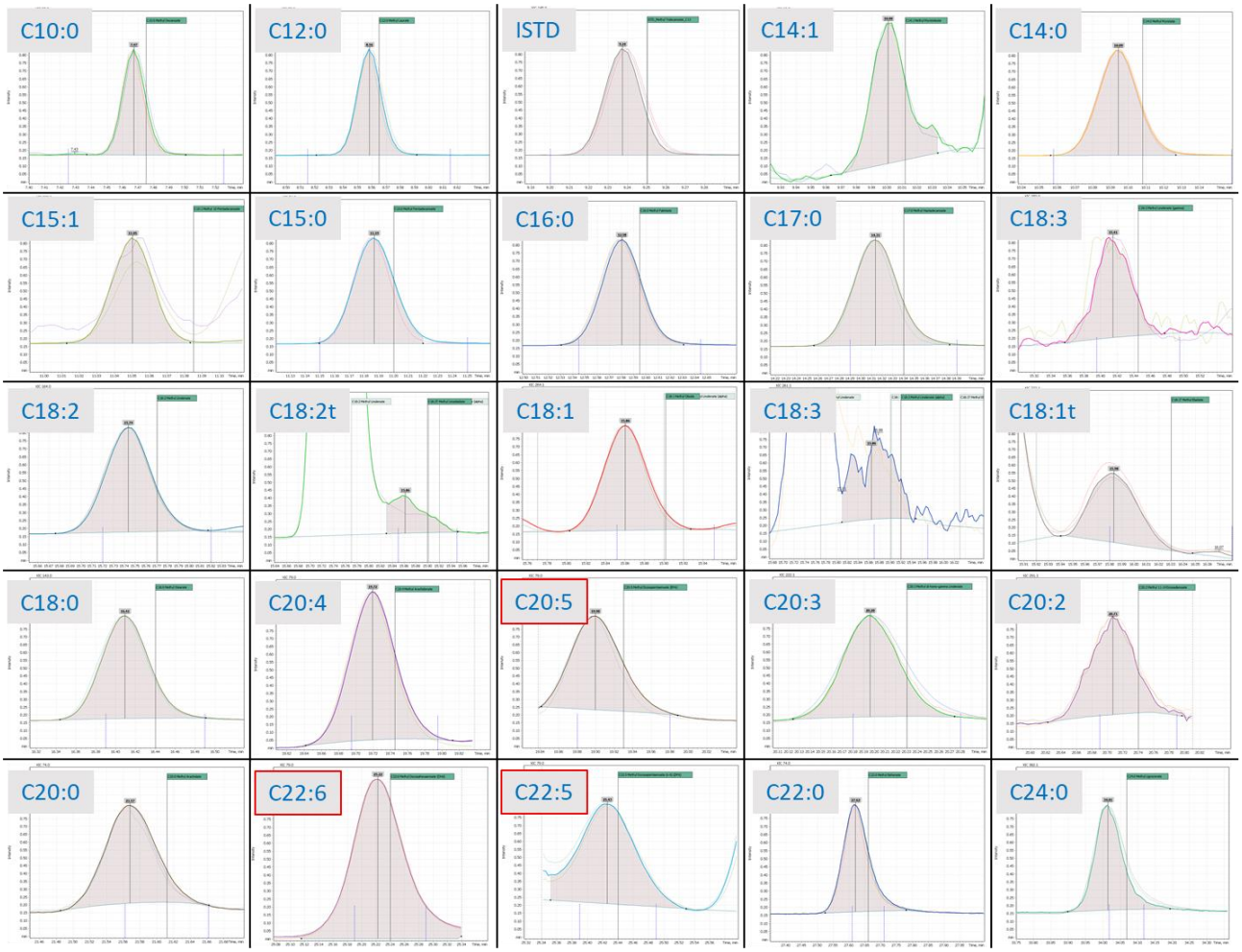


Рис. 4. Пример количественного анализа множества жирных кислот, с примерами их интегрирования программным обеспечением «Маэстро-Аналитик».

Таким образом, суммарный интеграл всех детектируемых жирных кислот определяет общее значение содержания жирных кислот в крови ($\Sigma_{ЖК}$). Показатель же Омега-3 индекс вычисляется как процентное содержание суммы интегралов эйкозапентаеновой (EPA) и докозагексаеновой (DHA) полиненасыщенных жирных кислот к полученному суммарному интегралу всех жирных кислот в крови. Индекс отношения Омега-6/Омега-3 жирных кислот вычисляется как суммарный интеграл Омега-6 кислот к суммарному интегралу Омега-3 кислот.

Расчёт **Омега-3 индекс**:

$$\Omega 3_i = \frac{\int(\Sigma_{ЖК})}{\int(DHA) + \int(EPA)}$$

Расчёт **Омега-6/Омега-3 индекс**:

$$\Omega 6 / \Omega 3 = \frac{\int(C20{:}3) + \int(C18{:}3) + \int(C20{:}4)}{\int(DHA) + \int(EPA) + \int(DPA)}$$

Стоит отметить, что наличие интегралов каждого метилового эфира жирных кислот, открывает дополнительные возможности расчётов таких показателей, как:

- *Индекс отношения полиненасыщенных жирных кислот к насыщенным жирным кислотам (ПНЖК: НЖК).* Является универсальным маркером нарушения обмена липидов и прогностическим показателем сердечно-сосудистых заболеваний.
- *Индекс отношения транс-жирных кислот к жирным кислотам* – прогностический показатель риска сердечно-сосудистых заболеваний, баланса ЛПВП и ЛПНП.

- Индекс отношения арахидоновой к эйкозапентаеновой кислоте. Диагностический маркер оценки провоспалительного эффекта эйкозаноидов и цитокинов; высокие значения индекса указывают на вероятность болевого синдрома вследствие воспалительных процессов.

Практическая оценка применимости метода

В ходе апробации аналитического метода определения Омега-3 и Омега-6/Омега-3 индексов в крови методом газовой хромато-масс-спектрометрии были обследованы 62 пациента (мужчин - 24, женщин – 39) среднего возраста от 25 до 60 лет. При исследовании было отмечено, что среднее значение статуса Омега-3 индекса для большинства пациентов составляло от 7 до 9 единиц (среднее 8,25 единиц), значения индекса Омега-6/Омега-3 наиболее часто составляли от 2 до 3 единиц (среднее 2,38 единиц).

Общее статистические показатели:

	omega_3	omega_6
count	62.000000	62.000000
mean	8.249677	2.382258
std	4.129425	1.104678
min	1.210000	0.830000
25%	5.692500	1.592500
50%	7.840000	2.225000
75%	10.905000	2.810000
max	17.910000	7.190000

Распределение статусов Омега-3 индекс (синие) и индекс Омега-6/Омега-3 (красное).

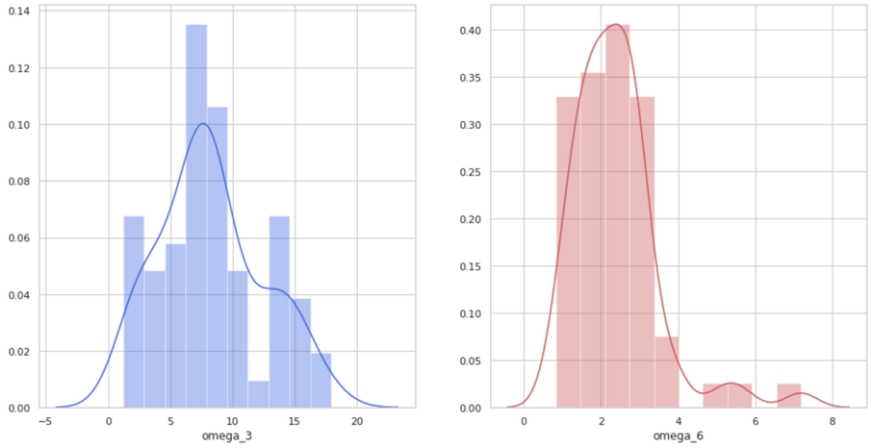


Рис. 5. Общие статистические показатели по 62 пациентам, а также распределение статусов Омега-3 и Омега-6 индексов.

Полученные результаты значений индексов согласуются с ожидаемыми значениями, как согласно литературными данным [11], так и с рекомендованными диапазонами для контроля Омега-3 и Омега-6 статусов.

Различие сигналов основных Омега-3 кислот в зависимости от полученного значения индекса представлено на рисунке 6. На рисунке продемонстрирована работа интегратора программного обеспечения «Маэстро-Аналитик», который обеспечивает надёжное интегрирование пиков даже на уровне их следовых количеств с близстоящим высокоинтенсивным пиком.

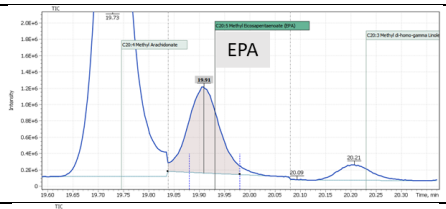
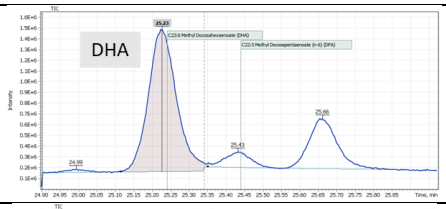
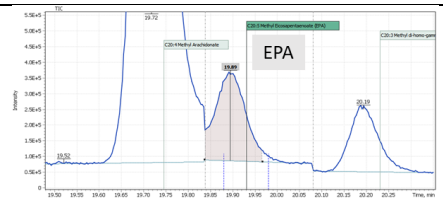
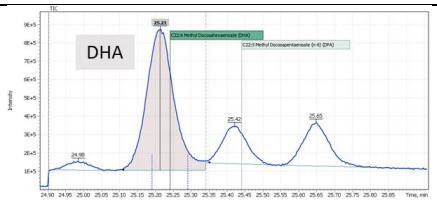
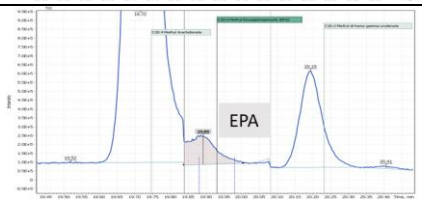
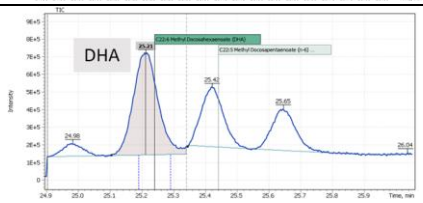
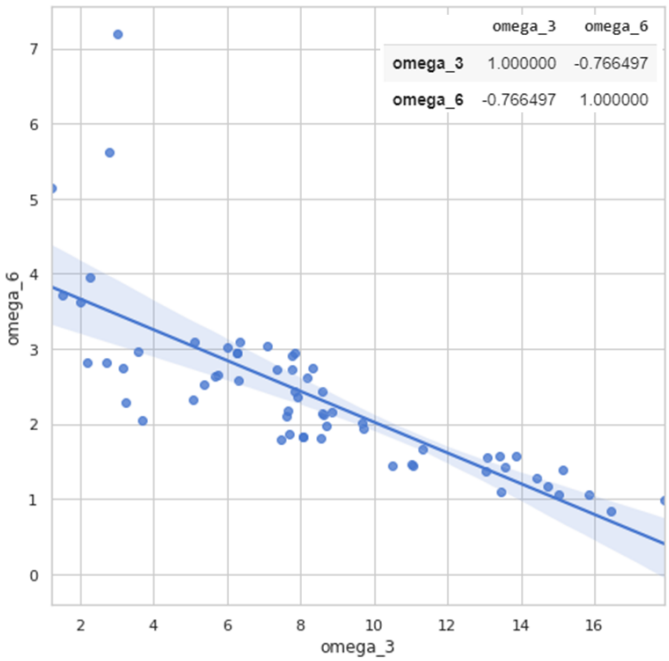
Индекс	Эйкозапентаеновой (EPA)	Докозагексаеновой (DHA)
Ω3 = 13,0		
Ω3 = 5,8		
Ω3 = 2,8		

Рис.6. Различие сигналов основных Омега-3 кислот в зависимости от статуса индекса.



Наличие интегральных данных также позволило смоделировать корреляционную кривую отношения индекса Омега-3 к Омега-6. В частности, на рисунке 7 представлена кривая с коэффициентом корреляции 0,76 (для 62 пациентов). Из представленных данных можно увидеть, что для большинства пациентов с нормальным статусом Омега-3 индекса (7-8 единиц), отношение Омега-6/Омега-3 кислот также находится в пределах ожидаемого целевого значения показателя (2 – 5).

Рис. 7. Корреляционная кривая отношения показателей Омега-3 и Омега-6 индексов.

Результаты работы показали, что для определения качественного и количественного состава жирных кислот в крови человека необходимо применение детального анализа с использованием метода газовой хромато-масс-спектрометрии. Своевременный контроль индексов Омега-3 и Омега-6 кислот имеет важное значение в обеспечении нормального физиологического статуса человека. Для практикуемого же врача подобные данные могут помочь в быстром реагировании на возможные нарушения и усовершенствовании тактики лечения больных.

Выводы

Омега-3 и Омега-6/Омега-3 индексы — доступные, достаточно точные, легко воспроизводимые показатели, определение которых должно быть включено в рутинную клиническую практику. Уровень Омега-3 индекса более 8% ассоциирован с минимальным сердечно-сосудистым риском и является целевым для большинства пациентов.

Таким образом, разработанный аналитический метод с использованием масс-спектрометрической системы Маэстро-αMC (ООО «Интерлаб») позволяет реализовать как ежедневый рутинный контроль статуса Омега-3 индекса человека, так и проводить крупномасштабные эпидемиологические исследования взаимосвязи между статусом жирных кислот и возможными заболеваниями. Это позволит врачам назначать более точную и эффективную терапию, откорректировать диету, провести профилактику сердечно-сосудистых заболеваний и, в итоге, достигнуть лучших результатов в лечении за максимально короткие сроки.

Литература

1. *Лохов П.Г., Арчаков А.И. Масс-спектрометрические методы в метаболомике // Биомед. химия. 2008. 54(5): 409–511.*
2. *Татьяна Павловна Новгородцева, Липидомика в медико-биологических исследованиях НИИ Медицинской климатологии и восстановительного лечения // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 4-5 (39-40) 2009, УДК [612.123+61+57]:001.8*
3. *Бурбелло А.Т. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты. Фармакология, клиническое применение. - СПб, 2005 - 303с.*
4. *Титов В.Н. Атеросклероз - патология полиеновых жирных кислот // Клиническая лабораторная диагностика. - 2001. - № 1 - С. 3 – 9*
5. *Левачев М. М. Значение жира в питании здорового и больного человека: справочник по диетологии. - М.: Медицина, 2002. - С. 25-32.*
6. *Norum K. R. Dietary fat and blood lipids//Nutr. Rev. - 1992. - Vol.50, №4, Suppl. 2. - P.30-37.*
7. *International Omega-3 learning and education consortium for health and medicine. University of Connecticut 2007-2012. http://www.omega31earning.uconn.edu/library/*
8. *Lavie CJ, Milani RV. Fish oils. In: Messerli FH, editor. Cardiovasc Drug Therapy. Philadelphia: Saunders, 1996. - P. 1608-13*
9. *Pauwels E.K. The protective effect of the mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk // Med Princ Pract. - 2011. - Vol.20, №2. - P. 103-111.*
10. *Chowdhury R, Warnakula S, Kunutsor S, Crowe F, Ward HA, et al. (2014) Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: A systematic review and meta-analysis. Ann int med 160: 398-406.*
11. *Жуков А.Ю., Ворслов Л.О., Давидян О.В. Омега-3 индекс: современный взгляд и место в клинической практике. Вопросы диетологии. 2017; 7(2): 69-74. DOI: 10.20953/2224-5448-2017-2-69-74*
12. *Brondz, I., Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. Analytica Chimica Acta, 2002. 465: p. 1-37.*