

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**PADIDINTOS BIOLOGINĖS VERTĖS GĖRIMŲ POVEIKIS JAUNŲ
ASMENŲ BIOCHEMINIAMS RODIKLIAMS**

Magistrantė MILDA VANAGAITĖ-ŽIČKIENĖ

(parašas)

Darbo vadovas

prof. A. Kaminskas

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab.dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data

Registracijos Nr.

Vilnius, 2016

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Riebalų rūgštys ir maistas	7
1.2. α -linoleno rūgštis	9
1.3. Kalcis ir vitaminas D	13
1.4. Prebiotikai	18
2. TYRIMO METODAI	21
2.1. Tiriamųjų grupė	21
2.2. Biocheminiai kraujo tyrimai ir jų metodai.....	21
2.3. Tiriamųjų, vartojusių biologiškai vertingus gėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi, riebalų rūgščių sudėties kraujo serume tyrimas dujų chromatografo/masių spektrometro pagalba	22
2.3.1. Riebalų ekstrakcija ir riebalų rūgščių metilo esterių gavimas iš kraujo serumo	22
2.3.2. Riebalų rūgščių metilo esterių masių spektrometrija/dujų chromatografija sąlygos.....	23
2.4. Rezultatų statistinis apdorojimas	25
3. REZULTATAI.....	26
3.1. I produktas	26
3.1.1. Tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi, kraujo serumo biocheminių ir antropometrinių rodiklių palyginimas prieš vartojimą ir baigus vartoti.....	26
3.1.2. Tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi riebalų rūgščių spektro kraujo serume palyginimas prieš ir po biogėrimų vartojimo	28
3.2. II produktas	31
3.2.1. Tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus vitaminu D, kalciumu ir prebiotikais, kraujo serumo biocheminių ir antropometrinių rodiklių palyginimas prieš ir baigus vartoti	31

4. REZULTATU APTARIMAS	37
4.1. I produkts	37
4.2. II produkts	40
5. IŠVADOS	43
PASIŪLYMAI	44
SUMMARY	45
LITERATŪROS SARAŠAS	47

SANTRUMPOS

1,25(OH)₂D – kalcitriolis

ALR – α -linoleno riebalų rūgštis

D2 – ergokalciferolis

D3 – cholekalciferolis

DHR – dokozaheksanoinė riebalų rūgštis

DTL- didelio tankio lipoproteinai

EPR- eikozapentanoinė riebalų rūgštis

FGF15 (angl. Fibroblast growth factor 15) – fibroblastų augimo faktorius 15 pelėse

FGF19 (angl. Fibroblast growth factor 19) – fibroblastų augimo faktorius 19 žmonėse.

LMTL- labai mažo tankio lipoproteinai

MTL – mažo tankio lipoproteinai

NF κ B – (angl. Nuclear factor kapa B) - branduolio faktorius kapa B

PNRR – polinesočiosios riebalų rūgštys

PTH – parathormonas

RAAS –renino-angiotenzino-aldosterono sistema

TAG – triacilgliceroliai

ĮVADAS

Maistas yra būtinas kiekvieno gyvo organizmo išgyvenimui. Maisto produktai, be pagrindinės funkcijos aprūpinti organizmą reikiamomis medžiagomis, gali veikti sveikatinančiai. Maistas, pagamintas ar paruoštas panaudojant mokslinę patirtį, vadinamas funkciniu maistu. Funkcinis maistas – tai maistas, kuris be teigiamo mitybinio poveikio žmogaus organizmui daro ir teigiamą fiziologinį poveikį. Funkcinio maisto, darančio poveikį žmogaus organizmui, efektyvumas priklauso nuo jame esančių veikliųjų medžiagų, kurios didina atsparumą susirgimams, gerina daugelį žmogaus organizmo funkcijų. Tai maistas, kuris gali būti praturtintas įvairiais vitaminais, mineralais, aminorūgštimis, polinesočiosiomis riebalų rūgštimis, maistinėmis skaidulomis ir kitais komponentais [10, 43, 56].

Šiuolaikinėje visuomenėje daugelis individų nesilaiko subalansuotos mitybos ir tai didina riziką susirgti širdies, kraujagyslių ir kitomis ligomis. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, nesveikos mitybos įpročiai, tokie kaip rūkymas ar fizinio aktyvumo nebuvimas, yra pagrindiniai širdies ir kraujagyslių ligų susirgimo rizikos veiksniai. Veikiant kartu su aukštu kraujo spaudimu, gliukozės ir lipidų koncentracijos padidėjimu kraujyje, šie rizikos veiksniai skatina širdies ir kraujagyslių ligų vystymąsi. Taigi, kontroliuojant šiuos rizikos veiksnius, galima užkirsti kelią širdies ir kraujagyslių ligoms, kurios tiek Lietuvoje, tiek ir visoje Europoje buvo ir tebėra pagrindinė mirties priežastis. Funkcinis maistas gali būti prevencijos ar gydymo priemonė, užkertanti kelią širdies ir kraujagyslių ligoms [10, 44].

D. B. Pangiotakos ir bendraautorių atlikta studija parodė, kad nenormalus lipidų kiekis kraujyje, rūkymas, hipertenzija, diabetas, nutukimas, psichosocialiniai faktoriai, netinkama mityba, mažas fizinis aktyvumas ir alkoholis yra vieni svarbiausių veiksnių, susijusių su miokardo infarkto rizika [44]. Daug studijų atlikta norint nustatyti tam tikro funkcinio maisto veikliųjų dalių poveikį tam tikrų širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnių, tokių kaip TAG, bendrasis cholesterolis, MTL-cholesterolis, DTL-cholesterolis, LMTL-cholesterolis, koncentracijoms kraujyje serume.

Gera mityba yra gyvybiškai svarbi sveikatai, organizmo augimui ir vystymuisi bei kaip prevencinė priemonė prieš įvairias ligas. Maistinės medžiagos ir jų komponentai, gaunami iš įvairių maisto produktų, išlaiko medžiagų apykaitos homeostazę ir aprūpina papildoma energija. Dėl žmonių genetinės variacijos, fenotipų skirtumų ir skirtingų kultūrų nėra optimalios dietos, kuri būtų pritaikyta kiekvienam organizmui. Todėl labai svarbu atrasti sąsajas tarp medžiagų apykaitos, vykstančios individualiame organizme, ir šių žmonių subalansuotos mitybos norint teisingai nustatyti, kurie maisto produktai yra būtini, kurie – mažiau būtini, o kurie nėra gyvybiškai reikalingi atitinkamai žmonių populiacijai. [43].

Darbo tikslas - ištirti ir išanalizuoti padidintos biologinės vertės gėrimų poveikį jaunų asmenų kraujo biocheminiams rodikliams.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti ir įvertinti biogėrimų, praturintų α -linoleno rūgštimi, poveikį sveikų asmenų biocheminiams rodikliams prieš vartojimą ir po vartojimo.
2. Ištirti ir įvertinti biogėrimų, praturtintų kalciumu, prebiotikais ir vitaminu D, poveikį sveikų asmenų biocheminiams rodikliams prieš vartojimą ir po vartojimo.
3. Ištirti ir išanalizuoti tiriamųjų, vartojusių α -linoleno rūgštimi praturtintus biogėrimus, kraujo serumo riebalų rūgščių spektrą prieš ir po biogėrimų vartojimo.

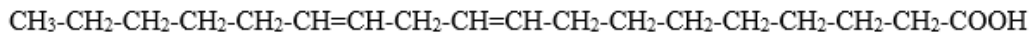
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Riebalų rūgštys ir maistas

Jau 1929 metais G.O. Burr nustatė, kad maisto riebalai yra ne tik energijos šaltinis, bet ir būtini normaliai organizmo veiklai [8]. Riebalų rūgščių spektras priklauso nuo mitybos veiksnių. Vienų riebalų rūgščių su maistu gauname per daug, kitų – per mažai, o tai gali turėti įtakos tam tikriems sveikatos sutrikimams. Norint klinikiškai diagnozuoti ir įvertinti šiuos sutrikimus, reikia įvertinti riebalų rūgščių spektrą. Maisto riebalai klasifikuojami pagal tai, kokios riebalų rūgštys juos sudaro. Riebalų rūgštys skirstomos į sočiausias riebalų rūgštis, kurios neturi dvigubųjų jungčių, mononesočiausias riebalų rūgštis, kurios turi vieną dvigubą jungtį, ir polinesočiausias riebalų rūgštis, kurios turi dvi ar daugiau dvigubąsias jungtis. Dažniausiai kraujyje pasitaikančios iš sočiųjų riebalų rūgščių yra palmitino (16:0) ir stearino (18:0) riebalų rūgštys. Dažniausiai pasitaikanti kraujyje mononesočioji riebalų rūgštis yra oleino (18:1 ω 9). Polinesočiosios riebalų rūgštys yra viena svarbiausių funkcinio maisto veikliųjų dalių. Kai kurių polinesočiųjų rūgščių mūsų organizmas nesintetina (linolo (18:2 ω 6) ir α -linoleno (18:3 ω 3)), todėl jos turi būti gaunamos su maistu ir yra vadinamos nepakeičiamomis riebalų rūgštimis. Yra dvi serijos polinesočiųjų riebalų rūgščių, kurios laikomos būtinomis. Jos, priklausomai nuo dvigubosios jungties padėties molekulėje, yra skirstomos į dvi grupes: ω 3 ir ω 6. Visos polinesočiosios riebalų rūgštys, kurių molekulėje pirma dviguba jungtis yra prie 6-ojo C atomo, skaičiuojant nuo galinės metilo grupės, priklauso ω 6 grupei. Kai tokia jungtis yra prie 3-ojo C atomo, priskiriama ω 3 grupei. Labiausiai susijusios su balansuota mityba iš ω 6 riebalų rūgščių grupės yra arachidono rūgštis (20:4 ω 6), kuri gali būti randama gyvuliniuose produktuose, ir linolo rūgštis (18:2 ω 6) (1 paveikslas), kuri dažniausiai randama augaliniuose aliejuose, sėklose, riešutuose ir gali būti paverčiama veikiant fermentams į arachidono rūgštį (3 paveikslas). ω 3 grupei priklauso iš augalų gaunama α -linoleno rūgštis (18:3 ω 3) (1 paveikslas) ir iš žuvų taukų gaunamos eikozapentanoinė rūgštis (20:5 ω 3) ir dokozaheksanoinė (22:6 ω :3) rūgštis (3 paveikslas) [6, 16, 23, 28, 52].



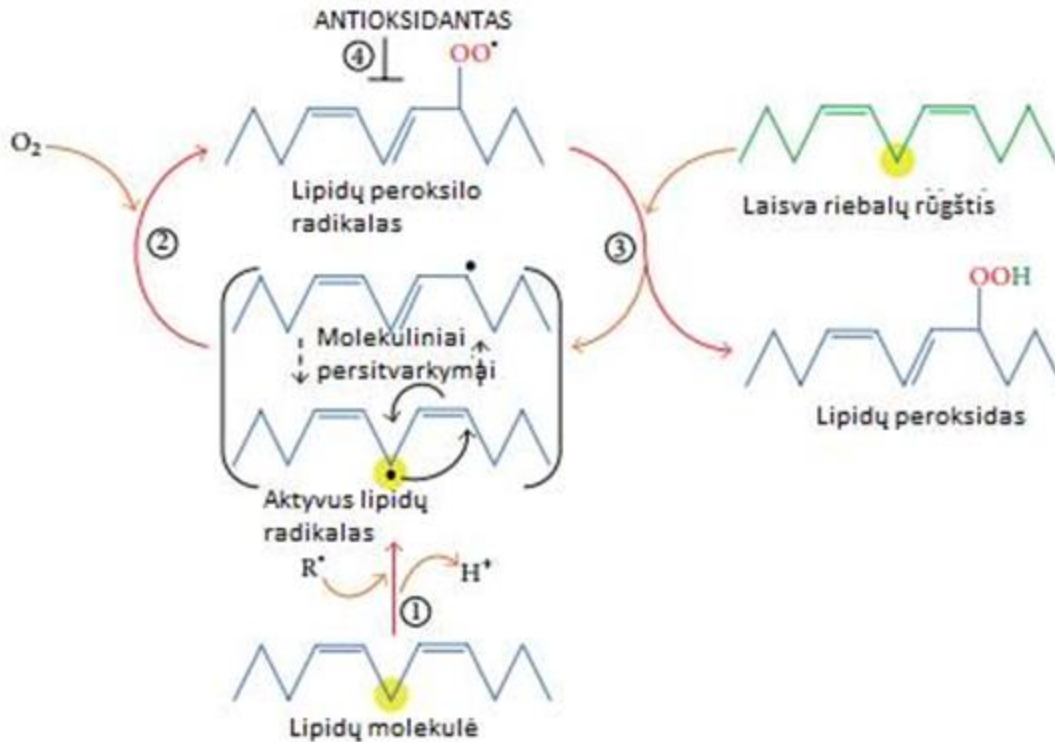
α -linoleno rūgštis $\omega 3$ (18:3); čia pirmas skaičius nurodo anglies atomų kiekį, antrasis - dvigubų jungčių skaičių molekulėje.



linolo rūgštis $\omega 6$ (18:2)

1 pav. Polinesočiųjų riebalų rūgščių linijinė struktūra [28].

Kraujagyslių ligų profilaktikai yra svarbus ne tik RR santykis, bet ir antioksidatorių, kurie gali slopinti ar visai nukenksminti organizme vykstančius oksidacinius procesus, kiekis maiste. Daug dėmesio skiriama tyrimams, susijusiems su oksidacijos pasekmėmis, kurias sukelia laisvieji radikalai. Jų fiziologinėmis sąlygomis susidaro nedaug, tačiau patologinių procesų metu (uždegimo, onkologinių ligų, hipoksijos, aterosklerozės), taip pat veikiant jonizuojančiai spinduliuotei, cheminėms medžiagoms, stresams, jų pasigamina labai daug. Vienas laisvųjų radikalų taikinių yra nesočiosios riebalų rūgštys. Padidėjęs laisvųjų deguonies radikalų kiekis organizme gali sukelti lipidų peroksidaciją ląstelės membranose. Lipidų peroksidacijos procesas susideda iš kelių stadijų: pradinė (iniciacijos), propagacijos, galutinė (terminacijos). Iniciacijos stadijoje prooksidantai, reaguodami su lipidų molekule, sukuria aktyvų lipidų radikalą ($L\cdot$). Propagacijos stadijoje, kadangi lipidų radikalas ($L\cdot$) nėra labai stabili molekulė, tai iškart reaguoja su molekulinio deguonimi ir suformuoja lipidų peroksilo radikalą ($LOO\cdot$). $LOO\cdot$ taip pat nėra labai stabilus ir reaguoja su kita laisva riebalų rūgštimi. Taip susidaro lipidų peroksidai ir nauji lipidų radikalai ($L\cdot$), toliau dalyvaujantys grandininėje reakcijoje. Terminacijos stadijoje, antioksidantai, tokie kaip vitaminas E, atiduoda savo vandenilio atomą $LOO\cdot$ ir suformuoja atitinkamą vitamino E radikalą, kuris reaguoja su kitu $LOO\cdot$ ir suformuoja neradikalinius produktus. Radikalinė reakcija sustoja, kai sureaguoja du radikalai ir gaunamas neradikalinis produktas (3 paveikslas). Lipidų peroksidai yra labai reaktyvūs ir gali jungtis su daugeliu kitų biomolekulių: baltymais, aminorūgštimis, biogeniniais aminais ar DNR. Polinesočiosios riebalų rūgštys yra ypač jautrios laisvųjų radikalų atakai, o oksiduotos rūgštys skatina aterosklerozę [3, 10, 22, 31, 32, 62].

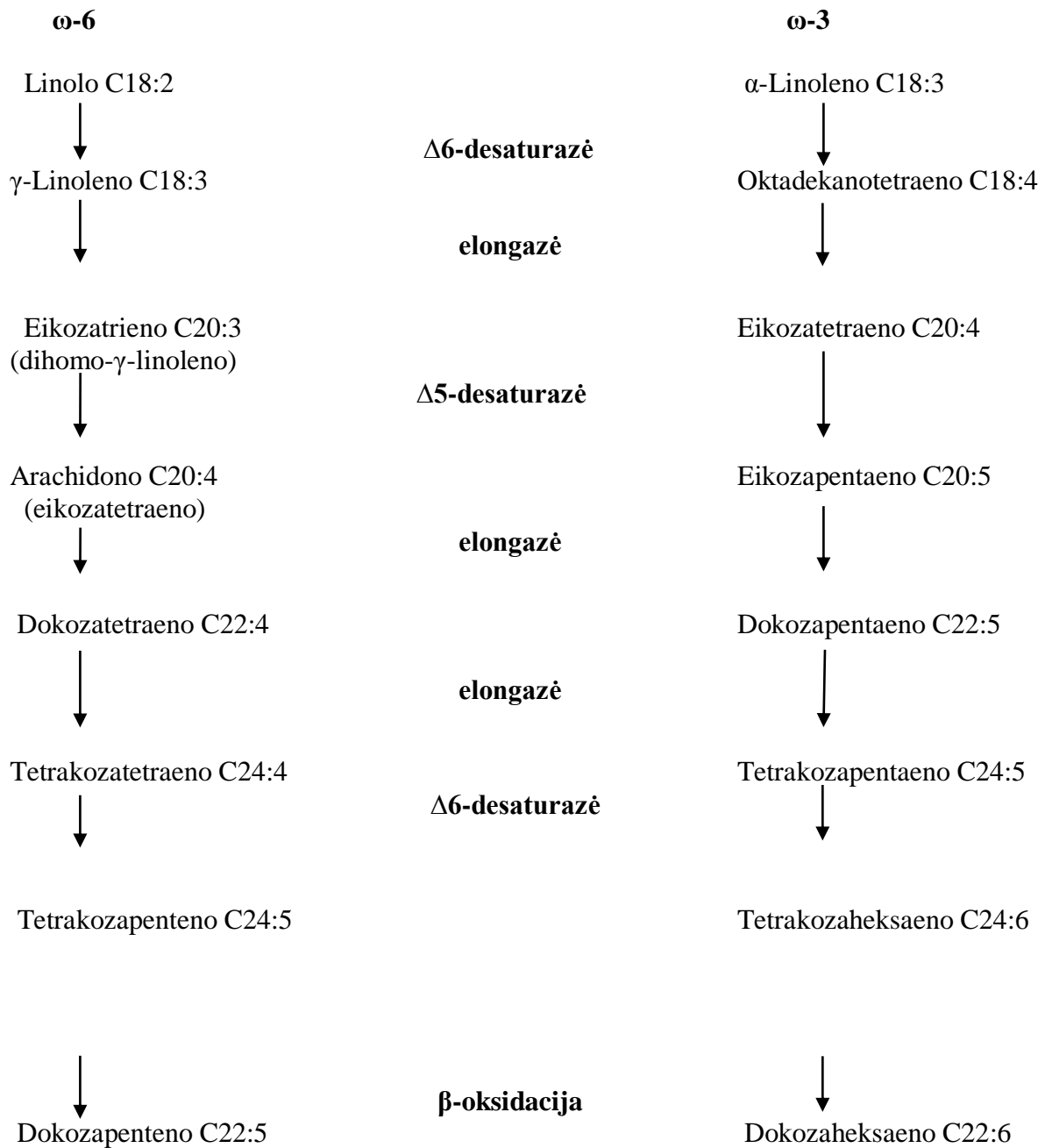


2 pav. Lipidų peroksidacijos mechanizmas. 1) Iniciacijos metu prooksidantai, reaguodami su lipidų molekule, sukuria L, kuris linkęs būti stabilizuojamas molekulinį persitvarkymų metu suformuojant konjuguotą dieną. 2) Propagacijos metu L reaguoja su molekulinium deguonimi ir suformuoja LOO•. 3) LOO• reaguoja su kita laisva riebalų rūgštimi ir suformuoja lipidų peroksidą ir naują lipidų radikalą. 4) Terminacijos metu antioksidantai atiduoda savo vandenilio atomą lipidų peroksi radikalui ir suformuoja neradikalinį produktą [3].

1.2. α -linoleno rūgštis

α -linoleno rūgštis, priklausanti ω 3 grupei, yra ilgagrاندė polinesočioji riebalų rūgštis (1 paveikslas). Didžiausios jos koncentracijos randamos linų sėmenų aliejuje, taip pat galima rasti sojos, rapsų aliejuose ir kitame augaliniame maiste. Du svarbūs junginiai, kuriuos organizmas gamina iš α -linoleno rūgšties, yra eikozapentanoinė ir dokozaheksanoinė riebalų rūgštys. α -linoleno rūgštis, su maistu patekusi į organizmą, fermentų pagalba verčiama į ilgagrandes polinesočiasias rūgštis: pirmiausia į eikozapentaeno, vėliau – į dokozaheksaeno rūgštį (3 paveikslas), kurių taip pat galima gauti su žuvų taukais. Trūkstant alfa linoleno rūgšties, nepasigamina pakankamai

dokozeheksaeno rūgšties, kuri yra pagrindinis smegenų ir tinklainės fosfolipidinės membranos komponentas, ir tai gali sukelti šių organų disfunkciją [1, 15, 16, 23].



3 pav. Linolo ir alfa linoleno riebalų rūgščių metabolizmo, susidarant ilgagrاندėms polinesočiosioms riebalų rūgštims, schema [23].

ω 3 riebalų rūgštys fiziologiškai reikšmingos žmogaus sveikatai, o ypač širdies ir kraujagyslių sistemai. Šių rūgščių per parą žmogus turi gauti 1-2 g. α -linoleno riebalų rūgšties trūkumas gali paskatinti lėtą augimą, kepenų suriebėjimą, odos pažeidimus ir reprodukcinį nepakankamumą. Nepakankamas α -linoleno rūgšties vartojimas gali būti susijęs su padidėjusia mirtingumo nuo širdies ir kraujagyslių ligų rizika [68]. Tai įrodė atliktos studijos. Viena iš jų – *Health Professionals Follow-up* studija, kurioje dalyvavo 45000 vyrų, parodė, kad tiems vyrams, kurie 14 metų vartojo didesnę kiekį alfa linoleno rūgšties širdies ir kraujagyslių ligų rizika sumažėjo 11%, lyginant su tais vyrais, kurie vartojo mažesnę kiekį alfa linoleno rūgšties [37]. Atliktos studijos taip pat patvirtino šių rūgščių poveikį mažinant triacilglicerolių koncentraciją kraujyje, veikiant antiaritmiškai, mažinant trombocitų agregaciją, mažinant kraujo spaudimą, stabilizuojant aterosklerozinę plokštelę. Šie visi veiksniai susiję su širdies ir kraujagyslių ligomis. TAG pernešami ir išnešiojami po organizmą lipoproteinų pagalba. Chilomikronai ir labai mažo tankio lipoproteinai - svarbiausi TAG pernešėjai. Kinetinės studijos parodė, kad ω 3 riebalų rūgštys mažina TAG koncentraciją kraujyje slopinant LMTL sekreciją iš kepenų. Vėliau atliktos studijos su gyvūnais leido ištyrinėti su tuo susijusius biocheminius mechanizmus. ω 3 riebalų rūgštys mažina TAG koncentraciją kraujyje, nes PNRR yra netinkamas substratas fermentams, dalyvaujantiems TAG sintezėje, ir taip sumažinamas TAG sintezėje dalyvaujančių fermentų aktyvumas (diacilglicerolio aciltransferazės ar fosfatido rūgšties fosfohidrolazė); taip pat jos mažina TAG sintezę, padidindamos fosfolipidų sintezę. Kaip pavyzdį galime imti tai, kad ω 3 riebalų rūgštys veikia raišką tam tikrų baltymų, reguliuojančių genus, atsakingus už riebalų metabolizmą bei kitus procesus, susijusius su širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksniais [23, 24, 27, 58]. Dokozaheksaeno rūgštis yra pagrindinis smegenų ir tinklainės fosfolipidinės membranos komponentas. Jos trūkumas gali paveikti jų funkciją. Eikozapentaeno ir dokozaheksaeno rūgštis gali slopinti trombocitų agregaciją, padeda išvengti širdies ir kraujagyslių ligų, reumatoidinio artrito, išsėtinės sklerozės, atopinio dermatito, opinio kolito, bronchinės astmos, onkologinių ligų, depresijos [6, 65].

Hipolipideminis ω 3 riebalų rūgščių poveikis yra tik vienas iš veiksnių, kurie turi įtakos antiaterogeniniam potencialui. Išaiškinta, kad infekcinės ligos ir uždegimas yra

svarbūs papildomi veiksniai, darantys įtaką aterosklerozinėms koronarinių arterijų ligoms [45, 53].

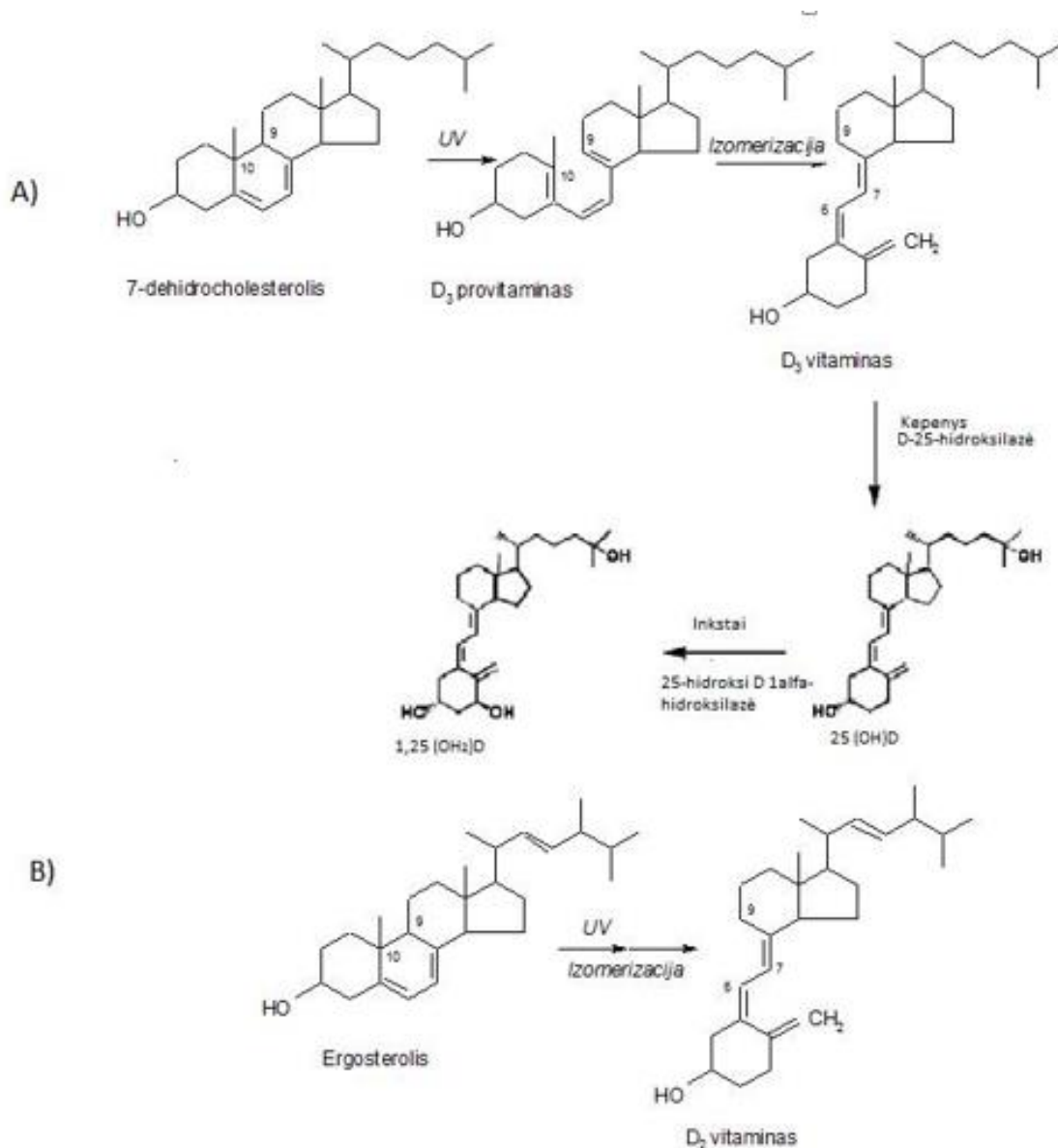
1.3. Kalcis ir vitaminas D

Studijos parodė, kad pieno produktai gali būti susiję su metaboliniu sindromu. Metabolinį sindromą gali sukelti įvairūs veiksniai, tokie kaip dislipidemija, atsparumas insulinui, padidėjęs kraujo spaudimas ir pilvinio tipo suriebėjimas. Kartu veikiant šiems veiksniams, ženkliai išauga diabeto ir širdies ir kraujagyslių ligų rizika [36].

Viena iš svarbiausių pieno produktų sudedamųjų dalių yra kalcis, kuris labiausiai susijęs su širdies ir kraujagyslių ligų rizika. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, kalcio trūkumas susijęs su įvairiomis sveikatos problemomis [67]. Jo yra visuose augalų ir gyvūnų audiniuose ir skysčiuose. Augalai ima kalcį iš dirvožemio, gyvūnai, tarp jų ir žmogus, gauna kalcį su maistu. Žmogui kalcis yra labai svarbus, rekomenduojama dienos norma priklauso nuo amžiaus, tačiau apytiksliai rekomenduojama gauti 800 mg per dieną. Apie 99% kalcio, esančio mūsų organizme, įeina į kaulų ir dantų sudėtį. Kiekvieną dieną mes netenkame kalcio per odą, nagus, plaukus, prakaitą, šlapimą, išmatas, todėl labai svarbu gauti pakankamai kalcio su maistu [14, 56]. Keletas atliktų studijų parodė kalcio ir juo praturtintų produktų poveikį siekiant sumažinti antsvorį ir besikaupiančius kūno riebalus. K. J. Lorenzen ir A. Astrup teigia, kad vienas iš kalcio veikimo mechanizmų, užkertančių kelią antsvoriui, yra padidėjęs išmatų kiekis ir padidėjęs energijos panaudojimas. Remdamiesi kitų autorių nuomone, K. J. Lorenzen ir A. Astrup teigia, kad tai susiję su padidėjusia sočiųjų riebalų rūgščių, ypač palmitino rūgšties, ekskrecija. Palmitino rūgštis įeina į pieno produktų sudėtį ir padidina cholesterolio koncentraciją kraujyje. Pirmiausia padidėja MTL-cholesterolio koncentracija, o jis labiausiai susijęs su širdies ir kraujagyslių ligomis. Sočiųjų riebalų rūgščių poveikio MTL koncentracijos padidėjimui mechanizmas iki galo nėra atrastas, bet manoma, kad jos veikia slopindamos MTL receptorių [36].

Vitaminas D yra riebaluose tirpių medžiagų grupė. Pagal cheminę prigimtį tai sekosteroidai – į steroidus panašios molekulės. Steroidai yra sudaryti iš keturių susijungusių anglies atomų žiedų, o vienas iš šių sekosteroidų žiedų yra suardytas (4 paveikslas) [5]. Vitaminas D gali būti gaunamas su maistu, taip pat gali būti sintetinamas gyvūnų odoje, žemesniuose augaluose ir mielėse veikiant UV spinduliams. Yra dvi vitamino D formos – vitaminas D2 (ergokalciferolis) ir D3 (cholecalciferolis). Vitaminas

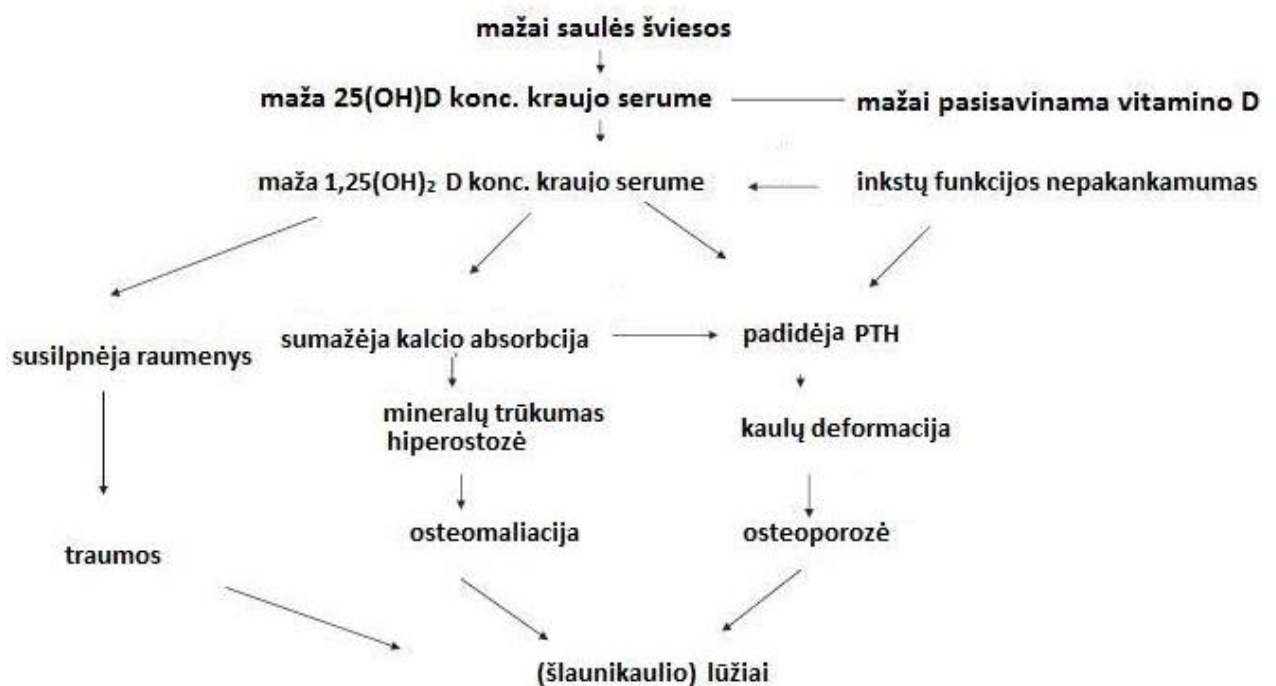
D3 yra sintetinamas odoje iš provitamino 7-dehidroksicholesterolio. Vitaminas D3 taip pat gali būti gaunamas su maistu. Jo daugiausiai gaunama su riebiomis žuvimis, kiaušinio tryniu ar vartojant papildus, praturtintus vitaminu D. Vitaminas D2 sintetinamas iš ergosterolio. Tiek vitaminas D2, tiek D3 gali būti naudojami kaip kai kurių maisto produktų, pavyzdžiui pieno, margarino, sulčių, papildai ir veikti sveikatinančiai [66]. Žmogaus organizmui svarbesnis yra vitaminas D3. D2 vitaminas dažniau naudojamas kaip komercinis preparatas, kuris išgaunamas iš mielių paveikus jas UV spinduliais, ir dedamas į pieną, sviestą. Iš žarnyno vitaminas D (tai vitaminas D2, D3 ar kartu) patenka į limfinę sistemą chilomikronų sudėtyje, o iš jos patenka į veninę kraują. Kraujyje vitaminas D pernešamas vitaminą D surišančio baltymo ir tik apie 1% laisvai cirkuliuoja plazmoje. Vitaminas D, patekęs į organizmą, yra biologiškai neveiklus, todėl, patekęs į kepenis, yra hidroksilinamas veikiant 25(OH)D-1 hidroksilazės ir verčiamas 25-hidroksivitaminu D (25(OH)D). 25(OH)D yra toliau hidroksilinamas, tik jau inkstuose, ir, veikiant 25-hidroksivitamino D 1-alfa-hidroksilazei, suformuojama biologiškai aktyvi vitamino D forma – 1,25-dihidroksi-vitaminas D (1,25(OH)₂D), kitaip vadinamas kalcitrioliu (3 paveikslas). 1,25(OH)₂D skatina kalcio ir fosforo rezorbciją plonajame žarnyne ir palaiko kalcio ir fosforo pakankamą kiekį kraujyje, taip užtikrindamas normalią kaulų mineralizaciją ir apsaugą nuo hipokalcemijos. Jei yra vitamino D trūkumas, tai organizmas gali rezorbuoti tik 10-15% su maistu gauto kalcio ir 60% fosforo, kai paprastai, esant pakankamam vitamino D kiekiui, yra rezorbuojama 30-40 % kalcio ir iki 80% fosforo. Šio vitamino rekomenduojama norma žmogui yra 30-40 ng/ml (75-100 nmol/l). [4, 5, 18, 41].



4 pav. a) Vitamino D₂, D₃ sintezės schema. D₃ katabolizmas ir aktyvacija. 1) Gyvūnų odoje yra sintetinamas vitaminas D₃ iš 7-dehidrocholesterolio. Veikiant UV spinduliams skyla ryšys tarp 9-10 anglies (C) atomo ir susidaro vitamino D₃ provitaminas, kuris spontaniškai maždaug per 36 valandas izomerizuoja ir virsta vitaminu D₃ - cholekaciferoliu. Patekęs į organizmą vitaminas D₃ yra neveiklus, dėl to patenka į kepenis ir ten hidroksilinamas, veikiant 25(OH)D-1 hidroksilazės verčiamas į 25(OH)D. Kitas etapas - inkstuose 25(OH)D hidroksilinamas veikiant 25-hidroksi-vitamino D 1alfa-hidroksilazės ir suformuoja biologiškai aktyvią vitamino D formą - 1,25(OH)₂D - kalcitriolį.

b) Vitamino D₂ sintezės schema. Augaluose ir mielėse: vitaminas D₂ sintetinamas iš ergosterolio, analogiškai kaip ir su vitaminu D₃, izomerizuoja veikiant UV spinduliams ir virsta vitaminu D₂ - ergokalciferolis [4, 18, 53].

Negaunant pakankamo kiekio vitamino D, sumažėja $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ koncentracija, tuo pačiu kalcio ir fosforo rezorbcija plonajame žarnyne, ir skatinama parathormono (PTH) sekrecija. PTH padeda išlaikyti kalcio ir fosforo homeostazę kraujyje. Padidėjusi PTH koncentracija skatina kaulų demineralizaciją, kaulai gali deformuotis, suplonėti, tapti trapūs (5 paveikslas). Vitaminas D taip pat reikalingas kaulams augti ir atsinaujinti. Pakankamas kiekis vitamino D gali apsaugoti nuo vaikų rachito ir suaugusiųjų osteomaliacijos. Vartojant vitaminą D kartu su kalciumu galima užkirsti kelią osteoporozei [35].



5 pav. Vitamino D trūkumo sukeltų sutrikimų patofiziologiniai išsivystymo mechanizmų schema [35].

Kaulų apsauga nėra vienintelis vitamino D poveikis. Yra žinoma, kad daugelis audinių savo paviršiuje turi vitamino D receptorių, prie kurių jungiasi vitaminas D. Prie žarnyne esančių receptorių prisijungia vitaminas D ir aktyvina kalcio rezorbciją. Tokie patys receptoriai gali būti randami ir kituose organuose, pradedant nuo prostatos, baigiant širdimi, taip pat kraujagyslėse, raumenyse ar endokrininėse liaukose. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ organizme atlieka įvairias funkcijas, tokias kaip ląstelių proliferacijos slopinimas, ląstelių diferenciacijos skatinimas, angiogenezės slopinimas, insulino gamybos skatinimas, renino

gamybos slopinimas [38]. Renino-angiotenzino-aldosterono sistema yra pagrindinis kraujo spaudimo reguliatorius. Aktyvinta RAAS gali sukelti oksidacinį stresą, endotelio disfunkciją, kraujagyslių standumo padidėjimą bei hipertrofiją. Jos komponentai – angiotenzinas 2 ir aldosteronas – tiesiogiai dalyvauja aterosklerozės patogenezėje. Buvo išaiškinta, kad vitaminas D yra stiprus RAAS slopintojas. *In vitro* atliktos studijos, kur buvo panaudotas jukstaglomerulinio ląstelės aparato modelis, parodė, kad vitaminas D slopina renino kelią, angiotenzinogeno genų raišką blokuodamas NFκB [7, 29, 40]. Taip pat PTH slopina lipolizę ir didina sintazės, dalyvaujančios riebalų rūgščių sintezėje, kiekį, o tai sudaro palankias sąlygas lipidams kauptis [26].

Osteoporozė yra susijusi su padidėjusia širdies ir kraujagyslių ligų rizika. Abiejų ligų rizikos veiksniai, tokie kaip hipertenzija, diabetas, rūkymas, piktnaudžiavimas alkoholiu, nepakankamas fizinis aktyvumas ir amžius, sutampa. Taip pat tiek širdies ir kraujagyslių ligos, tiek osteoporozė yra susijusios su kalcifikacijos procesu. Ateromos kalcifikacija ir kaulų mineralizacija yra panašūs procesai, turintys keletą bendrų bruožų. Buvo išaiškinta, kad arterijų kalcifikacija nėra tik pasyvus kalcio fosfato nusodinimas paskutinėje aterosklerozinės plokštelės formavimosi stadijoje, bet ir gerai organizuotas procesas, reguliuojamas panašių mechanizmų, kaip ir kaulų mineralizacijos procese [12, 20].

Aterosklerozės procesas susideda iš kelių etapų: prasideda uždegiminiu endotelio pažeidimu, sukeliama jo disfunkcija, baigiasi aterosklerotinės plokštelės plyšimu. Buvo išaiškinta, kad vitaminas D dalyvauja sisteminio uždegimo procese. Vitamino D receptoriai, ekspresuojami daugelyje ląstelių, turi įtakos aterosklerozės vystymuisi. Vitaminas D gali kontroliuoti daugybę fiziologinių ir pataloginių procesų, tokių kaip: kraujagyslių ląstelių augimą, migraciją, diferenciaciją; imuninio atsako moduliaciją, citokinų ekspresiją; taip pat uždegiminius kelius. Visa tai vaidina lemiamą vaidmenį aterosklerozės vystymosi procese pradedant nuo endotelio pažeidimo ir disfunkcijos, baigiant paskutiniu etapu – aterosklerozinės plokštelės pažeidimu ir plyšimu. Yra manoma, kad angiogenezė gali būti atsakinga už aterosklerotinės plokštelės plyšimą, o vitaminas D gali slopinti angiogenezės procesą [29].

Vitaminas D taip pat gali skatinti insulino sintezę ir sekreciją. 3 metus trukusi studija parodė, kad diabetu nesergančių pacientų, kurių amžius 65 metai ir daugiau, gavusių

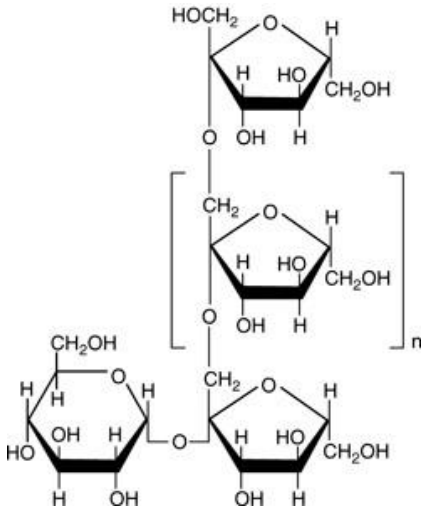
vitamino D ir kalcio 700 IU kiekį, gliukozės koncentracija kraujo serume yra žymiai mažesnė nei tų, kurie gavo placebo [39, 49].

1.4. Prebiotikai

Terminas maistinė skaidula buvo pradėtas vartoti 1953 metais, bet jos poveikis sveikatai buvo ilgai aiškinamas. Maistinėmis skaidulomis, arba kitaip, prebiotikais, vadinami angliavandeniai, kurių yra augaliniuose produktuose ir kurių neskaido žmogaus virškinimo trakto fermentai. Visi prebiotikai priklauso skaiduloms, bet ne visos skaidulos yra prebiotikai. Prebiotikais galime vadinti tas veikliąsias medžiagas, kurios pasižymi atsparumu skrandžio rūgštingumui; jų hidrolizėje dalyvauja tik žinduoliams būdingi fermentai; absorbuojamos tik viršutinėje virškinimo trakto dalyje; fermentuojamos žarnyno mikrofloros; skatinančios žarnyno bakterijų selektyvų augimą ir pasižyminčios sveikatinančiu veikimu [61]. Prebiotikai yra labai svarbūs žmogaus organizmui ir veikia sveikatinančiai: pagerinant virškinamojo trakto mikroflorą; selektyviai skatinant probiotikų augimą ir slopinant patogeninius mikroorganizmus; skatinant imuninės sistemos veiklą; skatinant mineralų absorbciją ir kaulų stabilizaciją; apsaugant nuo vėžio. Natūralių prebiotikų daugiausiai randama ankštinių augalų (sojų, žirnių, pupelių) sėklose, mielėse, o taip pat gausu vaisiuose, uogose, daržovėse, Rekomenduojama prebiotikų norma per parą tiek suaugusiems, tiek vaikams yra 14g/100kcal. Plačiausiai vartojami, daugiausiai ištirti prebiotikai yra nevirškinami oligosacharidai: fruktooligosacharidai, inulinas, oligofruktozė, gliukooligosacharidai, mananoligosacharidai, galaktooligosacharidai, ksilooligosacharidai, laktulozė, laktitolis, transgalaktooligosacharidai, izomaltooligosacharidai bei sojų oligosacharidai [2, 42, 50].

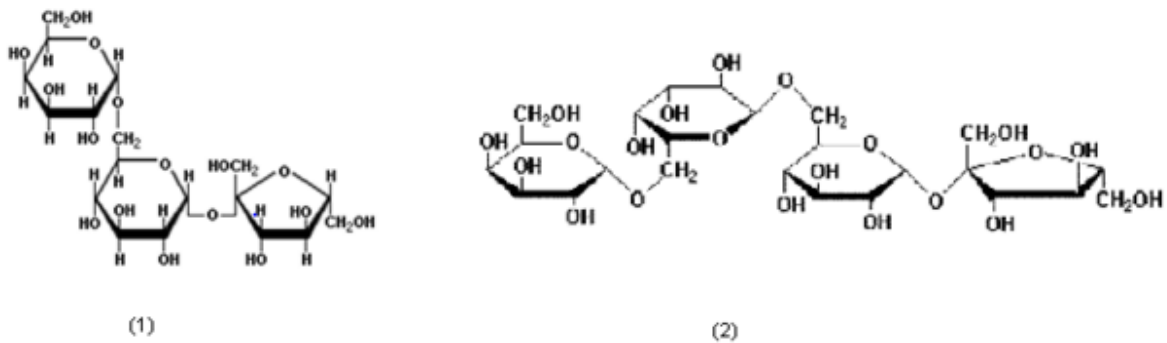
Vienas iš žinomiausių ir dažniausiai naudojamų prebiotikų – inulinas. Inulinas – angliavandenis, kuris sudarytas iš fruktozės liekanų, tarpusavyje sujungtų β -(2→1) ryšiais, o polimero gale prijungta gliukozės molekulė (6 paveikslas). Inulinas skatina naudingų bakterijų augimą gaubtinėje žarnoje ir taip savo ruožtu slopina nepageidaujamų bakterijų

veiklą. Taip pat manoma, kad padidina kalcio absorbciją kauluose, padidina atsparumą virškinimo trakto infekcijoms, padeda apsaugoti nuo arterinės hipertenzijos [33].



6 pav. Inulino struktūrinė formulė

Sojų sėklos yra oligosacharidų, tokių kaip rafinozė ir stachiozė, šaltinis. Rafinozė yra trisacharidas, kuris susideda iš gliukozės, fruktozės ir galaktozės liekanų. Stachiozė yra tetrasacharidas, kuris susideda iš galaktozės, susijungusios α -(1→6) ryšiais su rafinozės galaktozės liekana. (7 paveikslas). Manoma, kad sojų oligosacharidai gali veikti kaip antioksidatoriai, mažinti kraujo spaudimą ir apsaugoti nuo diabeto [13].



7 pav. 1) rafinozės struktūrinė formulė 2) stachiozės struktūrinė formulė

Epidemiologinės ir klinikinės studijos parodė, kad individams, kurie vartoja didesnę kiekį prebiotikų, ženkliai sumažėja rizika susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis bei sumažėja insulto, hipertenzijos, diabeto, nutukimo ar virškinimo sistemos sutrikimų rizika. Intervenciniai tyrimai parodė, kad padidinus skaidulinių medžiagų suvartojimą,

sumažinama širdies ir kraujagyslių ligų rizikos faktorių, tokių kaip cholesterolio ir trigliceridų koncentracija kraujyje. Pirmiausia, tirpios skaidulos padidina tulžies rūgščių ekskreciją taip sumažindamas bendrojo ir MTL-cholesterolio koncentraciją kraujyje. Cholesterolis yra naudojamas naujų tulžies rūgščių sintezėje, dėl to sumažėja jo koncentracija kraujo serume. Antra, trumpų riebalų rūgščių sintezė slopina cholesterolio sintezę. Trečia, kontroliuojant glikemiją maistinės skaidulos gali sumažinti antro tipo cukrinio diabeto riziką [34]. Studijos parodė, kad papildžius savo dienos maisto davinį papildomais 10 g maistinių skaidulų, mirtingumo rizika nuo širdies ir kraujagyslių ligų sumažėja 17 - 35% [64]. Septynios *Cohort* vykdomos studijos parodė, kad vartojusiems didesnį kiekį prebiotikų netgi 29% sumažėjo rizika susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis nei tų, kurie nevartojo arba vartojo labai mažą kiekį [34, 48].

J. H. Chang ir bendraautorių atliktos studijos rezultatai parodė, kad sojos pupelių praturtinti papildai gali sumažinti ir padėti reguliuoti gliukozės koncentraciją ir kraujo lipidų koncentraciją kraujyje diabetu sergantiems pacientams [11].

2. TYRIMO METODAI

2.1. Tiriamųjų grupė

Magistro darbo metu buvo tirta 50 sveikų savanorių, kurių amžius 20 – 24 metai. Jų įprastas dienos davinys buvo papildytas biologiškai vertingu gėrimu. Gėrimą tiriamieji vartojo 21 dieną, išgeriant po 0,5 litro per dieną. Tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes. Dvi grupės po 25 individus vartojo skirtingomis veikliosiomis medžiagomis praturtintus biologiškai vertingus gėrimus. Pirmosios grupės gėrimas buvo papildytas 2 g alfa linoleno rūgšties. Antrosios grupės gėrimas buvo praturtintas kalciu (150 mg), vitaminu D (0,75 µg) ir prebiotikais (inulinas, 2,5 g).

Kraujo tyrimai buvo atliekami iš ryto nuo 7:30 iki 9:00 val. prieš tai 12 valandų nevalgius. Arterinis kraujospūdis buvo matuojamas 2 kartus, pulso dažnis buvo matuojamas 1 kartą ramiai pabuvus 5 minutes, kūno sudėtis buvo vertinama naudojant „Omron BF 511“. Visi tiriamieji rodikliai buvo nustatomi 2 kartus – iki pradėdant vartoti biogėrimą ir baigus jį vartoti.

Buvo iširtas 25 tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus 2 g alfa linoleno rūgšties, kraujo serumo riebalų rūgščių spektras masių spektrometro ir dujų chromatografo pagalba, norint įvertinti riebalų rūgščių spektro sudėties pasikeitimą kraujo serume prieš ir po biogėrimų vartojimo.

Tyrimui atlikti buvo gautas Lietuvos Bioetikos komiteto leidimas (2012-11-29; registracijos numeris Nr. 158200-12-227-158).

2.2. Biocheminiai kraujo tyrimai ir jų metodai

Biocheminių kraujo rodiklių tyrimai 50 tiriamųjų buvo atlikti Santariškių ligoninės laboratorijoje. Kraujo serumo bendrojo cholesterolio ir TAG koncentracija buvo nustatoma fermentiniu kolorimetriniu metodu. MTL-cholesterolio koncentracija buvo apskaičiuojama naudojant *Friedewald'o* formulę. DTL-cholesterolis buvo tiriamas fermentiniu metodu. Gliukozės koncentracija kraujo plazmoje buvo tiriama naudojant fermentinį heksokinazės metodą. Kraujo serumo insulino koncentracija buvo vertinama taikant chemiliuminescentinį mikrodalelių imunoanalizės metodą.

2.3. Tiriamųjų, vartojusių biologiškai vertingus gėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi, riebalų rūgščių sudėties kraujo serume tyrimas dujų chromatografo/masių spektrometro pagalba

25 tiriamiesiems, vartojusiems biogėrimus praturtintus 2 g α -linoleno rūgšties, dujų chromatografijos-masių spektrometrijos pagalba buvo atlikti kraujo serumo riebalų rūgščių spektro tyrimai prieš ir baigus vartoti biogėrimus.

2.3.1. Riebalų ekstrakcija ir riebalų rūgščių metilo esterių gavimas iš kraujo serumo

1. Riebalų ekstrakcija vykdoma 20 ml chloroformo ir metanolio mišiniu (tūrių santykis 2:1) pagal Folch metodą [21]. Toks mėginys statomas į kratytuvą kambario temperatūroje 30 min ir paliekamas nakčiai, kad nusistovėtų.
2. Kitą dieną mėgintuvėlio viršutinis sluoksnis nusiurbiamas, o apatinis perfiltruojamas į metilino kolbą per popierinį filtrą su bevandeniu Na_2SO_4 .
3. Kolbos turinio skystoji dalis išgarinama panaudojant azotą.
4. Į kolbą pilame 10 ml metanolio ir 1 ml HCl, toliau taikomas Stoffel metodas [63].
5. Kolba prijungiama prie grįžtamojo šaldytuvo ir transesterifikavimas vykdomas 2 valandas 100°C temperatūroje verdančio vandens vonelėje.
6. Kolbos turinys perpilamas į dalijimo piltuvą: įpilama 4 ml vandens ir riebalų rūgščių metilo esteriai išskiriami naudojant heksaną 3 kartus po 2 ml.
7. Riebalų rūgščių metilo esteriai heksano tirpale surenkami į atskirą chromatografinį mėgintuvėlį.
8. Mėgintuvėlio turinys azotu koncentruojamas iki reikiamo maždaug 150-300 μl tūrio.

Tiriamos riebalų rūgštys:

Sočiosios riebalų rūgštys:

- 14:0 – tetradekano/miristino
- 16:0 – heksadekano/palmitino
- 18:0 – oktadekano/stearino

Mononesočiosios riebalų rūgštys:

- 16:1 ω 7 – 9-heksadeceno/palmitoleino
- 18:1 ω 7 – 11-oktadekano
- 18:1 ω 9 – 9-oktadekano/oleino
- 20: 1 ω 9 – 11-eikozano

Polinesočiosios riebalų rūgštys:

- 18:2 ω 6 – 9,12-oktadekadieno/linolo
- 18:3 ω 3 – 9,12,15-oktadekatrieno/ α -linoleno
- 20:4 ω 6 – 5,8,11,14-eikozatetraeno/arachidono
- 20:5 ω 3 – 5,8,11,14,17-eikozapentaeno
- 22:5 ω 3 – 7,10,13,16,19-dokosapentaeno
- 22:6 ω 3 – 4,7,10,13,16,19-dokozaheksaeno

2.3.2. Riebalų rūgščių metilo esterių masių spektrometrija/dujų chromatografija sąlygos

Aparatūra: riebalų rūgščių metilo esteriai buvo tirti dujų chromatografu ir identifikuoti masių spektrometru (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu), kolonėlė Rtx-5MS (ilgis - 30 m \times vidinis skersmuo - 0,25mm \times nejudrios fazės sluoksnio storis - 0,25 μ m).

Dujų chromatografo tyrimo sąlygos

- Kolonėlės termostato temperatūra: 80,0 °C
- Injektoriaus temperatūra: 250,00 °C
- Injekcijos tipas: su srauto dalijimu
- Srauto valdymo režimas: linijinis greitis
- Slėgis: 58,8 kPa

- Bendras srautas: 4,8 mL/min
- Srautas per kolonėlę: 0,90 mL/min
- Nešančiųjų dujų užsklandos laikas: 2,00 min
- Kolonėlės termostato temperatūra:

Dažnis	Temperatūra (°C)	Laikymo laikas (min)
-	80,0	1,00
6,00	310,0	5,00

Masių spektrometro tyrimo sąlygos

- Jonų šaltinio temperatūra: 200,00 °C
- Sąsajos temperatūra: 310,00 °C
- Detektoriaus naudos režimas: santykinis
- Detektoriaus nauda: 0,78 kV +0,00 kV
- Pradžios laikas: 5,10min
- Baigties laikas: 44,00min
- Įvykio laikas: 0,20sec
- Skanavimo greitis: 2500
- Masės intervalas m/z :29,00 - 500,00

2.4. Rezultatų statistinis apdorojimas

Tyrimų rezultatų statistiniam vertinimui naudojome IBM SPSS Statistics 22 programą. Naudojant Kolmogorovo - Smirnovą testą nustatyta, kad kintamųjų skirstiniai suderinami su normaliuoju skirstiniu ($p > 0,05$). Stjudento (t) kriterijų priklausomoms imtims skaičiavome tarp tų pačių tiriamųjų bazinių tyrimų rezultatų prieš vartojant ir tyrimo rezultatų po trijų savaičių biogėrimo vartojimo. Duomenys pateikti apskaičiavus aritmetinį vidurkį ir standartinius nuokrypius. Koreliaciniam ryšiui nustatyti naudotas Pirsono koreliacijos koeficientas. Siekiant nustatyti tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus vitaminu D, kalciu ir prebiotikais, cholesterolio ir MTL-cholesterolio koncentracijų įtaką prieš biogėrimų vartojimą cholesterolio ir MTL-cholesterolio koncentracijos pokyčiui, atsiradusiam po biogėrimų vartojimo, buvo naudota tiesinė regresinė analizė. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$. Grafikai ir diagramos sudaryti naudojant Excel 2013 ir IBM SPSS Statistics 22.

3. REZULTATAI

3.1. I produktas

3.1.1. Tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi, kraujo serumo biocheminių ir antropometrinių rodiklių palyginimas prieš vartojimą ir baigus vartoti

25 tiriamiesiems, kurių dienos davinyis buvo praturtintas biologiškai vertingais gėrimais, papildytais 2 g α -linoleno rūgšties, buvo atlikti kraujo serumo biocheminiai tyrimai ir nustatyti antropometriniai, kūno sudėties, arterinio kraujospūdžio ir pulso rodikliai prieš ir baigus vartoti biogėrimus. Rezultatai pateikti 1 ir 2 lentelėse.

1 lentelė. Kraujo serumo lipidų, angliavandenių ir kiti kraujo rodikliai iki pradedant vartoti ir baigus vartoti biogėrimus. (n=25)

	Iki pradedant vartoti biogėrimus Vidurkis\pmSN	Po 3 savaičių biogėrimų vartojimo Vidurkis\pmSN	t	p
Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	4,55 \pm 0,65	4,61 \pm 0,71	-0,999	0,328
DTL-cholesterolis (mmol/l)	1,53 \pm 0,27	1,56 \pm 0,28	-1,248	0,225
MTL- cholesterolis (mmol/l)	2,67 \pm 0,62	2,68 \pm 0,67	-0,383	0,705
TAG (mmol/l)	0,76 \pm 0,38	0,77 \pm 0,43	-0,115	0,909
Insulinas (pmol/l)	44,10 \pm 12,65	49,33 \pm 17,28	-1,621	0,119

Gliukozės koncentracija (mmol/l)	4,86±0,33	4,91±0,34	-1,37	0,184
Fibrinogenas (g/l)	2,80±0,37	2,85±0,42	-0,818	0,422
CRB (mg/l)	0,54±0,59	1,10±2,53	-1,205	0,240

Vertinant biogėrimų poveikį tiriamųjų kraujo serumo biocheminiams rodikliams nustatėme, kad po 3 savaičių biogėrimų, praturtintų α -linoleno rūgštimi, vartojimo statistiškai reikšmingai nepakito kraujo serumo biocheminių rodiklių koncentracijos (1 lentelė).

2 lentelė. Palyginamieji antropometriniai, kūno sudėties, arterinio kraujospūdžio ir pulso vertinimo tyrimo rezultatai iki pradedant vartoti ir praėjus trims savaitėms po biogėrimų vartojimo. (n=25)

	Iki pradedant vartoti biogėrimus Vidurkis±SN	Po 3 savaičių biogėrimų vartojimo Vidurkis±SN	t	p
Svoris (kg)	65,10±9,67	64,81±10,02	0,456	0,653
Ūgis (cm)	170,95±7,13	171±7,54	-0,726	0,476
KMI (kg/m²)	22,18±2,29	22,07±2,33	0,626	0,538
Kūno riebalai (%)	27,84±7,15	28,34±7,75	-1,288	0,211
Griaučių raumenų kiekis (%)	31,32±4,88	31,08±5,14	1,184	0,249

Visceralinių riebalų kiekis (%)	3,32±1,31	3,56±1,12	-2,313	0,030
Sistolinis arterinis kraujospūdis (mmHg)	126,48±16,05	118,75±27,75	1,38	0,179
Diastolinis arterinis kraujospūdis (mmHg)	73,08±7,98	72,34±7,01	0,27	0,788
Pulsas (k/min)	76,40±13,20	73,61±12,03	1,131	0,270

Po 3 savaičių biogėrimų vartojimo tiriamųjų antropometriniai, kūno sudėties, arterinio kraujospūdis ir pulso vertinimo tyrimo rezultatai rodo, kad vartojant biogėrimus statistiškai reikšmingai padidėjo tik visceralinių riebalų kiekis (3,32±1,31 % *versus* 3,56±1,12 %, p=0,030), tačiau normos ribos (3 - 4 %) nebuvo peržengtos. Kitų rodiklių statistiškai reikšmingo pokyčio aptikti nepavyko (2 lentelė).

3.1.2. Tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi riebalų rūgščių spektro kraujo serume palyginimas prieš ir po biogėrimų vartojimo

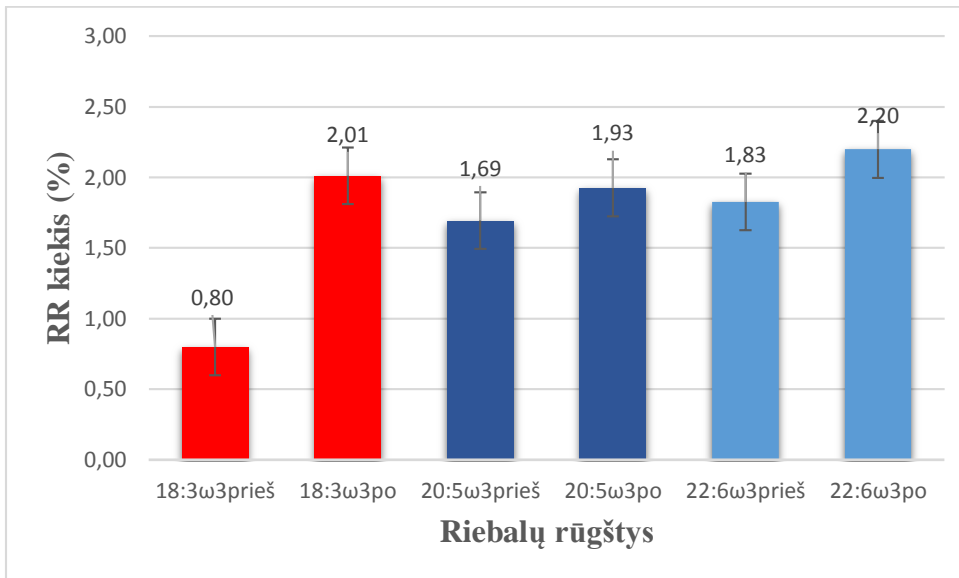
Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu nustatytas 25 tiriamųjų kraujo serumo riebalų rūgščių spektras prieš ir po biogėrimų vartojimo. Tyrimo metu tarpusavyje palygintos atskirų riebalų rūgščių procentinės koncentracijos; sočiųjų, mononesočiųjų, polisočiųjų riebalų rūgščių procentinių koncentracijų sumos bei polinesočiųjų riebalų rūgščių grupių: ω 3 ir ω 6 procentinių koncentracijų sumos prieš ir po biogėrimų vartojimo. Tyrimo rezultatai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Kraujo serumo riebalų rūgščių procentinių koncentracijų palyginimas prieš ir po biogėrimų vartojimo. (n=25).

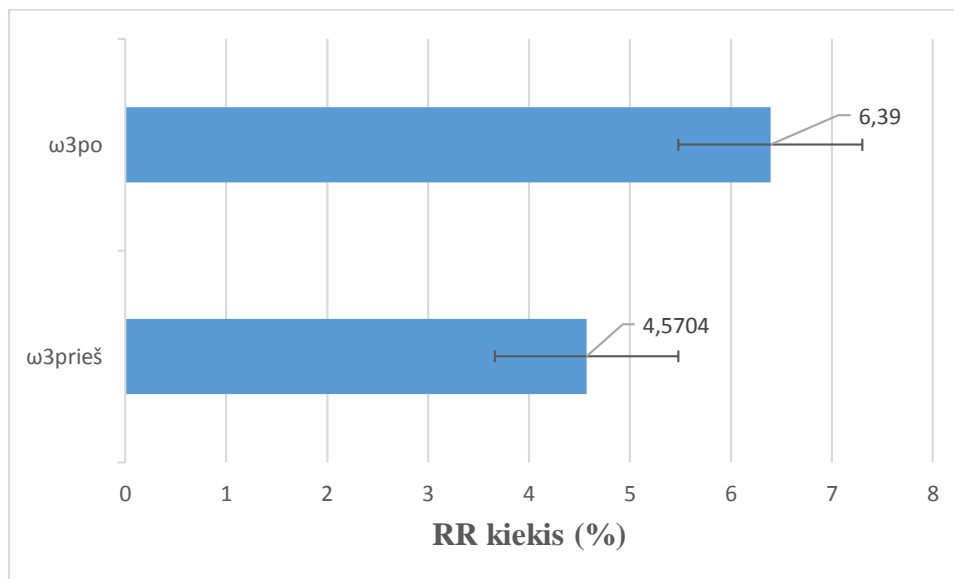
Riebalų rūgštys	Iki pradėdant vartoti biogėrimus Vidurkis±SN (%)	Po 3 savaičių biogėrimų vartojimo Vidurkis±SN (%)	t	p
Sočiosios				
14:0	2,35±1,74	2,37±1,44	-0,022	0,982
16:0	27,30±3,62	26,50±1,69	1,548	0,135
18:0	11,01±1,94	10,09±1,15	2,056	0,051
∑	40,67±4,93	38,97±3,47	2,134	0,043
Mononesočiosios				
16:1ω7	3,51±2,54	2,10±0,62	2,766	0,011
18:1ω9	19,92±7,59	22,30±3,24	-1,417	0,169
18:1ω7	2,15±1,10	2,50±0,55	-1,223	0,233
20:1ω9	0,24±0,35	0,26±0,24	-0,194	0,847
∑	25,82±7,17	27,16±2,70	-0,772	0,447
Polinesočiosios				
18:2ω6	24,00±5,44	22,26±2,65	1,432	0,165
18:3ω3	0,80±0,53	2,01±0,85	-6,769	<0,001
20:4ω6	4,94±1,55	5,23±0,98	-0,887	0,384
20:5ω3	1,69±1,90	1,93±1,93	-3,658	<0,001
22:5ω3	0,25±0,26	0,25±0,17	-0,021	0,983
22:6ω3	1,83±0,69	2,11±0,79	-3,581	0,002
∑	33,51±5,64	33,87±3,46	-0,218	0,829
∑ω3	4,56±2,51	6,39±2,42	-6,666	<0,001
∑ω6	28,94±6,43	27,49±2,63	0,958	0,348

Vertinant biogėrimų poveikį kraujo serumo riebalų rūgščių sudėčiai nustatėme, kad po 3 savaičių biogėrimų, praturtintų α -linoleno (18:3 ω 3) rūgštimi, vartojimo statistiškai reikšmingai padidėjo polinesočiųjų riebalų rūgščių: α -linoleno (0,80±0,53 % *versus* 2,01±0,85 %, p<0,001), eikozopentaeno (20:5 ω 3) (1,69±1,90 % *versus* 1,93±1,93 %, p<0,001), dokožoheksaeno (22:6 ω 3) (1,83±0,69 % *versus* 2,11±0,79 %, p<0,001) rūgščių procentinės koncentracijos tiriamųjų kraujo serume (8 paveikslas). Palyginus polinesočiųjų rūgščių grupių, ω 3 ir ω 6, procentinių koncentracijų sumas, nustatėme, kad statistiškai reikšmingas padidėjimas matomas ω 3 grupėje (4,56±2,51 % *versus* 6,39±2,42 %, p<0,001) (9 paveikslas), o ω 6 grupės statistiškai reikšmingo (p<0,05) pokyčio neaptikome. Taip pat buvo pastebėtas mononesočiosios rūgšties palmitoleino statistiškai reikšmingas

sumažėjimas ($3,51 \pm 2,54$ % versus $2,10 \pm 0,62$ %, $p=0,015$). Riebalų rūgščių procentinių koncentracijų sumų statistiškai reikšmingas sumažėjimas pastebėtas sočiųjų riebalų rūgščių grupėje ($40,67 \pm 4,93$ % versus $38,97 \pm 3,47$ %, $p=0,043$). Kitose grupėse statistiškai reikšmingo ($p < 0,005$) sumažėjimo aptikti nepavyko (3 lentelė).



8 pav. ALR, DHR, EPR procentinių koncentracijų tiriamųjų kraujo serume palyginimas prieš ir po biogėrimų vartojimo.



9 pav. ω3 polinesočiųjų rūgščių grupės procentinių koncentracijų palyginimas prieš ir po biogėrimo vartojimo.

3.2. II produktas

3.2.1. Tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus vitaminu D, kalciumu ir prebiotikais, kraujo serumo biocheminių ir antropometrinių rodiklių palyginimas prieš ir baigus vartoti

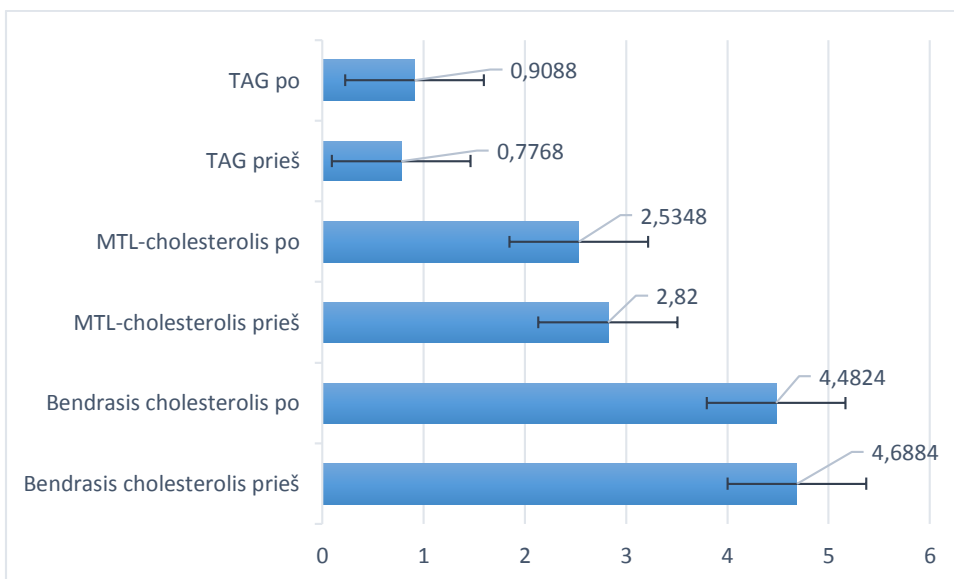
25 tiriamiesiems, kurie 3 savaites turėjo vartoti biologiškai vertingus gėrimus, praturtintus kalciumu (150 mg), vitaminu D (0,75 µg) ir prebiotikais (2,5 g) buvo atlikti kraujo serumo biocheminiai tyrimai ir nustatyti antropometriniai, kūno sudėties, arterinio kraujospūdžio ir pulso rodikliai prieš ir baigus vartoti biogėrimus. Gauti rezultatai pateikti 4 ir 5 lentelėse.

4 lentelė. Kraujo serumo lipidų, angliavandenių ir kiti kraujo rodikliai iki pradedant vartoti ir baigus vartoti biogėrimus (n=25).

	Iki pradedant vartoti biogėrimus Vidurkis±SN	Po 3 savaičių biogėrimų vartojimo Vidurkis±SN	t	p
Bendrasis cholesterolis (mmol/l)	4,69±0,91	4,48±0,73	2,075	0,049
DTL- cholesterolis (mmol/l)	1,51±0,36	1,53±0,34	-0,736	0,469
MTL- cholesterolis (mmol/l)	2,82±0,74	2,53±0,58	3,165	0,004
TAG (mmol/l)	0,77±0,31	0,91±0,42	-3,049	0,006
Insulinas (pmol/l)	57,14±27,62	65,48±24,84	-1,740	0,095

Gliukozės koncentracija (mmol/l)	5,00±0,40	4,91±0,42	1,195	0,244
Fibrinogenas (g/l)	2,94±0,52	2,98±0,74	-0,292	0,773
CRB (mg/l)	0,54±0,45	1,28±2,13	-1,936	0,065

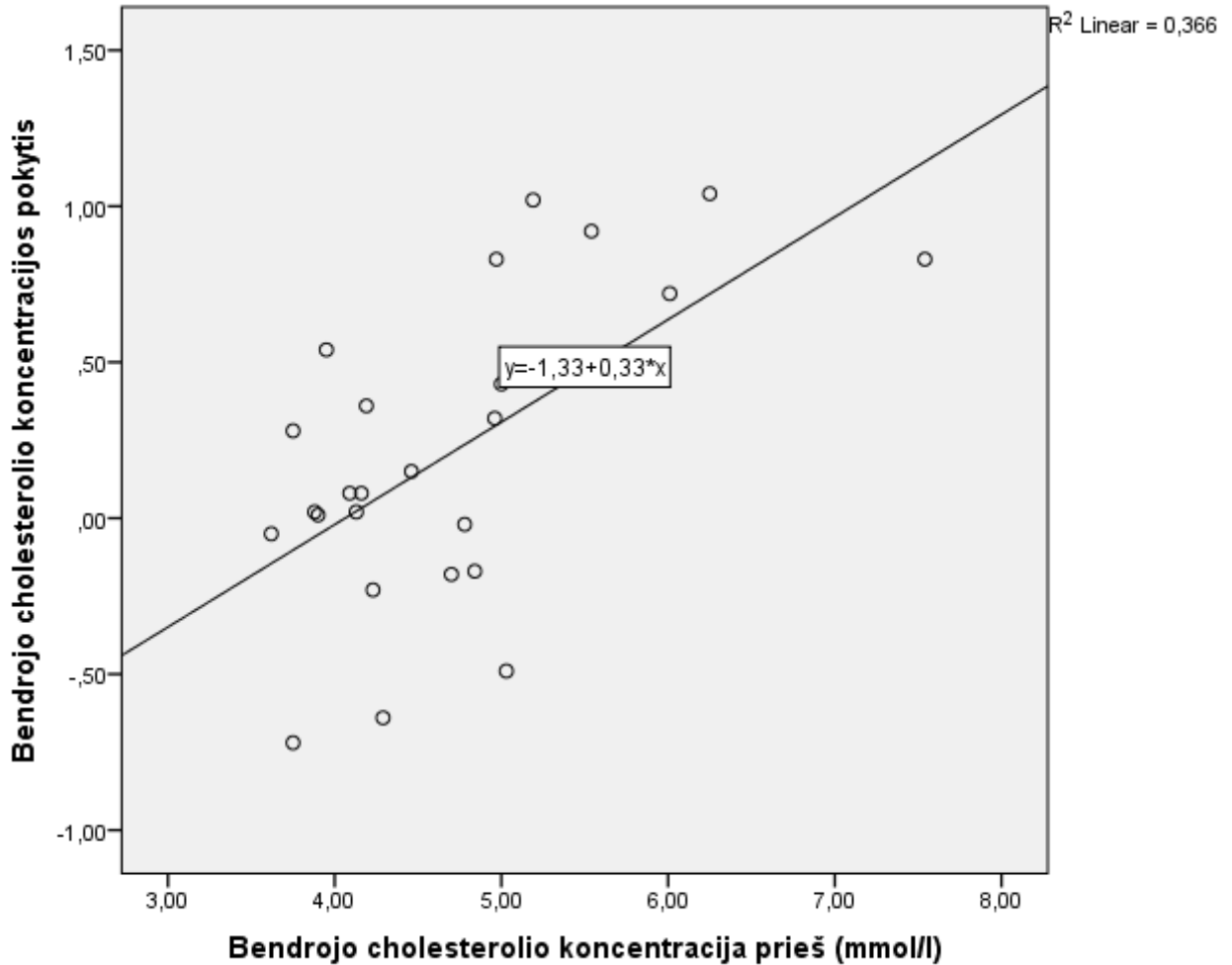
Vertinant biogėrimų, praturtintų vitaminu D, kalciumu ir prebiotinėmis skaidulomis poveikį kraujo rodikliams nustatėme, kad po 3 savaičių biogėrimų vartojimo statistiškai reikšmingai sumažėjo kraujo serumo bendrojo cholesterolio ($4,69 \pm 0,91$ mmol/l *versus* $4,48 \pm 0,73$ mmol/l, $p=0,049$) ir MTL-cholesterolio ($2,82 \pm 0,74$ mmol/l *versus* $2,53 \pm 0,58$ mmol/l, $p=0,004$) koncentracijos. Šio tyrimo rezultatai taip pat parodė, kad tiriamųjų kraujo serume statistiškai reikšmingai padidėjo TAG ($0,77 \pm 0,31$ mmol/l *versus* $0,91 \pm 0,42$) koncentracija, tačiau šis pokytis neperžengė normos ribų ($\leq 1,8$ mmol/l), taigi negalėjo turėti neigiamo poveikio sveikatai (10 paveikslas). Kitų biocheminių rodiklių statistiškai reikšmingų pokyčių aptikti nepavyko (4 lentelė).



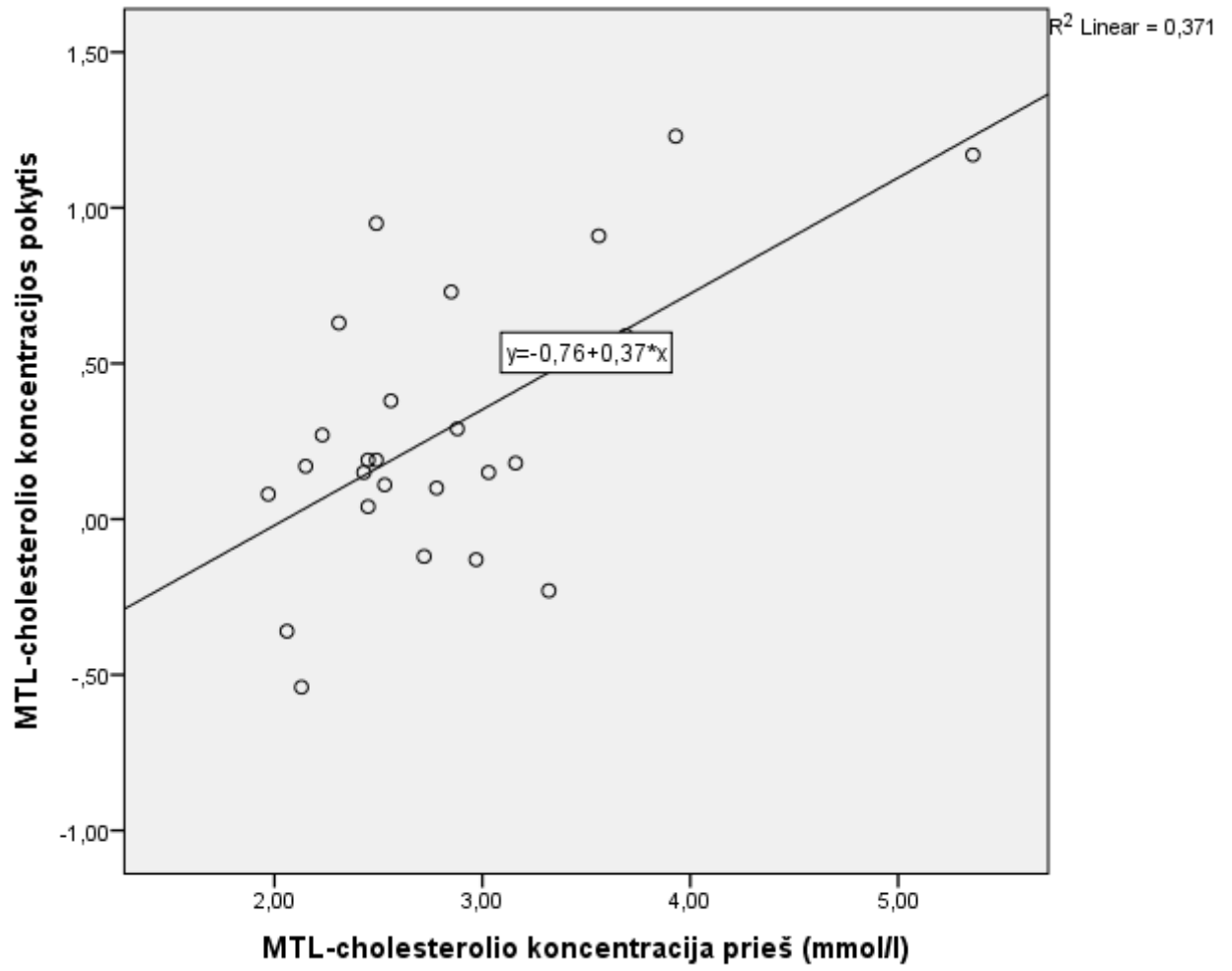
10 pav. Biocheminių rodiklių palyginimas prieš ir po biogėrimų, praturtintų kalciumu, vitaminu D ir prebiotikais, vartojimo

Norint išsiaiškinti, ar tam tikrų biocheminių rodiklių koncentracijos tiriamųjų kraujo serume prieš biogėrimų vartojimą turėjo įtakos biocheminių rodiklių pokyčiams, buvo nustatytas koreliacinis ryšys ir atlikta tiesinė regresinė analizė. Biocheminių rodiklių prieš ir po biogėrimų vartojimo pokytis apskaičiuotas jų skirtumu.

Nustatytas statistiškai reikšmingas teigiamas koreliacinis ryšys tarp bendrojo cholesterolio koncentracijos prieš biogėrimų vartojimą ir bendrojo cholesterolio koncentracijos pokyčio ($r=0,0605$, $p=0,001$). Kadangi nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys, atlikta regresinė analizė, kuria siekėme išsiaiškinti, ar bendrojo cholesterolio koncentracija prieš vartojant biogėrimus turi įtakos bendrojo cholesterolio koncentracijos pokyčiui. Nustatyta, kad sudarytas regresinis modelis statistiškai reikšmingas ir tinkamas ($R^2=0,366$, $p=0,001$). Iš to galime spręsti, kad kuo didesnė bendrojo cholesterolio koncentracija buvo prieš vartojant biogėrimą, tuo buvo matomas didesnis bendrojo cholesterolio koncentracijos pokytis.



Taip pat nustatytas statistiškai reikšmingas teigiamas koreliacinis ryšys tarp MTL-cholesterolio koncentracijos prieš biogėrimų vartojimą ir MTL-cholesterolio koncentracijos pokyčio ($r=0,516$, $p=0,008$). Kadangi nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys, buvo atlikta regresinė analizė, kuria siekėme išsiaiškinti, ar cholesterolio koncentracija prieš vartojant biogėrimus turi įtakos MTL-cholesterolio koncentracijos pokyčiui. Nustatyta, kad sudarytas regresinis modelis statistiškai reikšmingas ir tinkamas ($R^2=0,371$, $p=0,001$). Iš to galime spręsti, kad kuo didesnė MTL-cholesterolio koncentracija buvo prieš vartojant biogėrimą, tuo buvo matomas didesnis MTL-cholesterolio koncentracijos pokytis.



5 lentelė. Palyginamieji antropometriniai, kūno sudėties, arterinio kraujospūdžio ir pulso vertinimo tyrimo rezultatai iki pradedant vartoti ir praėjus trimis savaitėms po biogėrimų vartojimo (n=25).

	Iki pradedant vartoti biogėrimus Vidurkis±SN	Po 3 savaičių biogėrimo vartojimo Vidurkis±SN	t	p
Svoris (kg)	69,21±10,18	69,24±9,92	-0,178	0,860
Ūgis (cm)	175,53±6,81	175,54±6,80	-1,000	0,327
KMI (kg/m²)	22,36±2,09	22,37±2,01	-0,232	0,819
Kūno riebalai (%)	26,46±7,74	25,89±7,84	0,681	0,502
Griaučių raumenų kiekis (%)	32,86±6,24	32,28±7,08	0,990	0,332
Visceralinių riebalų kiekis (%)	3,76±1,45	3,76±1,59	0	1,000
Sistolinis arterinis kraujospūdis (mmHg)	133,36±13,36	130,12±13,62	1,431	0,165
Diastolinis arterinis kraujospūdis (mmHg)	78,08±7,27	75,16±8,73	1,583	0,127
Pulsas (k/min)	83,08±12,48	81,36±13,29	0,700	0,490

Vertinant tiriamųjų antropometrinių, kūno sudėties, arterinio kraujospūdžio ir pulso vertinimo tyrimo rezultatus statistiškai reikšmingų pokyčių aptikti nepavyko (5 lentelė).

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Funkcinio maisto gamyba – sparčiai besivystanti maisto pramonės sritis. Daugelyje šalių jos apimtis nuolat didėja. Šiuo metu sparčiai plečiasi funkcinio maisto ir mitybos srities moksliniai tyrimai. Mokslinių tyrimų rezultatai panaudojami žmonių sveikatai gerinti [57].

Šio tyrimo metu dvi grupės po 25 asmenis 3 savaites vartojo dviejų rūšių biogėrimus, praturtintus skirtingomis veikliosiomis medžiagomis. Pirmoji grupė vartojo biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi (2 g). Antroji grupė vartojo biogėrimus, praturtintus kalciu (150 mg), vitaminu D (0,75 μ g) ir prebiotikais (inulinu 2,5 g).

4.1. I produktas

Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad vartojant biogėrimus, praturtintus 2 g α -linoleno rūgšties, prieš ir po vartojimo statistiškai reikšmingai nepakito lipidų koncentracija tiriamųjų kraujo serume. Bendrojo cholesterolio (4,55 \pm 0,65 mmol/l *versus* 4,61 \pm 0,71 mmol/l, p=0,328), MTL cholesterolio (2,67 \pm 0,62 mmol/l *versus* 2,68 \pm 0,67 mmol/l, p=0,705), DTL cholesterolio (1,53 \pm 0,27 mmol/l *versus* 1,56 \pm 0,28 mmol/l, p=0,225) TAG (0,76 \pm 0,38 mmol/l *versus* 0,77 \pm 0,43 mmol/l, p=0,909) koncentracijos. Šie duomenys koreliavo su N. Kaul ir bendraautorių atliktais tyrimais, kur nebuvo nustatyti statistiškai reikšmingi kraujo plazmos lipidų (TAG, bendrojo cholesterolio, MTL-cholesterolio, DTL-cholesterolio) koncentracijos pokyčiai vartojant α -linoleno rūgštimi praturtintus papildus. 12 savaitių trukusioje N. Kaul ir bendraautorių studijoje dalyvavo 86 sveiki vyrai ir moterys, kurie atsitiktinai buvo paskirstyti į keturias grupes įtraukiant ir placebo grupę. 12 savaitių jie kiekvieną dieną turėjo vartoti papildus, praturtintus skirtingais komponentais: žuvų taukais (2 g/d), linų sėmenų aliejumi (2 g/d), kanapių sėklų aliejumi (2 g/d) ir placebo, praturtintus saulėgražų aliejumi (2 g/d). Nors ir nebuvo pastebėta statistiškai reikšmingų lipidų koncentracijos pokyčių, tačiau tiek mūsų atveju, tiek N. Kaul tyrimo metu, po 12 savaitių papildų vartojimo buvo pastebėtas statistiškai reikšmingas α -linoleno rūgšties, eikozopentaeno ir dokozoheksaeno koncentracijos padidėjimas tiriamųjų kraujo serume. Mūsų tyrimo metu statistiškai reikšmingai padidėjo ALR (0,80 \pm 0,53 % *versus* 2,01 \pm 0,85 %, p<0,001), EPR (1,69 \pm 1,90 % *versus* 1,93 \pm 1,93

%, $p < 0,001$) ir DHR ($1,83 \pm 0,69$ % *versus* $2,11 \pm 0,79$ %, $p = 0,002$) procentinės koncentracijos tiriamųjų kraujo serume. N. Kaul studijos metu grupėje, vartojusioje papildus, praturtintus žuvų taukais, stebimas statistiškai reikšmingas DHR ($66,1 \pm 6,5$ *versus* $95,4 \pm 7,0$) EPR ($22,6 \pm 3,0$ *versus* $35,0 \pm 3,0$) koncentracijos tiriamųjų kraujo plazmoje padidėjimas ir linų sėmenų aliejumi praturtintus papildus vartojusių ALR ($19,7 \pm 3,1$ *versus* $25,1 \pm 3,5$) koncentracijos padidėjimas [30]. A. Patenaude ir bendraautorių keturias savaites trukusioje studijoje dalyvavo dviejų amžiaus grupių individai 18-29 ir 45-69 metų. Šių asmenų dienos davinys buvo papildytas vienodu kiekiu linų sėmenų aliejaus, kuris taip pat parodė reikšmingą ALR, DHR, EPR riebalų rūgščių koncentracijos padidėjimą tiriamųjų kraujo serume, tačiau nepastebėta beveik jokių koncentracijos pokyčių kraujo serumo lipiduose (TAG, MTL-cholesterolis, DTL-cholesterolis, bendrasis cholesterolis) abiejose amžiaus grupėse. Nors jaunų asmenų amžiaus grupėse buvo galima pastebėti TAG koncentracijos sumažėjimą kraujo serume, lyginant jį su senesniųjų amžiaus grupe, tačiau jis nebuvo statistiškai reikšmingas. Taigi, šis tyrimas parodė, kad amžius rodiklių pokyčiams įtakos neturi [47]. Mūsų tyrimo metu taip pat buvo pastebėtas statistiškai reikšmingas palmitoleino rūgšties procentinės koncentracijos sumažėjimas ($3,51 \pm 2,54$ % *versus* $2,10 \pm 0,62$ %, $p = 0,011$). Kadangi D. Mozaffarian ir bendraautorių atlikta studija parodė, kad palmitoleino rūgšties koncentracijos pokyčiai gali būti susiję su tam tikrų biocheminių ir antropometrinių rodiklių pokyčiais, neatmetame galimybės, kad šios rūgšties statistiškai reikšmingas procentinės koncentracijos pokytis turėjo įtakos mūsų tiriamųjų biocheminių ir antropometrinių rodiklių svyravimams [38]. Dėl šios priežasties buvo nustatytas statistiškai reikšmingas koreliacijos ryšys tarp palmitoleino rūgšties procentinės koncentracijos pokyčio ir insulino pokyčio ($r = 0,560$, $p = 0,004$). Nustatytas neigiamas koreliacinis ryšys rodo, kad didėjant palmitoleino rūgšties procentinės koncentracijos pokyčiui, mažėja insulino koncentracijos pokytis. Šios rūgšties, kuri, kaip žinoma, yra sintetinama mūsų organizme, statistiškai reikšmingo pokyčio priežastys gali būti įvairios; kadangi, skirtingai nei A. Patenaude ar N. Kaul studijų metu, mūsų tyrimo metu nebuvo kontroliuojama tiriamųjų mityba, tad mes negalėjome žinoti, kokius papildomus produktus kartu su biogėrimais jie vartoja, o tai galėjo turėti įtakos šios rūgšties procentinės koncentracijos sumažėjimui tiriamųjų kraujyje ir, tuo pačiu, ir tam tikrų biocheminių rodiklių pokyčiams.

Kai kurie tyrėjai parodė nedidelį ALR, DHR, EPR rūgščių poveikį kraujo serumo lipidams. S. Egert ir jo bendraautorių atliktoje studijoje dalyvavo 74 sveiki 19-43 metų jaunuoliai. Tiriamųjų buvo paprašyta 6 savaites vietoj įprasto margarino/sviesto vartoti specialiai jiems paruoštą margariną. Vienos grupės tiriamųjų šis margarinas buvo papildytas ALR rūgštimi (4,4g/d), kitų EPR (2,2g/d), o trečios grupės DHR (2,3g/d). Tyrimo metu statistiškai reikšmingai nepakito bendrojo cholesterolio ir MTL-cholesterolio koncentracija visose grupėse, tačiau TAG koncentracija statistiškai reikšmingai sumažėjo visose grupėse: EPR – 15,1 %, $p=0,001$; DHR – 30,6 %, $p=0,001$; ALR – 16,8%, $p=0,05$ [19]. Kai kurie tyrėjai nustatė statistiškai reikšmingą DTL-cholesterolio koncentracijos padidėjimą. I. Sion ir jo bendraautorių atliktoje studijoje dalyvavo 59 sveiki vyrai. Jie 12 savaitių vartojo ALR praturtintą maistą. Tai grupei, kuri gavo 6.5 g per dieną, po 12 savaitių buvo nustatytas statistiškai reikšmingas DTL-cholesterolio koncentracijos padidėjimas ($0,97 \pm 0,25$ versus $1,06 \pm 0,23$ mmol/l, $p<0,03$) [59]. Kiti autoriai daugiau tyrė ALR, EPR, DHR poveikį hipercholesterolemija ar hipertrigliceridemija sergantiems pacientams. A. C. Skulas-Ray ir bendraautorių atlikta studija ištyrė 26 asmenis su silpna hipertrigliceridemija. Studija parodė EPR, DHR (EPR+DHR – 3,4 g/d) poveikį mažinant TAG koncentraciją, ($173 \pm 17,5$ versus $237 \pm 17,5$ mg/dl, $p<0,002$) lyginant su placebo poveikiu [60]. A. Patade ir jo bendraautoriai 3 mėnesius trukusioje studijoje tyrė moteris po menopauzės, kurios serga hipercholesterolemija. Jos 3 mėnesius turėjo vartoti 30 g/d linų sėmenų. Ištyrus šių moterų kraują buvo pastebėta, kad bendrojo cholesterolio koncentracija sumažėjo 7% tiriamųjų, o MTL-cholesterolis - 10% tiriamųjų [46].

Mūsų tyrimo rezultatai taip pat parodė, kad gliukozės ir kitų biocheminių rodiklių koncentracijos tiriamųjų kraujo serume statistiškai reikšmingai nepakito. Jokio statistiškai reikšmingo gliukozės koncentracijos pokyčio nebuvo nustatyta ir I. Sion bei bendraautorių atliktoje studijoje [58].

Antropometriniai kūno sudėties, arterinio kraujospūdžio ir pulso vertinimo tyrimo rezultatai parodė, kad 3 savaites vartojant biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi, statistiškai reikšmingai padidėjo tik visceralinių riebalų kiekis ($3,32 \pm 1,31$ versus $3,56 \pm 1,12$, $p=0,030$), bet jis neperžengė normos ribų. Tam įtakos galėjo turėti maistas, kurį tiriamieji vartojo kartu su biogėrimais, nes speciali dieta jiems nebuvo paskirta. I. Sion ir

jo bendraautorių atliktoje studijoje statistiškai reikšmingai pakito tik diastolinis kraujo spaudimas, jis sumažėjo ($74,6 \pm 8,2$ versus $71,7 \pm 10,1$ mmHG, $p < 0,02$) [58].

Šios atliktos studijos parodė, kad α -linoleno rūgšties poveikis mažinant kraujo lipidų koncentraciją dažniau pasireiškia hipercholesterolemija sergantiems žmonėms, tačiau sveikiems retai aptinkamas statistiškai reikšmingas pokytis. Daug atliktų studijų nesugebėjo nustatyti ALR poveikio DTL-cholesterolio koncentracijos pokyčiams. Mūsų tiriamieji asmenys vartojo 2 g ALR ir tyrimo trukmė buvo 3 savaitės. Reikšmingesnių pokyčių nebuvimą galima būtų paaiškinti trumpesniu tyrimo laikotarpiu, mažesniu suvartotu veikliosios medžiagos kiekiu, lyginant su kitų panašaus pobūdžio studijų rezultatais. Skirtingai nei kitų studijų metu, mūsų tyrimo metu tiriamiesiems nebuvo sudaryta speciali dieta kartu su biogėrimų vartojimu ir nebuvo kontroliuojama jų mityba, o tai galėjo turėti įtakos tyrimų rezultatams.

4.2. II produktas

Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad 3 savaites vartojant biogėrimus, praturtintus kalciu (150 mg), vitaminu D (0,75 μ g) ir prebiotikais (inulinas 2,5 g) statistiškai reikšmingai sumažėjo bendro cholesterolio ($4,69 \pm 0,91$ mmol/l versus $4,48 \pm 0,73$ mmol/l, $p = 0,049$), MTL-cholesterolio ($2,82 \pm 0,74$ mmol/l versus $2,53 \pm 0,58$ mmol/l, $p = 0,004$). Šie rezultatai koreliuoja su S. Y. Chen ir bendraautorių gautais tyrimų su gyvūnais rezultatais, kur buvo nustatytas statistiškai reikšmingas sojų oligosacharidų poveikis bendrojo cholesterolio, MTL-cholesterolio, TAG koncentracijos sumažėjimui [13]. Panašūs tyrimo rezultatai gauti ir P. Dehghan ir bendraautorių atliktoje studijoje, kurioje dalyvavo 49 II tipo diabetu sergančios moterys. Jos buvo paskirstytos į dvi grupes. Pirmosios grupės dienos davinys buvo papildytas inulinu (10 g/d), o kitos, kontrolinės grupės dienos davinys buvo papildytas maltodekstrinu (10 g/d). Buvo stebimas statistiškai reikšmingas bendrojo cholesterolio, TAG ir MTL-cholesterolio sumažėjimas ir DTL-cholesterolio padidėjimas inuliną gavusių tiriamųjų grupėje, o kontrolinėje grupėje statistiškai reikšmingų pokyčių aptikta nebuvo [17]. Mūsų atveju vartojant biogėrimus, praturtintus prebiotikais, vitaminu D ir kalciu, kraujo serumo TAG koncentracija statistiškai reikšmingai padidėjo ($0,77 \pm 0,31$ mmol/l versus $0,91 \pm 0,42$ mmol/l, $p = 0,006$), tačiau neperžengė normos ribų, todėl neturėjo

neigiamo poveikio tiriamųjų sveikatai. Ne tik P. Dehghan ir bendraautoriai nustatė priešingą nei mūsų tyrimo TAG koncentracijos kitimą: J. L. Causey ir bendraautoriai atliko tyrimą, kuriame dalyvavo 20 vidutinio amžiaus vyrų su nedidele hipercholesterolemija. 3 savaites jiems buvo paskirta dieta, kurią sudarė vaniliniai ledai, praturtinti 20 g inulino. Po 3 savaičių dietos statistiškai reikšmingai sumažėjo TAG koncentracija tiriamųjų kraujo serume ($282,92 \pm 194,22$ mg/dl *versus* $243,25 \pm 161,95$ mg/dl, $p=0,05$) [9].

Buvo nustatyti statistiškai reikšmingi teigiami koreliaciniai ryšiai tarp bendrojo cholesterolio koncentracijos prieš ir cholesterolio koncentracijos pokyčio ($r=0,605$, $p=0,001$) ir tarp MTL-cholesterolio koncentracijos prieš ir MTL-cholesterolio koncentracijos pokyčio ($r=0,516$, $p=0,008$). Buvo išaiškinta, kad kuo didesnė bendrojo cholesterolio ir MTL-cholesterolio koncentracija prieš tyrimą, tuo tiek bendrojo cholesterolio, tiek MTL-cholesterolio koncentracija labiau pakito. Tuo remiantis galime teigti, kad biocheminių rodiklių koncentracijos pokyčiams įtakos galėjo turėti ne tik biologiškai vertingų gėrimų vartojimas, bet ir biocheminių rodiklių skirtumai tarp tiriamųjų prieš biogėrimų vartojimą.

Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad prieš ir po biogėrimų vartojimo statistiškai reikšmingai nepakito gliukozės ir kitų biocheminių rodiklių koncentracijos po biogėrimų vartojimo. Tai koreliavo su J. L. Causey ir bendraautorių tyrimo rezultatais, nes jie taip pat nenustatė statistiškai reikšmingo gliukozės koncentracijos pokyčio [9].

Antropometriniai, kūno sudėties, arterinio kraujospūdžio ir pulso vertinimo tyrimo rezultatai rodo, kad vartojant biogėrimą nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų pokyčių.

Kadangi į šių biogėrimų sudėtį įėjo ir vitaminas D, ir kalcis, tai ieškota sąsajų ne tik su prebiotikų, bet ir su vitamino D poveikiu tiriamųjų kraujo serumo biocheminiams ir antropometriniais rodikliams. M. P. Pondos ir jos bendraautorių atliktoje studijoje buvo tiriamas ryšys tarp vitamino D kiekio ir jo poveikio kraujo serumo lipidų koncentracijai. Buvo atrinkti 4,06 mln. pacientų įrašai, kuriems buvo atlikti vitamino D ir kraujo serumo lipidų koncentracijos tyrimai nuo 2009 iki 2011 metų. Iš jų buvo atrinkti 108711 atitinkantys tam tikrus kriterijus. Ši studija parodė, kad pacientų, kurių vitamino D koncentracija kraujyje buvo optimali (>30 ng/ml), bendrojo cholesterolio, MTL-cholesterolio, TAG koncentracija statistiškai reikšmingai ($p<0,001$) mažesnė, o DTL-cholesterolio koncentracija statistiškai reikšmingai ($p<0,001$) didesnė lyginant su

pacientais, turinčiais vitamino D trūkumą (<20 ng/ml). Buvo ištirtas ir atgalinis poveikis pacientams, turintiems vitamino D trūkumą (<20 ng/ml), siekiant nustatyti, ar vitamino D koncentracijos padidėjimas nuo trūkumo iki optimalios koncentracijos, susijęs su tiriamųjų kraujo serumo lipidų koncentracijos pokyčiais. Vitamino D koncentraciją pakėlus iki 30 ng/ml buvo pastebimas statistiškai reikšmingas ($p<0,01$) bendrojo cholesterolio koncentracijos padidėjimas ir statistiškai reikšmingas ($p<0,02$) DTL-cholesterolio padidėjimas, bet nebuvo pastebėta jokių statistiškai reikšmingų patikimų MTL-cholesterolio, TAG koncentracijos pokyčių. M. P. Ponda ir jos bendraautoriai teigia, kad vitamino D papildai neturi įtakos riebalų metabolizmui. Kaip pavyzdys galėtų būti tai, kad nutukimas yra susijęs su vitamino D koncentracijos stoka ir dislipidemija. Taigi numetus svorio, vitamino D koncentracija padidėja, o kartu padidėja ir lipidų koncentracija. Taip vyksta todėl, kad vitaminas D yra riebaluose tirpus vitaminas, riebalinis audinys veikia kaip spąstai, kur susitelkusi vitamino D koncentracija sumažėja. Tai paaiškina vitamino D koncentracijos, taip pat ir lipidų koncentracijos sąsają su nesugebėjimu paveikti lipidų koncentracijos padidinus vitamino D koncentraciją. Kita priežastis, jog lipidų koncentracija daro įtaką vitamino D koncentracijos pokyčiams, o ne atvirkščiai. Esant dislipidemijai vitamino D koncentracija kraujo serume sumažėja. Dar viena priežastis galėtų būti tai, kad vitaminas D, patekęs su maistu ir rezorbuojamas žarnyne, gali turėti skirtingą poveikį lipidų metabolizmui, nei tas vitaminas D, kuris sintetinamas odoje. Kiti autoriai teigia, kad su maistu gaunamas vitaminas D gali skatinti žarnų epitelio FGF15 sintezę, kuri gali pakeisti tulžies rūgšties homeostazę pelėse. Kaip FGF19 sintezės pokyčiai vitamino D koncentracijos daromos įtakos gali lemti bendrojo cholesterolio, tulžies rūgščių pirmtakus, dar nėra iki galo ištirta. Tačiau Pondos ir jos bendraautorių teigimu, reikia detalesnių tyrimų, kad būtų išaiškintas vitamino D poveikis lipidų koncentracijai [51].

Šių atliktų studijų rezultatai parodė statistiškai reikšmingą vitamino D, kalcio ir prebiotikų poveikį kraujo serumo lipidų koncentracijos pokyčiams. Mūsų tyrimo rezultatai skyrėsi nuo kitų autorių tyrimo dėl to, kad atliktų tyrimų dizainas buvo skirtingas: imčių dydis, tyrimo laikas, suvartotas kiekis, kito maisto vartojimas, o tai galėjo reikšmingai paveikti rezultatus.

5. IŠVADOS

1. Ištyrus 25 sveikus asmenis, 21 dieną vartojusius biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi, buvo nustatyta, kad kraujo biocheminių rodiklių pokyčiai buvo statistiškai nereikšmingi ir išliko normų ribose. Taigi galime teigti, kad tiriamųjų vartoti biogėrimai, praturtinti α -linoleno rūgštimi, negalėjo turėti neigiamo poveikio jų sveikatai.
2. Atlikus tyrimą 25 asmenims, 21 dieną vartojusiems biogėrimus, praturtintus kalciu (150 mg), vitaminu D (0,75 μ g) ir prebiotikais (inulinu 2,5g) buvo pastebėta, kad statistiškai reikšmingai sumažėjo bendrojo cholesterolio ($4,69 \pm 0,91$ mmol/l *versus* $4,48 \pm 0,73$ mmol/l, $p=0,049$) ir MTL-cholesterolio ($2,82 \pm 0,74$ mmol/l *versus* $2,53 \pm 0,58$ mmol/l, $p=0,004$) koncentracijos, o TAG koncentracija statistiškai reikšmingai padidėjo ($0,77 \pm 0,31$ mmol/l *versus* $0,91 \pm 0,42$), tačiau neperžengė normos ribų. Remiantis tyrimo metu gautais rezultatais, galime teigti, kad vartoti biogėrimai, praturtinti vitaminu D, kalciu ir prebiotikais turėjo teigiamą poveikį lipidų apykaitai ir tiriamųjų sveikatai.
3. Ištyrus ir išanalizavus tiriamųjų, vartojusių biogėrimus, praturtintus α -linoleno rūgštimi, kraujo serumo riebalų rūgščių spektrą prieš ir po biogėrimų vartojimo, buvo nustatyta statistiškai reikšmingas procentinės koncentracijos padidėjimas ALR ($0,80 \pm 0,53$ % *versus* $2,01 \pm 0,85$ %, $p < 0,001$), EPR (20:5 ω 3) ($1,69 \pm 1,90$ % *versus* $1,93 \pm 1,93$ %, $p < 0,001$), DHR (22:6 ω 3) ($1,83 \pm 0,69$ % *versus* $2,11 \pm 0,79$ %, $p < 0,001$) tiriamųjų kraujo serume po biogėrimų vartojimo. Taip pat buvo nustatytas statistiškai reikšmingas sumažėjimas palmitoleino rūgšties ($3,51 \pm 2,54$ % *versus* $2,10 \pm 0,62$ %, $p=0,015$), tačiau kadangi ši rūgštis yra sintetinama mūsų organizme, tai manoma, kad vartoti biogėrimai, įtakos jai neturėjo. Iš gautų rezultatų galime teigti, kad vartoti biogėrimai turėjo teigiamos įtakos tiriamųjų sveikatai didinant ω 3 riebalų rūgščių kieki organizme.

PASIŪLYMAI

Remiantis mokslinės literatūros duomenimis ir šio tyrimo rezultatais, rekomenduojama įdiegti tokių biogėrimų, praturtintų biologiškai vertingomis veikliosiomis medžiagomis, gamybą ir taip pagerinti Lietuvos gyventojų sveikatos būklę bei apsaugoti nuo širdies, kraujagyslių ar kitų ligų.

SUMMARY

The Impact of Increased Value of Biological Drinks Biochemical Parameters in blood of Young Adults.

Aim: the investigation and analysis of the effect of drinks with an increased biological value on the biochemical parameters in blood of young people.

Objectives:

1. To investigate and evaluate the effect of an α -linoleic acid enriched biodrink on the biochemical parameters in blood of healthy subjects before and after consumption.
2. To investigate and evaluate the effect of a fibers and vitamin D enriched biodrink on the biochemical parameters in blood of healthy subjects before and after consumption.
3. To investigate and analyze the spectra of serum fatty acids of the subjects before and after consumption of the biodrinks.

Methods:

The biochemical experiments were carried out in Santariškės hospital laboratory using conventional methods. The fatty acid spectra were obtained by gas chromatography – mass spectrometry. The statistical analysis was performed using SPSS software package.

Results:

50 healthy volunteers were exposed to a biologically valuable drink that was added to their standard daily rations. The subjects consumed the drink for 21 days drinking half a liter a day. The drink in group one was enriched with 2 g of α -linoleic acid, the drink in group two was enriched with calcium (150 mg), vitamin D (0,75 μ g) and prebiotics (2,5 g). Our analysis shows that there is no statistically significant increase in serum biochemical parameters in group one, although there is a statistically significant percentage increase in ALA, EPA and DHA. There is a statistically significant decrease in total serum cholesterol and LDL cholesterol concentrations in the second group.

Conclusions:

Based on the results of the study it can be concluded that biologically valuable drinks have a positive effect on the biochemical parameters of young people.

Keywords: biological drinks, biochemical parameters, α -linolenic acid, vitamin D, calcium, prebiotics.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui prof. (HP) dr. A. Kaminskui už idėjas, suteiktas žinias, vertingas pastabas ir kantrybę. Visam Fiziologijos, biochemijos mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros kolektyvui už įgautas žinias, kurios buvo panaudotos rašant šį darba bei visokeriopą pagalbą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Albert CM, Oh K, Whang W, Manson JE, Chae UC, Stampfer JM, *et al.* Dietary α -linolenic acid intake and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease. *Circulation* 2005; 112: 3232-38.
2. Andrieux C. Prebiotics and health. In: Post-antibiotics era on animal nutrition. The 3rd techno world meeting. February 23. 2001. Korea. 2001. P. 45–53.
3. Ayla A, Munoz FM, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanism of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014. 1-31.
4. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem. Biol* 2014; 20;21(3):319-29.
5. Bleizgys A, Šapoka V. Vitamino D nepakankamumas – širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnys. *Laboratorinė medicina* 2012; 1(53): 40-47.
6. Bradberry JC, Hilleman DE. Overview of omega-3 fatty acid therapies. *Pharmacy and Therapeutics* 2013; 38(11): 681-91.
7. Brewer LC, Michos ED, Reis JP. Vitamin D in atherosclerosis, vascular disease, and endothelial function. *Curr Drug Targets* 2011; 12 (1): 54-60.
8. Burr GO, Burr MM. New deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. *Journal Biol. Chem.* 1929; 82: 345-67.
9. Causey JL, Feirtag JM, Gallaher DD, Tungland BC, Slavin JL. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. *Nutrition research* 2000; 20 (2): 191-201.
10. Cencic A, Chingwaru W. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients* 2010; 2:611-25.
11. Chang JH, Kim SM, Kim TW, Lee SS. Effects of soybean supplementation on blood glucose, plasma lipid levels, and erythrocyte antioxidant enzyme activity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Research and Practice* 2008; 2(3): 152-57.
12. Chen H, Li-jun L, Bo X, Rui L. Effect of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. *Food Chemistry* 2010; 119: 1633-36.

13. Chen SY, Lin CS, Lin CL, Kao CH. Osteoporosis is associated with high risk for coronary heart disease. *Medicine* 2015; 94(27):1-6.
14. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. Washington, DC: National Academy Press, 2010.
15. Connor EW. α -linolenic acid in health and diseases. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 : 827-8.
16. DeFilippis PA, Blaha JM, Jacobson AT. Omega-3 fatty acids for cardiovascular disease prevention. *Current treatment options in cardiovascular medicine* 2010; 12: 365-80.
17. Dehghan P, Gargari BP, Asgharijafarabadi. Effects of high performance inulin supplementation on glycemic status and lipid profile in women with type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Health Promotion Perspectives* 2013; 3(1): 55-63.
18. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289(1): F8-28.
19. Egert S, Kannenberg F, Somoza V, Erbersdobler HF, Wahrburg U. Dietary α -linolenic acid, EPA and DHA have differential effects on LDL fatty acid composition but similar effects on serum lipid profiles in normolipidemic humans. *The Journal of Nutrition* 2009; 139:861-68.
20. Farhat GN, Cauley JA. The link between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2008; 5(1): 19-34.
21. Folch J, Lees M, Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
22. Gavino VC, Miller JS, Ikharebha SO, Milo GE, Cornwell DG. Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. *J. Lipid Res* 1981; 22(5): 763-9.
23. Harris SW, Miller M, Tighe PA, Davidson HM, Schaefer JE. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 2008; 197: 12-24.
24. Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides?. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17(4): 387-93.

25. Hasler CM, Kundrat S, Wool D. Functional foods and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports* 2000; 2: 467-75.
 26. Jorde R, Grimnes G. Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog Lipid Res* 2011; 50 (4): 303-12.
 27. Jung UJ, Torrejon C, Tighe AP, Deckelbaum RJ. n3 Fatty acids and cardiovascular disease: mechanisms underlying beneficial effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87: 2003–9.
 28. Kaminskas A. Polinesočiosios riebalų rūgštys ir jų svarba žmogaus organizmui. - Vilniaus u-to l-kla, 1997. 3-32.
 29. Kassi E, Adamopoulos C, Basdra KE, Papavassiliou GA. Role of vitamin D in atherosclerosis. *Circulation* 2013; 128: 2517-31.
 30. Kaul N, Kreml R, Austria JA, Rchard MN, Edel AL, Dibrov E, *et al.* A comparison of fish oil, flaxseed oil and hempseed oil supplementation on selected parameters of cardiovascular health in healthy volunteers. *Journal of the American College of Nutrition* 2008; 27(1) 51-58.
 31. Kazakevičius RV, Janulevičiūtė NM, Ročka VS. Oksidacinis stresas ir patologiniai procesai. *Laboratorinė medicina*, nr. 1(13), 2002; 37-42.
 32. Kučinskienė ZA. Laisvaradikalinė oksidacija, antioksidacinė gynyba ir ligos. *Laboratorinė medicina* 2001; 1(9): 31-37.
 33. Kuntz MGF, Fiates GMR, Teixeira E. Characteristics of prebiotic food products containing inulin. *British Food Journal* 2013; 115(2): 235-51.
 34. Lattimer JM, Haub DM. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2010; 2: 1266-89.
 35. Lips P, Schoor van MN. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011; 25: 585-91.
 36. Lorenzen KJ, Astrup A. Dairy calcium intake modifies responsiveness of fat metabolism and blood lipids to a high-fat diet. *British Journal of Nutrition* 2011; 105: 1823-31.
- microbial interactions. In: Mosenthin R., Zentek J., Zebrowska T. *Biology and nutrition in growing animals*. Elsevier. 2006. 3–31.

37. Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB, Stampfer MJ, Willett WC, Siscovick DS *et al.* Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2005; 111(2): 157-64.
38. Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, *et al.* Circulating palmitoleic acid and risk of metabolic abnormalities and new-onset diabetes. *American Society of Nutrition* 2010; 92: 1350-8.
39. Muldowney S, Kiely M. Vitamin D and cardiometabolic health: a review of the evidence. *Nutrition Research Reviews* 2011; 24: 1–20.
40. Muller DN KM, Kvakan H. Vitamin D review. *J Renin Angiotenzin Aldosterone Syst* 2011; 12 (2): 125-8.
41. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The ‘‘sunshine’’ vitamin. *J Pharmacol Pharmacother* 2012; 3(2): 118-26.
42. Ooi L, Liong M. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences* 2010; 11:2499-522.
43. Pang G, Xie J, Chen Q, Hu Z. How functional foods play critical roles in human health. *Food science and Human Wellness* 2012; 1:26-60.
44. Pangiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohou C, Skoumas L, Stefanadis C. Five-year incidence of cardiovascular disease and its predictors in Greece: the ATTICA study. *Vascular medicine* 2008; 13: 113-21.
45. Park Y, Harris WS, Omega-3 fatty acid supplementation accelerated chylomicron triglyceride clearance. *Journal of lipid Research* 2003; 44: 455-63.
46. Patade A, Devareddy L, Lucas EA, Korlagunta K, Daggy BP, Arjmandi BH. Flaxseed reduces total and LDL cholesterol concentrations in native american postmenopausal women. *Journal of women’s health* 2008; 17 (3): 355-66.
47. Patenaude A, Rodriguez-Leyva D, Edel AL, Dibrov E, Dupasquier CMC, *et al.* Bioavailability of α -linolenic acid from flaxseed diets as a function of the age of the subject. *European Journal of Clinical Nutrition* 2009; 63: 1123–29.
48. Pereira MA, O’Reilly E, Augustsson K, Fraser GE, Goldbourt U, Heitmann BL, *et al.* Dietary fiber and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of cohort studies. *Arch Intern Med*. 2004; 164(4): 370-6.

49. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(6): 2017-29.
50. Piva A, Galvano F, Biagi B, Casadei G. Intestinal fermentation: dietary and microbial interactions. In: Mosenthin R., Zentek J., Zebrowska T. *Biology and nutrition in growing animals.* Elsevier. 2006. 3–31.
51. Ponda MP, Huang XX, Odeh MA, Breslow JL, Kaufman HW. Vitamin D may not improve lipid levels: a serial clinical laboratory data study. *Circulation* 2012; 126 (3): 270-77.
52. Praškevičius A., Ivanovienė L., Stasiūnienė N., Burneckienė J., Rodovičius H., Lukoševičius L., Kondratas D. *Biochemija. -Kauno medicinos u-to l-kla, 2003.* 299-368.
53. Rodriguez-Leyva D, Bassett C, McCullough R, Pierce NG. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Can J Cardiol* 2010; 26 (9): 489-96.
54. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, *et al.* The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(1): 53-8.
55. Schardt D. *Nutrition Action Health Letter* 2005; 32:8.
56. Schmidt DR, Holmstrom SR, Fon Tacer K, Bookout AL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Regulation of bile acid synthesis by fat-soluble vitamins A and D. *J. Biol Chem.* 2010; 285(19): 14486-94.
57. Sekmokienė D, Liutkevičius A, Malakauskas M. Funkcionalus maistas ir jo veikliosios dalys. *Veterinarija ir zootechnika* 2007; 37(59): 72-78.
58. Shearer CG, Savinova VO, Harris SW. Fish oil – how does it reduce plasma triglycerides? *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821 (5): 843-51.
59. Sioen I, Hacquebard M, Hick G, Maindix V, Larondelle Y, Carpentier YA, *et al.* Effect of ALA- enriched food supply on cardiovascular risk factors in males. *Lipids* 2009; 44: 603-11.
60. Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, Heuvel JPV, Wagner PR, West SG. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and

- endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *The American Journal of Clinical nutrition* 2011; 93: 243-52.
61. Slavin J. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients* 2013; 5: 1417-35.
 62. Spiteller G. Is lipid peroxidation of polyunsaturated acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases?. *Rejuvenation Res.* 2010; 13(1):91-103.
 63. Stoffel W, Chu F, Ahrens E. Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Anal Chem* 1959; 31(2): 307-8.
 64. Streppel MT, Ocké MC, Boshuizen HC, Kok FJ, Kromhout D. Dietary fiber intake in relation to coronary heart disease and all-cause mortality over 40 y: the Zutphen Study. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(4):1119-25.
 65. Takeuchi H, Sakurai C, Noda R, Sekine S, Murano Y, Wanaka K, *et al.* Antihypertensive effect and safety of dietary α -linolenic acid in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *J. Olco Sci* 2007; 56 (7): 347-60.
 66. Thacher DT, Clarke LB. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc.* 2011; 86(1): 50-60.
 67. WHO 2004. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Reports of a joint FAO/WHO expert consultation; Bangkok, Thailand, 21-30 September 1998. Hong Kong, China: World Health Organization and Food and Agriculture organization of the United Nations.
 68. Zatonski W, Campos H, Willett W. Rapid declines in coronary heart disease mortality in Eastern Europe are associated with increased consumption of oils rich in alpha-linolenic acid. *Eur J Epidemiol* 2008; 23: 3-10.