

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO BIOMEDICINOS MOKSLŲ  
INSTITUTO FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

OKSIDACINIO STRESO ĮTAKA TROMBOCITŲ MEMBRANOS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ  
SUDĖČIAI

Magistrantė ORINTA GOLUBEVAITĖ \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas

prof. dr. (HP) A. Kaminskas

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja

doc., dr. D. Karčiauskaitė

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2018 m., Vilnius

## TURINYS

SANTRUMPOS .....	4
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1. Oksidacinio streso sąvoka .....	7
1.2. Reaktyvios deguonies formos ir laisvieji radikalai .....	7
1.3. Reaktyvių deguonies formų susidarymas .....	8
1.4. Lipidų peroksidacija .....	9
1.5. Malondialdehidas .....	11
1.6. Riebalų rūgščių struktūra, metabolizmas .....	12
1.7. Trombocitai ir jų membrana .....	15
1.8. Oksidacinis stresas ir jo žalingas poveikis .....	18
2. TYRIMO APIMTIS IR METODAI .....	20
2.1. Tyrimo apimtis .....	20
2.2. Tyrimo metodai .....	20
2.2.1. Mėginių paruošimas. Riebalų ekstrakcija .....	21
2.2.2. Plonasluoksnė chromatografija ir transesterifikacija .....	21
2.2.3. Chromatografinė ir masių spektrometrinė analizė .....	22
2.2.4. Statistinė duomenų analizė .....	24
3. TYRIMO REZULTATAI IR APTARIMAS .....	25
3.1. Riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal malondialdehido koncentraciją .....	25
3.1.1. Sočiųjų riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal MDA koncentraciją .....	26
3.1.2. Mononesočiųjų riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal MDA koncentraciją .....	29
3.1.3. Polinesočiųjų riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal MDA koncentraciją .....	33
IŠVADOS .....	50

SUMMARY .....	51
PADĒKA.....	52
LITERATŪROS SĀRAŠAS.....	53
DARBO APROBACIJA .....	61

## SANTRUMPOS

ARA – arachidono riebalų rūgštis  
DHA – dokozaheksaeno riebalų rūgštis  
DNR – deoksiribonukleorūgštis  
DTL – didelio tankio lipoproteinai  
EPA – eikozapentaeno riebalų rūgštis  
LR – laisvieji radikalai  
MDA – malondialdehidas  
MNR – mononesočiosios riebalų rūgštys  
MTL – mažo tankio lipoproteinai  
NADPH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas  
PNR – polinesočiosios riebalų rūgštys  
ROS – reaktyviosios deguonies formos  
RR – riebalų rūgštys  
SN – standartinis nuokrypis  
SOD – superoksido dismutazė  
SRR – sočiosios riebalų rūgštys  
TNF – naviko nekrozės faktorius  
TX – tromboksanas  
Q – kvartilis

## IVADAS

Šiais laikais nemaža dalis žmonių su maistu gauna kalorijų perteklių, mažai vitaminų ir antioksidacinių medžiagų, stipriai sumažėjęs fizinis aktyvumas, alkoholio ir tabako vartojimas bei kitų įvairiausių veiksnių kompleksas prisideda prie padidėjusio reaktyvių deguonies formų susidarymo. Organizmo antioksidacinė sistema ne visada pajėgia nukenksminti reaktyvių deguonies formų perteklių, todėl per didelis šių medžiagų kiekis sukelia oksidacinį stresą [1]. Oksidacinis stresas siejamas su širdies ir kraujagyslių [2], neurodegeneracinėmis ligomis [3], tromboze bei padidėjusia trombocitų aktyvacija [4].

Pagrindinis reaktyvių deguonies formų taikinytis yra ląstelių membranų fosfolipidai ir jų sudėtyje esančios polinesočiosios riebalų rūgštys [5]. Vykstant lipidų peroksidacijai kaip skilimo produktas susidaro malondialdehidai, kuris pasigamina iš polinesočiuųjų riebalų rūgščių joms oksiduojantis, todėl jis yra svarbus kaip oksidacinio streso žymuo [6]. Trombocitų membranų fosfolipidų dvisluoksnis ir jo riebalų rūgščių sudėtis atlieka svarbų vaidmenį palaikant normalią organizmo hemostazę. Esant membranų riebalų rūgščių sudėties pokyčiams gali susidaryti biologiškai aktyvūs eikozanoidai, kurie pasižymi prouždegiminiu arba antiuždegiminiu poveikiu [7]. Tad nuo membranų fosfolipidų riebalų rūgščių sudėties priklauso biologiškai aktyvių eikozanoidų sintezės pusiausvyros palaikymas.

Žinoma, kad omega-3 riebalų rūgštys pasižymi apsauginiu poveikiu nuo širdies ir kraujagyslių ligų, tačiau šios riebalų rūgštys yra jautriausios lipidų peroksidacijai [8]. Todėl pasaulyje išlieka susidomėjimas kaip keičiantis trombocitų riebalų rūgščių sudėčiai gali pasikeisti lipidų peroksidacijos procesas bei pačių trombocitų aktyvumas. Detaliausi tyrimai atliekami siekiant nustatyti kaip keičiasi trombocitų membranų riebalų rūgščių sudėtis papildant membraną įvairiausiomis riebalų rūgštimis *in vivo* ir *in vitro* [9, 10]. Taip pat nemažai tyrimų atliekama norint nustatyti sveikų ir sergančių asmenų trombocitų riebalų rūgščių sudėties skirtumus [11, 12]. Tačiau tyrimų, kur yra vertinamas trombocitų membranų riebalų rūgščių spektras pagal oksidacinio streso žymenį malondialdehidą nepavyko aptikti, todėl tai yra aktualu.

Trombocitų membranų riebalų rūgščių sudėties nustatymas galėtų būti naudingas siekiant įvertinti trombocitų pasiruošimą būsimam aktyvacijos etapui bei kokių biologiškai aktyvių eikozanoidų sintezė bus intensyvesnė.

Šiame darbe magistrantė prisidėjo prie trombocitų membranų riebalų rūgščių išskyrimo, analizavo mokslinę literatūrą bei gautus duomenis, savarankiškai paruošė statistinę duomenų analizę.

**Darbo tikslas:** nustatyti oksidacinio streso įtaką trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgščių sudėčiai.

**Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgščių sudėtį.
2. Įvertinti trombocitų membranos riebalų rūgščių pasiskirstymą kvartiliuose priklausomai nuo malondialdehido koncentracijos.
3. Nustatyti ryšį tarp trombocitų membranos riebalų rūgščių bei jų santykių ir malondialdehido koncentracijos.
4. Įvertinti malondialdehido, kaip oksidacinio streso komponento įtaką trombocitų membranos riebalų rūgščių sudėčiai.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Oksidacinio streso sąvoka

D. Harmanas 1956 metais suteikė molekulinę pagrindą laisvųjų radikalų teorijai (laisvųjų radikalų senėjimo teorija). Tai leido manyti, kad mitochondrijose oksidacijos ir redukcijos reakcijų metu, kaip šalutiniai produktai, susidaro laisvieji radikalai ir kitos reaktyvios deguonies formos, kurios sukelia organizmo senėjimą [13]. Visi šie junginiai bendrai yra vadinami reaktyviomis deguonies formomis (ROS) (angl. – *reactive oxygen species*). Iš viso organizme esančio deguonies, apie 5 proc. jo tenka reaktyvioms deguonies formoms, o jų padidėjęs kiekis organizme sukelia oksidacinį stresą [14, 15].

Oksidacinį stresą taip pat galima pavadinti būseną, kai yra prarandama pusiausvyra tarp antioksidacinės sistemos ir oksidacijos proceso [16, 17].

Nuo oksidacinio streso žmogaus organizmas turi įvairias antioksidacines gynybos sistemas, kurios palaiko pusiausvyrą tarp ROS gamybos ir jų neutralizavimo, apimančias tokias fermentines sistemas kaip superoksido dismutazę, katalazę, glutationo peroksidazę [18].

## 1.2. Reaktyvios deguonies formos ir laisvieji radikalai

Šiuo metu, reaktyvios deguonies formos (ROS) terminas yra vartojamas apibūdinant įvairiems deguonies radikalams: superoksidui ( $O_2^{\bullet}$ ), hidroksiradikalui ( $OH^{\bullet}$ ) bei neradikaliniams deguonies junginiams – vandenilio peroksidui ( $H_2O_2$ ), ozonui ( $O_3$ ) [19].

Laisvieji radikalai (LR) tai – atomai ar molekulės, kurios savo išorinėje orbitalėje turi vieną nesuporuotą elektroną. LR yra chemiškai aktyvios, nestabilios molekulės. Dauguma molekulių, kurios susidaro fiziologinėmis sąlygomis neturi nesuporuotų elektronų [20].

Reaktyvias deguonies formas sudaro laisvieji radikalai ir chemiškai aktyvūs deguonies junginiai (1 lent.). Molekulinis deguonis gali sureaguoti su kitais radikalais ir taip gali susidaryti ypač reaktyvūs laisvieji radikalai, kurie sukelia lipidų, baltymų, DNR oksidaciją [21].

Endogeninės ROS yra gaminamos gyvuose organizmuose kaip normalaus ląstelės metabolizmo produktai, jų gaminimo greitis ir kiekis gali padidėti veikiant egzogeniniams veiksniams: rūkymui, dideliu oro užterštumui (kietomis dalelėmis, smulkiosiomis dalelėmis, įvairiais

metalais) [22, 23], ozonui, jonizuojančiai spinduliutei, sunkiųjų metalų jonams (švinas, kadmis) [24].

Pagrindinės trys ROS, turinčios fiziologinę reikšmę ir yra biologiškai pavojingiausi: superoksidas ( $O_2^{\bullet-}$ ), kuris turi nesuporuotą elektroną, hidroksilo radikalas ( $OH^{\bullet}$ ) ir vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ) [25].

**1 lent.** Reaktyviosios deguonies formos [19].

Reaktyvios deguonies formos			
Laisvieji radikalai		Neradikalai	
<b>Superoksidas</b>	<b><math>O_2^{\bullet-}</math></b>	<b>Vandenilio peroksidas</b>	<b><math>H_2O_2</math></b>
<b>Hidroksiradikalas</b>	<b><math>OH^{\bullet}</math></b>	Singuletinis deguonis	$^1O_2$
<b>Lipidų peroksiradikalas</b>	<b><math>LOO^{\bullet}</math></b>	Ozonas	$O_3$
<b>Hidroperoksiradikalas</b>	<b><math>HO_2^{\bullet}</math></b>	Hipochlorito rūgštis	HClO

Pagrindiniai ląstelės (endogeniniai) ROS šaltiniai yra: mitochondrijos, plazminė membrana, endoplazminis tinklas, lizosomos, peroksisomos [1]. Nedideli ROS ar LR kiekiai nėra žalingos ir toksiškos ląstelei dalelės, nes jos atlieką svarbų vaidmenį fiziologiniame prisitaikyme, yra svarbios reguliuojant ląstelių signalų perdavimo mechanizmus [1, 16, 26, 27]. Mitochondrijose pasigaminusios reaktyvios deguonies molekulės yra svarbios normaliai proliferuojančioms ląstelėms, signalų perdavimui tarp ląstelių bei ląstelių augimo funkcijoms reguliuoti [28].

### 1.3. Reaktyvių deguonies formų susidarymas

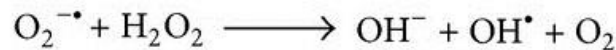
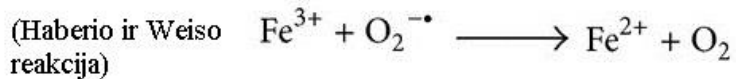
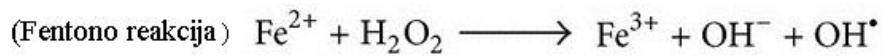
Oksidaciniam stresui susidaryti yra labai svarbi ROS gamyba ląstelėse. Vienas svarbiausių ROS šaltinių organizme yra mitochondrijos, kur redukuojant deguonį ( $O_2$ ) pirmiausia susidaro superoksidas ( $O_2^{\bullet-}$ ). Superoksidas ( $O_2^{\bullet-}$ ) susidaro vienu elektronu nepilnai redukuojant deguonį. Pats superoksidas nėra labai stiprus oksidantas, bet iš jo gali pasigaminti kitos reaktyvios deguonies formos [29]. Pasigaminę superoksidai susijungia ( $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ = H_2O_2 + O_2$ ) ir susidaro mažiau reaktyvus vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ), reakcijoje dalyvauja fermentas superoksido dismutazė



(SOD). Peroksisomose vandenilio peroksidas yra skaidomas į vandenį ir deguonį, dalyvaujant fermentui katalazei [30].

Superoksidas ( $O_2^{\cdot-}$ ) ir vandenilio peroksidas ( $H_2O_2$ ) gali redukuotis ir iki labai aktyvaus hidroksilo radikalo ( $OH^{\cdot}$ ) (1 pav.) [19, 31]. Hidroksilo radikalai ( $OH^{\cdot}$ ) dar gali susidaryti ir Fentono bei Haberio ir Weiso reakcijose (19) (1 pav.).

Laisvieji radikalai gali susidaryti fagocitozės metu, kai yra aktyvinamas fermentas NADPH oksidazė esantis fagocitinių ląstelių membranose (monocitų, makrofagų, neutrofilų). Kai į organizmą patenka svetimi mikroorganizmai tada yra pagaminamas superoksidas ( $O_2^{\cdot-}$ ), o jis padeda naikinti mikroorganizmus ir taip apsaugo organizmą nuo infekcijos [19]. Laisvieji radikalai, jei jų susidaro labai daug, gali padaryti žalos ir pačioms fagocitinėms ląstelėms ir aplinkiniams audiniams [32].



**1 pav.** Fentono ir Haberio-Weiso reakcijos [33].

#### 1.4. Lipidų peroksidacija

Nedidelis ROS kiekis yra reikalingas organizmui, bet esant per dideliu kiekiui ROS, poveikis yra žalingas. Esant patofiziologinėmis sąlygomis, atsiradus mitochondrijų disfunkcijai, sutrikus elektronų pernašos mechanizmui mitochondrijų kvėpavimo grandinėje, gali susiformuoti didžiuliai kiekiai ROS [21]. Pasigaminę per dideli kiekiai ROS veikia organizmo ląsteles žalingai – **sukelia lipidų peroksidaciją**. Labiausiai lipidus pažeidžia hidroksiradikalai ( $OH^{\cdot}$ ) ir hidroperoksiradikalai ( $OH_2^{\cdot}$ ). Oksidacinį stresą gali sukelti hidroksiradikalai ( $OH^{\cdot}$ ), nes gali atakuoti bet kurias organizmo biomolekules. Hidroperoksiradikalai ( $OH_2^{\cdot}$ ) sukelia membranos polinesočiųjų riebalų rūgščių grandininę peroksidaciją [34].

Dažniausi ROS taikiniai yra ląstelių membranų fosfolipidai, kraujo lipoproteinai. Lipidų peroksidacija gali vykti fermentiniu ir nefermentiniu būdais. Abiem atvejais bendras lipidų peroksidacijos mechanizmas yra panašus. Esant nefermentinei lipidų peroksidacijai, ROS oksiduoja

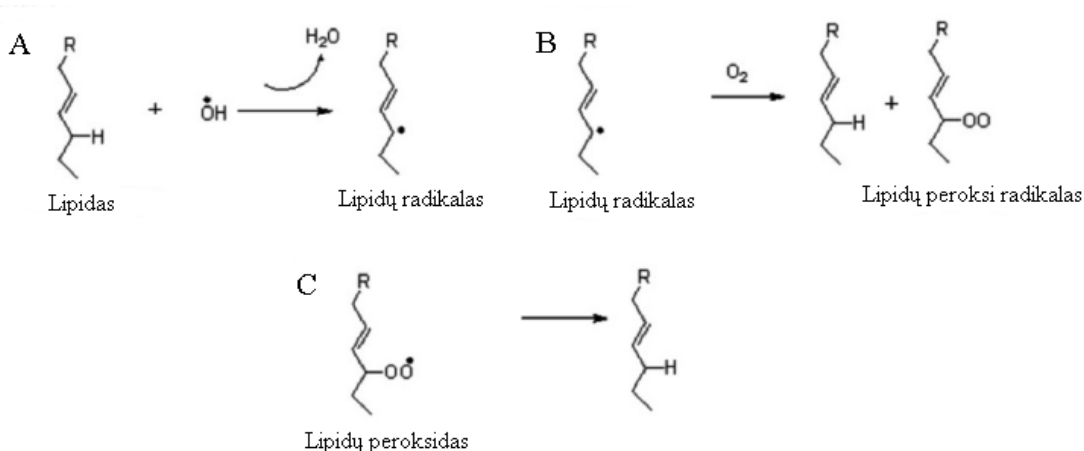
membranose esančių polinesočiųjų riebalų rūgščių (arachidono, linolo) grandinės dvigubuosius ryšius. Lipidų peroksidacija gali vykti trimis etapais: pradžios (angl. *Initiation*), sklidimo (angl. *Propagation*) ir baigties (angl. *Termination*) (2 pav.) [5]. Esant fermentinei lipidų peroksidacijai, iniciacijos etapas yra kontroliuojamas. Fermentiniu keliu yra kontroliuojama lipidų peroksidacijos molekulių gamyba ir taip yra sumažinamas LR kiekis. Kokie peroksidacijos produktai susidaro vykstant lipidų peroksidacijai priklauso nuo to, koks yra peroksidacijos substratas ir koku būdu vyksta peroksidacija [35].

Pradžios (angl. *Initiation*) etape yra gaminami nauji radikalai iš lipidų. Kai LR atakuoja polinesočiųsias riebalų rūgštis ir pasiima vandenilį iš metileno grupės (-CH<sub>2</sub>-), kuri yra prie riebalų rūgšties dvigubosio ryšio (C=C), tada susidaro lipidų radikalas (R<sup>•</sup>). Prasideda grandininė reakcija, nes peroksidaciją gali sukelti laisvasis radikalas, kilęs iš kitos lipidinės molekulės, arba gali sukelti, bet kuris kitas esantis laisvasis radikalas (pvz., OH<sup>•</sup>) [35].

Sklidimo (angl. *Propagation*) etapui yra reikalingas deguonis (O<sub>2</sub>). Toliau lipidų radikalai (R<sup>•</sup>) reaguoja su O<sub>2</sub>, susidaro lipidų peroksi radikalai (ROO<sup>•</sup>), lipidų peroksidai (ROOH) bei nauji lipidų radikalai (R<sup>•</sup>). Reakcijai įvykti yra reikalingi vario arba geležies jonai. Peroksiduota lipido molekulė gali sukelti kitų lipidų peroksidaciją ir taip susidaro grandininė reakcija, kuri gali pratęsti vis kitų molekulių pažeidimus [15, 36].

Baigties (angl. *Termination*) etape lipidų peroksidacijos grandininė reakcija nutrūksta, kai laisvieji radikalai susijungia ir susidaro nauji neradikaliniai junginiai [36].

Be lipidų oksidacijos, ROS gali sukelti ląstelės baltymų oksidaciją, dėl ko gali suirti svarbūs fermentai. ROS gali pažeisti ląstelės genetinę informaciją, o toks pažeidimas gali sąlygoti mutacijų atsiradimą [37].



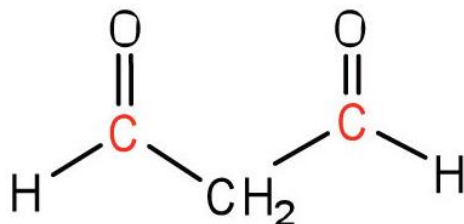
**2 pav.** Grandininės lipidų peroksidacijos etapai. A – pradžia; B – sklidimas; C – baigtis. Modifikuota pagal [38].

## 1.5. Malondialdehidai

Malondialdehidai (MDA), F2-izoprostanai ir 4-hidroksinonenalis yra pagrindiniai lipidų peroksidacijos produktai. Šios medžiagos pasigamina iš polinesočiųjų riebalų rūgščių joms oksiduojantis ir yra kaip skilimo produktai. MDA yra aktyvus junginys, turintis fiziologinę ir patologinę reikšmę ir yra naudojamas kaip lipidų peroksidacijos žymuo (3 pav.). Kambario temperatūroje MDA yra tirpus vandenyje, etanolyje, metanolyje. MDA gali polimerizuotis ir dalyvauti reakcijose su įvairiomis biomolekulėmis, įskaitant DNR, baltymus ir amino rūgštis [39]. MDA gali būti dviejų formų, laisvas arba kovalentiškai susijungęs su amino rūgštimis, baltymais, nukleorūgštimis, lipoproteinais [40]. Siekiant išsiaiškinti koks yra MDA ryšys su patologiniais procesais, yra atliekami tyrimai. MDA yra siejamas su kancerogeniškumu ir citotoksiškumu, cukriniu diabetu, neurodegeneracinėmis bei širdies ir kraujagyslių ligomis [41 - 43].

MDA *in vivo* gali susiformuoti iš arachidono (20:4 $\omega$ 6) ir kitų polinesočiųjų riebalų rūgščių, kaip šalutinis produktas tromboksano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sintezės metu, taip pat kitu būdu, nuo ROS priklausomoje lipidų peroksidacijos reakcijoje iš biciklinio endoperoksido [44].

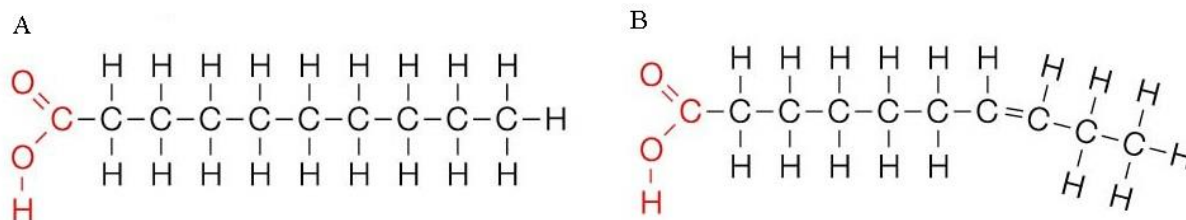
Pagamintas MDA molekulių skaičius priklauso nuo to, kiek tarp dvigubųjų ryšių yra po metileno grupę (-CH<sub>2</sub>-), pavyzdžiui iš arachidono (20:4 $\omega$ 6) rūgšties gali pasigaminti trys MDA molekulės, iš  $\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) – dvi MDA molekulės, iš linolo (18:2 $\omega$ 6) – viena MDA molekulė. Iš mononesočiosios oleino (18:1 $\omega$ 9) rūgšties negali pasigaminti MDA molekulės, nes nėra dviejų dvigubųjų ryšių ir metileno grupės (-CH<sub>2</sub>-) tarp jų. Sočioji stearino (18:0) riebalų rūgštis neturi dvigubųjų ryšių. Pagal šį mechanizmą iš eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgšties gali pasigaminti keturios MDA molekulės. Žmogaus trombocitai yra vienas pagrindinių MDA šaltinių [39]. MDA koncentracija gali būti išmatuojama įvairiuose audiniuose, šlapime, kraujo serume ir plazmoje [6].



3 pav. Malondialdehido struktūrinė formulė [45].

## 1.6. Riebalų rūgščių struktūra, metabolizmas

Riebalų rūgštys yra linijinės angliavandenilių grandinės su karboksi (-COOH) grupe grandinės gale ir sudaro ląstelių membranų fosfolipidų hidrofobinę dalį. Riebalų rūgštys gali būti suskirstytos į sočiąsias ir nesočiąsias (mononesočiąsias, polinesočiąsias) riebalų rūgštis. Pagrindinis skirtumas tarp sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių yra dvigubųjų ryšių skaičius grandinėje. Nesočios riebalų rūgštys savo grandinėje turi vieną ar daugiau dvigubųjų ryšių, o sočiosios riebalų rūgštys neturi dvigubųjų ryšių savo grandinėje [46]. Sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių struktūrinės formulės pateiktos 4 paveiksle.



**4 pav.** A - sočiųjų riebalų rūgščių struktūrinė formulė; B - nesočiųjų riebalų rūgščių struktūrinė formulė [47].

Per didelis sočiųjų riebalų rūgščių vartojimas gali sukelti širdies ir kraujagyslių ligas [48]. Mononesočiąsias riebalų rūgštis sudaro  $\omega$ -7 ir  $\omega$ -9 riebalų rūgštys ir jos yra sintetamos žmonių organizmuose. Mononesočios riebalų rūgštys yra siejamos su apsauginiu vaidmeniu širdies ir kraujagyslių ligų patogenezėje [49, 50]. Augaliniuose aliejuose (alyvuogių) iš  $\omega$ -9 riebalų rūgščių grupės, ypač gausu oleino (18: $\omega$ 9) riebalų rūgšties bei vitamino E, kuris pasižymi savo antioksidacinėmis savybėmis. Oleino rūgštis turi tik vieną dvigubą ryšį savo grandinėje, todėl buvimas kartu su vitaminu E, suteikia stipresnę apsaugą nuo lipidų peroksidacijos [51].

Polinesočiosioms riebalų rūgštims pagrinde yra priskiriamos  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 riebalų rūgštys.  $\omega$ -3 riebalų rūgščių grupei yra priskiriamos šios pagrindinės riebalų rūgštys:  $\alpha$ -linoleno (ALA; 18:3 $\omega$ 3) eikozapentaeno (EPA; 20:5 $\omega$ 3), dokozaapentaeno (DPA; 22:5 $\omega$ 3) ir dokozaheksaeno (DHA; 22:6 $\omega$ 3), jų daugiausia yra randama žuvyse ir kitose jūros gėrybėse. Linolo (LA; 18:2 $\omega$ 6) ir arachidono (ARA; 20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgštys yra priskiriamos  $\omega$ -6 riebalų rūgščių grupei. Šios riebalų rūgštys dažniausiai yra gaunamos iš augalinių aliejų, grūdų. Linolo (18:2 $\omega$ 6) ir  $\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) riebalų rūgštys yra nepakeičiamos, nes nėra gaminamos žmogaus organizme, todėl jas reikia gauti su maistu [52]. Jei vartojamas per mažas kiekis  $\omega$ -3 ar  $\omega$ -6 riebalų rūgščių, tai organizme gali

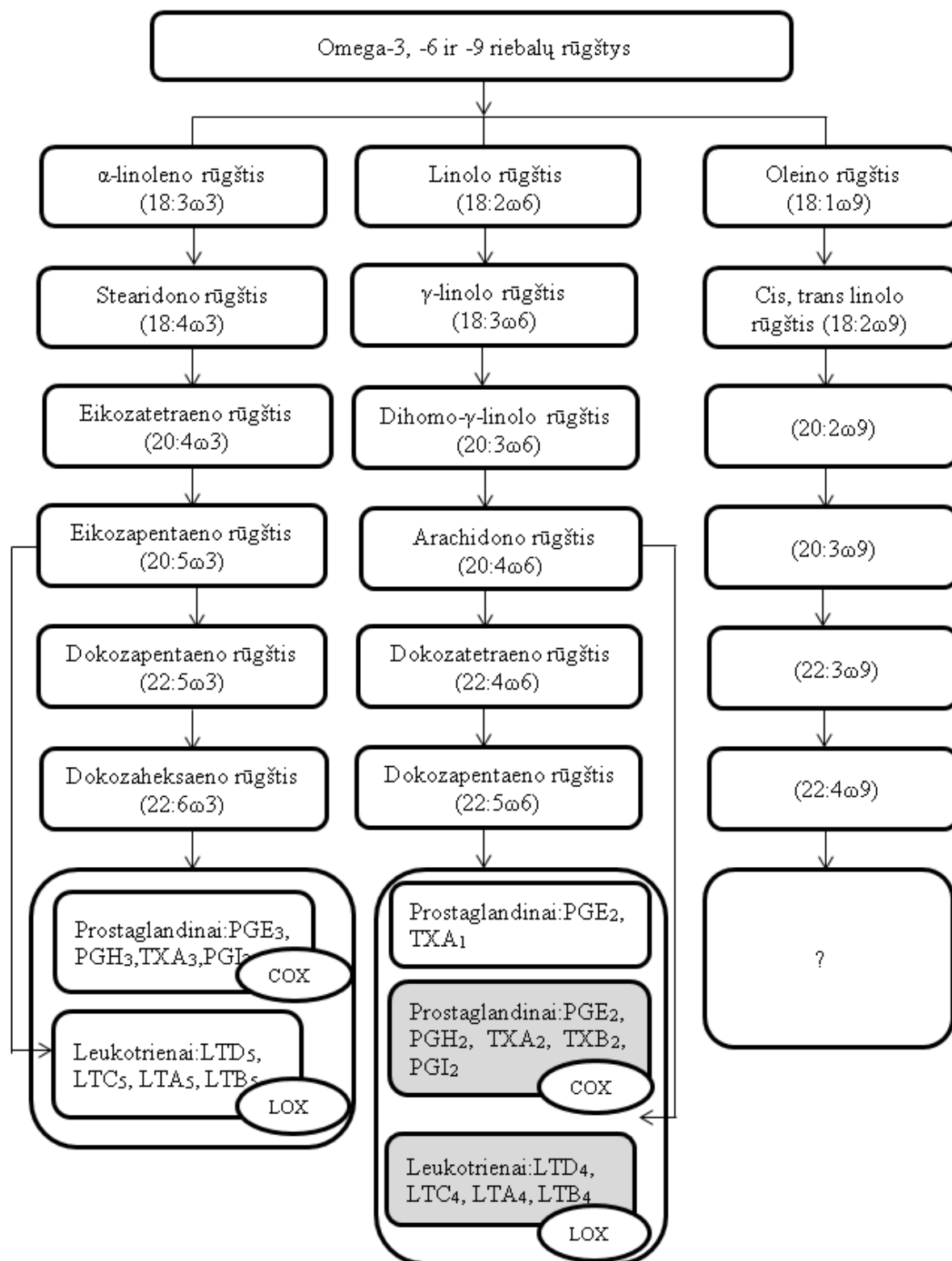
padaugėti  $\omega$ -9 riebalų rūgščių, kadangi organizmas pats gali pasigaminti polinesočias  $\omega$ -9 rūgštis iš kitų riebalų rūgščių [53].

$\omega$ -3 ir  $\omega$ -6 riebalų rūgščių konversijoje dalyvauja tie patys fermentai, todėl šios riebalų rūgščių klasės konkuruoja tarpusavyje dėl fermentų.  $\omega$ -3 polinesočiosios riebalų rūgštys per eilę mechanizmų gali reguliuoti procesus susijusius su uždegimu: trombocitų aktyvaciją ir agregaciją, vazokonstrikciją [54].  $\omega$ -3 polinesočiosios riebalų rūgštys gali veikti tiesiogiai, pakeičiant ARA riebalų rūgštį kaip substratą, gaminant eikozanoidus ir taip slopinant ARA rūgšties metabolizmą, arba netiesiogiai veikiant per genų ekspresiją [55].  $\omega$ -3 riebalų rūgštys slopina monocitų/makrofagų uždegiminių citokinų sekreciją (interleukinų, TNF) [56].

$\omega$ -6 riebalų rūgštys daugiau siejamos su prouždegiminiu poveikiu. Padidėjus ARA riebalų rūgšties kiekiui membranoje, yra intensyviau gaminami eikozanoidai kilę iš arachidono rūgšties. Šių eikozanoidų pagaminamas kiekis organizme padidėja, o sumažėja iš  $\omega$ -3 (EPA/DHA) riebalų rūgščių pagaminamas eikozanoidų kiekis [57].

Iš polinesočiuųjų riebalų rūgščių gaminasi metabolitai, kurie yra aktyvūs ir dalyvauja tiek normaliai homeostazei palaikyti, tiek patofiziologiniuose procesuose. Fermentai, kurie gamina signalinius mediatorius yra lipoksigenazė (LOX), dalyvaujanti gaminantis leukotrienams (LT), lipoksinui. Ciklooksigenazė (COX) dalyvauja gaminantis prostaglandinams (PG). Yra dvi COX fermento izoformos ląstelėse, COX1 izofermentas randamas visuose audiniuose, o COX2 izofermentas nustatomas audiniuose su aktyviu uždegimu [35]. Veikiant fosfolipazei A2, COX1 ir tromboksano sintazei, iš membranos arachidono rūgšties pasigamina tromboksanas A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). TXA<sub>2</sub> yra vazokonstriktorius, gaminamas aktyvuotų trombocitų ir skatinantis trombocitų agregaciją [52].

Pasigaminę biologiškai aktyvūs eikozanoidai yra svarbus uždegiminiams procesams [44]. Daugiausia prouždegiminių eikozanoidų yra pagaminama iš  $\omega$ -6 grupės arachidono (20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgšties (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, TxA<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>), o iš  $\omega$ -3 grupės, EPA riebalų rūgšties pagamintos medžiagos (PGE<sub>3</sub>, PGI<sub>3</sub>, TXA<sub>3</sub>, LTB<sub>5</sub>, LTC<sub>5</sub>, LTD<sub>5</sub>) veikia priešingai – priešuždegimiškai. Nėra duomenų, kad iš  $\omega$ -9 riebalų rūgščių gaminasi biologiškai aktyvios medžiagos (5 pav.) [44, 52, 58, 59].



5 pav. Omega-3, -6, -9 riebalų rūgščių metabolizmas [58].

Didelis  $\omega$ -6 ir  $\omega$ -3 riebalų rūgščių santykis yra siejamas su daugelio ligų patogenezė (širdies ir kraujagyslių ligomis, vėžiu, osteoporoze, uždegimais ir autoimuninėmis ligomis). Vakarų šalims būdingas  $\omega$ -6 ir  $\omega$ -3 riebalų rūgščių santykis yra (~15 : 1), optimaliausias santykis turėtų būti (~6 : 1) [57]. Uždegiminė reakcija yra normalus organizmo atsakas į infekciją ar traumą, o siekiant palaikyti biologiškai aktyvių eikozanoidų sintezės pusiausvyrą, svarbu palaikyti optimalų  $\omega$ -6 ir  $\omega$ -3 santykį. Esant lėtiniam uždegimams, galima pastebėti padidėjusį  $\omega$ -6 ir  $\omega$ -3 santykį [55, 57]. Didelis  $\omega$ -6 grupės, linolo (18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgšties vartojimas skatina greitesnę MTL oksidaciją, trombocitų agregaciją ir trukdo įsiterpti  $\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) riebalų rūgščiai į ląstelių membranos sudėtį.  $\omega$ -6 ir  $\omega$ -3 rūgščių nedidelio santykio palaikymas mažina neinfekcinių uždegiminių ligų atsiradimo riziką [56].

Mažo tankio lipoproteinų (MTL) riebalų rūgščių sudėtis yra susijusi širdies ir kraujagyslių ligomis. Didelis polinesočiųjų  $\omega$ -6 riebalų rūgščių kiekis (arachidono, linolo) gali padidinti MTL oksidaciją. Subalansuotas riebalų rūgščių vartojimas, mažina MTL oksidaciją. Didesnis sočiųjų ar mononesočiųjų (oleino) riebalų rūgščių kiekis nepadidina MTL oksidacijos. Nustatyta, kad PNRR/MNRR santykis didesnis CAD (širdies ir kraujagyslių ligų rizikos grupė) grupėje, nei ne CAD grupėje.  $\omega$ -6 riebalų grupės linolo ir arachidono riebalų rūgščių kiekis didesnis CAD grupėje. Taip pat didesnis oleino riebalų rūgščių kiekis mažina MTL oksidaciją. Membranose, kuriose yra daugiau PNRR, yra jautresnės oksidacijai [60].

Didesnis P/S riebalų rūgščių santykis rekomenduojamas siekiant išvengti širdies ir kraujagyslių ligų. Didesnis P/S santykis kaip tik galėtų didina oksidacinį stresą, nes kuo didesnis polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis, tuo daugiau substrato vykti lipidų peroksidacijai.

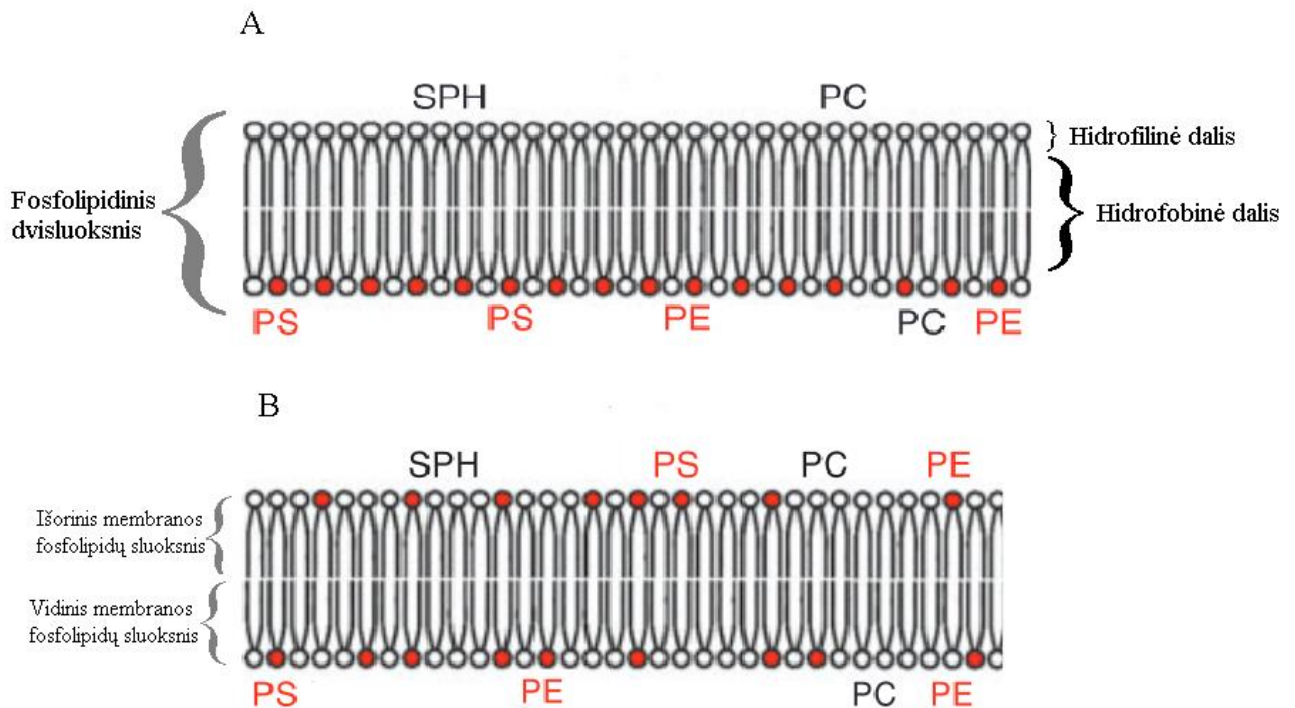
## 1.7. Trombocitai ir jų membrana

Šiais laikais jau yra žinoma, kad trombocitai yra pirmoji gynybinė grandis prieš hemoragijas, dalyvauja uždegiminiuose procesuose susijusiems su ateroskleroze, hemostaze ir tromboze [61]. Sumažėjęs trombocitų aktyvumas gali sukelti hemoragijas, o per didelis aktyvumas – trombozes. Susidarę trombai gali sustabdyti kraujo tėkmę, dėl ko kraujas gali nebepatekti į tam audinius ir organus [62]. Trombocitai – bebranduolės, disko formos ląstelės, kurios gaminasi kaulų čiulpuose iš megakariocitų ir kraujotakoje ilgiausiai cirkuliuoja iki 10 dienų [63, 64]. Trombocitų atliekamos funkcijos ir aktyvumas – glaudžiai susiję su fosfolipidine membrana ir jos sudėtimi.

Aptariant bendrai apie ląstelių plazminę membraną 1972 m. S. J. Singeris ir G. L. Nikolsonas pasiūlė ląstelės membranos mozaikos struktūros modelį (angl.: *Fluid – mosaic model*) [65]. Šis modelis remiasi tuo, kad ląstelės membraną sudaro lipidų dvisluoksnis, kuriame yra išsidėstę integralieji ir paviršiniai baltymai. Lipidai ir baltymai gali lengvai judėti ląstelių membranos lipidiniame dvisluoksnyje bei išsidėstyto mozaikos principu. Prie lipidų ar baltymų prisijungę angliavandeniai, išsidėsto išorinėje membranos pusėje [66]. Ląstelių membranas sudaro įvairių lipidų junginys, kuris sudaro mikrodomenus (lipidų plokštelės), pasižyminčius įvairiomis kompozicijomis ir funkcijomis [67].

Apie 65 proc. visų trombocitų lipidų sudaro fosfolipidai [68]. Trombocitai savo membranos paviršiuje turi daugybę receptorių, kurie padeda atlikti įvairias funkcijas. Esant trombocitų išorinei stimuliacijai, jų membranose vyksta aktyvus lipidų metabolizmas, dėl ko atsipalaiduoja įvairios biologiškai aktyvios medžiagos (eikozanoidai). Vienos biologiškai aktyvios medžiagos gali reguliuoti įvairius signalinius mechanizmus, kitos medžiagos gali paveikti imunines ląsteles ir kraujagyslių endotelį [62]. Trombocitų išorinį membranos fosfolipidų sluoksnį sudaro fosfatidilcholinas (PC) ir sfingomielinas (SPH), o vidinį membranos fosfolipidų sluoksnį sudaro fosfatidilserinas (PS) ir fosfatidiletanolaminas (PE) (6 pav.) [69]. Trombocitų membrana yra asimetriška, įvykus trombocitų aktyvacijai, asimetriškas membranos pasiskirstymas yra sutrikdomas, dėl ko membranos paviršiuje atsiduria fosfolipidas – fosfatidilserinas, kuris turi neigiamai įkrautą paviršių. Fosfatidilserino pozicijos pasikeitimas trombocitų membranoje yra atsakingas už trombocitų prokoaguliacinį aktyvumą [68].





**6 pav.** A – trombocitų membranos fosfolipidinis dvisluoksnis esant normaliam fosfolipidų išsidėstymui. B – trombocitų membranos fosfolipidinis dvisluoksnis esant prokoaguliaciniam aktyvumui. SPH – sfingomielinas, PC – fosfatidilcholinas, PS – fosfatidilserinas, PE – fosfatidiletanolaminas. Modifikuota pagal [69].

Membranos riebalų rūgščių sudėtis yra plačiai tyrinėjama pasaulyje, nes atsiradus membranos fosfolipidų riebalų rūgščių sudėties pokyčiams, gali pakisti mikrodomenų organizacija, dėl ko gali atsirasti ląstelės signaliniai pokyčiai, pakisti fizinės savybės [70]. Kai yra pažeidžiamas ląstelės membranos vientisumas, ląstelių membranos disfunkcija gali sukelti daugelį patologinių procesų [71]. Esant kraujagyslių pažeidimui, yra neapsaugotas baltymas kolagenas, prie kurio pradeda jungtis cirkuliuojantys trombocitai ir veikia kaip trombocitų sukibimo pagrindas. Kolagenas yra vienas labiausiai trombogeninių subendotelio komponentų [72].

Trombocitų membranos riebalų rūgščių sudėtis atlieka svarbų vaidmenį įvairiuose fiziologiniuose procesuose.  $\omega$ -3 riebalų rūgštys mažina su kolagenu susijusią trombocitų aktyvaciją, nes trombocituose, kuriuose yra didesnis kiekis dokozaheksaeno (22:6 $\omega$ 3) ir eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgščių, mažiau gali sujungti fibrinogeną, išskirti granulių turinį bei gaminti trombiną [73]. Trombocitų membranos didesnis dokozaheksaeno (22:6 $\omega$ 3) riebalų rūgščių kiekis ir mažesni arachidono/eikozapentaeno ir arachidono/dokozaheksaeno santykiai, gali būti siejami su mažesne trombocitų agregacija ir kraujagyslių okliuzija [74].

Yra literatūros duomenų, kad trombocitai prisotinti eikozapentaeno (EPA; 20:5 $\omega$ 3) ir dokozaheksaeno (DHA; 22:6 $\omega$ 3) riebalų rūgštimis sumažina trombino gamybą ir fosfolipido fosfatidilserino padėties išsidėstymą *in vitro*. Prisotinus trombocitų membraną EPA ir DHA riebalų rūgštimis, yra sumažintas trombozės formavimasis. Tyrimai rodo, kad EPA ir DHA riebalų rūgštys slopina, bet nevisiškai pašalina trombocitų gebėjimą gaminti trombiną *in vitro*. EPA ir DHA riebalų rūgštys sumažina trombocitų prokoaguliacines funkcijas ir veikia kaip apsauga nuo širdies ir kraujagyslių ligų [75]. Taip pat DHA riebalų rūgštis gali turėti teigiamą poveikį trombocitų aktyvumui ir oksidacijai. Yra duomenų, kad tiriamiesiems vartojant DHA riebalų rūgšties maisto papildus, sumažėjo su kolagenu susijusi trombocitų agregacija, arachidono (ARA; 20:4 $\omega$ 6) rūgšties metabolitų, tromboksano B<sub>2</sub> kiekis, lyginant su tiriamaisiais, kurie vartojo placebą [76].

S. Lin su kolegomis nustatė ir palygino trombocitų membranos riebalų rūgščių sudėtį tarp sveikų ir virškinimo trakto vėžiu sergančių asmenų. Pastebėta, kad ARA ir DHA riebalų rūgščių trombocitų membranoje yra daugiau asmenims, kurie serga virškinimo trakto vėžiu, lyginant su sveikais asmenimis, o yra sumažėję oleino (18:1 $\omega$ 9) ir kitų mononesočiųjų riebalų rūgščių [12]. (Lin, 2017).

## 1.8. Oksidacinis stresas ir jo žalingas poveikis

Oksidacinis stresas, lipidų peroksidacija produktų poveikis yra siejama su daugybe patofiziologinių procesų, nes susidaręs per didelis ROS kiekis, dalyvauja įvairių ligų patogenezėje, pradeda atakuoti svarbiausias žmogaus biomolekules, sutrikdo ląstelių funkcijas, sukelia uždegimą ar net ląstelių žūtį [16, 17].

Labai svarbų vaidmenį oksidacinis stresas atlieka širdies ir kraujagyslių ligų patogenezėje. Širdies ir kraujagyslių ligos yra pagrindinė mirtingumo ir sergamumo priežastis ne tik Lietuvoje, bet ir visoje Europoje [77, 78]. Kraujagyslių senėjimas yra širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnys, o kraujagyslių senėjimą gali sukelti oksidacinis stresas ir uždegimas, kai atsiranda kraujagyslių pokyčiai ir sumažėja jų elastingumas, vystosi aterosklerozė [79, 80]. Taip pat su padidėjusiu ROS poveikiu yra siejamas organizmo ir ląstelių senėjimas, neurodegeneracinės ligos (Alzheimerio, Parkinsono), įvairių piktybinių navikų atsiradimas, proliferacija ir progresavimas [28, 81 - 83].

Oksidacinis stresas yra siejamas su metaboliniu sindromu, kai ROS sukelia atsparumą insulinui periferiniuose audiniuose, paveikdamas įvairius insulino receptorių signalo perdavimo

taškus, kas sukelia II tipo cukrinį diabetą [84, 85]. Per didelis kiekis ROS gali pažeisti eritrocitus, sukeldami jų paviršiaus deformaciją bei greitesnę žūtį [86].

Oksidacinis stresas dalyvauja akių ligų patogenezėje (katarakta, Sjogreno sindromas) [87, 88]. Taip pat gali prisidėti prie vienos dažniausiai pasitaikančios kepenų ligos – nealkoholinės suriebėjusių kepenų ligos atsiradimo (hepatosteatozės) [89].

Lipidų peroksidacijos metu susidarę aktyvūs aldehydai slopina spermatozoidų judrumą, tuo pačiu padidina ROS gamybą, lipidų peroksidaciją, oksidacinę DNR pažeidimą, kas gali sukelti vyrų nevaisingumą [90].

Oksidacinis stresas siejamas su tromboze bei padidėjusia trombocitų aktyvacija [4, 91].

Yra įrodymų, kad kuo didesnė deguonies koncentracija yra naudojama neišnešiotų naujagimių gaivinimo metu, tuo didesnis oksidacinis stresas ir naujagimių mirtingumas. Reoksigenacijos metu, susidarę laisvieji radikalai gali žymiai padidinti naujagimių smegenų pažeidimo tikimybę, nes neišnešiotų naujagimių kvėpavimo ir antioksidacinės sistemos nėra pakankamai susiformavusios [92].

## 2. TYRIMO APIMTIS IR METODAI

### 2.1. Tyrimo apimtis

Magistro darbo tyrimas buvo vykdomas 2016 – 2017 metais Vilniaus universiteto, Medicinos fakulteto biochemijos laboratorijoje. Trombocitų membranos riebalų rūgščių nustatymui, atsitiktine tvarka, buvo išrinkti 89 sveiki, įvairaus amžiaus vyrai ( $36,5 \pm 10,8$ ). Dėl nepavykusio asmens identifikavimo, ar nepavykusios riebalų rūgščių metilo esterių ekstrakcijos, iš tiriamųjų grupės pašalinta 10 asmenų. Vilniaus universiteto ligoninės, Santaros klinikų, laboratorinės medicinos centre vadovaujant habil. Dr., Prof. Z. A. Kučinskienei, buvo vykdomas projektas „Lėtinio streso nulemti aterosklerozės proceso ypatumai: naujų biožymenų paieška ir tyrimas“ (ATEROSTRES; 2015–2018), kur buvo nustatyti įvairūs tiriamųjų antropometriniai ir biocheminiai rodikliai. Fosfolipidinės membranos riebalų rūgščių nustatymui buvo naudojami „ATEROSTRES“ projekto metu gauti vyrų trombocitai. Šio projekto metu nustatyta, tiriamųjų kraujo serumo MDA koncentracija buvo naudojama tolimesniems paskaičiavimams. Kraujo serumo malondialdehido koncentracija buvo nustatyta didelio efektyvumo skysčių chromatografijos metodu.

Tiriamieji asmenys buvo suskirstyti pagal MDA koncentraciją į kvartilius (Q1, Q2, Q3), tiriamųjų imtis  $n=79$ .

### 2.2. Tyrimo metodai

Tyrimo objektas: vyrų trombocitai.

Trombocitai buvo gaunami Vilniaus universiteto ligoninės, Santaros klinikų laboratorijoje. Pirmiausia tiriamųjų veninis kraujas paimamas į vakuuminį mėgintuvėlį žaliu kamšteliu. Tada centrifuguojama 10 min. 3000 g, nucenrifuguotas mėgintuvėlis yra pernešamas į sterilias sąlygas, vėliau nusiurbiamas ir pašalinama  $\frac{3}{4}$  plazmos, likusi mėgintuvėlio dalis yra išsiurbiamas ir sumaišoma su RPM 16401 (Bi, Izraelis) santykiu 3:1. Toks mėgintuvėlis yra šaldomas kintamos temperatūros šaldikliu, sumažinant  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 1 min. iki  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tada perkeliama į  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  šaldiklį ir saugoma iki trombocitų panaudojimo. Tolesniam naudojimui trombocitai yra atšildomi.

### 2.2.1. Mėginių paruošimas. Riebalų ekstrakcija

Mėginys (trombocitai) buvo atšildomi ir supilami į kolbą, lipidų ekstrakcija atlikta naudojant 10 ml chloroformo - metanolio mišinio (santykis 2:1) pagal *Folch* metodą [93]. Mėginys, užpiltas chloroformo - metanolio, statomas į kratytuvą kambario temperatūroje 30 min. Ekstraktas perfiltruojamas į mėgintuvėlį su padalomis per filtrinį popierinį filtrą. Į mėgintuvėlį pilama distiliuoto vandens (2 ml), viskas gerai sumaišoma ir paliekama per naktį nusistovėti. Sekančią dieną mėgintuvėlio viršutinis (vandens) sluoksnis nusiurbiamas, o apatinis sluoksnis perfiltruojamas į metilinio kolbą per popierinį filtrą su bevandeniu  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , kurio reikia sugerti riebalų ekstrakte buvusį vandenį. Tirpiklis išgarinamas naudojant rotacinį garintuvą.

### 2.2.2. Plonasluoksnė chromatografija ir transesterifikacija

Plonasluoksnei chromatografijai paruošiamas chromatografinis indas ir į jį įpilama judri fazė (heksanas + etilo eteris + acto rūgštis, santykiu 70:30:1). Paruošiama chromatografinė plokštelė, chromatografiniu švirškštu užlašinamas ekstraktas. Tada chromatografinė plokštelė buvo įdedama į chromatografinį indą su judria faze. Užkilus judriai fazei iki chromatografinės plokštelės viršaus, indas atidaromas, išimama chromatografinė plokštelė, išpilama judri fazė iš indo. Leidžiama chromatografinėi plokštei nudžiūti. Vėliau į chromatografinį indą įdedama išdžiūvusi chromatografinė plokštelė su keliais jodo grūdeliais. Palaikoma per naktį.

Kitą dieną, nuo chromatografinės plokštelės nugrandomas nusidažęs fosfolipidų sluoksnis į kolbą, įpilama 10 ml metanolio ir 1 ml druskos rūgšties (HCl), kolba prijungiama prie grįžtamojo šaldytuvo ir vykdoma transesterifikacija 2 val. 100 °C temperatūroje, naudojant verdančio vandens vonelę. Po transesterifikacijos kolbos turinys perpilamas į dalijimo piltuvą, įpilama 4 ml distiliuoto vandens. Riebalų rūgščių metilo esteriai išskiriami naudojant solventą heksaną. Sumaišius, šiek tiek palaukiama, kol nusistovi matomi sluoksniai. Iš dalijimo piltuvo apatinis sluoksnis nupilamas, o viršutinis sluoksnis įpilamas į chromatografinį mėgintuvėlį, per filtrinį popierių su bevandeniu  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  [94]. Chromatografinis mėgintuvėlis dedamas į dujų chromatografą su masių spektrometrijos detektoriumi.

### 2.2.3. Chromatografinė ir masių spektrometrinė analizė

Atliekant tyrimą, buvo naudojamas dujų chromatografijos metodas, su masių spektrometrijos detektoriumi, kuris padeda nustatyti riebalų rūgščių spektrą trombocitų membranoje.

Riebalų rūgščių metilo esteriai buvo tirti dujų chromatografu naudojant masių spektrometrijos detektorių (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu), kolonėlė Rtx-5MS (ilgis - 30 m × vidinis skersmuo - 0,25mm × nejudrios fazės sluoksnio storis - 0,25µm). Dujų chromatografijos tyrimo sąlygos pateiktos 2 lentelėje. Kolonėlės termostato temperatūra pateikta 3 lentelėje. Masių spektrometrijos tyrimo sąlygos pateiktos 4 lentelėje.

2 lent. Dujų chromatografijos tyrimo sąlygos.

Kolonėlės termostato temperatūra	80 °C
Injektoriaus temperatūra	250 °C
Injekcijos tipas	Su srauto dalijimu
Srauto valdymo režimas	Linijinis greitis
Slėgis	58,8 kPa
Bendras srautas	4,8 mL/min
Srautas kolonėlėje	0,90 mL/min
Nešančiųjų dujų užsklandos laikas	2 min

3 lent. Kolonėlės termostato temperatūra.

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

4 lent. Masių spektrometrijos tyrimo sąlygos.

Jonų šaltinio temperatūra	200 °C
Sąsajos temperatūra	310 °C
Detektoriaus naudos režimas	santykinis
Detektoriaus nauda	0,78 kV+0,00 kV

Pradžios laikas	5,10 min
Baigties laikas	44,00 min
Įvykio laikas	0,20 sec
Skenavimo greitis	2500
Masės intervalas m/z	29,00 - 500,00

Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu trombocitų membranoje buvo nustatyta 13 riebalų rūgščių (5 lent.).

5 lent. Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu nustatytos riebalų rūgštys.

Sočiosios riebalų rūgštys	14:0 (tetradekano/miristino) 16:0 (heksadekano/palmitino) 18:0 (oktadekano/stearino)
Mononesočios riebalų rūgštys	16:1 $\omega$ 7 (9 – heksadekano/palmitoleino) 18:1 $\omega$ 7 (11 – oktadekano) 18:1 $\omega$ 9 (9 – oktadekano/oleino) 20:1 $\omega$ 9 (11 – eikozano)
Polinesočios riebalų rūgštys	18:2 $\omega$ 6 (9,12 – oktadekadieno/linolo) 18:3 $\omega$ 3 (9,12,15 – oktadekatrieno, $\alpha$ -linoleno) 20:4 $\omega$ 6 (5,8,11,14 – eikozatetraeno/arachidono) 20:5 $\omega$ 3 (5,8,11,14,17 – eikozapentaeno) 22:5 $\omega$ 3 (7,10,13,16,19 – dokoza pentaeno) 22:6 $\omega$ 3 (4,7,10,13,16,19 – dokozaheksaeno)

Šiam tyrimui apskaičiavome, kokią procentinę dalį trombocitų membranoje sudarė kiekviena iš nustatytų riebalų rūgščių nuo bendro riebalų rūgščių kiekio, taip pat paskaičiavome bendrą sočiųjų, mononesočiųjų, polinesočiųjų riebalų rūgščių sumą procentais, polinesočiųjų  $\omega$ -3 ir  $\omega$ -6 sumą procentais, polinesočiųjų  $\omega$ -3 ir  $\omega$ -6 riebalų rūgščių ( $\omega$ -3/ $\omega$ -6), polinesočiųjų ir sočiųjų (P/S), linolo ir arachidono (18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6),  $\alpha$ -linoleno ir eikozapentaeno (18:3 $\omega$ 3/20:5 $\omega$ 3) bei arachidono ir eikozapentaeno (20:4 $\omega$ 6/20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgščių santykius.

#### 2.2.4. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant *Microsoft Office Excel 2016* ir *IBM SPSS Statistics 24* programas. Buvo naudojamas Šapiro–Vilko (*Shapiro-Wilk*) testas norint išsiaiškinti, ar duomenys yra pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Šapiro – Vilko testo rezultatai parodė, kad gauti duomenys nėra pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Tad tolimesnei statistinei duomenų analizei buvo taikyti neparametriniai metodai. Palyginimui tarp dviejų grupių buvo taikytas Mano ir Vitnio U (*Mann-Whitney U*) testas. Koreliacijos tarp kintamųjų įvertinimui naudotas Spirmano (Spearman) koreliacijos koeficientas.

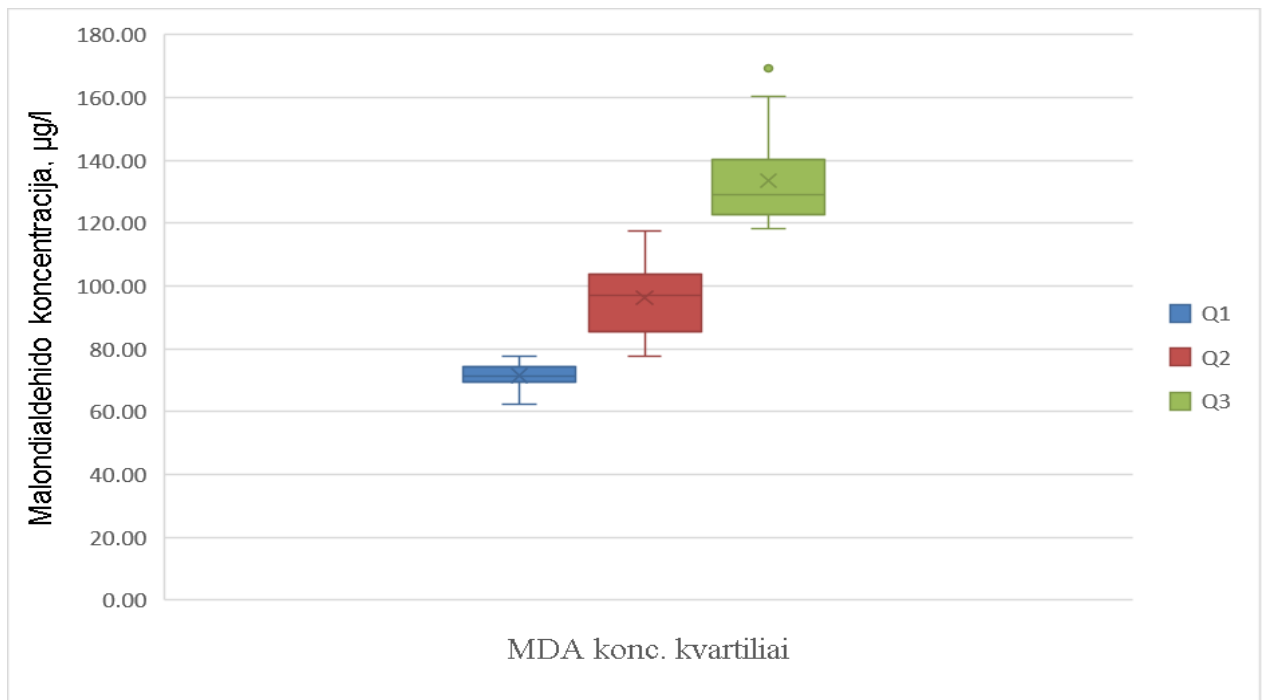
Lentelėse ir grafikuose duomenys pateikiami mediana, minimumu ir maksimumu, kadangi duomenys nėra pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Siekiant palyginti gautus rezultatus, bendra riebalų rūgčių procentinė suma buvo pateikta ir vidurkiu bei standartiniu nuokrypiu. Grafiniam vaizdavimui rezultatai pateikiami stačiakampėmis diagramomis (angl. *boxplot*). Rezultatai yra laikomi statistiškai reikšmingais, jei  $p < 0,05$ .



### 3. TYRIMO REZULTATAI IR APTARIMAS

#### 3.1. Riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal malondialdehido koncentraciją

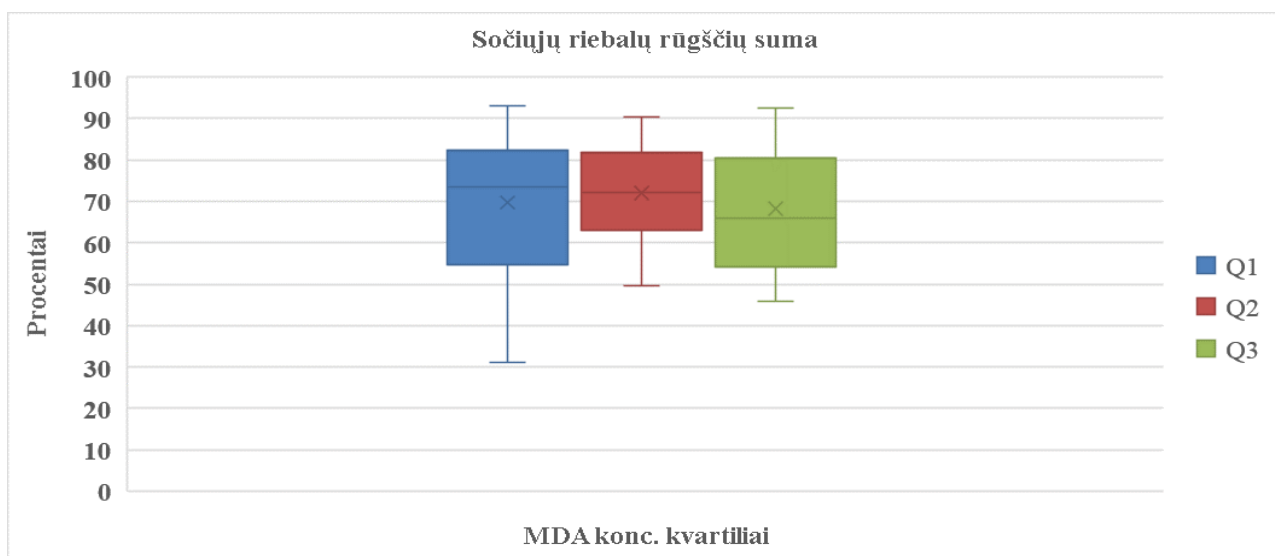
Mes nustatėme trombocitų membranos riebalų rūgštis ir palyginome riebalų rūgščių spektrą, tarp tiriamųjų asmenų su skirtinga kraujo serumo malondialdehido (MDA) koncentracija. Tiriamieji asmenys buvo sugrupuoti pagal kraujo serumo MDA koncentraciją į kvartilius. Pirmame kvartilyje (1Q) – 0-25 proc. duomenų, antrajame kvartilyje (Q2) – 25-75 proc. duomenų, trečiajame kvartilyje (Q3) – 75-100 proc. duomenų. Kraujo serumo MDA koncentracijos reikšmės suskirstėme į kvartilius: Q1 – 62,47-77,58  $\mu\text{g/l}$ , Q2 – 77,79-117,61  $\mu\text{g/l}$ , Q3 – 118,10-169,32  $\mu\text{g/l}$ . Q1 – duomenys esant mažiausioms kraujo serumo MDA koncentracijoms, trečiame kvartilyje (3Q) – duomenys esant didžiausioms kraujo serumo MDA koncentracijoms. Iš viso tiriamųjų – n=79, 1Q – n=20, 2Q – n=40, Q3 – n=19 (7 pav.).



7 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal MDA koncentracijos kvartilius.

### 3.1.1. Sočiųjų riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal MDA koncentraciją

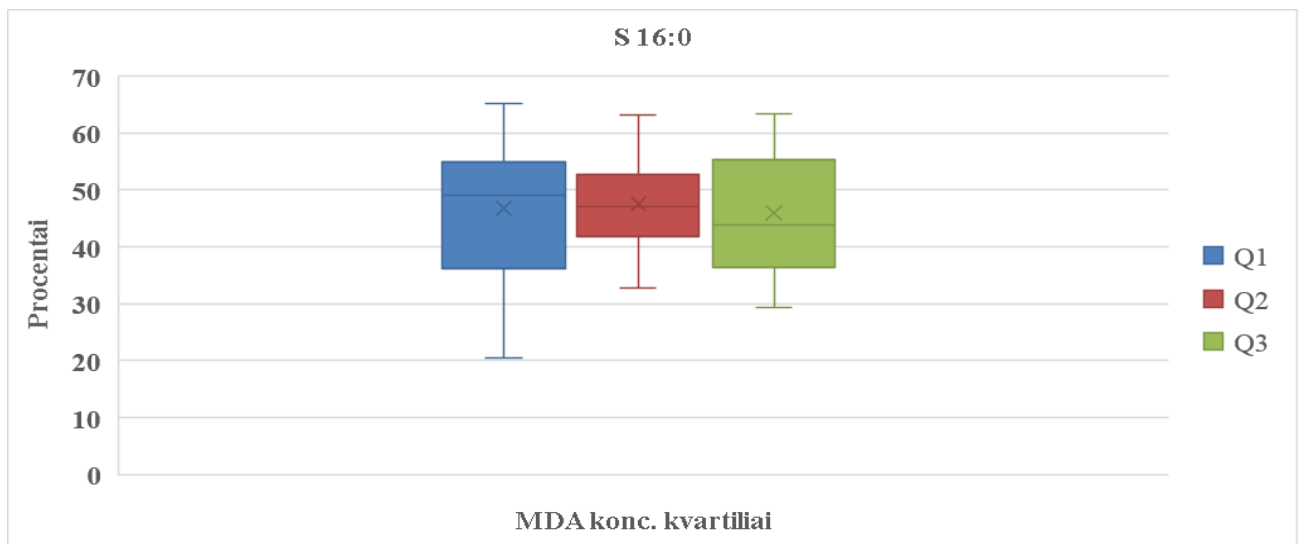
Nustačius trombocitų membranos riebalų rūgščių spektrą, buvo apskaičiuota bendra sočiųjų riebalų rūgščių procentinė suma. Nustatyta, kad sočiųjų riebalų rūgščių nežymiai daugiau yra esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), o esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), sočiųjų riebalų rūgščių yra mažiau (mediana Q1=73,42; Q2=72,19; Q3=65,95) (8 pav.). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp MDA koncentracijos kvartilų nebuvo pastebėta (Q1 ir Q3, p=0,607).



**8 pav.** Sočiųjų riebalų rūgščių sumos pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilų.

Literatūros duomenimis, didesnis kiekis sočiųjų riebalų rūgščių dažniausiai sudaro membranas, kurios yra stipriai susijusios su signaliniais mechanizmais. Miristino ir palmitino riebalų rūgštys gali kovalentiškai modifikuoti baltymus, kurie yra susiję su signalų perdavimu [53]. Mes nustatėme, kad trombocitų membranos fosfolipidinio sluoksnio didžiausią riebalų rūgščių dalį sudaro sočiosios riebalų rūgštys. Panašius į mūsų tyrimo gautus rezultatus gavo ir S. Lin su bendraautoriais, kurie taip pat nustatė panašų sočiųjų riebalų rūgščių kiekį trombocitų membranoje [12].

Nustatytos palmitino (16:0) riebalų rūgšties pasiskirstymas yra nežymiai didesnis (p=0,728) pirmajame MDA koncentracijos kvartilyje (Q1), kai MDA koncentracija yra mažesnė lyginant su antruoju (Q2) ir trečiuoju (Q3) kvartiliais (mediana Q1=48,99; Q2=47,17; Q3=43,81) (9 pav.). Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp MDA koncentracijos nenustatyta.

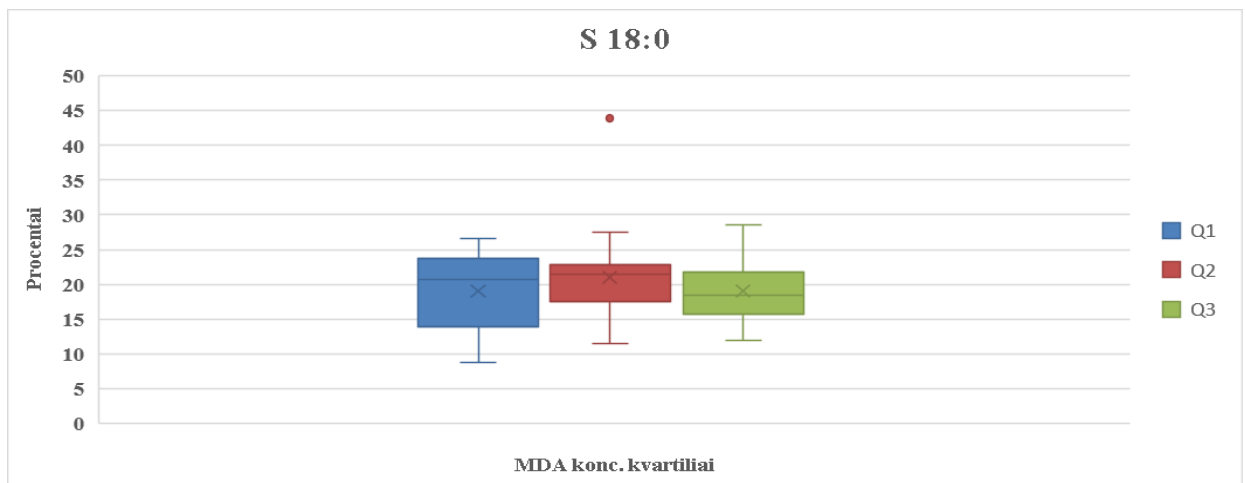


**9 pav.** Palmitino (16:0) riebalų rūgštis pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Sočioji palmitino (16:0) riebalų rūgštis sudaro didžiausią procentą trombocitų membranoje (mediana=46,59). Šios rūgštis didesnis kiekis pirmajame MDA kvartilyje (Q1), didina bendrą sočiųjų riebalų rūgščių sumos procentą.

Mes nustatėme, kad palmitino (16:0) rūgštis yra pagrindinė trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgštis. Panašius rezultatus pateikė ir C. M. Skeaff su bendraautoriais, jie nustatė kad palmitino (16:0) riebalų rūgštis taip pat yra pagrindinė trombocitų membranoje [9].

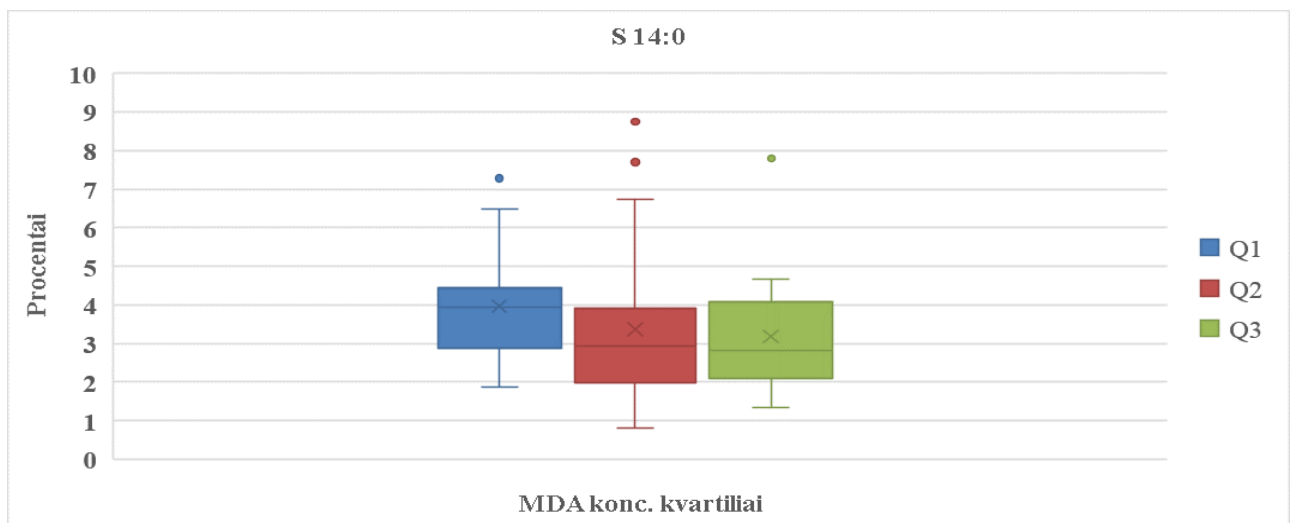
Sočiosios stearino (18:0) riebalų rūgštis pasiskirstymas nėra tendencingas tarp MDA koncentracijos kvartilių, nors galima pastebėti nežymų sumažėjimą ( $p=0,117$ ) trečiame kvartilyje (Q3) esant didesnei MDA koncentracijai, lyginant su antruoju kvartiliu (Q2) (mediana Q1=20,73; Q2=21,41; Q3=18,45) (10 pav.).



**10 pav.** Stearino (18:0) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Savo tyrime mes nustatėme, kad stearino (18:0) riebalų rūgštis tiriamųjų asmenų trombocitų membranoje vidutiniškai sudaro 20,04 proc. J. De Castro su bendraautorais nustatė labai panašų stearino (18:0) riebalų rūgšties procentinį kiekį (19,71 proc.) trombocituose [11]. Taip pat E. Vognild ir bendra autorių publikacijoje stearino riebalų rūgšties trombocituose nustatyta vidutiniškai 21,40 proc. [95].

Nustačius trombocitų membranos sočiųjų riebalų rūgščių spektrą, galima pastebėti tendenciją ( $p=0,089$ ), kad miristino (14:0) riebalų rūgšties yra daugiau pirmajame kvartilyje (Q1), kai MDA koncentracija yra mažesnė, lyginant trečiuoju (Q3) kvartiliu, kai MDA koncentracija yra didesnė (mediana  $Q1=3,93$ ;  $Q2=2,93$ ;  $Q3=2,81$ ) (11 pav.).

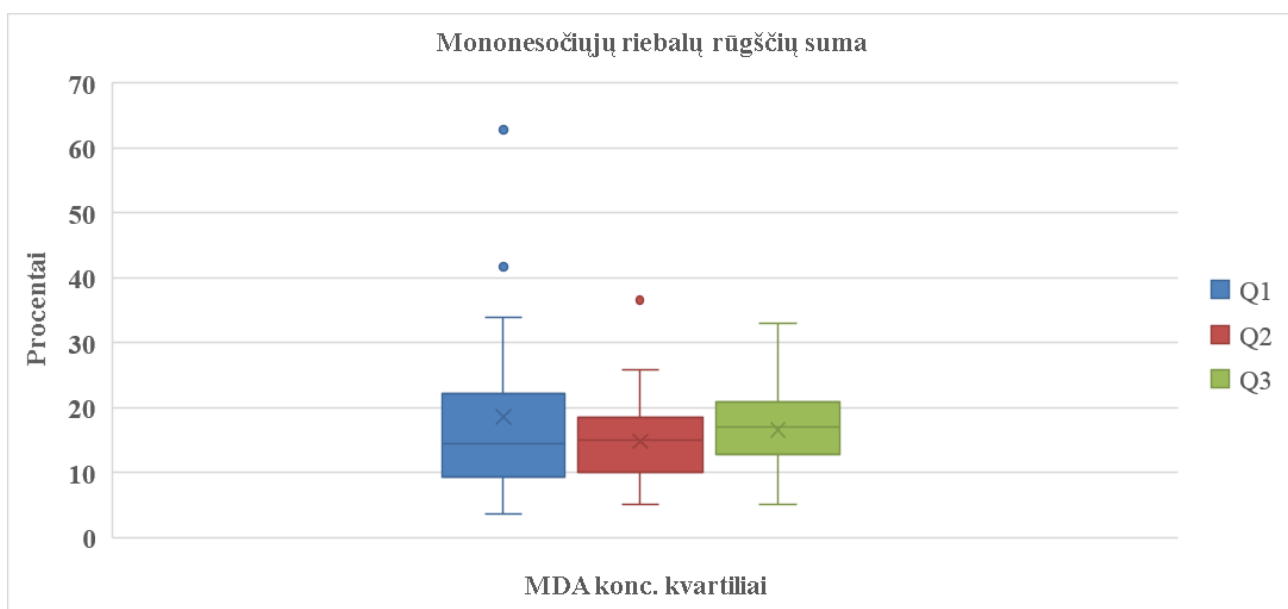


**11 pav.** Miristino (14:0) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Nors miristino riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių yra tendencingas, tačiau ši riebalų rūgštis sudaro vidutiniškai 3,47 proc. visų mūsų nustatytų riebalų rūgščių.

### 3.1.2. Mononesočiųjų riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal MDA koncentraciją

Nustačius trombocitų membranos riebalų rūgščių spektrą, buvo apskaičiuota bendra mononesočiųjų riebalų rūgščių suma. Galima pastebėti, kad mononesočiųjų riebalų rūgščių pasiskirstymas yra nežymiai mažesnis esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), o esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), mononesočiųjų riebalų rūgščių kiekis yra nežymiai didesnis ( $p=0,771$ ) (mediana Q1=14,54; Q2=15,00; Q3=16,99) (12 pav.). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp MDA koncentracijos kvartilių nebuvo nustatyta.

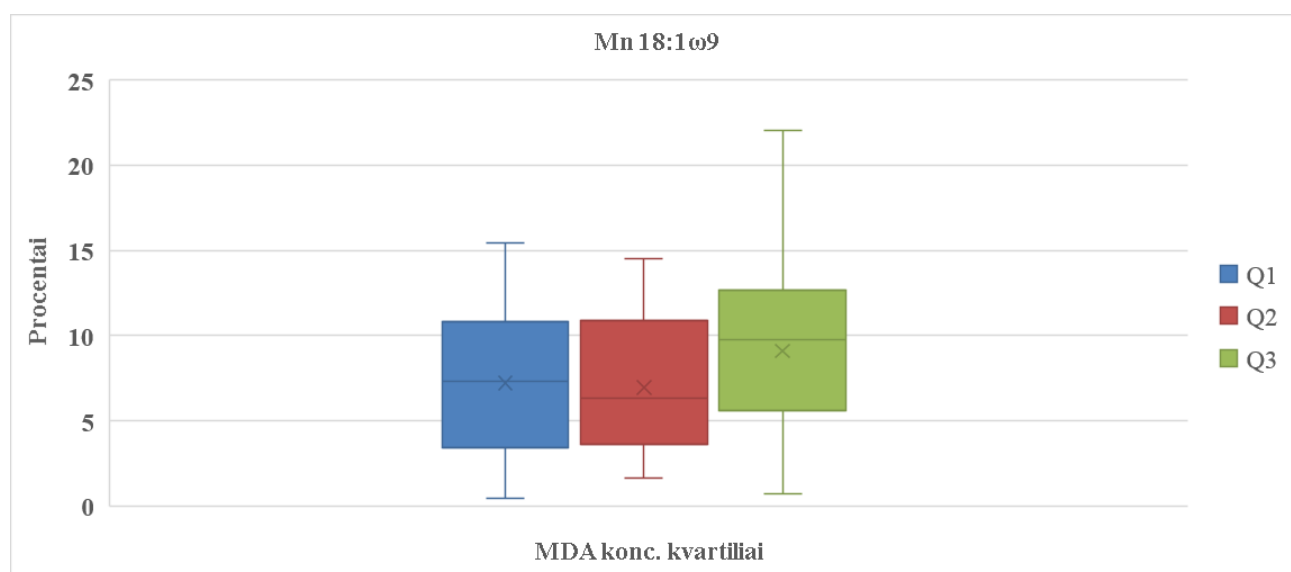


**12 pav.** Mononesočiųjų riebalų rūgščių sumos pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Nustačius individualias mononesočiųjų riebalų rūgštis, jų pasiskirstymai tarp MDA koncentracijos kvartilių yra šiek tiek prieštaringi, nes kai kurių mononesočiųjų riebalų rūgščių kiekis mažėja esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), o kai kurių – didėja. Bendrą mononesočiųjų riebalų rūgščių sumą trombocitų fosfolipidinėje membranoje nulemia tos rūgštys, kurių procentiškai yra daugiausia.

Mūsų tyrime nustatyta trombocitų membranos bendrą vidutinę procentinę mononesočiųjų riebalų rūgščių sumą labai panašiai gavo ir S. Lin su bendraautorais [12]. Mes nustatėme vidutiniškai 16,18 proc. mononesočiųjų riebalų rūgščių, o S. Lin su bendraautorais nustatė vidutiniškai 15,58 proc.

Nustatėme, kad iš mononesočiųjų riebalų rūgščių trombocitų membranoje, daugiausia yra oleino (18:1 $\omega$ 9) riebalų rūgšties (mediana=7,11). Lyginant oleino riebalų rūgšties pasiskirstymą pagal malondialdehido koncentraciją nustatėme, kad oleino riebalų rūgšties yra daugiau trečiame kvartilyje (Q3), kai MDA koncentracija yra didesnė, lyginant su pirmuoju (Q1) ir antruoju (Q2) kvartiliais (mediana Q1=7,31; Q2=6,34; Q3=9,79) (13 pav.). Statistiškai reikšmingai daugiau oleino (18:1 $\omega$ 9) riebalų rūgšties yra trečiame kvartilyje (Q3), esant didesnei MDA koncentracijai, lyginant su antruoju kvartiliu (Q2) ( $p=0,049$ ).



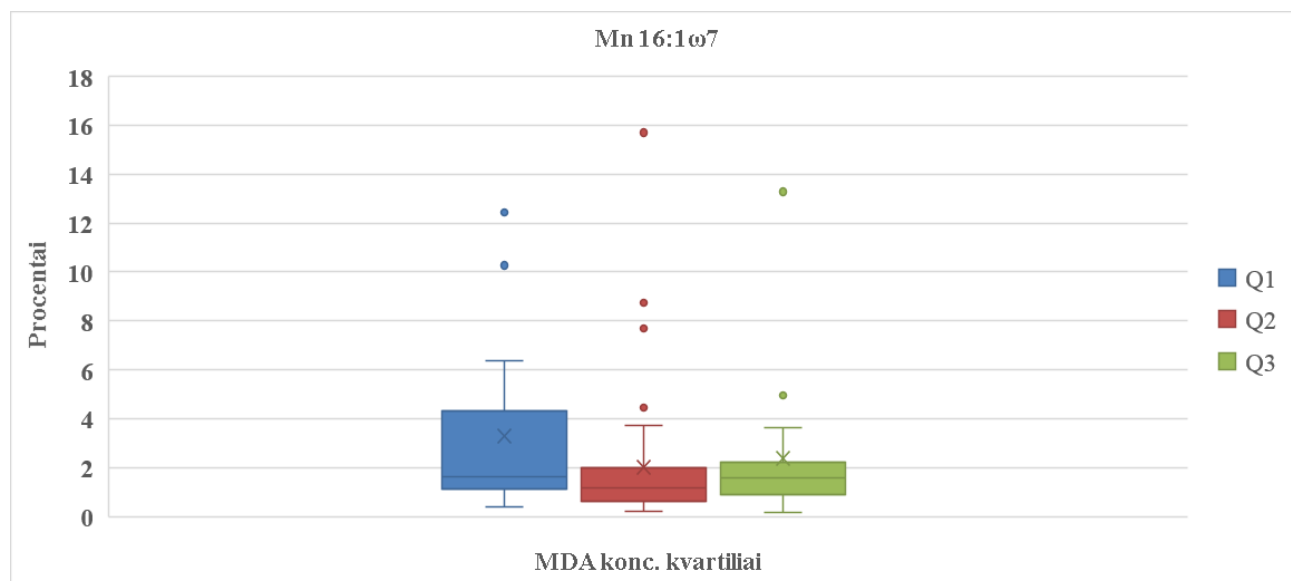
**13 pav.** Oleino (18:1 $\omega$ 9) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Oleino (18:1 $\omega$ 9) riebalų rūgštis yra gaminama mūsų organizme, bet taip pat gali būti gaunama su maistu. Aliejuose, kur gausu oleino riebalų rūgšties, yra ir vitamino E (tokoferolių), kuris pasižymi antioksidaciniu poveikiu. Oleino rūgštis yra svarbi fosfolipidinės membranos dali ir sudaro didžiausią mononesočiųjų riebalų rūgščių procentą, lyginant su kitomis mononesočiosiomis riebalų rūgštimis. Oleino riebalų rūgštis galėtų apsaugoti membraną nuo peroksidacijos, nes pasižymi antioksidaciniu poveikiu, kadangi mažina ROS susidarymą. Oleino riebalų rūgšties padidėjimą esant didesnei MDA koncentracijai, galima paaiškinti kaip siekimą sumažinti tą MDA

koncentraciją, arba kaip kompensaciją, kuomet polinesočios riebalų rūgštys yra aktyviai panaudojamos MDA sintezei t. y. esant  $\omega$ -3 ir  $\omega$ -6 polinesočiųjų riebalų rūgščių deficitui, imama spartinti oleino riebalų rūgščių sintezę, kuri yra kitų  $\omega$ -9 polinesočiųjų riebalų rūgščių, reikalingų membranai, pirmtakas.

J. De Castro su bendraautorais nustatė, kad oleino riebalų rūgštis yra pagrindinė trombocitų membranos mononesočioji riebalų rūgštis [11]. Mūsų tyrime oleino riebalų rūgštis taip pat sudaro didžiausią mononesočiųjų riebalų rūgščių dalį. Tą patvirtina ir S. Lin ir bendraautorių pateikti duomenys [12].

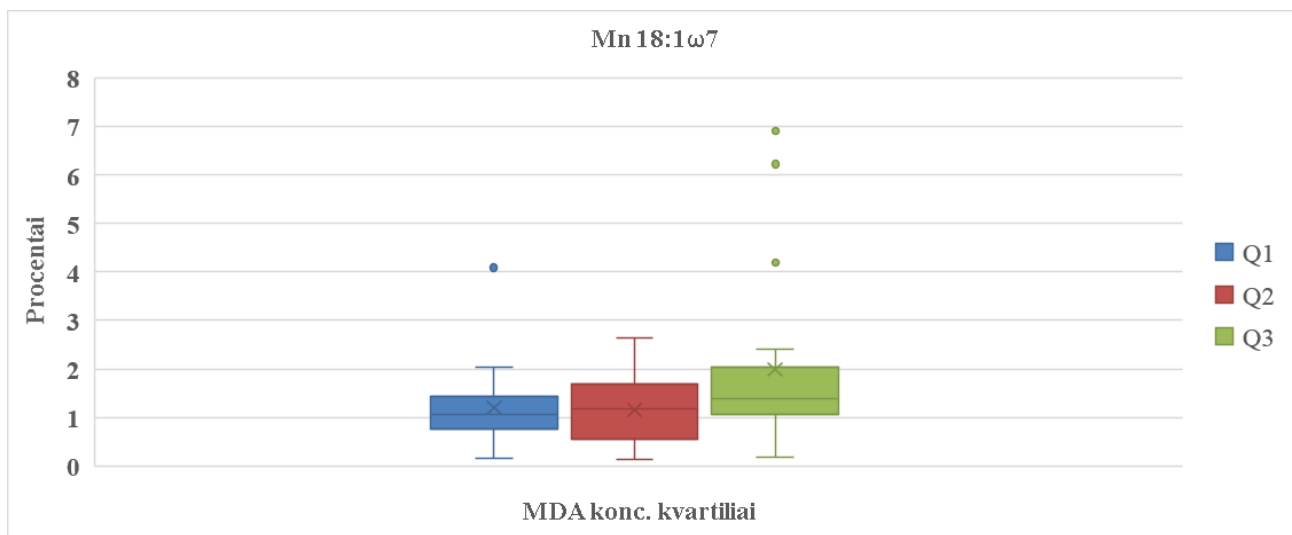
Nustačius palmitoleino (16:1 $\omega$ 7) riebalų rūgštį, palyginome šios mononesočiosios riebalų rūgšties pasiskirstymą tarp MDA koncentracijos kvartilų. Galima pastebėti, kad palmitoleino (16:1 $\omega$ 7) riebalų rūgštis yra daugiau ( $p=0,056$ ) pirmame kvartilyje (Q1), kai MDA koncentracija yra mažesnė, lyginant su antruoju kvartiliu (Q2) (mediana Q1=1,63; Q2=1,15; Q3=1,59) (14 pav.).



**14 pav.** Palmitoleino (16:1 $\omega$ 7) riebalų rūgštis pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilų.

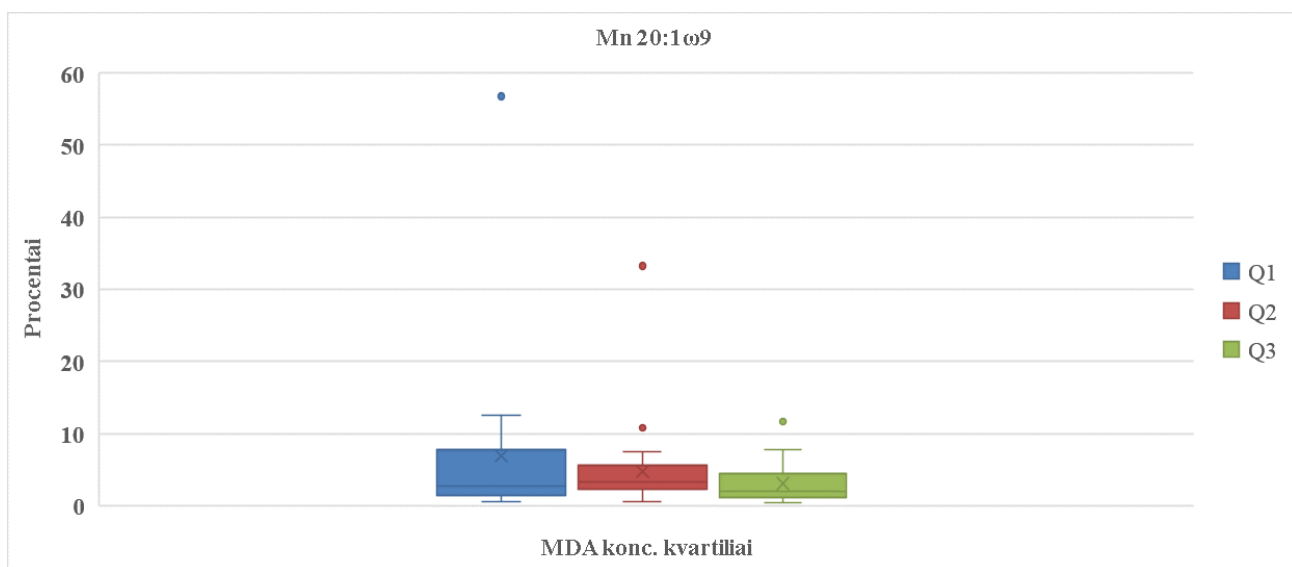
Esant mažesnei kraujo serumo MDA koncentracijai palmitoleino (16:1 $\omega$ 7) riebalų rūgštis yra daugiau. Galima manyti, kad ši riebalų rūgštis gali būti pagaminama pačio organizmo iš palmitino riebalų rūgštis, tiek gaunama su maistu (augalinės kilmės maistu, aliejais), o tokia maiste yra antioksidantų, vitamino E (tokoferolių), kurie galėtų būti susiję su šios riebalų rūgštis didesniu kiekiu esant mažesnei MDA koncentracijai.

Nustačius oktadekano (18:1 $\omega$ 7) rūgštį trombocitų membranoje, palyginome šios mononesočiosios riebalų rūgšties pasiskirstymą tarp MDA koncentracijos kvartilių. Galima pastebėti šios oktadekano (18:1 $\omega$ 7) riebalų rūgšties tendencingą didėjimą ( $p=0,070$ ), didėjant MDA koncentracijai (mediana Q1=1,06; Q2=1,19; Q3=1,38) (15 pav.).



**15 pav.** Oktadekano (18:1 $\omega$ 7) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Nebuvo pastebėta mononesočiosios eikozano (20:1 $\omega$ 9) riebalų rūgšties pasiskirstymo tendencijos tarp MDA koncentracijos kvartilių (mediana Q1=2,65; Q2=3,07; Q3=1,98) (16 pav.).

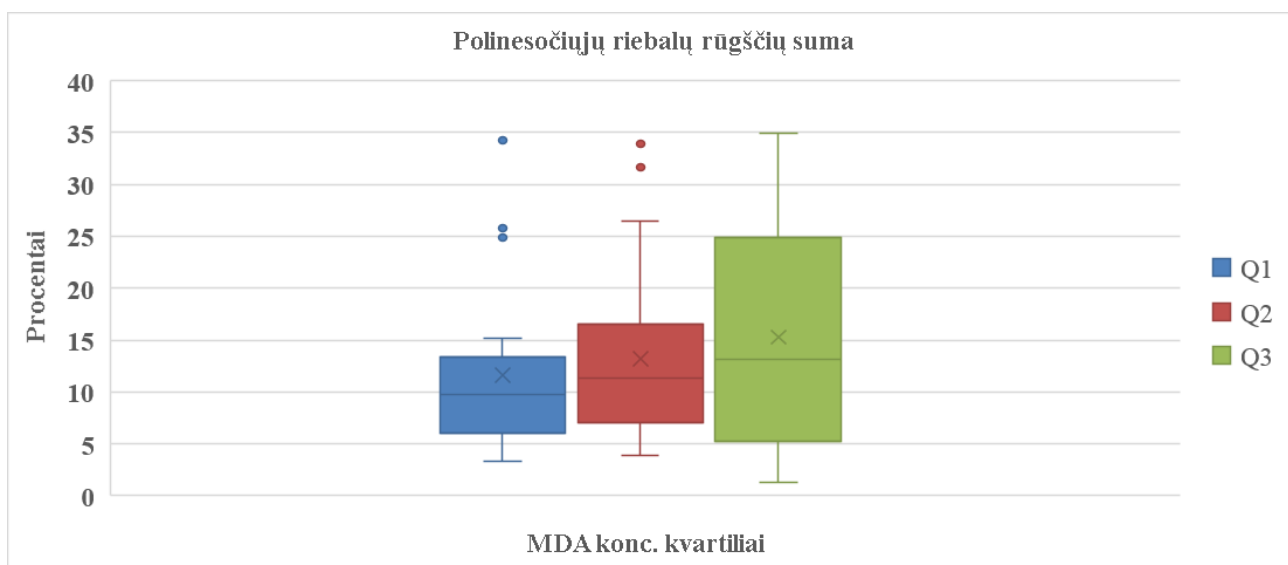


**16 pav.** Eikozano (20:1 $\omega$ 9) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.



### 3.1.3. Polinesočiųjų riebalų rūgščių spektro palyginimas pagal MDA koncentraciją

Apskaičiavus bendrą polinesočiųjų riebalų rūgščių sumą, galima pastebėti, kad polinesočiųjų riebalų rūgščių yra daugiau ( $p=0,336$ ) esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), o esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), polinesočiųjų riebalų rūgščių yra mažiau (mediana Q1=9,80; Q2=11,38; Q3=13,09) (17 pav.). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp MDA koncentracijos kvartilijų nebuvo nustatyta.

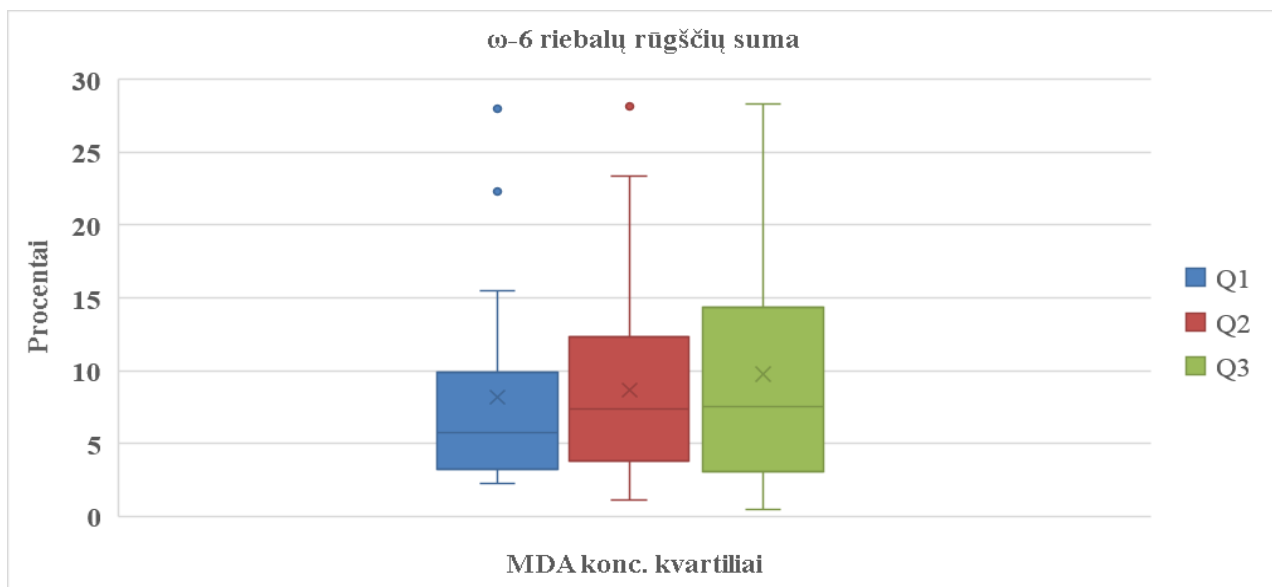


**17 pav.** Polinesočiųjų riebalų rūgščių sumos pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilijų.

Padidėjęs polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis esant didesnei MDA koncentracijai, tai galėtų būti trombocito atsakas pasiruošti būsimam suaktyvėjimo procesui, nes iš polinesočiųjų riebalų rūgščių gaminasi įvairūs eikozanoidai, kurie yra reikalingi tolimesnei trombocitų veiklai. Taigi, didesnė MDA koncentracija yra veiksnys, kuris skatina trombocitą gaminti daugiau polinesočiųjų riebalų rūgščių (ARA, EPA, DHA ir kt.) iš kurių vėliau bus gaminami eikozanoidai. Oksidacijos procesas yra veiksnys, kuris gali paruošti trombocitus būsimam aktyvacijos etapui, kadangi šios polinesočiosios riebalų rūgštys turi būti patalpintos membranos fosfolipidiniame dvisluoksnyje, o iš čia toliau panaudojamos eikozanoidų ir dokoanoidų sintezei.

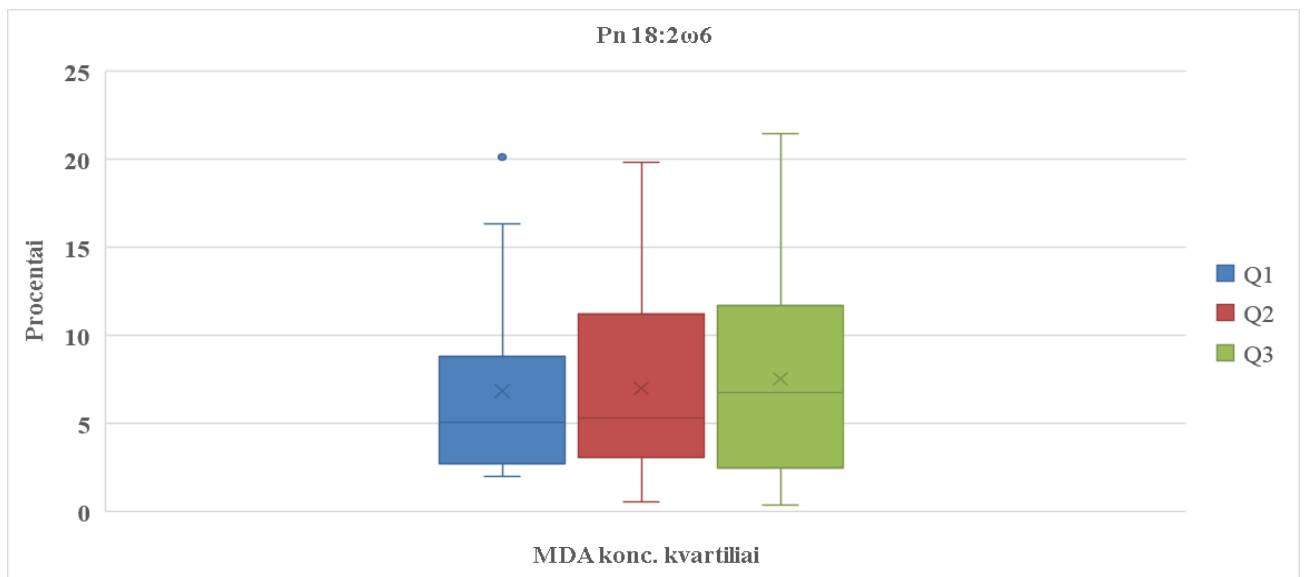
Mes nustatėme šiek tiek mažesnę trombocitų membranos polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekį, nei savo tyrime nustatė J. De Astro su bendraautoriais [11]. Skirtumą galėjo lemti tai, kad skyrėsi metodinė dalis, taip pat tiriamųjų grupė.

Siekiant išsiaiškinti, kurios polinesočiosios riebalų rūgštys lemia tokį jų pasiskirstymą tarp MDA koncentracijos kvartilių, buvo apskaičiuota polinesočiųjų  $\omega$ -6 riebalų rūgščių suma. Esant didesnėms MDA koncentracijos vertėms (Q3), pastebima nežymiai didesnė ( $p=0,813$ )  $\omega$ -6 riebalų rūgščių suma, o esant mažesnėms MDA koncentracijos vertėms (Q1), pastebima nežymiai mažesnė  $\omega$ -6 riebalų rūgščių suma (mediana Q1=5,72; Q2=7,41; Q3=7,53) (18 pav.).



**18 pav.**  $\omega$ -6 riebalų rūgščių sumos pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

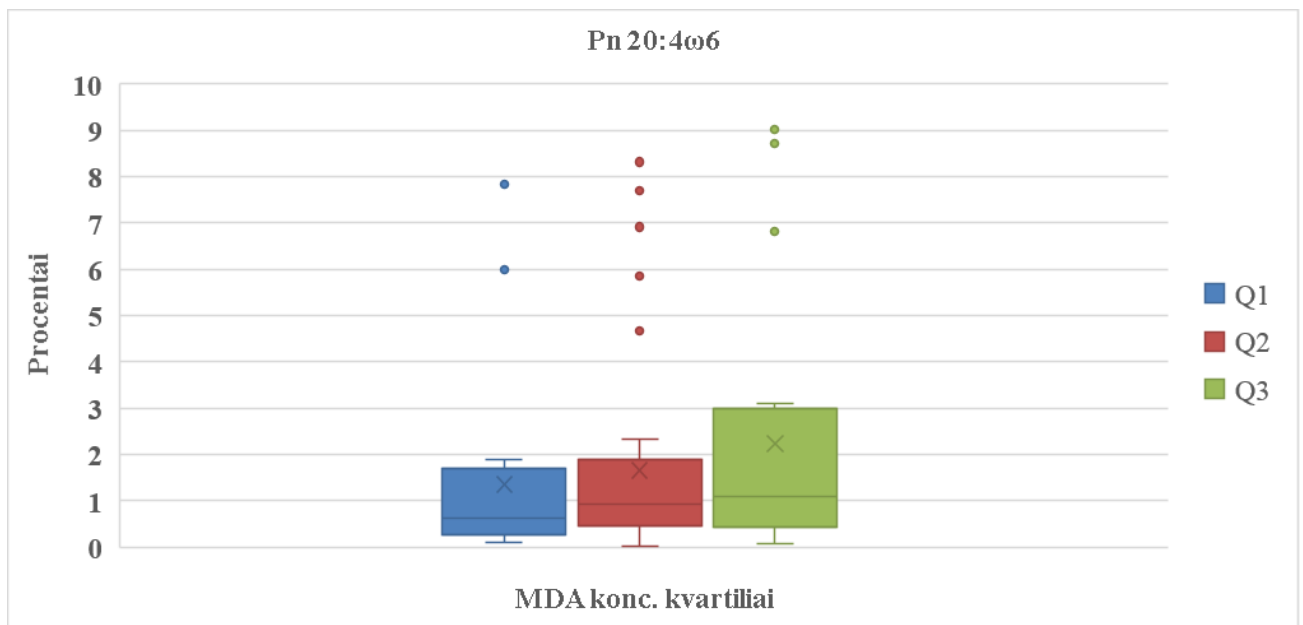
Iš  $\omega$ -6 grupės, polinesočiosios linolo (18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgšties pasiskirstymas yra nežymiai didesnis ( $p=0,901$ ), esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), o esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), linolo (18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgšties yra nežymiai mažiau (mediana Q1=5,08; Q2=5,29; Q3=6,75) (19 pav.).



**19 pav.** Linolo (18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Linolo (LA; 18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgštis yra gaunama su maistu (aliejaus) ir atspindi mitybinę racioną, kadangi ji yra nepakeičiama ir mūsų organizmas jos negamina. Linolo (18:2 $\omega$ 6) rūgštis padidėjimas esant didesnei MDA koncentracijai galėtų parodyti šios rūgštis įjungimą į membraną (fosfolipidų sintezę). Esant didesnei MDA koncentracijai, linolo riebalų rūgštis galėtų intensyviau būti įjungiama į membranos sintezę, kad galėtų vykti tolimesnė riebalų rūgščių konversija ir eikozanoidų gamyba. Augaliniai aliejai teikia ne tik linolo (18:2 $\omega$ 6) rūgštį, bet kartu teikia ir antioksidacines medžiagas, o tai galėtų suteikti apsaugą nuo MDA oksidacinio poveikio.

Iš  $\omega$ -6 grupės, polinesočiosios arachidono (20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgštis pasiskirstymas yra didesnis ( $p=0,235$ ), esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), o esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), arachidono (20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgštis yra mažiau (mediana Q1=0,63; Q2=0,92; Q3=1,08) (20 pav.).

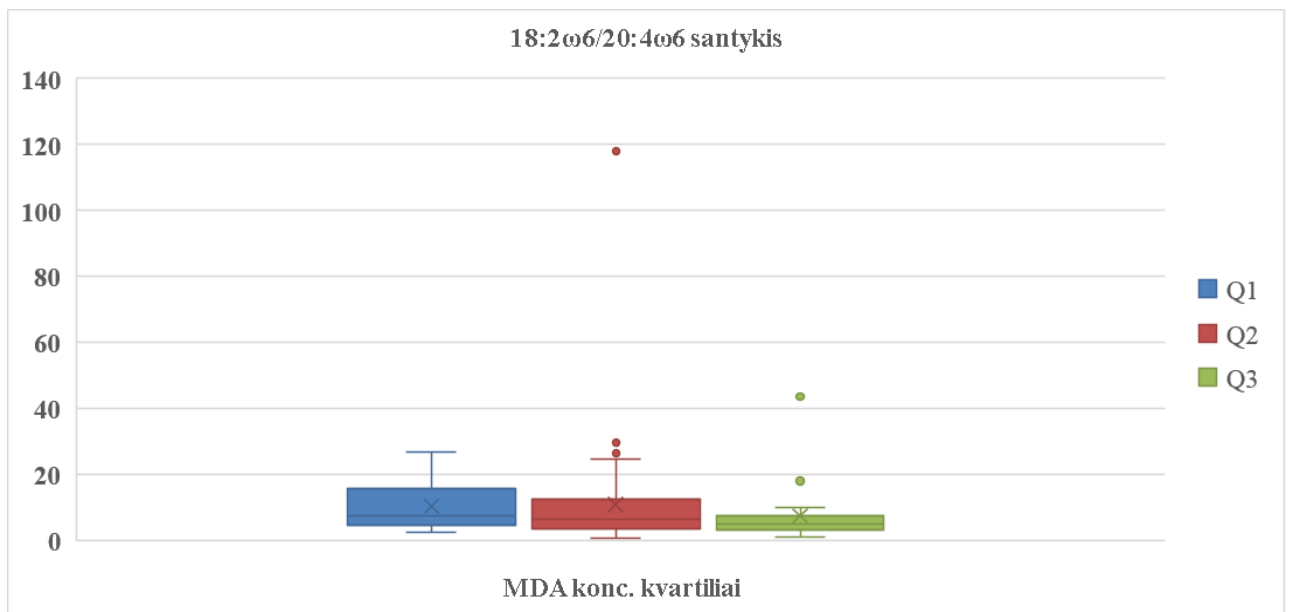


**20 pav.** Arachidono (20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Esant didesnei MDA koncentracijai arachidono (20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgšties daugėja, nes daugėja ir linolo (18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgšties, kuri yra gaunama tik su maistu. Tai mums parodo, kad vyksta konversija iš linolo (18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgšties į arachidono (20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgštį. Tikėtina, kad ištyrus tuos pačius tiriamuosius po kurio laiko, galima būtų nustatyti ženklėsnę arachidono riebalų rūgšties padidėjimą.

Literatūros duomenimis, iš trombocitų arachidono riebalų rūgšties gaminasi tromboksanas A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), kuris yra labai svarbus širdies ir kraujagyslių ligų patogenezėje, nes skatina trombocitų agregaciją ir vazokonstrikciją [96]. Didesnė MDA koncentracija galėtų būti veiksnys, kuris skatintų didesnį TXA<sub>2</sub> susidarymą. Mes nustatėme, kad esant didesnei MDA koncentracijai, trombocitų membranoje yra daugiau arachidono riebalų rūgšties, o pagal tai galime spręsti, kad galėtų susidaryti didesnis kiekis TXA<sub>2</sub>, kas galėtų paveikti organizmą aktyvesnei trombogenezei.

Tam, kad būtų galima įvertinti riebalų rūgščių konversiją, apskaičiavome linolo/arachidono (18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgščių santykį. Nustatėme, kad esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), linolo/arachidono (18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgščių santykis yra statistiškai reikšmingai mažesnis ( $p=0,038$ ), lyginant su Q1, kai MDA koncentracija yra mažesnė (Mediana Q1=7,49; Q2=6,33; Q3=5,08) (21 pav.).

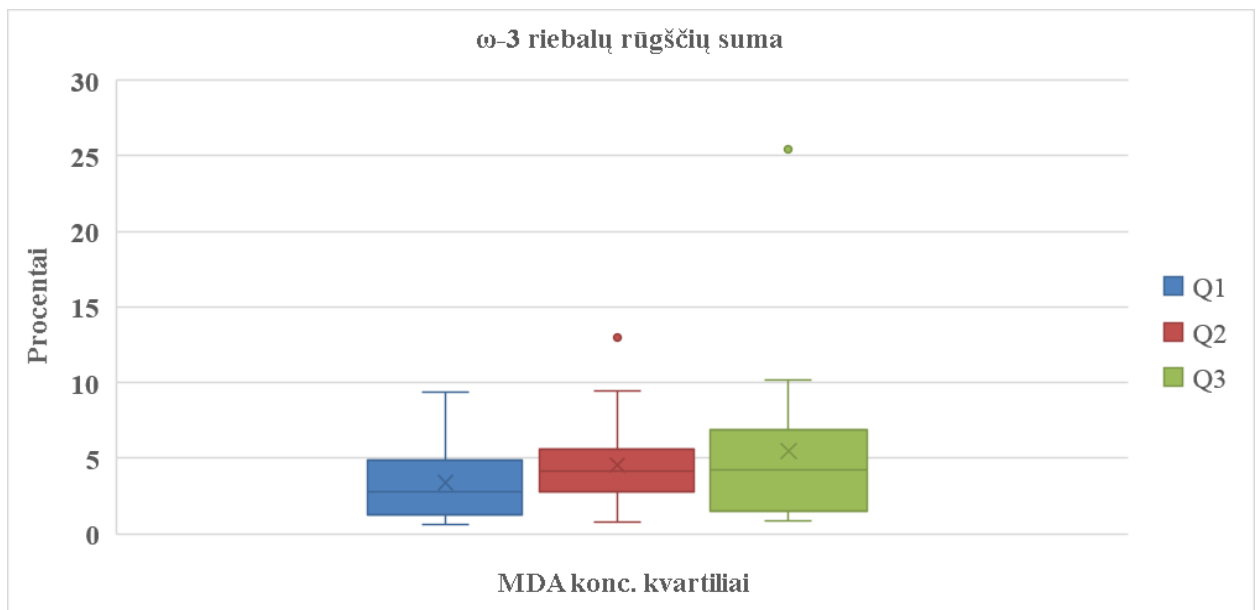


**21 pav.** Linolo/arachidono (18:2ω6/20:4ω6) riebalų rūgščių santykio pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Esant mažesniai 18:2ω6/20:4ω6 riebalų rūgščių santykiui, galima spręsti, kad vyksta intensyvesnė linolo (18:2ω6) riebalų rūgšties konversija į arachidono (20:4ω6) riebalų rūgštį ir yra aktyvesnė eikozanoidų sintezė, kai yra didesnė MDA koncentracija. Galima manyti, kad ši konversija, tai kaip trombocito pasiruošimas būsimai eikozanoidų sintezei, o tai sąlygotą aktyvesnę eikozanoidų sintezę ateityje. Taip pat sąlygotą ir būsimą trombocitų aktyvaciją, nes gaminami tromboksani aktyvintų trombocitus ir jie greičiau galėtų įsijungti į kraujo krešėjimo procesą. Tai gali būti neigiamas veiksnys, jei dar yra kitų papildomų rizikos veiksnių, kurie skatina ne infekcinės ligos patogenezę (aterosklerozę, trombozę). Taigi, didesnė MDA koncentracija galėtų būti veiksnys, kuris inicijuoja trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgščių konversiją iš linolo (18:2ω6) rūgšties į arachidono (20:4ω6) rūgštį ir aktyvesnę prouždegiminių eikozanoidų sintezę.

Apskaičiavus ω-6 riebalų rūgščių sumą, toliau buvo siekiama išsiaiškinti, kurios dar polinesočiosios riebalų rūgštys lemia tokį jų pasiskirstymą tarp MDA koncentracijos kvartilių, tad buvo apskaičiuota ir polinesočiuųjų ω-3 riebalų rūgščių suma. Esant didesnėms MDA koncentracijos vertėms (Q3), pastebima didesnė ( $p=0,184$ ) bendra ω-3 riebalų rūgščių suma, o esant mažesnėms MDA koncentracijos vertėms (Q1), pastebima mažesnė ω-3 riebalų rūgščių suma (mediana Q1=2,81; Q2=4,12; Q3=4,20). Buvo nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp Q1 ir Q2

( $p=0,041$ ). Nustatėme, kad esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1),  $\omega$ -3 riebalų rūgščių suma yra statistiškai reikšmingai mažesnė ( $p=0,041$ ), lyginant su antruoju kvartiliu (Q2) (22 pav.).

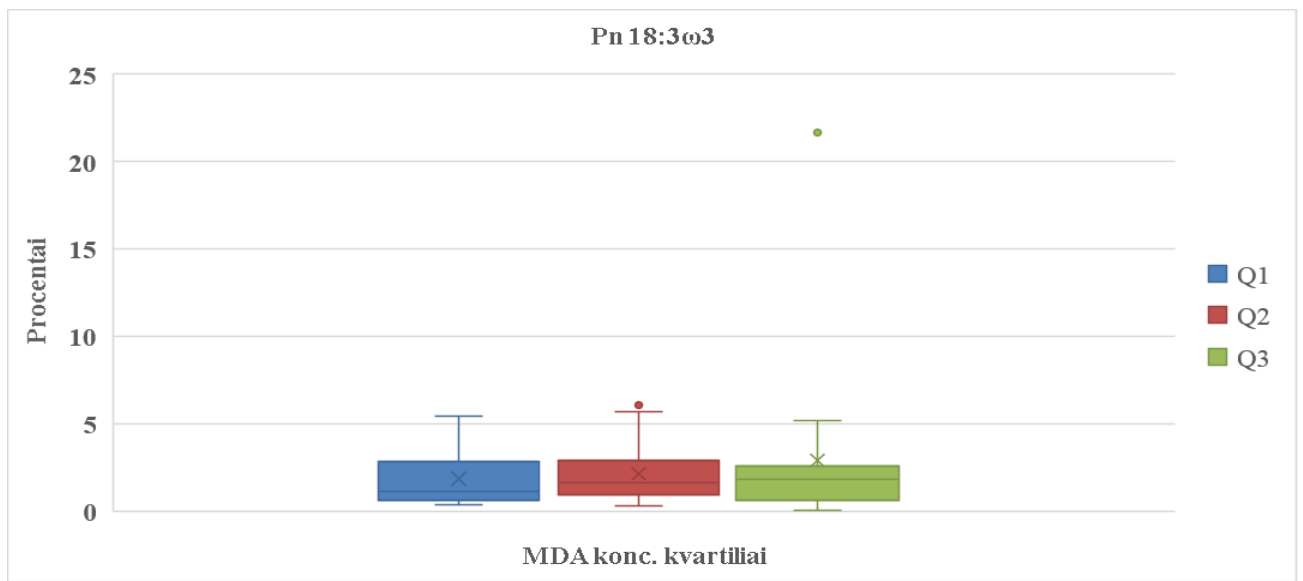


**22 pav.**  $\omega$ -3 riebalų rūgščių sumos pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Iš  $\omega$ -3 riebalų rūgščių joms oksiduojantis gali pasigaminti daugiau malondialdehido molekulių, bet iš  $\omega$ -3 gaminasi priešūždegiminiai eikozanoidai, tromboksanas, kuris yra mažai aktyvus ir neturi tokios reikšmės kaip iš  $\omega$ -6 riebalų rūgščių pasigaminę eikozanoidai.

Mūsų tyrime nustatytas trombocitų membranos bendras  $\omega$ -3 riebalų rūgščių kiekis labai panašus į D. Li ir bendraautorių publikacijoje pateiktą trombocitų membranos  $\omega$ -3 riebalų rūgščių kiekį, tačiau mokslininkai nustatė nežymiai didesnę  $\omega$ -6 riebalų rūgščių kiekį [97].

Iš  $\omega$ -3 grupės, polinesočiosios  $\alpha$ -linoleno ( $18:3\omega$ 3) riebalų rūgšties pasiskirstymas yra nežymiai didesnis ( $p=0,569$ ), esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), o esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1),  $\alpha$ -linoleno ( $18:3\omega$ 3) riebalų rūgšties yra nežymiai mažiau (mediana Q1=1,10; Q2=1,61; Q3=1,82) (23 pav.).

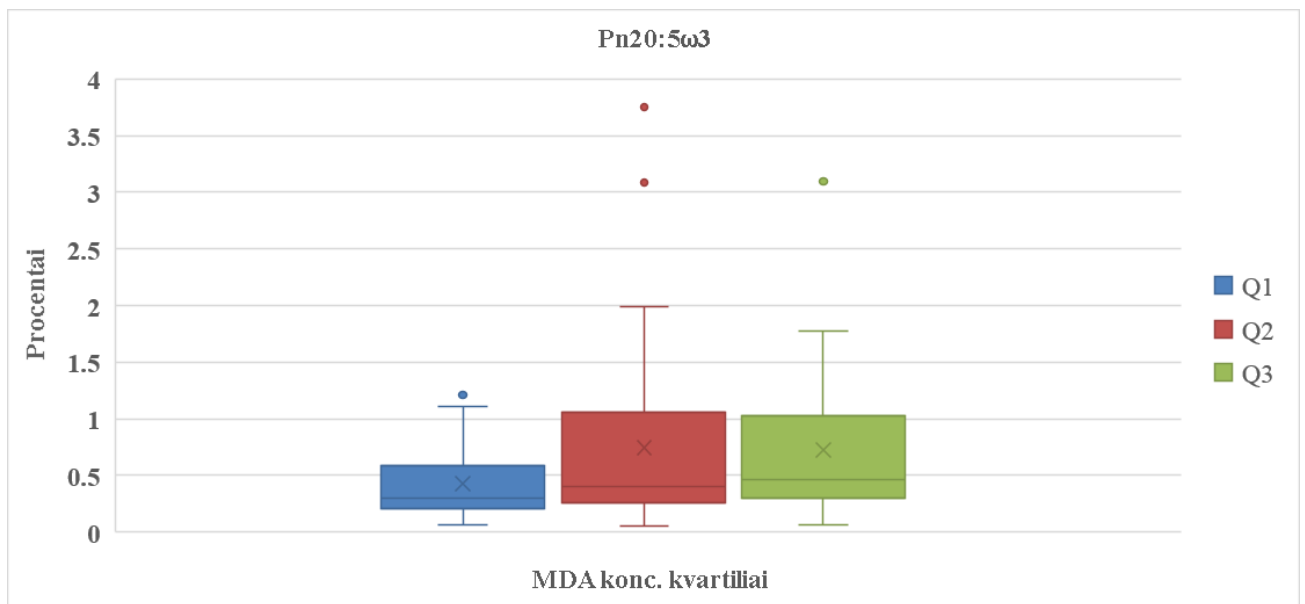


**23 pav.**  $\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) riebalų rūgštis pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

$\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) riebalų rūgštis yra gaunama su maistu (aliejaus, jūros gėrybėmis) ir atspindi mitybinį racioną, kadangi  $\alpha$ -linoleno rūgštis yra nepakeičiama ir mūsų organizmas jos negamina.  $\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) rūgštis nežymus padidėjimas esant didesnei MDA koncentracijai, galėtų parodyti šios rūgštis įjungimą į membranos fosfolipidus. Esant didesnei MDA koncentracijai,  $\alpha$ -linoleno riebalų rūgštis galėtų intensyviau būti įjungiama į membranos sintezę, kad galėtų vykti tolimesnė riebalų rūgščių konversija, eikozanoidų sintezė. Taip pat  $\alpha$ -linoleno rūgštis kiekis priklauso nuo maisto raciono.

D. Li ir bendraautorių publikacijoje pateikti mažesni trombocitų membranos  $\alpha$ -linoleno riebalų rūgštis kiekiai, nei mes nustatėme savo tyrime, bet kaip jau kaip buvo minėta,  $\alpha$ -linoleno riebalų rūgštis kiekis priklauso nuo maisto raciono, nes nėra gaminama žmogaus organizme [97].

Nustatėme dar vienos  $\omega$ -3 grupės, polinesočiosios eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštis pasiskirstymą tarp MDA koncentracijos kvartilių. Esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštis yra daugiau ( $p=0,141$ ), o esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštis yra mažiau (mediana Q1=0,30; Q2=0,40; Q3=0,46) (24 pav.).



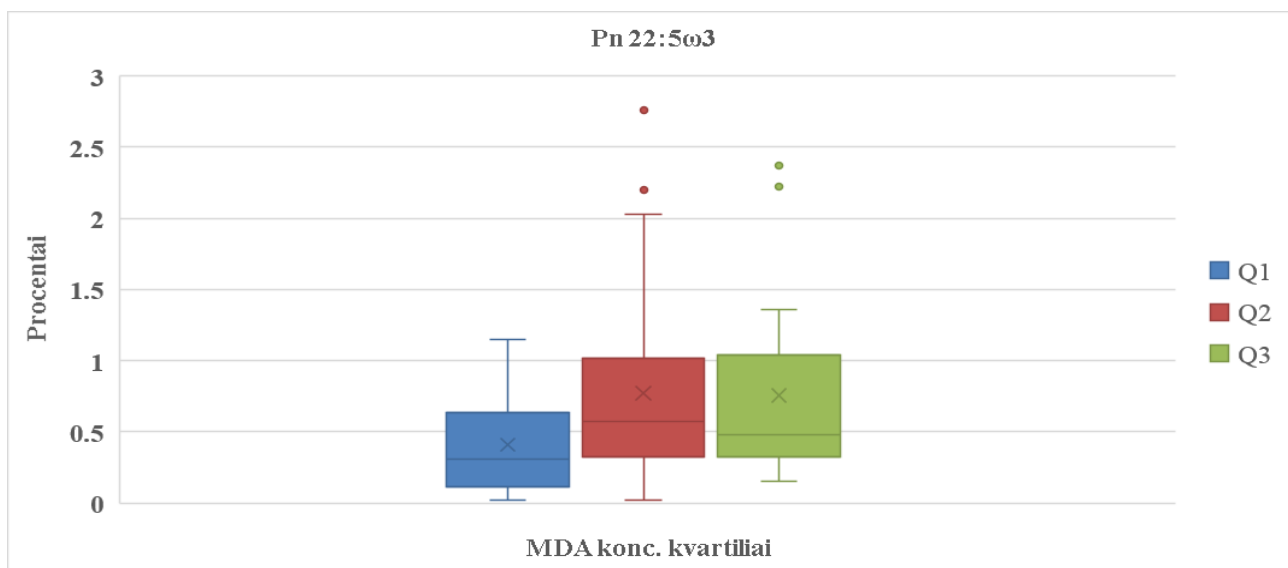
**24 pav.** Eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštis pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Esant didesnei MDA koncentracijai eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštis daugėja, nes daugėja ir  $\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) riebalų rūgštis, kuri yra gaunama tik su maistu. Tai mums parodo, kad vyksta  $\alpha$ -linoleno (18:3 $\omega$ 3) riebalų rūgštis konversija į eikozapentaeno (20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštį.

M. K. Larson ir bendraautorių eksperimentinis tyrimas parodė, kad trombocitų membraną prisotinus eikozapentaeno (EPA; 20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštimi yra sumažinamos trombocitų prokoaguliacinės savybės. EPA riebalų rūgštis kartu su DHA riebalų rūgštimi pasižymi apsauginiu poveikiu nuo širdies ir kraujagyslių ligų, nes iš šių riebalų rūgščių gaminasi antiuždegiminės biologiškai aktyvios medžiagos [75].

Nustatėme, kad polinesočiosios dokozaepentaeno (22:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštis yra mažiau esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), lyginant su antruoju (Q2) ir trečiuoju (Q3) kvartiliais, kai MDA koncentracija yra didesnė (mediana Q1=0,31; Q2=0,58; Q3=0,48) (25 pav.). Buvo nustatyta, kad statistiškai reikšmingai mažiau dokozaepentaeno (22:5 $\omega$ 3) riebalų rūgštis yra, esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), lyginant su antruoju ir trečiuoju kvartiliais: Q1 ir Q2 ( $p=0,020$ ) bei Q1 ir Q3 ( $p=0,038$ ).

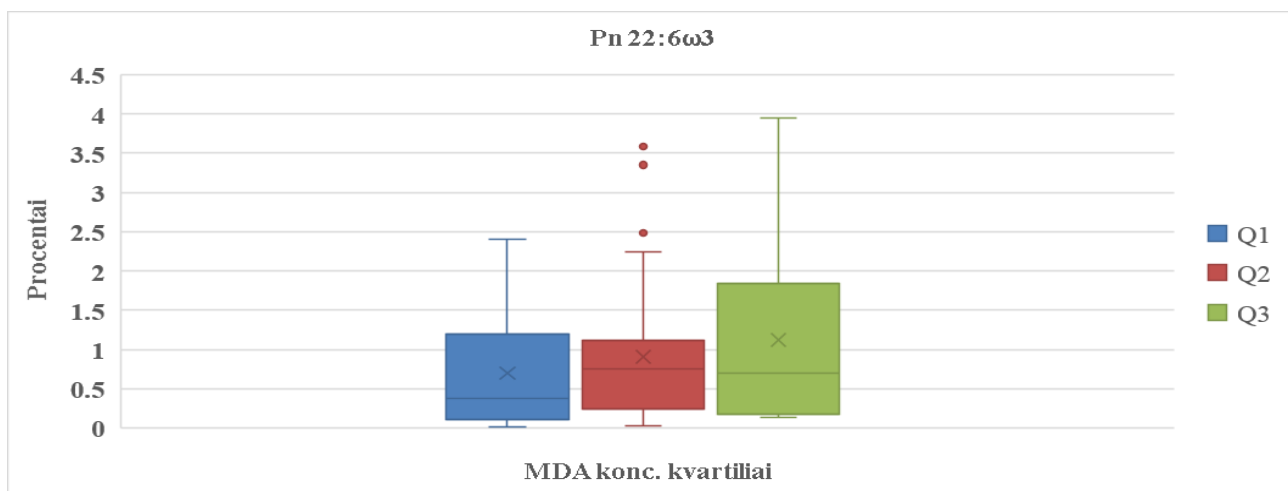




**25 pav.** Dokoza pentaeno (22:5 $\omega$ 3) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Dokoza pentaeno (22:5 $\omega$ 3) riebalų rūgšties galėjo padaugėjo dėl to, kad yra intensyvesnė riebalų rūgščių konversija.

Polinesočiosios dokoza heksaeno (22:6 $\omega$ 3) riebalų rūgšties yra nežymiai daugiau ( $p=0,141$ ), esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), o esant mažesnei MDA koncentracijai (Q1), dokoza heksaeno (22:6 $\omega$ 3) riebalų rūgšties yra mažiau (mediana Q1=0,37; Q2=0,75; Q3=0,70) (26 pav.).



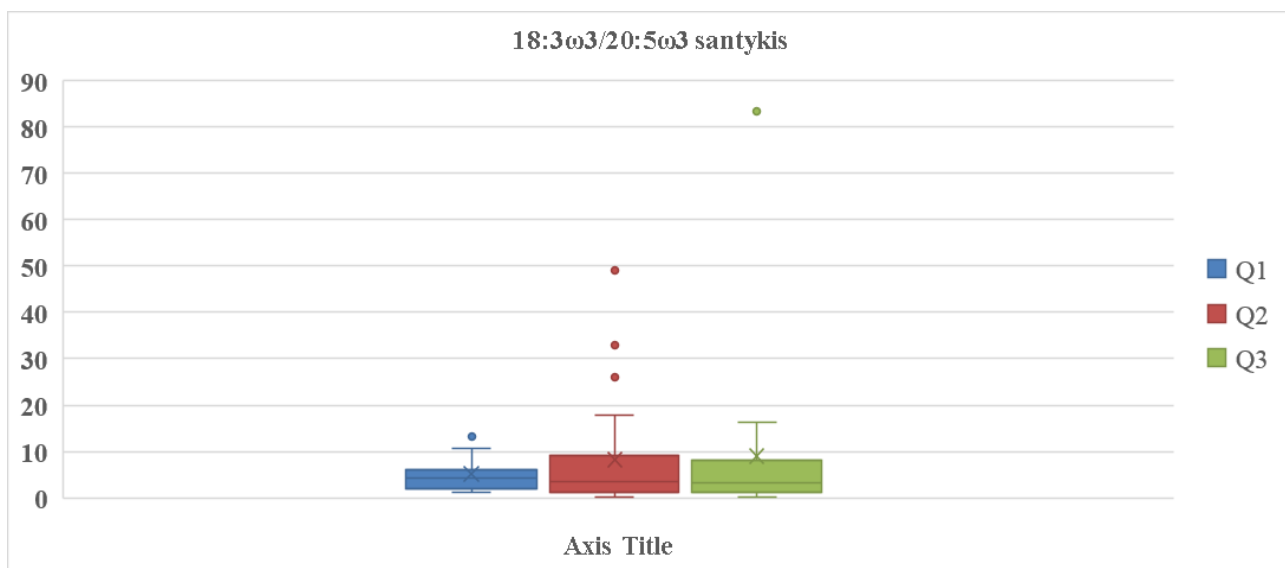
**26 pav.** Dokoza heksaeno (22:6 $\omega$ 3) riebalų rūgšties pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Esant didesnei MDA koncentracijai dokozaheksaeno (22:6 $\omega$ 3) riebalų rūgštis daugėja, nes daugėja ir kitų polinesočiųjų riebalų rūgščių. Tai mums parodo, kad vyksta riebalų rūgščių konversija ir yra pasiruošimas dokozanoidų gamybai bei trombocitų aktyvacijai.

DHA riebalų rūgštis poveikis plačiai nagrinėjamas literatūroje. Véricel ir bendraautorai atliko tyrimą, kur į trombocitų membraną buvo inkorporuojama dokozaheksaeno (DHA; 22:6 $\omega$ 3) riebalų rūgštis ir matuojama susidariusi MDA koncentracija. Buvo nustatyta, kad jei DHA riebalų rūgštis yra daugiau trombocito membranoje, tai susidariusi MDA koncentracija taip pat yra didesnė, nors nedideli kiekiai DHA riebalų rūgštis kaip tik turi antioksidacinį poveikį kartu su vitamino E veikla. Publikacijos autorių nuomone, membranoje esantys dideli kiekiai omega-3 riebalų rūgščių, o ypač DHA rūgštis, galėtų būti susiję su lipidų peroksidacija. Rezultatams taip pat galėtų turėti įtakos, kuriame fosfolipidų poklasyje DHA riebalų rūgštis yra kaupiama [8]. Mūsų tyrimo metu nustatėme, kad trombocitų membranoje esant mažesniai DHA riebalų rūgščių kiekiui, MDA koncentracija yra mažesnė, o esant didesniai DHA riebalų rūgštis kiekiui, atitinkamai MDA koncentracija yra didesnė, nors statistiškai reikšmingų skirtumų nenustatėme. Mūsų tyrime nebuvo didelės oksidacijos, bet tą galima bus patvirtinti atlikus tyrimą su pacientais turinčiais ženkliai padidintą kraujo serumo MDA koncentraciją.

N. Guillot su bendraautorais tyrė DHA riebalų rūgštis poveikį trombocitams. Sveikiems vyrams buvo duodama maisto papildų su DHA riebalų rūgštimi ir stebima šios riebalų rūgštis įjungimas į trombocitų fosfolipidinę membraną bei trombocitų aktyvumas. Mokslininkų rezultatai atskleidė, kad didesnis DHA riebalų rūgštis kiekis trombocitų membranoje statistiškai reikšmingai sumažina trombocitų aktyvumą ir galėtų būti kaip apsauga nuo širdies ir kraujagyslių ligų [98].

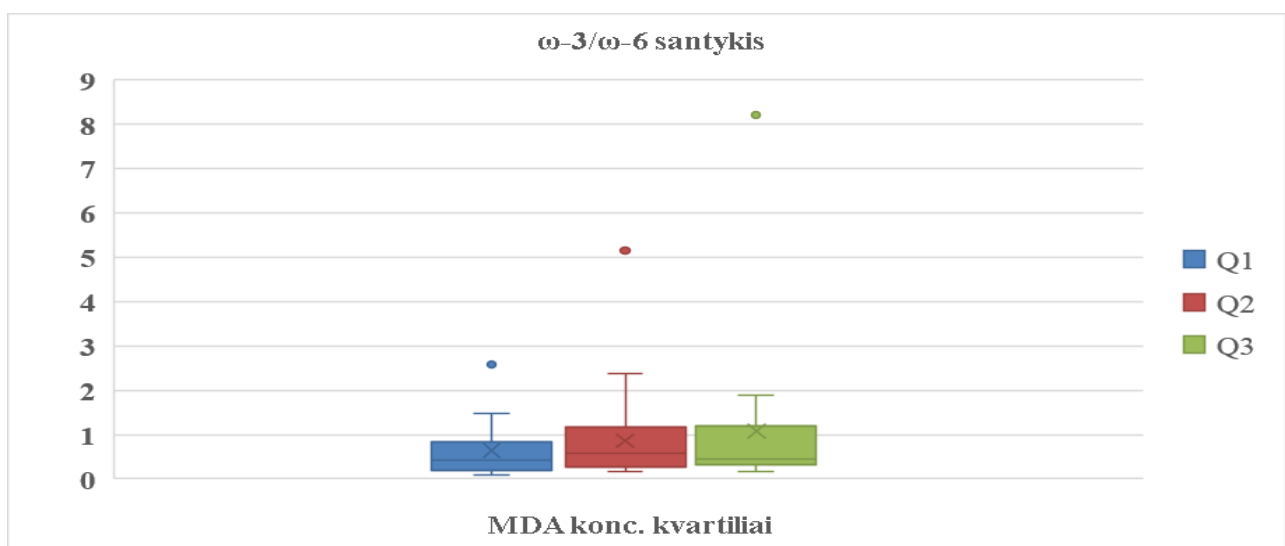
Apskaičiavus  $\alpha$ -linoleno/eikozapentaeno (18:3 $\omega$ 3/20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgščių santykį, galima pastebėti, kad esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), 18:3 $\omega$ 3/20:5 $\omega$ 3 riebalų rūgščių santykis yra nežymiai mažesnis ( $p=0,531$ ), lyginant su pirmuoju kvartiliu (Q1), kai MDA koncentracija yra mažesnė (Mediana Q1=4,20; Q2=3,51; Q3=3,15) (27 pav.).



**27 pav.**  $\alpha$ -linoleno/eikozapentaeno ( $18:3\omega_3/20:5\omega_3$ ) riebalų rūgščių santykio pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Esant mažesniai  $18:3\omega_3/20:5\omega_3$  riebalų rūgščių santykiui, galima spręsti, kad vyksta intensyvesnė  $\alpha$ -linoleno ( $18:3\omega_3$ ) riebalų rūgšties konversija į eikozapentaeno ( $20:5\omega_3$ ) riebalų rūgštį.

Apskaičiavus  $\omega_3/\omega_6$  riebalų rūgščių santykį, galima pastebėti, kad nėra šio santykio pasiskirstymo tendencijos tarp MDA koncentracijos kvartilių (mediana  $Q_1=0,43$ ;  $Q_2=0,57$ ;  $Q_3=0,45$ ) (28 pav.).

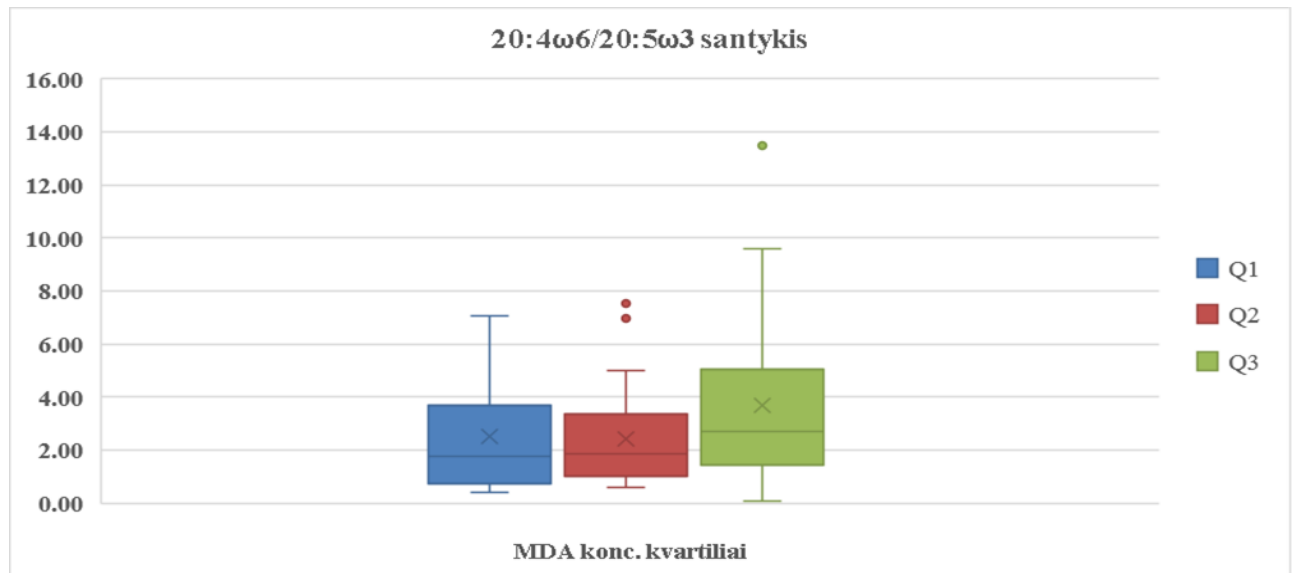


**28 pav.**  $\omega_3/\omega_6$  riebalų rūgščių santykio pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Kuo mažesnis  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 riebalų rūgščių santykis, tuo  $\omega$ -6 grupės riebalų rūgščių yra daugiau, o  $\omega$ -3 grupės riebalų rūgščių yra mažiau. Todėl iš  $\omega$ -6 riebalų rūgščių grupės turėtų gamintis daugiau prouždegiminių eikozanoidų. Gaminant daugiau prouždegiminių eikozanoidų nei antiuždegiminių - sutrinka pusiausvyra tarp šių biologiškai aktyvių medžiagų, todėl per ilgesnį laiką, mažo  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 santykio palaikymas prisideda prie lėtinių ligų patogenezės.

Esant didesniai  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 riebalų rūgščių santykiui,  $\omega$ -3 riebalų rūgštys turėtų atsverti  $\omega$ -6 riebalų rūgščių prouždegiminį aktyvumą, bet  $\omega$ -3 grupės riebalų rūgštys yra labiau jautrios oksidacijai ir sutrikus apsauginiams mechanizms, gali lengviau susidaryti lipidų peroksidai.

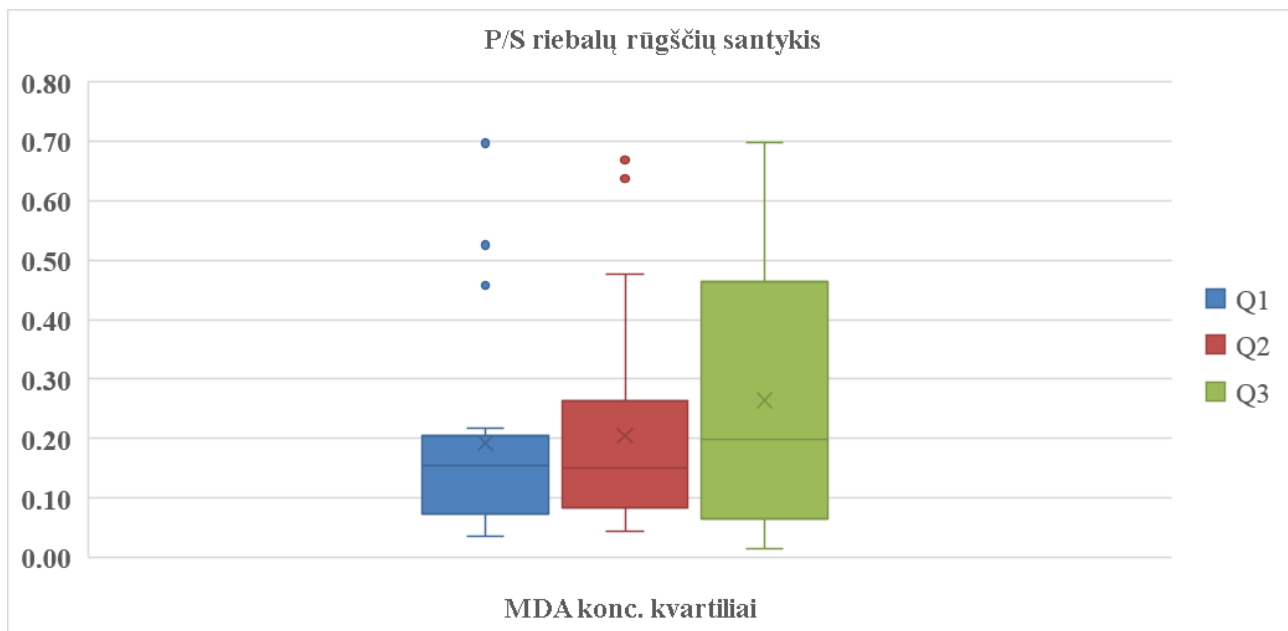
Apskaičiavus arachidono/eikozapentaeno (20:4 $\omega$ 6/20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgščių santykį, galima pastebėti, kad esant didesnei MDA koncentracijai (Q3), 20:4 $\omega$ 6/20:5 $\omega$ 3 riebalų rūgščių santykis yra didesnis ( $p=0,443$ ), lyginant su pirmuoju kvartiliu (Q1), kai MDA koncentracija yra mažesnė (Mediana Q1=1,77; Q2=1,75; Q3=2,71) (29 pav.).



**29 pav.** Arachidono/eikozapentaeno (20:4 $\omega$ 6/20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgščių santykio pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Šis arachidono/eikozapentaeno (20:4 $\omega$ 6/20:5 $\omega$ 3) riebalų rūgščių santykis parodo, kuri riebalų rūgštis lengviau dalyvauja MDA gamyboje. Jei šis santykis didėja, didėjant MDA koncentracijai, tai daugiau MDA gaminasi iš arachidono riebalų rūgšties. Esant mažesnei MDA koncentracijai, mažiau MDA pasigamina iš arachidono riebalų rūgšties.

Buvo apskaičiuotas polinesočiųjų/sočiųjų (P/S) riebalų rūgščių santykis. Kuo P/S santykis yra didesnis, tuo polinesočiųjų riebalų rūgščių yra daugiau, o sočiųjų riebalų rūgščių mažiau. Esant didesnėms MDA koncentracijos vertėms (Q3), pastebimas didesnis ( $p=0,396$ ) P/S riebalų rūgščių santykis, o esant mažesnėms MDA koncentracijos vertėms (Q1, Q2), pastebimas mažesnis P/S riebalų rūgščių santykis (mediana Q1=0,15; Q2=0,15; Q3=0,20) (30 pav.). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp MDA kvartilių nebuvo nustatyta.



**30 pav.** Polinesočiųjų/sočiųjų (P/S) riebalų rūgščių santykio pasiskirstymas tarp MDA koncentracijos kvartilių.

Dalis polinesočiųjų riebalų rūgščių konvertuojama į kitas riebalų rūgštis, o kita dalis riebalų rūgščių (arachidono, eikozapentaeno) dalyvauja MDA gamyboje, bet šių riebalų rūgščių lieka pakankamas kiekis, kad galėtume nustatyti kurios riebalų rūgštis yra daugiau/mažiau esant tam tikrai koncentracijai. Jei yra mažas P/S santykis, tai ir MDA koncentracija yra mažesnė, nes yra mažiau polinesočiųjų riebalų rūgščių iš kurių susidaro MDA.

Tiriamųjų trombocitų membranos riebalų rūgščių pasiskirstymas buvo palygintas pagal MDA koncentracijos kvartilius. Taip pat pateiktas bendras procentinis riebalų rūgščių spektras. Duomenys pateikti mediana, minimumu ir maksimumu bei p reikšmėmis, bendras procentinis riebalų rūgščių kiekis papildomai pateikiamas vidurkiu ir standartiniu nuokrypiu (SN) (6 lent.)

**6 lent.** Riebalų rūgščių spektro palyginimas tarp tiriamųjų su skirtinga MDA koncentracija.

Riebalų rūgštys	Mediana, minimumas, maksimumas	MDA koncentracijos kvartilai			Bendras riebalų rūgščių kiekis (vidurkis $\pm$ SN) (n=79)	Testas ir p reikšmė Mann - Whitney
		Q1* (n=20)	Q2* (n=40)	Q3* (n=19)		
S 14:0	Mediana	3,93	2,93	2,81	3,08 (3,47 $\pm$ 1,64)	1*2*, p=0,050 1*3*, p=0,089 2*3*, p=0,858
	Min.	1,88	0,81	1,34	0,81	
	Max.	7,28	8,75	7,79	8,75	
S 16:0	Mediana	48,99	47,17	43,81	46,59 (47,00 $\pm$ 9,32)	1*2*, p=0,962 1*3*, p=0,728 2*3*, p=0,427
	Min.	20,53	32,72	29,32	20,53	
	Max.	65,11	63,15	63,39	65,11	
S 18:0	Mediana	20,73	21,41	18,45	20,47 (20,04 $\pm$ 5,08)	1*2*, p=0,520 1*3*, p=0,792 2*3*, p=0,117
	Min.	8,76	11,52	11,89	8,76	
	Max.	26,65	43,87	28,60	43,87	
Mn 16:1 $\omega$ 7	Mediana	1,63	1,15	1,59	1,46 (2,42 $\pm$ 3,12)	1*2*, p=0,056 1*3*, p=0,444 2*3*, p=0,334
	Min.	0,39	0,19	0,18	0,18	
	Max.	12,44	15,70	13,29	15,70	
Mn 18:1 $\omega$ 7	Mediana	1,06	1,19	1,38	1,24 (1,36 $\pm$ 1,13)	1*2*, p=0,845 1*3*, p=0,070 2*3*, p=0,133
	Min.	0,15	0,13	0,19	0,13	
	Max.	4,09	2,64	6,90	6,90	
Mn 18:1 $\omega$ 9	Mediana	7,31	6,34	9,79	7,11 (7,53 $\pm$ 4,35)	1*2*, p=0,925 1*3*, p=0,283 2*3*, p=0,098
	Min.	0,46	1,61	0,69	0,46	
	Max.	15,43	14,52	22,05	22,05	
Mn 20:1 $\omega$ 9	Mediana	2,65	3,07	1,98	3,09 (4,87 $\pm$ 7,37)	1*2*, p=0,820 1*3*, p=0,204 <b>2*3*, p=0,049</b>
	Min.	0,58	0,56	0,36	0,36	
	Max.	56,77	33,26	11,72	56,77	
Pn 18:2 $\omega$ 6	Mediana	5,08	5,29	6,75	6,25 (7,10 $\pm$ 5,20)	1*2*, p=0,754 1*3*, p=0,901 2*3*, p=0,974
	Min.	2,01	0,54	0,40	0,40	
	Max.	20,12	19,82	21,46	21,46	
Pn 18:3 $\omega$ 3	Mediana	1,10	1,61	1,82	1,55 (2,24 $\pm$ 2,69)	1*2*, p=0,249 1*3*, p=0,569 2*3*, p=0,638
	Min.	0,35	0,28	0,03	0,03	
	Max.	5,43	6,08	21,66	21,66	
Pn 20:4 $\omega$ 6	Mediana	0,63	0,92	1,08	0,9 (1,71 $\pm$ 2,25)	1*2*, p=0,243 1*3*, p=0,235 2*3*, p=0,691
	Min.	0,09	0,02	0,07	0,02	
	Max.	7,84	8,31	9,01	9,01	
Pn 20:5 $\omega$ 3	Mediana	0,30	0,40	0,46	0,38 (0,66 $\pm$ 0,70)	1*2*, p=0,134

	Min.	0,06	0,05	0,06	0,05	1*3*, p=0,141 2*3*, p=0,942
	Max.	1,21	3,75	3,10	3,75	
Pn 22:5ω3	Mediana	0,31	0,58	0,48	0,51 (0,68±0,60)	<b>1*2*, p=0,020</b> <b>1*3*, p=0,038</b> 2*3*, p=0,903
	Min.	0,02	0,02	0,15	0,02	
	Max.	1,15	2,76	2,37	2,76	
Pn 22:6ω3	Mediana	0,37	0,75	0,70	0,62 (0,91±0,92)	1*2*, p=0,335 1*3*, p=0,141 2*3*, p=0,650
	Min.	0,02	0,03	0,13	0,02	
	Max.	2,40	3,58	3,95	3,95	
Suma SRR %	Mediana	73,42	72,19	65,95	70,86 (70.52±13.61)	1*2*, p=0,820 1*3*, p=0,607 2*3*, p=0,270
	Min.	31,17	49,6	45,78	31,17	
	Max.	93,00	90,51	92,59	93,00	
Suma MNRR %	Mediana	14,54	15,00	16,99	15,18 (16,18±9,11)	1*2*, p=0,672 1*3*, p=0,771 2*3*, p=0,284
	Min.	3,69	5,04	5,05	3,69	
	Max.	62,80	36,57	32,99	62,80	
Suma PNRR %	Mediana	9,80	11,38	13,09	10,99 (13,30±8,56)	1*2*, p=0,233 1*3*, p=0,336 2*3*, p=0,697
	Min.	3,31	3,83	1,33	1,33	
	Max.	34,22	33,89	34,97	34,97	
Suma ω-3	Mediana	2,81	4,12	4,20	3,85 (4,49±3,53)	<b>1*2*, p=0,041</b> 1*3*, p=0,184 2*3*, p=0,968
	Min.	0,59	0,79	0,84	0,59	
	Max.	9,37	13,00	25,46	25,46	
Suma ω-6	Mediana	5,72	7,41	7,53	7,44 (8,81±7,01)	1*2*, p=0,605 1*3*, p=0,813 2*3*, p=0,987
	Min.	2,25	1,14	0,49	0,49	
	Max.	27,96	28,13	28,28	28,28	
ω-3 / ω-6	Mediana	0,43	0,57	0,45	0,47 (0,86±1,13)	1*2*, p=0,149 1*3*, p=0,296 2*3*, p=0,858
	Min.	0,08	0,17	0,18	0,08	
	Max.	2,57	5,15	8,21	8,21	
P/S	Mediana	0,15	0,15	0,20	0,15 (0,22±0,18)	1*2*, p=0,490 1*3*, p=0,396 2*3*, p=0,661
	Min.	0,04	0,04	0,01	0,01	
	Max.	0,70	0,67	0,70	0,70	
18:2ω6/20:4ω6	Mediana	7,49	6,33	5,08	6,12(9,87±14,49)	1*2*, p=0,210 <b>1*3*, p=0,038</b> 2*3*, p=0,347
	Min.	2,57	0,54	0,99	0,54	
	Max.	26,78	118	43,57	118	
18:3ω3/20:5ω3	Mediana	4,20	3,51	3,15	3,65 (7.64±12.77)	1*2*, p=0,438 1*3*, p=0,531 2*3*, p=0,808
	Min.	1,20	0,26	0,04	0,04	
	Max.	14,68	50,44	83,31	83,31	

20:4 $\omega$ 6/20:5 $\omega$ 3	Mediana	1,77	1,75	2,71	1,85 (3,05 $\pm$ 3,05)	1*2*, p=0,792
	Min.	0,39	0,05	0,09	0,09	1*3*, p=0,443
	Max.	7,06	7,06	13,50	13,50	2*3*, p=0,320

Nustačius trombocitų membranos riebalų rūgščių spektrą pastebėjome, kad pagrindinės riebalų rūgštys yra palmitino (16:0), stearino (18:0), oleino (18:1 $\omega$ 9) ir linolo (18:2 $\omega$ 6) riebalų rūgštys. Tokias pat pagrindines riebalų rūgštis gavo ir C. G. Walker su bendraautoriais, tik jie dar įtraukė ir arachidono (20:4 $\omega$ 6) riebalų rūgštį [99].

Buvo atliktas Spirmano koreliacijos testas, siekiant išsiaiškinti ar yra koreliacija tarp MDA koncentracijos ir trombocitų membranos riebalų rūgščių sudėties. Spirmano testas parodė, kad yra silpna, bet statistiškai reikšminga atvirkštinė koreliacija tarp miristino (14:0) riebalų rūgšties ir MDA koncentracijos ( $r=-0,255$ ;  $p=0,023$ ). Nustatėme silpną, bet statistiškai reikšmingą atvirkštinę koreliaciją tarp MDA ir 18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6 santykio ( $r=-0,244$ ;  $p=0,034$ ). MDA koncentracija didėja, mažėjant 18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6 santykiui. 18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6 mažėja, didėjant MDA koncentracijai. Tarp kitų nustatytų riebalų rūgščių bei jų santykių ir MDA koncentracijos, statistiškai reikšmingos koreliacijos nebuvo nustatyta (7 lent.)

**7 Lent.** Trombocitų membranos riebalų rūgščių koreliacija su malondialdehido koncentracija.

Riebalų rūgštis	Koreliacijos koeficientas r	P reikšmė
14:0 (miristino)	<b>-0,255</b>	<b>0,023</b>
16:0 (palmitino)	-0,013	0,912
18:0 (stearino)	0,013	0,913
16:1 $\omega$ 7 (palmitoleino)	-0,189	0,095
18:1 $\omega$ 7 (11 – oktadekano)	0,170	0,134
18:1 $\omega$ 9 (oleino)	0,118	0,300
20:1 $\omega$ 9 (eikozano)	-0,123	0,281
18:2 $\omega$ 6 (linolo)	0,012	0,920
18:3 $\omega$ 3 ( $\alpha$ -linoleno)	0,023	0,841
20:4 $\omega$ 6 (arachidono)	0,201	0,081
20:5 $\omega$ 3 (eikozapentaeno)	0,088	0,439
22:5 $\omega$ 3 (dokozaepentaeno)	0,194	0,087



22:6 $\omega$ 3 (dokozaheksaeno)	0,119	0,298
Suma SRR %	-0,029	0,800
Suma MNRR %	0,002	0,985
Suma PNRR %	0,084	0,463
$\omega$ -3	0,097	0,395
$\omega$ -6	0,017	0,883
$\omega$ -3/ $\omega$ -6	0,100	0,382
P/S	0,050	0,665
18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6	<b>-0,244</b>	<b>0,034</b>
18:3 $\omega$ 3/20:5 $\omega$ 3	-0,040	0,729
20:4 $\omega$ 6/20:5 $\omega$ 3	0,130	0,264

J. Klvanová su bendraautoriais ištyrė fosfolipidinės membranos riebalų rūgščių sudėtį ir nustatė, kad yra tiesioginė koreliacija tarp mononesočiųjų bei polinesočiųjų riebalų rūgščių ir MDA koncentracijos, o atvirkštinė koreliacija – tarp sočiųjų riebalų rūgščių ir MDA koncentracijos. Mokslininkai pastebėjo, kad sveikiems asmenims lipidų peroksidacija yra intensyvesnė, dėl fosfolipidinėje membranoje esančio didesnio polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekio [100]. Mūsų atliktame tyrime nors ir nenustatėme statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp MDA koncentracijos ir membranos fosfolipidų mononesočiųjų, polinesočiųjų ir sočiųjų riebalų rūgščių, tačiau pastebėjome, kad didėjant MDA koncentracijai, nežymiai didėja polinesočiųjų ir mononesočiųjų riebalų rūgščių kiekis, o mažėja sočiųjų riebalų rūgščių kiekis.

## IŠVADOS

1. Trombocitų membranoje nustatėme 13 riebalų rūgščių, iš kurių sočiosios riebalų rūgštys sudaro vidutiniškai 70,52 proc., mononesočiosios - 16,18 proc., polinesočiosios - 13,30 proc. Gauti duomenys buvo labai panašūs į kitų autorių pateiktus rezultatus apie trombocitų membraną.
2. Esant didesnei malondialdehido koncentracijai, nustatėme didesnę polinesočiųjų ir mononesočiųjų riebalų rūgščių kiekį bei mažesnę sočiųjų riebalų rūgščių kiekį. Mononesočiųjų riebalų rūgščių didesnis procentinis kiekis buvo nulemtas statistiškai reikšmingu ( $p=0,049$ ) oleino (18:1 $\omega$ 9) riebalų rūgšties padidėjimu.
3. Nustatėme silpną atvirkštinę koreliaciją tarp miristino (14:0) riebalų rūgšties ir malondialdehido koncentracijos ( $r=-0,255$ ;  $p=0,023$ ). Nustatėme silpną atvirkštinę koreliaciją tarp MDA ir 18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6 santykio ( $r=-0,244$ ;  $p=0,034$ ). Tarp kitų nustatytų riebalų rūgščių bei jų santykių ir MDA koncentracijos, statistiškai reikšmingos koreliacijos nebuvo nustatyta.
4. Nustatėme, kad didesnė malondialdehido koncentracija yra veiksnys, skatinantis trombocitus įjungti daugiau polinesočiųjų riebalų rūgščių į fosfolipidinį membranos sluoksnį, iš kurių vėliau bus gaminami eikozanoidai/dokozanoidai reikalingi trombocitų aktyvacijos etapui. Didesnė malondialdehido koncentracija skatina konversiją iš linolo į arachidono riebalų rūgštį (parodo 18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6 santykis,  $p=0,038$ ).

## SUMMARY

### **The effect of oxidative stress on platelet membrane fatty acids composition**

**The aim of the study** was to evaluate the effect of oxidative stress on platelet membrane fatty acid composition.

**Introduction.** Oxidative stress causes lipid peroxidation and the peroxidation process in the platelet membrane provides a variety of lipid peroxides including malondialdehyde, which has been implicated in the etiology of cardiovascular diseases. Some polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of platelet membrane are the major substrate for the biosynthesis of eicosanoids, which have well-established roles in regulation of inflammation, immunity and platelet aggregation.

**Materials and methods.** Platelets membrane fatty acids methyl esters of 79 healthy men (aged  $36,5 \pm 10,8$  and without any acute clinical condition at the time) were identified by gas chromatography – mass spectrometry, while malondialdehyde was measured by high performance liquid chromatography in blood serum. Individuals were divided into quartiles according to the blood serum malondialdehyde concentration. The concentration of blood serum malondialdehyde was compared to the composition of platelets membrane fatty acids of apparently healthy individuals.

**Results.** The total sum in percentage of saturated fatty acids compared to the lowest and the highest blood serum malondialdehyde concentration was decreased, while the level of polyunsaturated and monounsaturated fatty acids increased.

No statistically significant differences in platelets membrane fatty acids composition between the highest and the lowest concentration of blood serum malondialdehyde, except 22:5 $\omega$ 3, which was significantly higher in the highest blood serum malondialdehyde concentration ( $p=0,038$ ) and 18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6 ratio, which was significantly higher in the lowest blood serum malondialdehyde concentration ( $p=0,038$ ).

Blood serum malondialdehyde concentration of healthy individuals has statistically significant correlation of 14:0 fatty acid ( $r=-0,255$ ;  $p=0,023$ ) and 18:2 $\omega$ 6/20:4 $\omega$ 6 ratio ( $r=-0,244$ ;  $p=0,034$ ).

**Conclusion.** Malondialdehyde concentration is a factor which stimulates platelets to synthesize PUFAs and eicosanoids/docosanoids which are required for platelet activation.

**Keywords.** Oxidative stress, peroxidation, malondialdehyde, platelets membrane, fatty acids.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui prof. dr. (HP) A. Kaminskui už vertingus patarimus ir pastabas interpretuojant rezultatus bei rašant šį darbą. Dėkoju laboratorinės medicinos gydytojai I. Bikulčienei už metodinę pagalbą.

Dėkoju prof. dr. (HP) Z. A. Kučinskienei ir katedros vedėjai doc. dr. D. Karčiauskaitei už suteiktą galimybę pasinaudoti duomenimis atliekant tolimesnius paskaičiavimus baigiamojo darbo tema.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Görlach A, Dimova EY, Petry A, Martínez-Ruiz A, Hernansanz-Agustín P, Rolo AP. et al., Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biol.* 2015 Dec;6:372-85.
2. Vichova T, Motovska Z. Oxidative stress: Predictive marker for coronary artery disease. *Exp Clin Cardiol.* 2013 Spring;18(2):e88-91.
3. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep.* 2016 May;4(5):519-522. DOI:10.3892/br.2016.630.
4. Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res.* 2012 Mar;129(3):378-81.
5. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 15;482(3):419-425.
6. Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova.* 2009;32:169–174.
7. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008 Mar;47(2):147-55.
8. Véricel E, Polette A, Bacot S, Calzada C, Lagarde M. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J Thromb Haemost.* 2003 Mar;1(3):566-72.
9. Skeaff CM, Hodson L, McKenzie JE. Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *J Nutr.* 2006 Mar;136(3):565-9.
10. Adili R, Voigt EM, Bormann JL, Foss KN, Hurley LJ, Meyer ES, et al. In vivo modeling of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid-mediated inhibition of both platelet function and accumulation in arterial thrombi. *Platelets.* 2017 Dec 29:1-9.
11. De Castro J, Hernández-Hernández A, Rodríguez MC, Sardina JL, Llanillo M, Sánchez-Yagüe J. Comparison of changes in erythrocyte and platelet phospholipid and fatty acid composition and protein oxidation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Platelets.* 2007 Feb;18(1):43-51.

12. Lin S, Li T, Liu X, Wei S, Liu Z, Hu S, et al. Abnormal octadeca-carbon fatty acids distribution in erythrocyte membrane phospholipids of patients with gastrointestinal tumor. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jun; 96(24): e7189.
13. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul;11(3):298-300.
14. Kazakevičius R. V. Hipoksija. Oksidacinis stresas. Apoptozė. Vilnius: Vilniaus Universiteto leidykla; 2007.
15. Mildažienė V. Oksidacinis stresas ir senėjimas. Projektas BPD2004-ESF-2.4.0-01-04/0157, „Naujausių gamtos mokslo žinių sklaidos mokytojams tinklas“. Interneto prieiga: [http://gamta.vdu.lt/mokytojai/kursai/Oksidacinis\\_stresas\\_ir\\_senejimas.pdf](http://gamta.vdu.lt/mokytojai/kursai/Oksidacinis_stresas_ir_senejimas.pdf).
16. Yoshikawa T, Naito Y. What Is Oxidative Stress? *JMAJ* 2002 45(7): 271–276.
17. Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Apr;15(4):243-56. doi: 10.1038/nrm3772.
18. Paulsen CE, Carroll KS. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev*. 2013 Jul 10;113(7):4633-79.
19. Kadziauskas J. Biochemijos pagrindai. Vilnius: „Standartų spaustuvė“; 2012
20. Schieber M., Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current biology : CB*. 2014;24(10):R453-R462.
21. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol*. 2013 Feb 8;1:244-57.
22. Miller MR, Shaw CA, Langrish JP. From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Future Cardiol*. 2012 Jul;8(4):577-602.
23. Zhang X, Staimer N, Gillen DL, Tjoa T, Schauer JJ, Shafer MM, et al. Associations of oxidative stress and inflammatory biomarkers with chemically-characterized air pollutant exposures in an elderly cohort. *Environ Res*. 2016 Oct;150:306-19.
24. Matović V, Buha A, Đukić-Čosić D, Bulat Z. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol*. 2015 Apr;78:130-40.
25. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*. 2012 Jan; 5(1): 9–19.
26. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol*. 2014 Aug 12;5:285.

27. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Apr;33:8-13.
28. Diebold L, Chandel NS. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic Biol Med.* 2016 Nov;100:86-93.
29. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003 Oct 15; 552(Pt 2): 335–344.
30. Glasauer A, Navdeep SC. ROS. In *Current Biology*, Volume 23, Issue 3, 2013, Pages R100-R102.
31. Xinyuan Li, Pu Fang, Jietang Mai, Eric T Choi, Hong Wang, Xiao-feng Yang. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol.* 2013; 6: 19.
32. Kučinskienė Z. A. Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai. Vilnius: Vilniaus universiteto leidykla; 2008.
33. Liang SS, Shiue YL, Kuo CJ, Guo SE, Liao WT, Tsai EM. Online monitoring oxidative products and metabolites of nicotine by free radicals generation with Fenton reaction in tandem mass spectrometry. *ScientificWorldJournal.* 2013 Jul 25;2013:189162.
34. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
35. Higdon A, Diers A. R, Oh JY, Landar A, Victor M. Darley-Usmar. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J.* 2012 Mar 15;
36. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 2011, 111 (10) pp. 5944-5972.
37. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012 May;24(5):981-90.
38. Sameer D. Oxidants and Antioxidants in Complementary and Alternative Medicine: A Review. 2014 *Spatula.* 4. 1-16.
39. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017 May 1;524:13-30.
40. Tsikas D, Rothmann S, Schneider JY, Suchy MT, Trettin A, Modun D, et al. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS

- and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> and nitric oxide (NO). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Apr 15;1019:95-111.
41. Cai F, Dupertuis YM, Pichard C. Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation on colorectal cancer risk and treatments. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012 Mar;15(2):99-106.
  42. Garcia SC, Grotto D, Bulcão RP, Moro AM, Roehrs M, Valentini J. et al. Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug Chem Toxicol.* 2013 Jul;36(3):306-12.
  43. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R. et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010 Oct;44(10):1125-71.
  44. Massey KA, Nicolaou A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jun; 59(100): 45–55.
  45. Malondialdehido struktūrinē formulē. Interneto prieda: [https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Eastern Mennonite University/EMU%3A Chemistry for the Life Sciences \(Cessna\)/17%3A Lipids/17.2%3A Fats and Oils](https://chem.libretexts.org/LibreTexts/Eastern_Mennonite_University/EMU%3A_Chemistry_for_the_Life_Sciences_(Cessna)/17%3A_Lipids/17.2%3A_Fats_and_Oils).
  46. Wang TY, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest.* 2013 Nov;43(11):1203-23.
  47. Hussein JS. Cell membrane fatty acids and health. *Int J PharmPharm Sci.* 2013 5(3):38–46.
  48. Salter AM. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Animal.* 2013 Mar;7 Suppl 1:163-71.
  49. Ortega A, Varela LM, Bermudez B, Lopez S, Abia R, Muriana FJ. Dietary fatty acids linking postprandial metabolic response and chronic diseases. *Food Funct.* 2012 Jan;3(1):22-7.
  50. Spittler G, Afzal M. The action of peroxy radicals, powerful deleterious reagents, explains why neither cholesterol nor saturated fatty acids cause atherogenesis and age-related diseases. *Chemistry.* 2014 Nov 10;20(46):14928-45.
  51. Melo RB, Guimarães SB, Silva PG, Oriá RB, Melo JU, Vasconcelos PR. Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 after molar extraction in rats. *Acta Cir Bras.* 2014 Jun;29(6):371-5.



52. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med*. 2015 Nov-Dec;24(6):931-41.
53. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2015 Sep;39(1 Suppl):18S-32S.
54. Molfino A, Gioia G, Rossi Fanelli F, Muscaritoli M. The role for dietary omega-3 fatty acids supplementation in older adults. *Nutrients*. 2014 Oct 3;6(10):4058-73.
55. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006 Jun;83(6 Suppl):1505S-1519S.
56. Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother*. 2006 Nov;60(9):502-7.
57. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab*. 2012:539426.
58. Johnson M, Bradford C. Omega-3, Omega-6 and Omega-9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases. *J Glycomics Lipidomics*. 2014. 4:123.
59. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr;1851(4):469-84.
60. Nayeri H, Naderi GA, Asgari S, Sadeghi M, Boshtam M, Mohamadzadeh S. et al. LDL fatty acids composition as a risk biomarker of cardiovascular disease. *Artery Res*. 2017. Dec (20):1-7.
61. Colkesen Y, Muderrisoglu H. The role of mean platelet volume in predicting thrombotic events. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(4):631–634.
62. Vardon Bounes F, Mujalli A, Cenac C, Severin S, Le Faouder P, Chicanne G, Gaits-Iacovoni F, Minville V, Gratacap MP, Payrastre B. The importance of blood platelet lipid signaling in thrombosis and in sepsis. *Adv Biol Regul*. 2018 Jan;67:66-73.
63. Picker SM. In-vitro assessment of platelet function. *Transfus Apher Sci*. 2011 Jun;44(3):305-19.
64. Austin SK. Haemostasis. *Medicine*. Volume 41, Issue 4, April 2013, Pages 208-211.
65. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 (1972), pp. 720–731. DOI: 10.1126/science.175.4023.720

66. Nicolson LG. The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1451-66.
67. Escribá PV. Membrane-lipid therapy: A historical perspective of membrane-targeted therapies - From lipid bilayer structure to the pathophysiological regulation of cells. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Sep;1859(9 Pt B):1493-1506.
68. Dolegowska B, Lubkowska A, De Girolamo L. Platelet lipidomic. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Apr-Jun;26(2 Suppl 1):23S-33S.
69. Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost*. 2011 Oct;9(10):1883-91.
70. Ibarguren M, López DJ, Escribá PV. The effect of natural and synthetic fatty acids on membrane structure, microdomain organization, cellular functions and human health. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1518-28.
71. Escribá PV, Nicolson GL. Membrane structure and function: relevance of lipid and protein structures in cellular physiology, pathology and therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jun;1838(6):1449-50.
72. Kee MF, Myers DR, Sakurai Y, Lam WA, Qiu Y. Platelet mechanosensing of collagen matrices. *PLoS One*. 2015 Apr 27;10(4):e0126624.
73. Larson MK, Shearer GC, Ashmore JH, Anderson-Daniels JM, Graslie EL, Tholen JT. et al. Omega-3 fatty acids modulate collagen signaling in human platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011 Mar-Apr;84(3-4):93-8.
74. Geppert J, Min Y, Neville M, Lowy C, Ghebremeskel K. Gender-specific fatty acid profiles in platelet phosphatidyl-choline and -ethanolamine. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010 Jan;82(1):51-6.
75. Larson MK, Tormoen GW, Weaver LJ, Luepke KJ, Ishan A. Patel, Hjelmén CE. et al. Exogenous modification of platelet membranes with the omega-3 fatty acids EPA and DHA reduces platelet procoagulant activity and thrombus formation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Feb 1; 304(3): C273–C279.
76. Véricel E, Colas R, Calzada C, Lê QH, Feugier N, Cugnet C, et al. Moderate oral supplementation with docosahexaenoic acid improves platelet function and oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Thromb Haemost*. 2015 Aug;114(2):289-96.

77. Lietuvos sveikatos apsaugos ministerija Higienos instituto Sveikatos informacijos centras. Lietuvos sveikatos statistika 2016. Interneto prieiga: <http://www.hi.lt/uploads/pdf/leidiniai/Statistikos/la2016.pdf>
78. Statistika dėl mirštamumo Europoje. Interneto prieiga: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Causes\\_of\\_death\\_-\\_standardised\\_death\\_rate,\\_2014\\_\(per\\_100\\_000\\_inhabitants\)\\_YB17.png#filelinks](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Causes_of_death_-_standardised_death_rate,_2014_(per_100_000_inhabitants)_YB17.png#filelinks)
79. El Assar M, Angulo J, Rodríguez-Mañas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med.* 2013 Dec;65:380-401.
80. Zhang PY, Xu X, Li XC. Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014 Oct;18(20):3091-6.
81. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012:646354.
82. Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, León R. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther.* 2016 Jan;157:84-104.
83. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2017 Feb 28;387:95-105.
84. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011 Sep 1;51(5):993-9.
85. Hurrle S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomedical Journal.* 2017 Nov. Volume 40, Issue 5, Pages 257-262.
86. Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind MJ. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol.* 2014; 5: 84.
87. Wakamatsu TH, Dogru M, Matsumoto Y, Kojima T, Kaido M, Ibrahim OMA, et al. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjogren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Jan 7;54(1):201-10.
88. Thiagarajan R, Manikandan R, Antioxidants and cataract. *Free radical research.* 2013 May;47(5):337-45.
89. Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res.* 2013 Nov;47(11):869-80.
90. Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, et al. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of

- aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod.* 2015 Jun;21(6):502-15.
91. Fuentes E, Palomo I. Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging. *Life Sci.* 2016 Mar 1;148:17-23.
  92. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Cháfer-Pericás C, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.* 2017 Aug;12:674-681.
  93. 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.
  94. Stoffel W, Chu F, Ahrens E. Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Anal Chem* 1959; 31(2): 307-8.
  95. Vognild E, Elvevoll EO, Brox J, Olsen RL, Barstad H, Aursand M, Osterud B. Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. *Lipids.* 1998 Apr;33(4):427-36.
  96. Chen H. Role of thromboxane A2 signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018 Jan;134:32-37.
  97. Li D, Turner A, Sinclair AJ. Relationship between platelet phospholipid FA and mean platelet volume in healthy men. *Lipids.* 2002 Sep;37(9):901-6.
  98. Guillot N, Caillet E, Laville M, Calzada C, Lagarde M, Véricel E. Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J.* 2009 Sep;23(9):2909-16.
  99. Walker CG, West AL, Browning LM, Madden J, Gambell JM, Jebb SA et al. The Pattern of Fatty Acids Displaced by EPA and DHA Following 12 Months Supplementation Varies between Blood Cell and Plasma Fractions. *Nutrients.* 2015 Aug 3;7(8):6281-93.
  100. Klvanová J, Beno I, Ondreicka R, Volkovová K, Staruchová M, Grancicová E. et al. Relation between fatty acid composition, vitamin E and malondialdehyde levels, and activity of antioxidant enzymes in the blood. 1998. *Bratisl. Lek. Listy* 99:245–249.

## **DARBO APROBACIJA**

Darbo rezultatai yra pristatyti tarptautinėje mokslinėje konferencijoje. Pateiktos tezės ir standinis pranešimas.

Bikulčienė I, Golubevaitė O, Karčiauskaitė D, Hendrixson V, Kaminskas A, Kučinskienė ZA. The relationship between fatty acid composition of platelet membrane, blood serum malondialdehyde and body mass index in healthy men. 14th Baltic Congress of Laboratory Medicine, May 10 – 12, 2018, Vilnius, Lithuania. *Laboratorinė medicina*. 2018, Vol. 20 Special Supplement, S19.