

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Inga
BIKULČIENĖ

Riebalų rūgščių vertinimas
atsižvelgiant į malono dialdehido,
kaip oksidacijos rodiklio, koncentraciją
sveikų ir inkstų akmenlige sergančių
asmenų organizme

DAKTARO DISERTACIJA

Medicinos ir sveikatos mokslai,
Medicina (M 001)

VILNIUS 2020

Disertacija rengta Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba ir Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondas.

Disertacija ginama eksternu

Mokslinis konsultantas:

prof. dr. Arvydas Kaminskas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – **prof. dr. Janina Tutkuvienė** (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Nariai:

prof. dr. Vytautas Kasiulevičius (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

doc. dr. Sandra Meidutė-Abaravičienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Rimantas Stukas (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, visuomenės sveikata – M 004),

doc. dr. Daiva Urbonienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. birželio mėn. 26 d., 14 val., Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Didžiojoje auditorijoje (203 aud.).

Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21/27, Vilnius, Lietuva, tel. +37061351641; el. paštas: inga.bikulciene@mf.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>.

VILNIUS UNIVERSITY

Inga
BIKULČIENĖ

Evaluation of fatty acids' composition
based on the concentration of
malondialdehyde as an oxidation
indicator in healthy volunteers and
uronephrolithiasis-diagnosed patients

DOCTORAL DISSERTATION

Medicine and Health Sciences,
Medicine (M 001)

VILNIUS 2020

This dissertation was written at the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine of the Institute of Biomedical Sciences at the Faculty of Medicine of Vilnius University. The research was supported by Research Council of Lithuania and Lithuanian State Science and Studies Foundation.

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant:

Prof. Dr. Arvydas Kaminskas (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Janina Tutkuvienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

Members:

Prof. Dr. Vytautas Kasiulevičius (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Assoc. Prof. Dr. Sandra Meidutė-Abaravičienė (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Rimantas Stukas (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Public Health – M 004),

Assoc. Prof. Dr. Daiva Urbonienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 2 p.m. on June 26, 2020 in the Great Hall (Room 203) of the Faculty of Medicine of Vilnius University.

Address: M. K. Čiurlionio str. 21/27, Vilnius, Lithuania.

Tel. +37061351641; e-mail: inga.bikulciene@mf.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the Libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

TURINYS

SANTRUMPOS	9
ĮVADAS	12
1. DARBO AKTUALUMAS	12
2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI	13
2.1 Darbo tikslas.....	13
2.2 Uždaviniai	13
3. DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS.....	13
4. PRAKTINĖ REIKŠMĖ.....	13
5. GINAMIEJI DISERTACIJOS TEIGINIAI	14
LITERATŪROS APŽVALGA	15
1. RIEBALŲ RŪGŠTYS	15
2. RIEBALŲ RŪGŠČIŲ METABOLIZMAS	19
3. TROMBOCITAI IR JŲ SAVYBĖS.....	23
3.1 Trombocitų fosfolipidinė membrana ir jos ypatumai.....	24
3.2 Trombocitų ir leukocitų agregatų formavimosi sąsaja su aterotromboze ir uždegimu	27
4. LAISVIEJI DEGUONIES RADIKALAI.....	29
4.1 Laisvųjų deguonies radikalų susidarymas.....	29
4.2 Laisvųjų deguonies radikalų kenksmingumo šalinimas	31
4.3 Lipidų peroksidacija	34
4.4 Lipidų peroksidacijos produktas – malono dialdehididas.....	36
4.5 Oksidacinis stresas.....	38
5. RIEBALŲ RŪGŠČIŲ SĄSAJA SU OKSIDACINIŲ STRESU IR INKSTŲ KANALĖLIŲ PAŽEIDIMU.....	40
6. INKSTŲ AKMENLIGĖS PAPLITIMAS IR SĄSAJA SU KITAIS ORGANIZMO SUTRIKIMAIS.....	42
7. AMONIO JONŲ APYKAITOS POKYČIAI SERGANT INKSTŲ AKMENLIGE	43
8. METABOLINIO SINDROMO ĮTAKA AKMENŲ FORMAVIMUISI INKSTUOSE	44
9. POLINESOČIŲJŲ RIEBALŲ RŪGŠČIŲ SĄSAJA SU INKSTŲ AKMENLIGE	45

DARBO METODOLOGIJA	47
1. TIRIAMIEJI IR BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ TIPAS.	47
2. TIRIAMŲJŲ SUSKIRSTYMAS	47
3. TYRIMŲ METODIKA	49
3.1 Trombocitų išskyrimas	49
3.2 Trombocitų aktyvacijos žymenų tyrimas	49
3.3 Riebalų rūgščių išskyrimas ir nustatymas	49
3.3.1 Riebalų rūgščių išskyrimas	49
3.3.1.1 Lipidų ekstrakcija	49
3.3.1.2 Plonasluoksnė chromatografija	50
3.3.1.3 Riebalų rūgščių transesterifikacija	50
3.3.2 Riebalų rūgščių nustatymas	50
3.3.2.1 Dujinės chromatografijos ir masių spektrometrijos sąlygos	51
3.4 Malono dialdehido koncentracijos kraujo serume nustatymas	53
3.5 Cheminės inkstų akmenų sudėties analizė	53
4. STATISTINĖ ANALIZĖ	53
TYRIMŲ REZULTATAI	54
1. SVEIKŲ VYRŲ TROMBOCITŲ MEMBRANOS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ SUDĖTIES SAŠAJOS SU OKSIDACINIO STRESO ŽYMENIMIS TYRIMO REZULTATAI	54
1.1 Trombocitų membranos sočiųjų riebalų rūgščių sudėties palyginimas skirtinguose malono dialdehido koncentracijos kraujo serume kvartiliuose	54
1.2 Trombocitų membranos mononesočiųjų riebalų rūgščių sudėties palyginimas skirtinguose malono dialdehido koncentracijos kraujo serume kvartiliuose	55
1.3 Trombocitų membranos polinesočiųjų riebalų rūgščių sudėties palyginimas skirtinguose malono dialdehido koncentracijos kraujo serume kvartiliuose	56
1.4 Trombocitų membranos sočiųjų, mononesočiųjų ir polinesočiųjų riebalų rūgščių sudėties sąsajų su trombocitų ir leukocitų agregatų formavimusi nustatymas	61
2. VYRŲ, SERGANČIŲ INKSTŲ AKMENLIGE IR METABOLINIŲ SINDROMU, PILVO RIEBALINIO AUDINIO RIEBALŲ RŪGŠČIŲ SUDĖTIES TYRIMO REZULTATAI	64

2.1 Pacientų, sergančių inkstų akmenlige, pasiskirstymas pagal inkstų akmenų tipą ir metabolinio sindromo diagnozę	64
2.2 Inkstų akmenlige sergančių tiriamųjų grupių riebalų rūgščių sudėties palyginimas pagal inkstų akmenų tipą ir metabolinio sindromo diagnozę	65
2.3 Pacientų, sergančių inkstų akmenlige, ir kontrolinės sveikų asmenų grupės riebalų rūgščių sudėties palyginimas	67
2.4 Pacientų, kuriems diagnozuota inkstų akmenligė su metaboliniu sindromu ir be metabolinio sindromo, bei kontrolinės sveikų asmenų grupės riebalų rūgščių sudėties palyginimas	70
REZULTATŲ APTARIMAS.	73
IŠVADOS	79
DARBO TAŠOS KRYPTYS	80
LITERATŪROS SĄRAŠAS.	81
SANTRAUKA (SUMMARY)	97
1. INTRODUCTION	97
1.1 Aim of the Study	97
1.2 Tasks of the Study	98
1.3 Scientific Novelty of the Study	98
1.4 Practical Significance of the Study	98
2. MATERIALS AND METHODS	99
2.1 Study design	99
2.2 Distribution of individuals.	100
2.3 Research methodology	101
2.3.1 Platelet extraction	101
2.3.2 Determination of platelet activation markers	101
2.3.3 Extraction and determination of platelet membrane fatty acids	101
2.3.4 Determination of malondialdehyde concentration in blood serum.	103
2.3.5 Chemical analysis of the composition of kidney stones.	103
3. RESULTS	104
3.1 Results of research on the association of platelet membrane fatty acid composition with markers of oxidative stress in healthy men	104

3.2 Results of research of abdominal adipose tissue fatty acid composition in men with uronephrolithiasis and metabolic syndrome	114
4. DISCUSSION.....	121
5. CONCLUSIONS	127
6. REFERENCES.....	128
7. LIST OF PUBLICATIONS	133
8. ABOUT THE AUTHOR	135
 PADĒKA.....	 136
 PUBLIKACIJŪ SARAŠAS IR JŪ KOPIJOS	 137
1. STRAIPSNIAI	137
2. MOKSLINIAI PRANEŠIMAI.....	137

SANTRUMPOS

- ADP – adenzino difosfatas
AHA/NHLBI (angl. *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute*) – Amerikos širdies asociacija / Nacionalinis širdies, plaučių ir kraujo institutas
ATP – adenzino trifosfatas
BHT – dibutilhidroksitoluenas
BRR – būtinosios riebalų rūgštys
C – anglis
Ca²⁺ – kalcio jonai
CAT – katalazė
CD – cukrinis diabetas
COX – ciklooksigenazė
DAG – diacilglicerolis
DTL-Ch – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis
ETS – endoplazminio tinklo stresas
GP – glikoproteinų receptorius
GPIa–IIIa – glikoproteinų receptoriai nuo Ia iki IIIa
GPIb ir IIb – glikoproteinų receptoriai Ib ir IIb
GPVI – glikoproteinų receptorius VI
GSH – redukuotas glutationas
GSSG – oksiduotas glutationas
GST – glutationo transferazė
GTPx – glutationo peroksidazė
H – vandenilio atomas
H⁺ – vandenilio jonas
5-HEPE – 5-hidroksieikozapentaeno rūgštis
4-HNE – 4-hidroksi-2-nonenalas
IL-6 – interleukinas 6
IP₃ – inozitolio 1,4,5-trisfosfatas
LOX – lipoksigenazė
LNL – lėtinės neinfekcinės ligos
LT – leukotrienas
LTA₅ – leukotrienas A₅
LTB₄ – leukotrienas B₄
LTB₅ – leukotrienas B₅

LTC₅ – leukotrienas C₅
LTD₅ – leukotrienas D₅
LX – lipoksinas
LXA₄ – lipoksinas A₄
LXB₄ – lipoksinas X₄
MDA – malono dialdehidas
MNRR – mononesočiosios riebalų rūgštys
MTL – mažo tankio lipoproteinai
MTL-Ch – mažo tankio lipoproteinų cholesterolis
MS – metabolinis sindromas
NADPH – nikotinamido adenino dinukleotido fosfatas, redukuota forma
NADPH-oksidadzė – nikotinamido adenino dinukleotido fosfato redukuotos formos oksidadzė
NF-κB – aktyvių B ląstelių branduolio faktoriaus kapa lengvosios grandinės stipriklis
NH₃ – amoniakas
NH₄⁺ – amonio jonas
NHANES (angl. *National Health and Nutrition Examination Survey*) – Nacionalinė sveikatos ir mitybos tyrimo apžvalga
NRR – nesočiosios riebalų rūgštys
OS – oksidacinis stresas
PC – fosfatidilcholinai
PE – fosfatidiletanolaminai
PG – prostaglandinas
PGD – prostaglandinas D
PGE – prostaglandinas E
PGE₂ – prostaglandinas E₂
PGF – prostaglandinas F
PGG₃ – prostaglandinas G₃
PGH₂ – prostaglandinas H₂
PGI – prostaglandinas I
PGI₂ – prostaglandinas I₂
PGI₃ – prostaglandinas I₃ (prostaciklinas I₃)
PIP₂ – fosfatidilinozitolio 4,5-bisfosfatas
PIP₃ – fosfatidilinozitolio 3,4,5-trisfosfatas
PKC – baltymų kinazė C
PLA₂ – fosfolipazė A₂
PLC – fosfolipazė C

PNRR – polinesočiosios riebalų rūgštys
PRX – peroksiredoksinas
PS – fosfatidilserinas
PSGL-1 – P-selektino glikoproteino ligandas-1
ROS – aktyviosios deguonies formos
RR – riebalų rūgštys
Rv – rezolvinas
RvD₁ – rezolvinas D₁
RvD₂ – rezolvinas D₂
RvD₃ – rezolvinas D₃
RvD₄ – rezolvinas D₄
RvE₁ – rezolvinas E₁
RvE₂ – rezolvinas E₂
SOD – superoksido dismutazė
SPH – sfingomielinas
SRR – sočiosios riebalų rūgštys
TAG – triacilglicerolis
TBR – tiobarbitūro rūgštis
TLA – trombocitų ir leukocitų agregatai
TLR – tiesioginis antigenų atpažinimo receptorius
TMA – trombocitų ir monocitų agregatai
TNA – trombocitų ir neutrofilų agregatai
TNF- α – navikų nekrozės faktorius α
TP – tarpkvartilinis plotis
TRX – tioredoksinas
TXA₂ – tromboksanas A₂
TXA₃ – tromboksanas A₃
Q – kvartilis

ĮVADAS

1. DARBO AKTUALUMAS

Lėtinės neinfekcinės ligos (LNL) yra genetinių, fiziologinių, aplinkos ir elgsenos veiksnių rezultatas. Pagrindinės LNL grupės yra širdies ir kraujagyslių ligos, vėžys, lėtinės kvėpavimo takų ligos ir cukrinis diabetas. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, šios keturios grupės ligų sukelia daugiau nei 80 proc. visų ankstyvų mirčių nuo LNL pasaulio mastu. Širdies ir kraujagyslių ligos sudaro didžiausią dalį mirčių nuo LNL – nuo šių ligų miršta 17,9 mln. žmonių per metus, o nuo vėžio, kvėpavimo takų ligų ir cukrinio diabeto – atitinkamai 9,0 mln., 3,9 mln. ir 1,6 mln. [1, 2].

Tabako vartojimas, fizinio aktyvumo stoka, žalingas alkoholio vartojimas ir nesveika mityba didina ne tik mirštamumo nuo LNL riziką, bet ir riziką susirgti dar viena, vadinamąja civilizacijos liga – inkstų akmenlige [3]. Inkstų akmenligės paplitimas, Nacionalinės sveikatos ir mitybos tyrimo apžvalgos (NHANES) 2013–2014 metų duomenimis, siekia net 10,1 proc. ir šis paplitimas vis dar nemažėja [4]. Taigi, minėti rizikos veiksniai bei per pastaruosius 60–100 metų padidėjęs su maistu gaunamų kalorijų kiekis prisideda prie suintensyvėjusios aktyviųjų deguonies formų gamybos ir jų kaupimosi, dėl to ląstelėje vystosi oksidacinis stresas. Oksidacinis stresas sietinas su nutukimu, II tipo cukriniu diabetu [5], širdies ir kraujagyslių [6] bei neurodegeneracinėmis ligomis [7], tromboze ir padidėjusiu trombocitų aktyvumu [8] bei inkstų proksimalinių kanalėlių pažeidimu [9].

Oksidaciniam stresui ir lipidų peroksidacijai yra jautrūs ląstelių membranų fosfolipidai, ypač juose esančios polinesočiosios riebalų rūgštys. Aktyviosios deguonies formos, vykstant lipidų peroksidacijai, keičia ląstelės membranos lipidų sudėtį, struktūrą ir dinamiką. Dėl to keičiasi ir pačios ląstelės struktūra, veikla bei fizinės savybės, o tai gali sukelti biologiškai aktyvių medžiagų gamybos pokyčius. Šie pokyčiai žmogaus organizme skatina uždegimą, aterogenezę ir trombozę. Taigi, dėl oksidacinio streso ir lipidų peroksidacijos vykstantys ląstelės membranos lipidų struktūros ir dinamikos pokyčiai skatina širdies ir kraujagyslių [6] bei neurodegeneracinius pažeidimus, vėžį, taip pat akių ir inkstų degeneraciją [10, 11].

2. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

1.1 Darbo tikslas

Įvertinti nuo oksidacijos priklausomos riebalų rūgščių sudėties svarbą sveikiems ir inkstų akmenlige sergantiems asmenims.

1.2 Uždaviniai

1. Įvertinti trombocitų membranos riebalų rūgščių sudėtį priklausomai nuo malono dialdehido koncentracijos kraujo serume.
2. Įvertinti trombocitų membranos riebalų rūgščių sudėties sąsają su trombocitų agregacija.
3. Nustatyti ir įvertinti inkstų akmenlige sergančių ir kontrolinės sveikų asmenų grupės pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių sudėtį.
4. Palyginti sveikų ir inkstų akmenlige sergančių asmenų pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių sudėtį vertinant pacientus, turinčius ir neturinčius metabolinio sindromo.

3. DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS

Nors mokslinės publikacijos rodo, kad tyrėjų domėjimasis, kaip keičiantis ląstelių membranos fosfolipidų ar paties riebalinio audinio riebalų rūgščių sudėčiai gali pasikeisti ląstelių, pavyzdžiui, trombocitų, aktyvumas ar inkstų kanalėlių funkcija, išlieka, tačiau stinga detalių mokslinių tyrimų, kuriuose būtų vertinama trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgščių sudėtis pagal oksidacinio streso žymenį malono dialdehidą bei trombocitų ir leukocitų agregatų formavimąsi ir pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių sudėties bei metabolinio sindromo įtaka skirtingos kilmės inkstų akmenų susidarymui. Todėl šie tyrimai ir jų rezultatai šiandien yra aktualūs ir skatina ieškoti naujų lėtinių neinfekcinių ligų tarpusavio patogenezės ryšių.

4. PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Nustatyti trombocitų membranos fosfolipidų bei pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių sudėtį būtų naudinga siekiant įvertinti trombocitų pasirusimą būsimam aktyvacijos etapui ir biologiškai aktyvių medžiagų (pvz., eikozanoidų ir dokozanoidų), kurios tiesiogiai ar netiesiogiai dalyvaudamos uždegimo procese gali paveikti inkstų akmenligės patogenezę, sintezės intensyvumui.

5. GINAMIEJI DISERTACIJOS TEIGINIAI

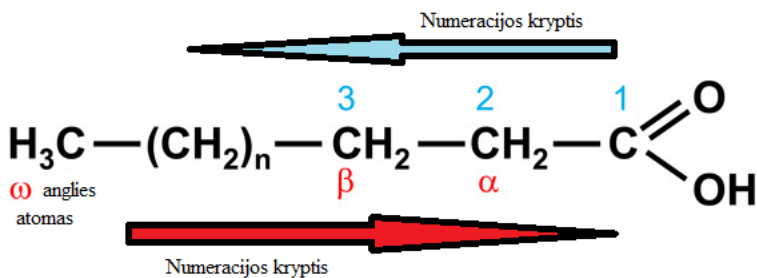
- Oksidacinis stresas daro įtaką sveikų vyrų trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgščių sudėčiai.
- Pacientų, sergančių inkstų akmenlige, pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių sudėtis skiriasi nuo sveikų asmenų.
- Oksidacinio streso nulemta riebalų rūgščių sudėtis veikia biologiškai aktyvių medžiagų sintezę, kuri neatsiejama nuo aterotrombozės ir uždegimo, atliekančių svarbų vaidmenį lėtinių neinfekcinių ligų patogenezėje.

LITERATŪROS APŽVALGA

1. RIEBALŲ RŪGŠTYS

Riebalų rūgštys (RR) yra ilgosios anglies atomų grandinės mono-karboksirūgštys. Šios rūgštys gali būti laisvos (susijungusios su albuminu kraujyje), bet dažniausiai esterintos. RR yra silpnos rūgštys, karboksigrupės pK – apie 4,75 (anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius RR grandinėje daro įtaką pK reikšmės pokyčiams). Esant fiziologiniam pH jos yra anijonai (RCOO⁻). Neigiamas karboksigrupės krūvis daro molekulę hidrofilinę, o ilga uodega – labai hidrofobinę. Taigi, RR yra amfifilinės molekulės. Tokios molekulės vandens ir oro paviršiuje sudaro vieną sluoksnį, kur hidrofilinės karboksigrupės nukreiptos į vandenį, o hidrofobinės anglies (C) atomų grandinės išsidėsto ore [12].

Sisteminiuose RR pavadinimuose C atomai pradedami numeruoti nuo karboksigrupės C atomo galo, kuris žymimas 1. Nesisteminiuose pavadinimuose C atomai žymimi graikų abėcėlės raidėmis α, β, γ. Raide α pažymimas C atomas, susijungęs su karboksigrupės C (C-2) atomu. Vartojama ir alternatyvi RR nomenklatūra – omega (ω) sistema. Remiantis šia sistema, C atomai pradedami numeruoti nuo metilo grupės C atomo galo, kuris vadinamas ω anglies atomu (1 pav.) [13, 14].

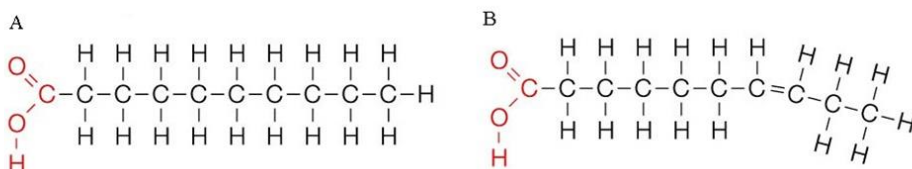


1 pav. Bendra RR formulė [15]

Remiantis angliavandenilinės grandinės ilgiu, RR gali būti klasifikuojamos į: trumpagrandes RR, turinčias iki 8 C atomų, vidutinio ilgio grandinės RR, turinčias nuo 8 iki 12 C atomų, ir ilgagrandes RR, turinčias daugiau nei 12 C atomų grandinėje. Tačiau literatūroje pasitaiko ir labai ilgos grandinės RR terminas, kuris apibūdina RR grandinę, turinčią daugiau nei 22 C atomus. Dažniausiai biologinėse sistemose aptinkamos tarp C14 ir C24 anglies

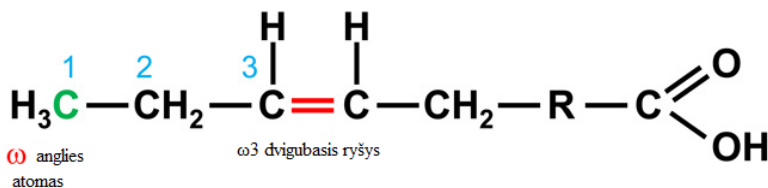
atomų turinčios RR, o žmogaus organizme vyrauja dažniausiai tarp C16 ir C18 anglies atomų turinčios RR (ilgagrandės) bei nešakotos, lyginį C atomų skaičių turinčios RR.

RR gali būti sočiosios RR (SRR) ir nesočiosios (NRR). SRR neturi dvigubųjų ryšių angliavandenilinėje grandinėje, o NRR turi bent vieną dvigubąjį ryšį. NRR dvigubieji ryšiai atskirti metileno grupe (-CH₂-) ir nesudaro konjuguotos sistemos (2 pav.).



2 pav. A – SRR struktūrinė formulė; B – NRR struktūrinė formulė [16]

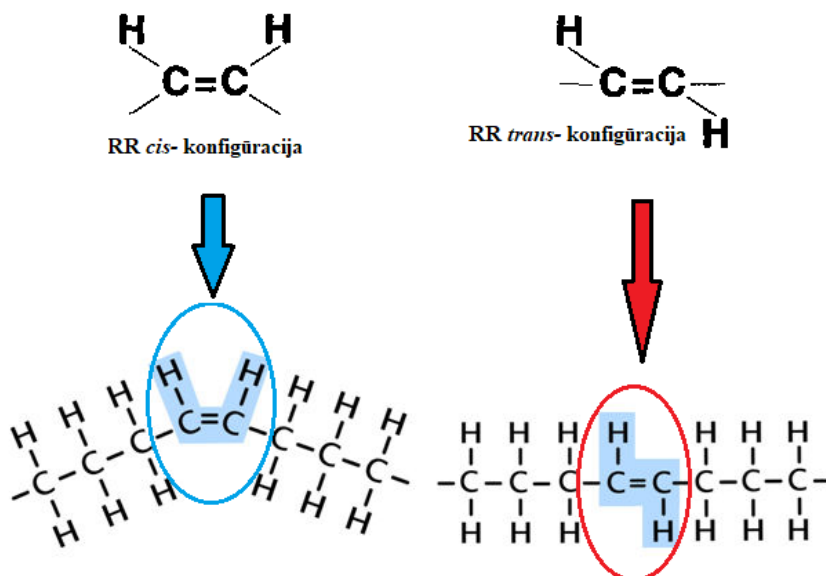
NRR yra skirstomos į du pogrupius: mononesočiosios RR (MNRR), turinčios vieną dvigubąjį ryšį, ir polinesočiosios RR (PNRR), turinčios du ir daugiau dvigubųjų ryšių. Dvigubąjo ryšio padėtis žymima simboliu Δ , skaičiais žymima, tarp kurių C atomų susidaro šis ryšys. Remiantis ω sistema, NRR nurodoma dvigubąjo ryšio buvimo vieta C atomų grandinėje, skaičiuojant nuo ω anglies atomo. Šis dvigubasis ryšys dažniausiai yra nutolęs per 3, 6 arba 9 C atomus nuo angliavandenilinės grandinės galo (3 pav.).



3 pav. Dvigubąjo ryšio numeracija pagal ω sistemą [15]

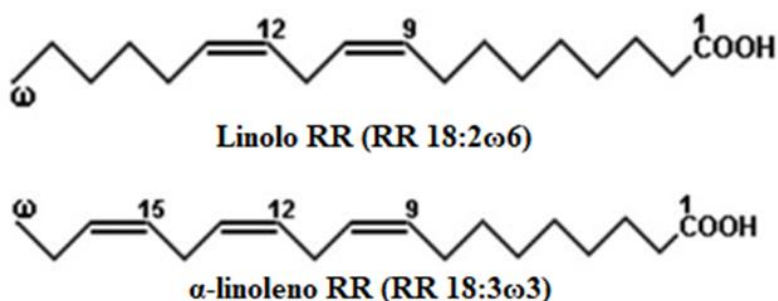
RR dvigubąjo ryšio geometrija yra apibūdinama cis- ir trans- nomenklatūros sistemomis (taip pat žinomos kaip (E/Z) izomerizmas). Šios nomenklatūros sistemos nurodo grandinėje esančių dviejų C atomų arba grupių, sujungtų dvigubuoju ryšiu, išsidėstymą molekulės plokštumoje. Jei C atomai arba grupės yra išsidėstę toje pačioje molekulės plokštumoje, tai RR yra cis- konfigūracijos, jei priešingoje pusėje – trans- konfigūracijos. Trans- konfigūracijos

RR C atomu grandinēs išķidēto kompaktiškai ir sudaro tvarkingas iķtemptas struktūras, o esant cis- konfigurācijos dvigubajam ryšiui molekulēje susidaro lūžis (kinkas) ir grandinēs išķidēto netvarkingai (4 pav.) [16, 17].



4 pav. RR angliavandenilnēs grandinēs dvigubujū ryšijū cis- ir trans- konfigurācijos [18, 19]

Žmogaus organizmē yā tam tikrū PNRR, kurios ne sintetinamos, bet gānamos tik su maistu. Jos vadinamos būtinosiomis RR (BRR). BRR yā skirstomas į dvi klases: omega 3 (ω 3) ir omega 6 (ω 6). Žymėjimas ω 6 ir ω 3 PNRR yā pagrįstas pirmo dvigubojo ryšio vieta, skaičiuojant nuo RR molekulēs metilo grupēs C atomo galo. ω 6 BRR yā linolo RR (RR 18:2 ω 6) ir ω 3 BRR – α -linoleno RR (RR 18:3 ω 3) (5 pav.).



5 pav. Būtiniosios riebalū rūgštys: linolo ω 6 ir α -linoleno ω 3 [20]

RR 18:2 ω 6 yra randama daugelyje augalų sėklų (pvz., saulėgražų, sezamų, kanapių), išskyrus kokosų, kakavmedžių ir palmių. Kita ω 6 RR – arachidono RR (RR 20:4 ω 6), jos yra vištienos, jautienos produktuose bei kietai virtuose kiaušiniuose. ω 3 BRR – RR 18:3 ω 3 – randama žaliųjų lapinių daržovių chloroplastuose bei linų, rapsų, šalavijų, perilių ir graikinių riešutų sėklose. Kitos ω 3 PNRR: eikozapentaeno RR (RR 20:5 ω 3) ir dokozaheksaeno RR (RR 22:6 ω 3), randamos šaltavandenėse žuvyse (pvz., lašišose, upėtakiuose, skumbriose) bei įvairiose jūrų gėrybėse (pvz., austrėse, krevetėse) [21]. Augaliniam aliejui, ypač alyvuogių, gausu ir ω 9 RR, kurios sintetamos ir žmogaus organizme. Viena tokių RR, kurios taip pat randama alyvuogių aliejui, yra oleino RR (RR 18:1 ω 9). RR 18:1 ω 9 turi tik vieną dvigubąjį ryšį angliavandeni- linėje grandinėje, todėl augaliniuose aliejuose esantis α tokoferolis (vitaminas E), būdamas antioksidantas, saugo RR 18:1 ω 9 nuo lipidų peroksidacijos [22]. Suvartojant per mažai ω 3 ar ω 6 RR, organizme gali padaugėti ω 9 RR, nes, kaip buvo minėta, pats organizmas geba sintetinti ω 9 PNRR iš kitų RR [23].

Dabartinių mokslinių publikacijų duomenimis, SRR pakeitus MNRR ir PNRR, sumažinamas sergamumas lėtinėmis uždegiminėmis ligomis, pagerinamas audinių jautrumas insulinui bei sumažinama sergamumo bei mirtingumo nuo širdies ir kraujagyslių ligų rizika (1 lentelė) [24–27].

1 lentelė. ω 3, ω 6, ω 9 PNRR poveikis žmogaus organizmui [27]

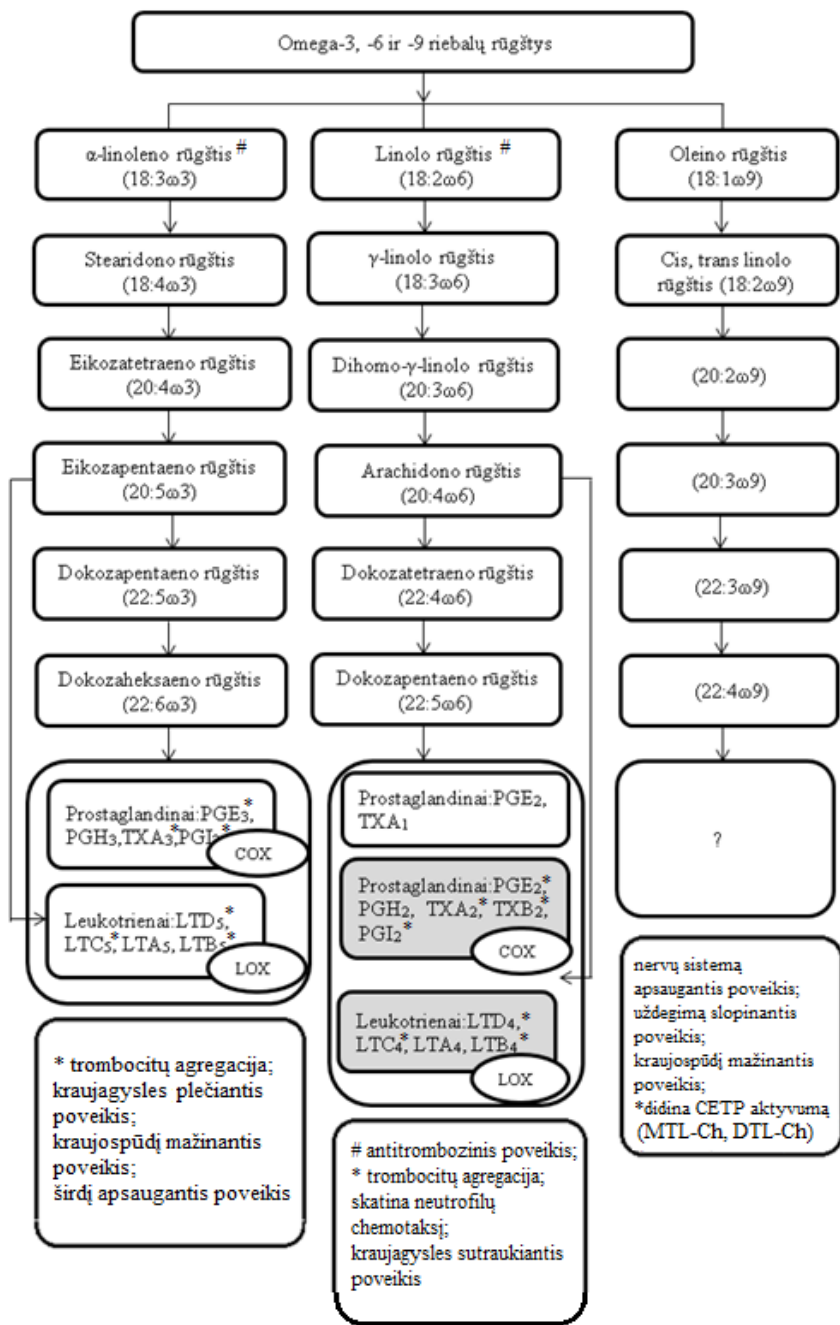
Riebalų rūgštis (RR)	Struktūra	Poveikis organizmui
ω*3 PNRR		
α -linoleno	RR 18:3** ω 3	↓# Oksidacinį stresą ↓ Uždegimą ↓ Trombocitų agregaciją ↓ Cholesterolio kiekį kraujyje ↓ Arterinį kraujo spaudimą
Eikozapentaeno	RR 20:5 ω 3	↓ Oksidacinį stresą ↓ Uždegimą ↓ Arterinį kraujo spaudimą Pagerina audinių jautrumą insulinui
Dokozaheksaeno	RR 22:6 ω 3	↓ Uždegimą ↓ Lipidų kiekį kraujyje Pagerina pacientų, sergančių Alzheimerio liga, psichinę būklę Pagerina kognityvinę funkciją ↑## Regėjimo aštrumą ↓ Gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių augimą

Riebalų rūgštis (RR)	Struktūra	Poveikis organizmui
ω6 PNRR		
Linolo	RR 18:2ω6	↑ Uždegimą ↑ Oksidacinį stresą ↑ Kraujagyslių adhezijos molekulių-1 raišką
Arachidono	RR 20:4ω6	↑ Uždegimą ↑ Oksidacinį stresą ↑ Trombocitų agregaciją ↑ Kraujagyslių pažeidimą ↑ Vazokonstrikciją ↑ Eikozanoidų sintezę
ω9 PNRR		
Oleino	RR 18:1ω9	↓ Aterogeniškumą ↓ Mažo tankio lipoproteinų cholesterolio kiekį ↓ Mažo tankio lipoproteinų cholesterolio oksidaciją Apsaugo kraujagysles Pagerina lipidų sudėtį

PNRR – polinesočiosios riebalų rūgštys; * – dvigubojo ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje; ** – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; ↓[#] – sumažėja, sulėtėja; ↑^{##} – padidėja, suintensyvėja

2. RIEBALŲ RŪGŠČIŲ METABOLIZMAS

PNRR yra daugelio biologiškai aktyvių metabolitų pirmtakai, kurie dalyvauja įvairiuose patofiziologiniuose procesuose bei padeda palaikyti ląstelės homeostazę [28]. Labiausiai mokslinėse publikacijose nagrinėjami biologiškai aktyvūs lipidų mediatoriai yra RR 20:4ω6, RR 22:5ω3 ir RR 20:5ω3, sintetamos iš su maistu gaunamų BRR: RR 18:2ω6 ir RR18:3ω3, dalyvaujant Δ6 ir Δ5 desaturazėms (fermentai, sudarantys dvigubuosius ryšius angliavandenilinėje grandinėje) bei elongazėms (fermentai, ilginantys angliavandenilinę grandinę dviem C atomais). Tačiau ω9 PNRR, kaip manoma, dalyvauja BRR apykaitoje, bet ne biologiškai aktyvių medžiagų sintezėje [21, 27] (6 pav.).

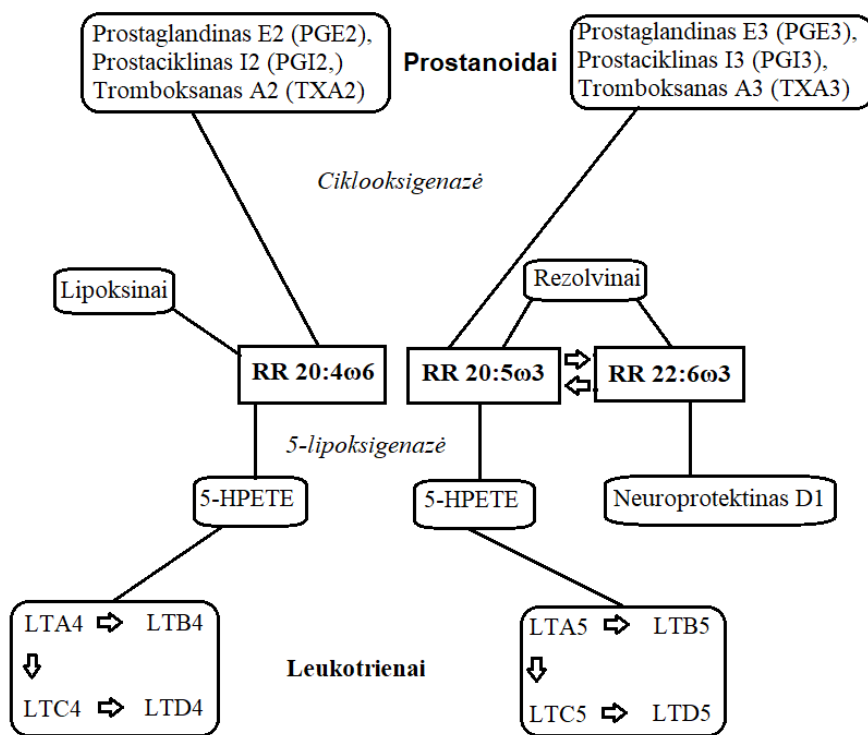


6 pav. ω3, ω6 ir ω9 PNRR apykaita ir poveikis ligų išsivystymui [27]

PGE, PGH, PGI – prostaglandinai E, H ir I; PGE₂ – prostaglandinas E2, PGH₂ – prostaglandinas H2, PGI₂ – prostaglandinas I2, PGE₃ – prostaglandinas E3, PGH₃ – prostaglandinas H3, PGI₃ – prostaglandinas I3; LTA, LTB, LTC, LTD – leukotrienai A, B, C ir

D: LTA4 – leukotrienas A4, LTB4 – leukotrienas B4, LTC4 – leukotrienas C4, LTD4 – leukotrienas D4, LTA5 – leukotrienas A5, LTB5 – leukotrienas B5, LTC5 – leukotrienas C5, LTD5 – leukotrienas D5; tromboksanai: TXA1 – tromboksanas A1, TXA2 – tromboksanas A2, TXA3 – tromboksanas A3; COX – ciklooksigenazės kelias; LOX – lipoksigenazės kelias; Ca²⁺ – kalcio jonas; CETP – cholesterolio esterio pernašos baltymas; MTL-Ch – mažo tankio lipoproteinų cholesterolis; DTL-Ch – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis

Iš RR C20:4 ω 6 ir RR 20:5 ω 3, dalyvaujant fermentams ciklooksigenazėms (COX) ir lipoksigenazėms (LOX), sintetinami 20 C atomų turintys oksiduoti dariniai – eikozanoidai (gr. eikoso – dvidešimt). Eikozanoidai skirstomi į kelias klases: prostaglandinus, prostaciklinus, tromboksanus, leukotrienus ir lipoksinus (7 pav.).



7 pav. ω 6 ir ω 3 PNRR metaboliniai keliai [21]

RR 20:4 ω 6 – arachidono rūgštis; RR 20:5 ω 3 – eikozapentaeno rūgštis; RR 22:6 ω 3 – dokozaheksaeno rūgštis; 5-HPETE – 5-hidroperoksieikozatetraeno rūgštis (tarpinis metabolitas); LTA4 – leukotrienas A4; LTB4 – leukotrienas B4; LTC4 – leukotrienas C4; LTD4 – leukotrienas D4; LTA5 – leukotrienas A5; LTB5 – leukotrienas B5; LTC5 – leukotrienas C5; LTD5 – leukotrienas D5

Fermentas COX turi du izofermentus, vadinamus COX-1 ir COX-2. COX-1 randama visuose audiniuose, o COX-2 – tik audiniuose, kuriuose vyksta aktyvus uždegimas, išskyrus inkstus ir smegenis, kur COX-2 randama natūraliai. Pagrindinis COX-1 ir COX-2 produktas yra prostaglandinas H₂ (PGH₂), kuris gali būti metabolizuojamas į kitus prostaglandinus (PG), veikiant prostaglandino D (PGD), prostaglandino E (PGE), prostaglandino F (PGF) ir prostaglandino (dar vadinamo prostaciklinu) I (PGI) sintazėms ir izomerazėms [29]. Taigi, RR C20:4 ω 6, dalyvaujant COX, verčiama į: prostaglandiną E₂ (PGE₂), kuris aktyvina uždegimo procesą bei pasižymi proaritminiu poveikiu, prostacikliną I₂ (PGI₂), atsakingą už kraujagyslių išsiplėtimą (didina kraujagyslių spindį), ir į tromboksaną A₂ (TXA₂), kuris aktyvina trombocitų agregaciją ir sukelia kraujagyslių spazmus. Tačiau RR 20:5 ω 3, dalyvaujant COX, metabolizuojama į biologiškai aktyvias medžiagas, kurios pasižymi priešingu poveikiu: prostaglandinui E₃ (PGE₃) būdingas uždegimą slopinantis poveikis, prostaciklinas I₃ (PGI₃) plečia kraujagysles, tiek PGE₃, tiek PGI₃ pasižymi antiaritminiu poveikiu, o tromboksanas A₃ (TXA₃) slopina trombocitų agregaciją [11, 21].

Literatūroje minimi trys LOX izofermentai, kurių randama leukocituose, trombocituose ir endotelio ląstelėse: 5-LOX, 12-LOX ir 15-LOX. 5-LOX produktai yra susiję su širdies ir kraujagyslių ligų patogenezė bei uždegimo procesais. Veikiant 5-LOX, RR C20:4 ω 6 verčiama į leukotrienus (LT) – leukotrieną B₄ (LTB₄), kuris yra uždegimą skatinantis lipidų mediatorius, didinantis leukocitų chemotaksį, reaktyvių deguonies radikalų gamybą ir reguliuojantis uždegimą skatinančių citokinų – navikų nekrozės faktoriaus α (TNF- α), interleukino 6 (IL-6), interleukino 1 (IL-1) išsiskyrimą [30], o veikiant 15-LOX susidaro lipoksinai (LX) – lipoksinas A₄ (LXA₄) ir lipoksinas B₄ (LXB₄), kurie mažina pernelyg didelį audinių pažeidimą ir lėtinį uždegimą [31]. RR 20:5 ω 3, veikiant LOX, metabolizuojama į leukotrieną A₅ (LTA₅), leukotrieną B₅ (LTB₅), leukotrieną C₅ (LTC₅) ir leukotrieną D₅ (LTD₅) bei E grupės rezolvinus (Rv) (pvz., rezolvinas E₁ (RvE₁) ir rezolvinas E₂ (RvE₂)), kurie pasižymi uždegimą slopinančiu poveikiu – mažina uždegiminių citokinų ir chemokininų sintezę [32]. D grupės rezolvinų (pvz., rezolvinas D₁ (RvD₁), rezolvinas D₂ (RvD₂), rezolvinas D₃ (RvD₃) ir rezolvinas D₄ (RvD₄)), sintetinamų iš RR 22:6 ω 3, randama centrinėje nervų sistemoje. Jie vadinami neuroprotektiniais, nes pasižymi nervų sistemos apsauginiu poveikiu: slopina uždegimą slopinančių veiksnių išsiskyrimą ir proapoptozinės kaspazės-3 aktyvumą bei antiapoptozinių faktorių (t. y. Bcl-2 šeimos baltymų) stimuliavimą [21, 28, 29, 33].

Taigi, biologiškai aktyvūs lipidų mediatoriai, gaunami iš PNRR, susiję su daugeliu biocheminių ir signalo perdavimo kelių, reguliuoja uždegimą

skatinančius ir slopinančius procesus, aktyvindami fermentus bei gamindami citokinus ar kitas ūminės fazės molekules, taip veikdami įvairias fiziologines organizmo sistemas bei patologinius procesus.

3. TROMBOCITAI IR JŲ SAVYBĖS

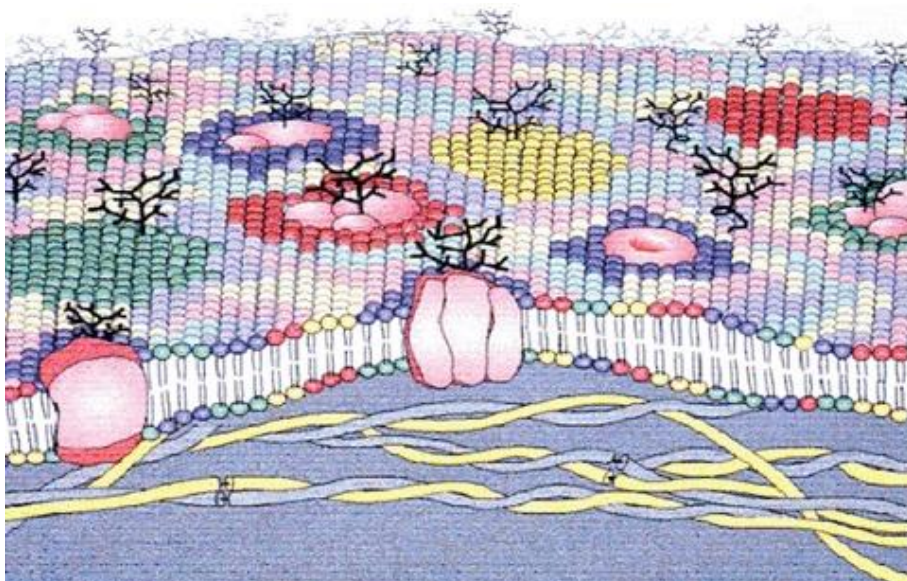
Trombocitai – bebranduolės, disko formos, nuo 0,5 μm iki 2–4 μm dydžio kraujyje cirkuliuojančios ląstelės, kurių yra nuo 150 iki 400 \times 10⁹ litre (daugiau yra moterų nei vyrų kraujyje, nepaisant mažesnio trombopoetino kiekio [34]). Trombocitai susidaro kaulų čiulpuose iš megakariocitų. Kraujotakoje jie cirkuliuoja iki 10 dienų (vėliau juos pašalina retikuloendotelinė sistema [35]), atlikdami esminį vaidmenį vykstant hemostazei ir trombozei [36, 37]. Be to, trombocitai dalyvauja organizmo imuninėse ir uždegiminėse reakcijose [38].

Trombocitai, turėdami signalo baltymus ir paviršiaus glikoproteinų receptorius (GP) (pvz.: GP Ia–IIa ir GP VI dalyvauja prijungiant kolageną, GP Ib – prijungiant von Willebrando faktorių bei GP IIb–IIIa – prijungiant fibrinogeną), geba reaguoti į kraujagyslių sienelių pažeidimus. Be lizosomų bei endoplazminio tinklo, trombocitai turi nukleorūgščių likučių, gautų iš megakariocitų, bei mitochondrijų [39]. Todėl trombocitas daugiausia energijos (apie 80 proc. visos gaunamos energijos) adenino nukleotidų pavidalu gauna vykstant aerobiniam oksidaciniam fosforilinimui mitochondrijose [40].

Be adenozino difosfato (ADP) sandėliavimo, trombocitai turi ir specifinių granulių – serotonino ir kalcio sandėliavimo, α -granulėse kaupiami tokie krešėjimo faktoriai kaip von Willebrando faktorius, multimerinas, trombospondinas-1, fibrinogenas, taip pat randama imunoglobulino E ir chimokinių: trombocitų faktoriaus-4, beta tromboglobulino. Trombocitų granulių komponentai sukelia organizmo gynybinį atsaką, aktyvina greta esančius trombocitus ir leukocitus bei dalyvauja reguliuojant audinių regeneraciją [41]. Tačiau trombocitų degranuliacija bei granulių komponentų sekrecija gali sukelti recipientui ir nepageidaujamų reiškinių, pavyzdžiui, febrilinių ir alerginių transfuzijos reakcijų [42–44]. Vis dėlto kraujagyslių endotelio ląstelės gamina ir trombocitų veiklą slopinančius inhibitorius: azoto oksidą (NO) (plečia kraujagysles ir apsaugo ląsteles nuo išeminio įvairių organizmo audinių pažeidimo [45]), PGI₂ (taip pat plečia kraujagysles bei slopina trombocitų agregaciją [46]) ir natūraliąją ATPazę (kitais dar vadinama CD39, ji metabolizuoja ir taip neutralizuoja aktyvių trombocitų išskiriamus adenozino trifosfatą (ATP) ir ADP), taip sustabdydami tolesnę trombocitų veiklą ir jų kaupimąsi bei agregaciją kraujagyslių pažeidimo vietoje, sukeldami nuo trombocitų priklausomas širdies ir kraujagyslių ligas [47].

3.1 Trombocitų fosfolipidinė membrana ir jos ypatumai

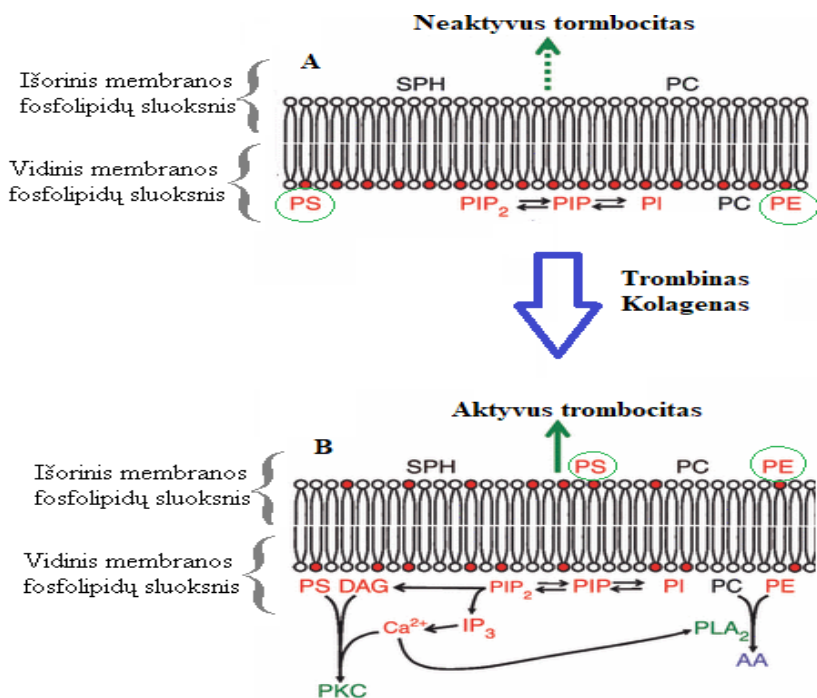
Trombocitų aktyvumas bei jų atliekamos funkcijos glaudžiai susijusios su fosfolipidine membrana bei jos sudėtimi. Dar 1972 m. S. J. Singeris ir G. L. Nikolsonas, remdamiesi termodinaminiais ląstelės membranos lipidų ir baltymų išsidėstymo principais bei membranos asimetrija ir šoniniu judėjimu membranos matrikse, pasiūlė ląstelės membranos skystamozaiškės sandaros modelį (angl. fluid-mosaic model). Šio modelio autorių teigimu, ląstelės membranos pagrindą sudaro lipidų dvisluoksnis, kuriame yra išsidėstę baltymai: integralieji (įsiterpę į membraną) ir paviršiniai (išsidėstę membranos paviršiuje). Kadangi ląstelės membrana yra skysta, lipidai ir baltymai gali lengvai judėti lipidiniame dvisluoksnyje sudarydami mozaiką, o angliavandeniai, prisijungę prie lipidų arba baltymų, išsidėsto išorinėje membranos pusėje [48, 49]. Ląstelių membranas sudaro ir mikrodomenai / membranų domenai (specifinės lipidų ir baltymų sudėties judrios dėmės ląstelės membranoje), kitaip dar vadinami lipidų plaustais, kurie yra sudaryti iš sfingomielino ir cholesterolio ir turi didelę įtaką tam tikriems ląstelės procesams, pavyzdžiui, membranų pernašai, ląstelių augimui, apoptozei, signalo perdavimui per membraną (8 pav.) [50].



8 pav. Scheminis ląstelės membranos skystamozaiškės sandaros modelis. Įvairūs lipidai, išryškinti skirtingomis spalvomis, formuoja mikrodomenus aplink integraliuosius membranos baltymus ir glikoproteinus, asimetriškai išsidėsčiusius ląstelės membranoje [51]

Lipidai sudaro nuo 16 iki 19 proc. sausos trombocitų masės, iš jų 65 proc. yra fosfolipidai, 25 proc. – neutralūs lipidai ir apie 8 proc. – glikolipidai. Neaktyvių trombocitų dvisluoksnę membraną sudaro simetriškai pasiskirstę skirtingų rūšių fosfolipidai: išoriniame membranos sluoksnyje randama fosfatidilcholino (PC) ir sfingomielino (SPH), o vidiniame sluoksnyje – fosfatidilserino (PS) ir fosfatidiletanolamino (PE). Trombocituose (ar jų membranoje) esantys lipidų nešikliai, kontroliuodami judėjimą per dvisluoksnę membraną, užtikrina trombocitų plazminės membranos fosfolipidų asimetriją. Tačiau po trombocitų aktyvacijos trombinu ir kolagenu įvyksta metaboliniai pokyčiai, kurie sutrikdo asimetrinę trombocitų membranos pasiskirstymą. Per specifinius kanalus į ląstelę gausiai veržiantis kalcio jonams (Ca^{2+}), fosfolipazė C (PLC) hidrolizuoja fosfatidilinozitolio 4,5-bisfosfatą (PIP2) į antrinius signalo nešiklius: diacilglicerolį (DAG) ir inozitolio 1,4,5-trisfosfatą (IP3). Susidarę DAG, PS bei Ca^{2+} aktyvina baltymų kinazę C (PKC). Veikiant fosfolipazei A2 (PLA2), iš glicerofosfolipidų atpalaiduojama RR 20:4 ω 6 ir vyksta baltymų, kurie sąveikauja su fosfoizonitido 3-kinazės produktu, fosfatidilinozitolio 3,4,5-trisfosfatu (PIP3), aktyvacija, pavyzdžiui, baltymų kinazės B. Tokiu būdu aktyviame trombocite iš membranos vidinio sluoksniu į išorinę perkeliama prokoaguliaciniai fosfolipidai: PS ir PE (9 pav.). Toks PS vietos pasikeitimas trombocitų membranoje sudaro palankias sąlygas pradėti kraujo krešėjimo kaskadą bei suformuoja signalą, skatinantį apoptozinių ląstelių fagocitozę [52, 53].

Pasaulyje yra plačiai tyrinėjami ląstelės fosfolipidinės membranos RR bei jų sudėties pokyčiai, nes pastarieji gali sukelti reikšmingų membranos pakitimų, taip moduluodami ląstelių funkcijas. Membranos fosfolipidų RR sudėtis gali paveikti tokius membranų biofizinius parametrus, kaip takumą, laidumą, domenų formavimą, bei ląstelėje vykstančius procesus: ląstelių dalijimąsi (endocitozė ir egzocitozė), signalo transdukciją, membranos baltymų veiklą ir antiproliferacinę kontrolę. Ląstelės membranos takumo pokyčiai gali daryti įtaką baltymų kataliziniam aktyvumui, pavyzdžiui, žmogaus eritrocitų membranos natrio siurblio aktyvumui, o membranos laidumo pokyčiai lemia membranos sutrikimus. Pavyzdžiui, NRR apsaugo membraną nuo jodido ir ditionito jono pernašos, nekeisdamos termodinaminių fosfolipidinės membranos savybių, o toks apsauginis SRR poveikis yra minimalus.



9 pav. Trombocitų membranos fosfolipidų persiskirstymas po aktyvacijos [53]

A – nestimuluotas trombocitas, B – stimuluotas trombinu ir kolagenu trombocitas. SPH – sfingomielinas; PC – fosfatidilcholinai; PS – fosfatidilserinas; PE – fosfatidiletanolaminas; PIP₂ – fosfatidilinozitolio 4,5-bisfosfatas; PIP – fosfatidilinozitolio monofosfatas; PI – fosfatidilinozitolis; IP₃ – inozitolio trisfosfatas; DAG – diacilglicerolis; Ca²⁺ – kalcio jonai; PKC – baltymų kinazė C; PLA₂ – fosfolipazė A₂; AA – arachidono RR

Ląstelės fosfolipidinės membranos RR dalyvauja ir ląstelėje vykstančiuose procesuose. Lipidai, būdami amfifilinės molekulės, veikia kaip tarpininkai, skatindami membranos sintezę. RR 18:1ω9 ir RR 20:4ω6 labiausiai aktyvina membranos sintezę, o SRR ir trans-NRR slopina. Manoma, kad lipidų mikrodomenai moduliuoja signalinių baltymų lokalizaciją, tokiu būdu kontroliuodami viduląstelines kaskadas, pavyzdžiui, sergant Alzheimerio liga RR 22:6ω3 sumažina amiloido β sanaujas smegenyse, kontroliuodama lipidų mikrodomenų pasiskirstymą ląstelės membranoje. Membranoje RR gali veikti kaip modulatoriai ir kaip signalo nešikliai, ypač jei signalas sužadinas ląstelės membranos lygiu. Toks daugialypis RR poveikis susijęs su teigiamu ar neigiamu įvairių signalo kaskadų reguliavimu, pavyzdžiui, inozitolio fosfato metabolizmu, uždegimu ar nuo Ca²⁺ priklausomu impulsu. Be to, keletas signalo transdukcijos sistemų yra susijusios su ląstelės proliferacijos

reguliuojama, pavyzdžiui, PKC sistema, kuri reguliuoja greitą ląstelės augimą [54]. Taigi, pažeidus ląstelės membranos vientisumą, sutrinka membranos funkcija ir gali kisti ląstelės fiziologiniai procesai [55].

Jei kraujagyslės pažeidžiamos, kraujyje cirkuliuojantys trombocitai prisijungia prie kraujagyslių sienelių ekspresuojamų subendotelio baltymų, pavyzdžiui, kolageno, kuris yra laikomas vienu iš stipriausių trombogeninių subendotelio komponentų susidarant krešuliams. Mokslinių publikacijų duomenimis, trombocitai geba įvertinti pagrindinių kolageno substratų mechanines savybes bei pakeisti savo fiziologiją taip, kad darytų įtaką PS ekspozicijai ir tiesiogiai veiktų krešulio formavimąsi. Vadinas, subendotelio kolageno standumas skatina trombocitų telkimąsi, jų aktyvumą bei fibrino susidarymą, taip didindamas gyvybei pavojingos trombozės riziką [56].

Veiksny, kuris leistų bent iš dalies sumažinti širdies ir kraujagyslių sutrikimų riziką, yra $\omega 3$ RR poveikis trombocitų metabolizmui. Trombocitai, kurie savo membranos fosfolipidų sudėtyje turi daugiau RR 20:5 $\omega 3$ ir RR 22:6 $\omega 3$, geba mažiau prisijungti fibrinogeno, mažiau išskirti savo granuliu turinio bei geba slopinti trombino gamybą. Be to, RR 20:5 $\omega 3$ ir RR 22:6 $\omega 3$ šiek tiek sumažina ir pačių trombocitų bei eritrocitų skaičių, dėl to sulėtėja arterijų okliuzijos progresavimas, o tai yra labai naudinga širdies ir kraujagyslių sistemai [57–59]. Būdamas membranos fosfolipidų sudėtyje, RR 22:6 $\omega 3$ veikia biofizinius dvisluoksnės membranos parametrus, pavyzdžiui, lipidų susipakavimą, membranos išlinkimus, lipidų persivertimo iš vienos membranos pusės į kitą (angl. flip-flop) dažnį, lipidų fazių atskyrimą ir pralaidumą bei membranos takumą. Kuo daugiau membranos fosfolipidai turi PNR, tuo membrana yra takesnė [11].

Taigi, PNR yra neatsiejama dalis trombocitų fosfolipidinės membranos, kurios sudėtis gali moduluoti ir pačių trombocitų atliekamas funkcijas.

3.2 Trombocitų ir leukocitų agregatų formavimosi sąsaja su aterotromboze ir uždegimu

Trombocitų ir leukocitų sąveika nusako tarp ląstelių vykstantį procesą, kuriam būdingi trombocitų ir skirtingų tipų leukocitų signalų tarpusavio mainai ir kuris jungia du pamatinius patofiziologinius procesus: aterotrombozę ir uždegimines imunines reakcijas.

Trombocitai geba perduoti biocheminius signalus neutrofilams, monocitams ir limfocitams per adhezinius receptorius ir daugybę išskiriamų tirpių

mediatorių. Ir priešingai, leukocitų išskiriamos proteazės ir NO gali moduluoti trombocitų atsaką. Nors RR 20:4ω6, vykstant trombocitų ir leukocitų „tarpląstelinei sąveikai“, didina uždegimą skatinančių ir vazokonstrikcinių junginių, pavyzdžiui, LT ir TXA2, gamybą, bet minėtas „tarpląstelinis metabolizmas“ kartu skatina išsiskirti ir LX, kurie slopina uždegiminį procesą. Aktyvūs trombocitai gali sąveikauti ir su kraujagyslių endotelium bei skatinti adhezinių molekulių bei chemokinių išsiskyrimą, kurie lemia leukocitų telkimąsi endotelio pažeidimo vietoje.

Trombocitų ir leukocitų agregatai (TLA) formuojasi, kai aktyvūs trombocitai ant savo membranos paviršiaus iškelia α -granulių P-selektiną (kitaip dar vadinamas CD62P), kurį atpažįsta leukocitų membranos paviršiuje esantis P-selektino glikoproteino ligandas-1 (PSGL-1). PSGL-1 ir P-selektinui susijungus, PSGL-1 inicijuoja β 2 integrino, dažniausiai makrofagų-1 antigeno, konformacijos pokyčius ir skatina sudaryti tvirtas jungtis su neutrofilais. Panašiu būdu trombocitai jungiasi prie monocitų β 1 ir β 2 integrinų ir skatina limfocitų telkimąsi periferiniuose limfiniuose mazguose, palengvindami limfocitų patekimą į aukštesnes endotelio venules [60].

Pastebėta, kad TLA, tiksliau trombocitų ir monocitų agregatų (TMA) formavimasis (kadangi pastarieji lengviau sudaro agregatus nei trombocitai ir neutrofilai), suintensyvėja esant širdies ir kraujagyslių pažeidimams: ūminiam koronariniam sindromui, kuris koreliuoja su miokardo nekrozės žymenimis (troponinu I ir troponinu T bei kreatino kinazės MB izofermentu) [61], stabiliai koronarinei širdies ligai, aterosklerozės pažeistoms vainikinėms kraujagyslėms ar įvykus jų trombozei. Be to, trombocitai in vivo gali būti aktyvinti ir suintensyvėjus TXA2 sintezei dėl periferinių kraujagyslių (arterijų) pažeidimo, nesant hipercholesterolemijos, hipertenzijos ar cukrinio diabeto (CD) [60, 62]. Vadinasi, trombocitų atliekamos funkcijos bei jų aktyvumas glaudžiai susiję su fosfolipidine membrana bei jos sudėtimi. Pakitus membranos fosfolipidų RR sudėčiai, gali susidaryti biologiškai aktyvūs eikozanoidai, pasižymintys uždegimą skatinančiu ar jį slopinančiu poveikiu [11]. In vitro tyrimai parodė, kad trombocitai, kontaktuodami su monocitais, padidina citokinių ir prostanoidų, pavyzdžiui, PGE2, gamybą monocituose (pastarieji yra veikiami nuo trombocitų priklausomos COX-2) bei aktyvina monocitų adheziją prie kraujagyslių endotelio [63].

Kraujagyslių uždegimas atlieka svarbų vaidmenį pažeidžiant endotelį ir aktyvinant aterogenezę. Trombocitai bei TLA prisideda prie šio nuolatinio kraujagyslių endotelio pažeidimo, lemiančio nuo trombocitų priklausomų

trombų formavimąsi ir paplitimą, ypač sergant ūminiu koronariniu sindromu [64–66]. Nors uždegimas savaime nėra susijęs su TMA susidarymu, tačiau padidėjusi intrakoronarinė P-selektino raiška aktyviuose trombocituose bei padidėjusi audinių faktoriaus raiška aktyviuose monocituose yra vietinio intrakoronarinio uždegimo veiksniai, lemiantys miokardo infarktą su ST segmento pakilimu [67]. Be to, buvo rasta trombocitų ir neutrofilų kilmės katijoninių baltymų pacientams, sergantiems uždegiminėmis glomerulų ligomis. Šie duomenys leidžia daryti prielaidą, kad trombocitų ir neutrofilų agregatai (TNA) dalyvauja ir uždegimui pažeidžiant inkstus [60].

Taigi, remiantis pateiktais tyrimų duomenimis [11, 60–66] teigtina, kad trombocitai prisideda prie uždegiminio proceso, sutelkdami ir aktyvindami leukocitus: aktyvina integrino adheziją ir chemotaksį; lemia greitą atsaką, pavyzdžiui, laisvųjų deguonies radikalų, mieloperoksidazės ir proteazių išsiskyrimą neutrofiluose; stimuliuoja viduląstelinus signalus, taip skatindami uždegimą ir protrombozinio geno raišką monocituose [60].

4. LAISVIEJI DEGUONIES RADIKALAI

4.1 Laisvųjų deguonies radikalų susidarymas

Aktyviosios deguonies formos (ROS) terminas vartojamas apibūdinant įvairius deguonies radikalus, pavyzdžiui, superoksido anijoną ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilo radikalą (OH^{\bullet}), bei neradikalinius deguonies junginius, pavyzdžiui, vandenilio peroksidą (H_2O_2), ozoną (O_3).

Laisvieji radikalai (LR) – tai atomai ar molekulės, kurios savo išorinėje orbitalėje turi vieną nesuporuotąjį elektroną. LR yra chemiškai aktyvios, nestabilios molekulės. Dauguma molekulių, susidariusių fiziologinėmis sąlygomis, neturi nesuporuotųjų elektronų [68].

ROS sudaro LR ir chemiškai aktyvūs deguonies junginiai (2 lentelė). Pagrindinės ROS, turinčios fiziologinę reikšmę ir biologiškai pavojingiausios, yra: $O_2^{\bullet-}$, kuris turi nesuporuotąjį elektroną, OH^{\bullet} ir H_2O_2 [69]. Molekulinis deguonis, reaguodamas su kitais radikalais ir sudarydamas kitus daug aktyvesnius LR, sukelia lipidų, baltymų, DNR molekulių oksidaciją (veikia tiek purinų, tiek pirimidinų bazines) [70].

2 lentelė. Svarbiausi endogeniniai oksidatoriai [69]

Laisvieji radikalai	Formulė	Reakcijos lygčių pavyzdžiai
Superoksido anijonas	$O_2^{\cdot-}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$ $2O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Vandenilio peroksidas	H_2O_2	Hipoksantinas + $H_2O + O_2 \leftrightarrow$ ksantinas + H_2O_2 Ksantinas + $H_2O + O_2 \leftrightarrow$ šlapimo rūgštis + H_2O_2
Hidroksilo radikalas	OH^{\cdot}	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$
Hipochlorito rūgštis	HClO	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HClO + H_2O$
Peroksilo radikalai	ROO^{\cdot}	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$
Hidroperoksilo radikalas	HOO^{\cdot}	$O_2^- + H_2O \leftrightarrow HOO^{\cdot}$

Endogeninės ROS, sintetamos žmogaus organizme, yra vertinamos kaip normalus ląstelės metabolizmo produktas. ROS gali būti išskiriamos skirtingose ląstelės vietose: mitochondrijose, membranose, endoplazminiame tinkle, lizosomose, peroksisomose [5]. Tiek bakterijoms, tiek gyvūnams nedideli ROS kiekiai yra būtini ląstelių tarpusavio ryšiui palaikyti ir homeostazei, padeda reguliuoti ir įvairius fiziologinius organizmo procesus: augimo faktoriaus signalų perdavimą, hipoksinį atsaką, uždegimą bei imuninį atsaką ląstelėse [5, 71–74].

Tačiau ROS sintezės greitį bei kiekį gali padidinti aplinkos veiksniai (išoriniai oksidatoriai): rūkymas, didelis oro užterštumas (kietosios dalelės, smulkiosios dalelės, įvairūs metalai) [75, 76], O_3 , jonizuojančioji spinduliuotė, sunkiųjų metalų jonai (švinas, kadmis) [77]. Cigarečių dūmuose esantys oksidatoriai ir LR, pavyzdžiui, $O_2^{\cdot-}$ ir NO, bei organiniai junginiai, įkvėpti į plaučius, suaktyvina neutrofilų ir makrofagų kaupimąsi, o tai dar labiau padidina oksidatorių žalą. O_3 gali sukelti lipidų peroksidaciją, DNR pažaidas, neutrofilų antplūdį į kvėpavimo takų epitelį [78]. Jonizuojančioji spinduliuotė, dalyvaujant deguoniui, OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$, organinius radikalus verčia į H_2O_2 ir organinius hidroperoksidus (ROOH). ROOH reaguodami su aktyviais metalų jonais, pavyzdžiui, geležimi ir variu, Fentono reakcijos būdu sukelia oksidacinį stresą (OS) (10 pav.).



10 pav. Haberio ir Weisso bei Fentono reakcijos [79]

Sunkiųjų metalų jonai, pavyzdžiui, geležies, vario, kadmio, gyvsidabrio, nikelio, švino ir arseno, veikdami per Haberio ir Weisso bei Fentono reakcijas (10 pav.) ir sudarydami OH• radikalus, sumažina antioksidacinių fermentų, dalyvaujančių lipidų peroksidacijos reakcijose bei reakcijose su branduolio baltymais ir DNR, aktyvumą taip pažeisdami organizmo ląsteles. Taigi, sunkiųjų metalų jonai gali suaktyvinti organizme vykstančią lipidų oksidaciją, kuri sukelia ląstelių ir organų sistemų, pavyzdžiui, kraujodaros sistemos, nervų sistemos, širdies ir kraujagyslių sistemos, pažaidas [80] bei dalyvauja navikų genezėje [70].

4.2 Laisvųjų deguonies radikalų kenksmingumo šalinimas

Aerobinių organizmų ląstelėse yra integruota antioksidacinė sistema, kuri padeda blokuoti žalingą ROS poveikį. Antioksidacinė sistema gali būti suskirstyta į dvi kategorijas: fermentiniai ir nefermentiniai antioksidantai. Pagrindiniai fermentiniai antioksidantai yra superoksido dismutazė (SOD), katalazė (CAT) bei glutationo peroksidazė (GTPx). Kiti antioksidantai: hemo oksigenazė-1 bei oksidacijos-redukcijos reakcijose dalyvaujantys baltymai – tioredoksinai (TRX), peroksiredoksinai (PRX) ir glutaredoksinai. Glutationo transferazės (GST) yra kita fermentinių antioksidantų šeima, kuri inaktyvina antrinius metabolitus (3 lentelė) [69].

3 lentelė. Fermentiniai antioksidantai [69]

Antioksidantai	Akronimas	Katalizuojamos reakcijos
Superoksido dismutazė	SOD	$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$ $M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$
Katalazė	CAT	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ $H_2O_2 + Fe(III)\text{-E} \rightarrow H_2O + O = Fe(IV)\text{-E}(.)$ $H_2O_2 + O = Fe(IV)\text{-E}(.) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$
Glutaciono peroksidazė	GSH-Px	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Tioredoksinas	TRX	Adenozino monofosfatas + sulfitas + tioredoksino disulfidas = 5'-adenililsulfatas + tioredoksinas Adenozino 3',5'-difosfatas + sulfitas + tioredoksino disulfidas = 3'-fosfoadenililsulfatas + tioredoksinas
Peroksiredoksinas	PRX	$2R'\text{-SH} + ROOH \rightarrow R'\text{-S-S-R}' + H_2O + ROH$
Glutaciono transferazė	GST	$RX + GSH = HX + R\text{-S-GSH}$

SOD turi tris izofermentus: CuZn-SOD, Mn-SOD ir EC-SOD. Visi izofermentai yra randami žmogaus plaučiuose. Mn-SOD randamas mitochondrijų matrikse, EC-SOD – užląsteliniame matrikse, ypač tose vietose, kur yra daug I tipo kolageno skaidulų, bei apie plaučių ir magistralines kraujagysles. CuZn-SOD ir Mn-SOD yra pagrindiniai SOD izofermentai, kurie neutralizuoja didžiausią dalį $O_2^{-\bullet}$, versdami jį į H_2O_2 .

Toliau H_2O_2 , veikiamas CAT, yra verčiamas vandeniu (H_2O). CAT – tai tetrameras, sudarytas iš keturių vienodų monomerų, kurių kiekvienas savo aktyviajame centre turi po hemo grupę. Skaidant H_2O_2 į H_2O ir O_2 , CAT taip pat prijungia nikotinamido adenino dinukleotido fosfato redukuotą formą (NADPH) kaip redukcinių ekvivalentų, kad būtų išvengta fermento oksidacinio inaktyvinimo [81, 82].

Antioksidacinis fermentas, kuris taip pat neutralizuoja H_2O_2 bei lipidų ROOH, susidariusius vykstant membranų lipidų peroksidacijai, yra GSH-Px – šeima tetramerinių fermentų, kurie savo aktyviajame centre turi unikalią selenocisteino aminorūgštį ir mažos molekulinės masės tiolius. Literatūroje apibūdinamos keturios GSH-Px formos, koduojamos skirtingų genų: GSH-Px-1 (ląstelių GSH-Px) labai paplitusi, neutralizuoja H_2O_2 ir RR peroksidus, bet ne esterifikuotus lipidų ROO•. Esterifikuotus lipidų ROO• neutralizuoja membranų GSH-Px-4 (fosfolipidų hidroperoksido GSH-Px), kuri geba naudoti kelis skirtingus mažos molekulinės masės tiolius kaip redukcinius ekvivalentus. GSH-Px-2 (virškinamojo trakto GSH-Px) aptinkama virškinamojo trakto epitelio ląstelėse, mažina su maistu gaunamų peroksidų kiekį. GSH-Px-3 (užląstelinis GSH-Px) – vienas iš svarbiausių antioksidacinių fermentų, randamų užląsteliniame skystyje [69].

TRX, randama žmogaus ląstelių citozolyje ir mitochondrijose, dalyvauja šalinant H_2O_2 kenksmingumą, kaip ir PRX, kurių yra nustatytos šešios skirtingos formos (PRX I – PRX VI). Pastarieji savo sudėtyje taip pat turi tiolius. Neseniai rastas PRX V, kuris veikia kaip peroksinitrito reduktazė, yra laikomas junginiu, galinčiu apsaugoti nuo ROS sukeliama plaučių pažeidimo [82].

Antioksidacinių fermentų šeima, kuri neutralizuoja antrinius metabolitus, pavyzdžiui, nesočiuosius aldehydus, peroksidus ir hidroperoksidus, yra GST. Literatūroje apibūdinamos trys didelės GST šeimos: citozolio GST, mitochondrijų GST ir su membrana susijusi mikrosomų GST, kuri dalyvauja eikozanoidų ir GSH metabolizme.

Antroji antioksidacinės sistemos kategorija yra nefermentiniai antioksidantai. Tai mažos molekulinės masės junginiai: vitaminai (vitaminas C ir vitaminas E), β karotenai, šlapimo rūgštis ir GSH (4 lentelė).

4 lentelė. Nefermentiniai antioksidantai [69, 83, 84]

Cheminis pavadinimas	Struktūrinė formulė
Retinolis	
Askorbo rūgštis	
α tokoferolis	
β karotenas	
Glutationas	

Vandenyje tirpi askorbo rūgštis (vitaminas C), veikdama vandeniniuose organizmo skysčiuose (kaip ir šlapimo rūgštis, glutationas), užtikrina viduląstelinį ir užląstelinį antioksidacinį poveikį, šalindama deguonies LR. Be to, redukuotos formos askorbo rūgštis susidariusį laisvą α tokoferolio radikalą verčia į aktyvųjį α tokoferolį, kuris vėl gali neutralizuoti ROO \cdot .

Membranas apsaugoti nuo lipidų peroksidacijos tenka vienam iš svarbiausių lipiduose tirpių antioksidantų – α tokoferoliui (vitaminas E). α tokoferolis atiduota elektroną ROO^{\bullet} , kuris susidaro lipidų oksidacijos metu, tokiu būdu apsaugo nuo galimo tolesnio ROO^{\bullet} poveikio PNRR grandinėms ir sustabdo grandinę LR reakcija. Be to, α tokoferolis skatina ir navikinių ląstelių apoptozę.

Glutathionas (GSH) – pagrindinis vandenyje tirpus antioksidantas, randamas visuose skysčiuose – tiek viduląstelinuose, tiek užląstelinuose. GSH/GSSG (oksiduoto glutathiono) santykis yra pagrindinis OS veiksnys. GSH neutralizuoja H_2O_2 ir lipidų ROO^{\bullet} dalyvaujant GSH-Px. GSH atiduoda savo elektroną H_2O_2 , kad susidarytų H_2O ir O_2 , o GSSG, veikiant GSH reduktazei, kuri kaip elektrono donora naudoja NAD(P)H, redukuojamas į GSH. Be to, redukuotas GSH atiduoda savo protonus membranų lipidams, taip apsaugodamas membranas nuo oksidacinio poveikio. Jis apsaugo ląsteles ir nuo apoptozės, sąveikaudamas su proapoptoziniais ir antiapopoziniais signalų keliais, bei reguliuoja keletą transkripcijos faktorių – aktyvių B ląstelių branduolio faktoriaus kapa lengvosios grandinės stipriklis (NF- κ B), AP-1 ir Sp-1 veiklą, juos aktyvindamas.

β karotenas, augaluose randamas pigmentas, reaguoja su ROO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$ ir OH^{\bullet} . Karotenoidų antioksidacinis poveikis dažniausiai pasireiškia esant nedidelei ROS koncentracijai. Tiek karotenoidai, tiek retino rūgštis gali reguliuoti transkripcijos faktorius. β karotenas slopina oksidatoriaus paskatintą NF- κ B aktyvaciją ir interleukino 6 (IL-6) bei navikų nekrozės faktoriaus α (TNF- α) gamybą. Be to, retino rūgštis pasižymi antiproliferaciniu poveikiu karcinomos ląstelėms, sustabdydama ląstelės vystymosi ciklą ar sukeldama jos apoptozę [69, 70].

Tačiau, remiantis šiandienos atsitiktinių imčių kontroliuotomis metaanalizėmis, nerasta jokio ryšio tarp antioksidantų turinčių papildų vartojimo ir rizikos susirgti vėžiu [85, 86]. Toks vadinamasis antioksidantų paradoksas sietinas ne tik su vėžinėmis ligomis, bet ir su II tipo CD bei širdies ir kraujagyslių ligomis [87, 88]. Vis dėlto maistas, kuriame natūraliai yra maži kiekiai įvairių antioksidantų, turi nedidelį, bet teigiamą poveikį stabdant LNL vystymąsi [89–91].

4.3 Lipidų peroksidacija

Susidarius tam tikroms patofiziologinėms sąlygoms: sutrikus mitochondrijų funkcijai, elektronų pernašai mitochondrijų kvėpavimo grandinėje, gali

susidaryti dideli kiekiai ROS [70]. Tuomet lipidai, ypač PNRR, sąveikauja su deguonies radikalais ir taip pasireiškia viena iš galimų ląstelės pažeidimo formų – lipidų peroksidacija.

Labiausiai lipidus pažeidžiančios ROS yra OH^\bullet ir hidroperoksilo radikalas (OH_2^\bullet). OH^\bullet sukelia oksidacinę ląstelės pažeidimą, nes geba atakuoti bet kurias organizmo biomolekules [92], taip sukeldami neurodegeneracines ląstelių pažaidas [93, 94], širdies ir kraujagyslių ligas [95] bei navikinius procesus organizme [96, 97]. Hidroperoksilo radikalai OH_2^\bullet (tai protoną prisijungusi superoksido $\text{O}_2^{\bullet-}$ forma), kurie yra stipresni oksidatoriai nei $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikalai, inicijuoja fosfolipidų polinesočiųjų riebalų rūgščių grandinės oksidaciją, taip sukeldami ląstelės membranos struktūrinius ir funkcinius sutrikimus [98–100].

Dažniausi ROS taikiniai žmogaus organizme yra ląstelių membranų fosfolipidai bei kraujo lipoproteinai. Lipidų peroksidacija gali vykti dviem būdais: fermentiniu ir nefermentiniu. Vykstant nefermentinei lipidų peroksidacijai, ROS oksiduoja membranose esančių PNRR dvigubuosius ryšius. RR 20:4 ω 6 turi keturis dvigubuosius ryšius, todėl daug lengviau oksiduojasi nei RR18:3 ω 3, kuri turi tris dvigubuosius ryšius, ar RR 18:2 ω 6, kuri turi du dvigubuosius ryšius. RR 18:1 ω 9 turi tik vieną dvigubąjį ryšį, todėl nedalyvauja lipidų peroksidacijoje [70].

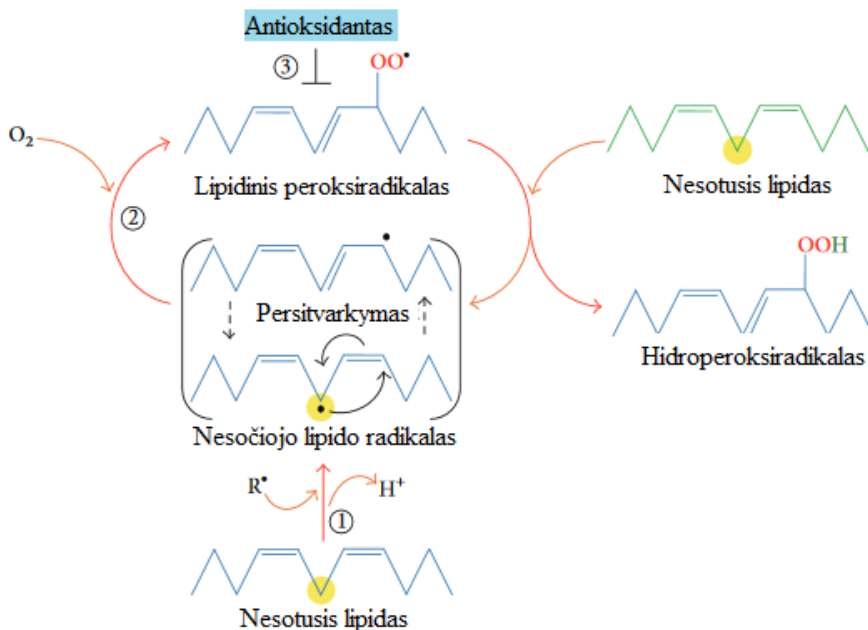
Lipidų peroksidacija vyksta trimis etapais: pradėties (angl. initiation), sklidimo (angl. propagation) ir baigties (angl. termination) (11 pav.) [101–103]. Vykstant fermentinei lipidų peroksidacijai, dalyvaujant fermentams LOX, COX bei citochromui P450, pradėties etapas yra kontroliuojamas. Tokiu būdu kontroliuojama lipidų peroksidacijos molekulių sintezė bei sumažinamas LR kiekis ląstelėje.

Pradėties etape LR (pvz., OH^\bullet) atakuoja PNRR, atima vandenilio atomą (H) iš $-\text{CH}_2-$, esančios prie RR dvigubąjo ryšio ($\text{C} = \text{C}$), ir susidaro lipidinis radikalas (L^\bullet) [104].

Sklidimo etape reikalinga tripletinė deguonies (3O_2) molekulė bei vario arba geležies jonai. L^\bullet reaguoja su 3O_2 ir susidaro lipidinis peroksiradikalas (LOO^\bullet). Tada LOO^\bullet atima H iš šalia esančios kitos lipidų molekulės, sudarydamas naują L^\bullet (kuris toliau tęsia grandininę reakciją), o pats virsta hidroperoksiradikalu (LOOH). Susidaręs naujas L^\bullet toliau tęsia lipidų peroksidacijos grandininę reakciją, kuri pažeidžia vis kitų lipidų molekules.

Paskutiniame – baigties – lipidų peroksidacijos etape grandininė reakcija nutrūksta, kai fenoliniai antioksidantai (α tokoferolis ir dibutilhidroksitoluenas (BHT)) atiduota H atomą LOO^\bullet , virsdami atitinkamais α tokoferolio arba

BHT radikalais, ir reaguoja su kitu $\text{LOO}\cdot$, formuodami naujus neradikalinius junginius ($\text{L}\cdot + \text{L}\cdot \rightarrow \text{L}-\text{L}$; $\text{L}\cdot + \text{LOO}\cdot \rightarrow \text{L}-\text{OOL}$; $\text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot \rightarrow \text{LOOL} + \text{O}_2$). Tokie peroksidacijos produktai dažniausiai susidaro iš gana didelių ilgagrandžių RR molekulių ar fosfolipidų, kurių sandara būdinga peroksiduotoms membranoms. LOOH molekulė yra nestabili ir gali sudaryti antrinius lipidų peroksidacijos produktus: malono dialdehidą (MDA), 4-hidroksi-2-nonenalą (4-HNE) bei izoprostanus [101, 105].



11 pav. Lipidų peroksidacijos procesas: 1 – pradėties etapas; 2 – sklidimo etapas; 3 – baigties etapas [105]

4.4 Lipidų peroksidacijos produktas – malono dialdehidas

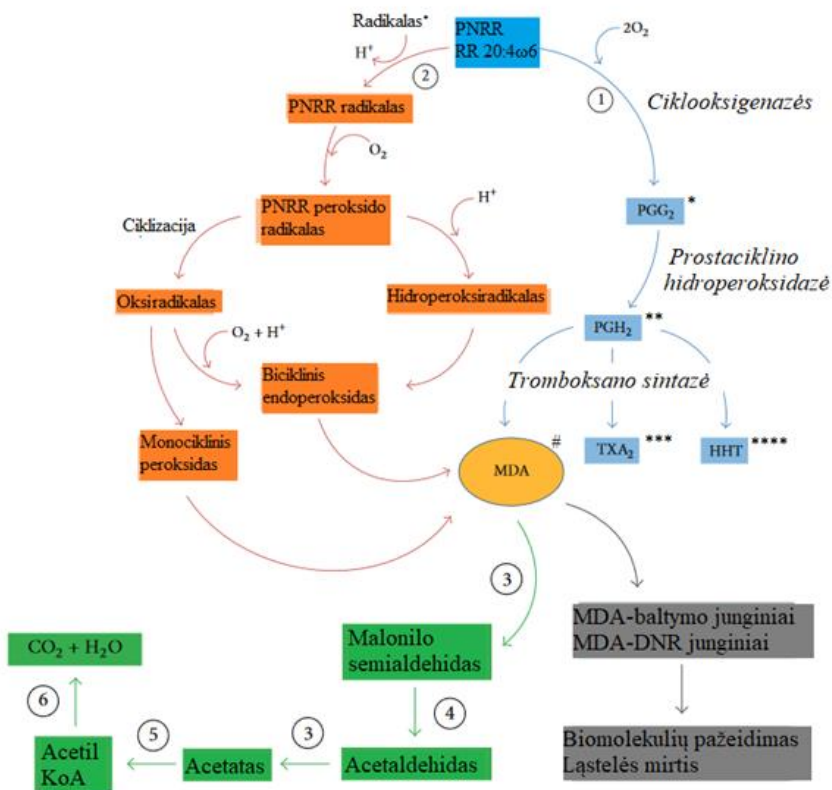
Vykstant lipidų, ypač PNRR, peroksidacijai, susidaro malono dialdehidas (MDA). Jis laikomas svarbiu OS žymeniu. Be to, MDA siejamas ir su kancerogeniniu, citotoksiniu poveikiu žmogaus organizmo ląstelėms bei cukrinio diabeto, neurodegeneracinių, širdies ir kraujagyslių ligų patogenezėje [106–108].

MDA, kaip ir kiti, pavyzdžiui, F_2 -izoprostano 15(S)-8-izoprostaglandinas $\text{F}_{2\alpha}$ bei 4-HNE, gerai ištirtas bei dažniausiai naudojamas lipidų peroksidacijos žymuo biologiniuose skysčiuose, gaunamas kaip skilimo produktas

oksiduojantis PNRR. MDA yra tiobarbitūro rūgšties aktyvios medžiagos prototipas, tirpus vandenyje bei organiniuose tirpikliuose: etanolyje, metanolyje. Be to, kambario temperatūroje MDA gali polimerizuotis ir dalyvauti reakcijose su įvairiomis biomolekulėmis, tarp jų DNR, baltymais bei aminorūgštimis [109]. Yra žinoma, kad MDA gali būti dviejų formų: laisvas arba kovalentiniais ryšiais susijungęs su aminorūgštimis, baltymais, nukleorūgštimis ar lipoproteinais [110]. MDA koncentracija gali būti išmatuojama įvairiuose audiniuose bei biologiniuose skysčiuose: šlapime, kraujo serume ar plazmoje [111].

MDA in vivo gali susiformuoti iš $\omega 3$ ar $\omega 6$ PNRR, vykstant TXA2 sintezei, kaip šalutinis fermentinių procesų produktas, ar iš biciklinio endoperoksido ir (ar) iš monociklinio peroksido nefermentinių, vykstant nuo deguonies radikalo priklausomos reakcijoms (12 pav.) [105, 112]. Susintetintas MDA gali būti arba metabolizuojamas fermentiniu keliu, arba gali reaguoti su ląstelių ir audinių baltymais ar DNR, suformuodamas junginius, sukeliančius biomolekulių pažeidimus. Fermentiniu keliu MDA oksiduojamas mitochondrijų aldehido dehidrogenazės, tada dekarboksilinamas į acetaldehidą, veikiant dekarboksilazei. Toliau acetaldehidas oksiduojamas aldehido dehidrogenazės į acetatą ir galiausiai trikarboksirūgščių cikle verčiamas į anglies dioksidą ir H₂O. Kita vertus, fosfogliukoizomerazė metabolizuoja citoplazmos MDA į metilglioksalą ir toliau, kad padidėtų tolerancija OS [113], antioksidacinę sistemą reguliuojančių glioksalazės sistemos fermentų yra verčiamas į D-laktatą naudojant GSH kaip kofaktorių [105].

Susintetintų MDA molekulių skaičius priklauso nuo dvigubųjų ryšių skaičiaus (kadangi tarp dvigubųjų ryšių esanti -CH₂- grupė yra naudojama MDA susidaryti), pavyzdžiui, iš RR 20:4 ω 6 gali susidaryti trys MDA molekulės, iš RR 20:5 ω 3 – keturios MDA molekulės. Tačiau iš RR 18:1 ω 9 MNRR nebus gaunama MDA molekulė, nes nėra dviejų dvigubųjų ryšių bei -CH₂- tarp jų. Tuo pasižymi ir stearino SRR (RR 18:0) – nėra dvigubųjų ryšių, vadinasi, nebus sudaromos MDA molekulės [109].



12 pav. MDA susidarymas ir metabolizmas [105]

1 – fermentinis kelias; 2 – nefermentinis kelias; 3 – aldehido dehidrogenazė; 4 – dekarboksilazė; 5 – acetil-KoA sintazė; 6 – trikarboksirūgščių ciklas; PGG₂* – prostaglandinas G₂; PGH₂** – prostaglandinas H₂; TXA₂*** – tromboksanas A₂; HHT**** – 12-l-hidroksi-5,8,10-heptadekatrieno rūgštis; MDA[#] – malono dialdehidas

Taigi, MDA yra vienas iš galutinių PNRR peroksidacijos produktų ląstelėje. Jis pradedamas gaminti dėl padidėjusio LR susidarymo ir yra laikomas vienu iš dažniausiai matuojamų OS žymenų [109, 114].

4.5 Oksidacinis stresas

Oksidacinis stresas (OS) – tai pusiausvyros tarp antioksidantų ir LR sutrikimas, atsirandantis dėl antioksidantų išsekimo arba dėl pernelyg didelio ROS susidarymo ar kaupimosi. Esant OS, ląstelės neutralizuoja oksidatoriaus poveikį ir atkuria oksidacijos-redukcijos reakcijų pusiausvyrą.

aktyvindamos arba blokuodamos genus, koduojančius gynybos fermentus, transkripcijos faktorius ir struktūrinius baltymus. GSH/GSSG santykis yra vienas svarbiausių žmogaus organizmo OS veiksmų. Didesnė ROS gamyba organizme gali pakeisti DNR struktūrą, sukelti baltymų ir lipidų modifikacijas, streso paveiktų transkripcijos faktorių aktyvinimą bei uždegimą skatinančių ir jį slopinančių citokinų gamybą.

ROS gali sukelti DNR pokyčius, kurie pasireiškia purinų ar (ir) pirimidinų bazių degradacija, viengrandės arba dvigrandės DNR įtrūkiais, purino, pirimidino ar glikozidinio ryšio pokyčiais, mutacijomis, delecijomis ar translokacijomis bei kryžminių jungčių su baltymais susidarymu. Dauguma DNR modifikacijų yra svarbios kancerogenezei, senėjimui ir neurodegeneraciniams, širdies ir kraujagyslių bei autoimuninių ligų išsivystymui. 8-hidroksiguanozino susidarymas yra geriausiai žinoma DNR pažeida, sukelia OS, ir gali būti laikomas kancerogenezės žymeniu. Be to, OS sukelia mikrosatelitų nestabilumą. Nors ląstelės ir gali lengvai toleruoti viengrandės DNR įtrūkius, tačiau dėl jonizuojančiosios spinduliuotės atsiradę dvigrandės DNR įtrūkiai gali būti labai pavojingi ląstelių gyvybingumui [69].

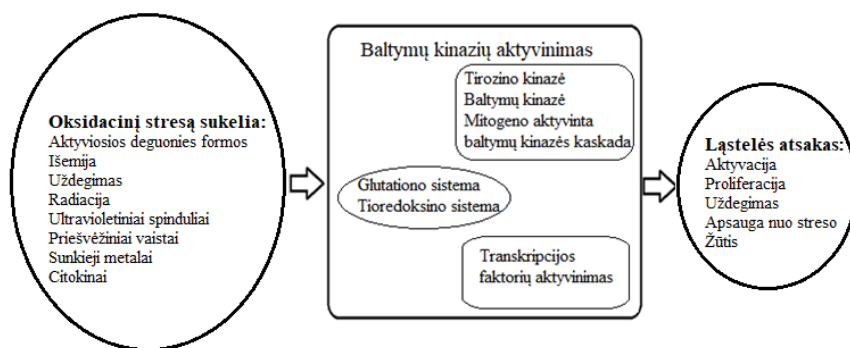
ROS gali sukelti ir peptidinės grandinės fragmentaciją, baltymų elektrinio krūvio ir kryžminių jungčių pokyčius, specifinių aminorūgščių oksidaciją. Susidaro ditirozinas, nitrinti ir chlorinti tirozino junginiai, kurių dideli kiekiai randami pažeistuose uždegiminėmis ligomis sergančių pacientų audiniuose. ROS sukelia pažeidimai padidina baltymų jautrumą proteolizei, dalyvaujant specifinėms proteazėms. Ypač jautrus oksidacijai yra baltymai, kurie savo sudėtyje turi aminorūgščių: cisteino ir metionino, bei fermentai, turintys metalo jonų savo aktyviame centre. Tokie baltymai pakeičia savo konformaciją, praranda struktūrą ir degraduoja, o fermentai praranda aktyvumą.

Kaip jau buvo minėta, ROS gali sukelti lipidų peroksidaciją ir pažeisti membranos lipidų dvisluoksne struktūrą, inaktyvindami su membrana susijusius receptorių ir fermentus bei padidindami audinių pralaidumą. Lipidų peroksidacijos produktai: MDA ir nesotieji aldehydai, gali slopinti daugelį ląstelių baltymų suformuodami kryžmines baltymų jungtis. 4-HNE paskatina ląstelių GSH išsekimą ir peroksido gamybą bei aktyvina epidermio augimo faktoriaus receptorių ir fibronektino gamybą. Aterosklerozė taip pat yra inicijuojama mažo tankio lipoproteinų (MTL) lipidų peroksidacijos [69, 70].

ROS gali būti išskiriamos kraujagyslių sistemoje pačių ląstelių: monocitų, endotelio ląstelių, neutrofilų. Trombocitai, kurie atlieka pagrindinį vaidmenį aterosklerozės procese, išskirdami uždegimines ir protrombozines molekules, taip pat gali sintetinti ROS. Fermentai, dalyvaujantys susidarant trombocitų

ROS (pvz., H_2O_2), yra SOD ir nikotinamido adenino dinukleotido fosfato redukuotos formos oksidazė (NADPH-oksidazė). Pastaroji, kaip viduląstelis signalas, atlieka pagrindinį vaidmenį aktyvinant trombocitus bei išskiriant izoprostanus – RR 20:4ω6 oksidacijos produktus. Aktyvinti trombocitai intensyviau sudaro agregatus su monocitais ir dalyvauja vystantis arterinėms ir veninėms trombozėms. Be to, OS gali padidinti trombocitų aktyvumą mažindamas NO biologinį prieinamumą. NO slopina trombocitų telkimąsi ir tolesnį arterinės trombozės progresavimą [115, 116].

Taigi, lipidų peroksidacijos produktų poveikis (ROS ypač jautrūs yra ląstelių membranų fosfolipidai ir jų sudėtyje esančios PNRR [10]) yra siejamas su daugybe patofiziologinių procesų. ROS pažeidžia svarbiausias žmogaus organizmo biomolekules, sutrikdo ląstelių funkcijas, sukelia uždegimą ar ląstelių žūtį (13 pav.) [117, 118]. Be to, padidėja trombocitų aktyvacija bei išsivysto trombozė [115, 116]. Tokiu būdu OS dalyvauja aterosklerozės, hipertenzijos, CD, išeminės širdies ligos ir navikų patogenezėje [117] bei vystantis inkstų, ypač proksimalinių kanalėlių, pažeidimui [9].



13 pav. Oksidacinis stresas ir ląstelės atsakas į jį [117]

5. RIEBALŲ RŪGŠČIŲ SAŠAJA SU OKSIDACINIU STRESU IR INKSTŲ KANALĖLIŲ PAŽEIDIMU

Dabartinių mokslinių publikacijų duomenimis, nutukimas yra susijęs su hipoksija, OS ir netgi su mechaniniu ląstelės pažeidimu, sukeltu adipocitų hipertrofijos. Adipocitų hipertrofija ir vėliau išsivystanti riebalinio audinio disfunkcija sukelia uždegimą ir OS pacientams, sergantiems metaboliniu sindromu (MS) [119, 120]. Be to, vis dažniau vartojama lipotoksiškumo sąvoka, kuri apibrėžia SRR ir jų metabolitų kaupimąsi ląstelėse, įvairiais

patogeneziniais mechanizmais sukeltą OS bei endoplazminio tinklo stresą (ETS) (angl. *endoplasmic reticulum stress*). ETS lemia baltymų struktūros ir išsidėstymo erdvėje pokyčius, lipidų ir sterolių sintezės sutrikimus, kalcio kaupimąsi ląstelėse ir galiausiai ląstelių žūtį dėl apoptozės. ETS sukelti pažeidimai įtakoja daugelio ligų, pavyzdžiui CD, lėtinės inkstų ligos, ir tokių būklių kaip audinio ar organo išemija ar reperfuzijos sutrikimai, patogenezę [121].

Nutukusių pacientų organizme OS sukelia riebaliniame audinyje sintetinamų ROS kaupimąsi. Manoma, kad to priežastis yra padidėjusi NADPH-oksidazės, kuri dalyvauja ROS gamyboje, geno raiška riebaliniame audinyje bei sumažėjusi antioksidaciniu veikimu pasižyminčių fermentų genų raiška. NADPH-oksidazės geno raišką skatina SRR perteklius riebaliniame audinyje [122]. Nutukusiems asmenims būdinga sutrikusi pilvo riebalinio audinio funkcija, kai kraujyje cirkuliuoja vis daugiau laisvų endogeninių SRR, o gebėjimas kaupti egzogenines RR taip pat yra sutrikęs [123].

Mokslinių publikacijų duomenimis, didesnis MNRR kiekis, gaunamas su maistu, paskatina riebaliniame audinyje esančių antioksidacinių fermentų (GSH-Px, CAT ir kt.) genų raišką ir tokiu būdu sumažina OS, o didesnis su maistu gaunamų SRR kiekis nutukusių asmenų riebaliniame audinyje skatina NADPH-oksidazės genų raišką bei slopina genų, koduojančių antioksidacinius fermentus, raišką. P. Peña-Orihuela ir bendraautorai mano, kad asmenų, kuriems diagnozuotas MS, dietoje esančių SRR pakeitimas MNRR būtų efektyvus būdas mažinti OS [124]. Atlikti eksperimentai su laboratorinėmis pelėmis leidžia daryti prielaidą, kad SRR pakeitimas MNRR turėtų mažinti ir uždegimą riebaliniame audinyje, kartu ir atsparumą insulinui [125].

O. Gunes ir bendraautorai siekė įvertinti eritrocitų membranos RR sudėties ir atsparumo insulinui ryšį nagrinėdami nutukusių (daliai jų nustatytas atsparumas insulinui) ir normalaus svorio turkų tautybės paauglių grupes. Šie tyrėjai nustatė statistiškai reikšmingai didesnę palmitoleino RR (RR 16:1ω7) ir mažesnę RR 20:5ω3 koncentraciją nutukusių paauglių (tiek turinčių, tiek neturinčių atsparumo insulinui) grupėje, palyginti su kontrolinės grupės paaugliais [126].

Tyrimų *in vitro* duomenimis, pasitelkiant proksimalinių inkstų kanalėlių ląstelių kultūras nustatyta, kad PNRR (ypač RR 18:3ω3 ir RR 20:5ω3) ir MNRR (ypač RR 18:1ω9) mažina OS bei slopina ETS [127, 128]. Tačiau tyrimai, kurie nagrinėjo palmitino RR (RR 16:0) poveikį proksimalinių inkstų kanalėlių ląstelėms *in vitro*, parodė, kad RR 16:0, priešingai, sukelia ETS, kuris lemia inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelių apoptozę ir nekrozę. Kaip

ir buvo minėta, tokiu poveikiu nepasižymi RR 18:3 ω 3. Pastaroji sumažino endoplazminio tinklo pažeidimą sukėlusių žymenų – fosforilinto eukariotų iniciacijos faktoriaus 2 α , C/EBP homologinio baltymo koncentraciją bei ląstelių apoptozę [121].

Japonijos mokslininkai pagrindė kitą RR 16:0 oksidacinio poveikio molekulinį mechanizmą. Tyrėjų duomenimis, inkstų kanalėlių ląstelių kultūrose RR 16:0 didina monocitų chemotaksio baltymo raišką. Mechanizmas grindžiamas RR 16:0 gebėjimu didinti viduląstelių DAG koncentraciją, o tai paskatina PKC šeimos baltymų aktyvaciją. Nustatyta, kad RR 18:1 ω 9 ir RR 20:5 ω 3 per fermento diacilglicerolio aciltransferazės geno raiškos aktyvinimą paverčia viduląsteliniais DAG į triacilglicerolius (TAG) ir tokiu būdu slopina PKC aktyvinimą. Todėl išvengiama inkstų kanalėlių ląstelių pažeidimo. Be to, RR 20:5 ω 3 pasižymi platesniu apsauginiu poveikiu nuo tubulointersticinių pažeidimų: moduluoja branduolio receptoriaus aktyvinimą – slopindamas NF- κ B, vykdo metabolinę konversiją į biocheminius mediatorius, pavyzdžiui, rezolvinus, kurie gali slopinti uždegimą, plazminės membranos lipidų plaustų keitimus priklausomai nuo tiesioginio antigenų atpažinimo receptoriaus (TLR) funkcijos [127]. Yra duomenų, kad laisvųjų RR perteklius viršija mitochondrijų galimybes vykdyti RR β -oksidaciją, todėl susidaro iš dalies oksiduotas acilkarnitinas bei didesnės DAG koncentracijos, lemiančios atsparumą insulinui [129]. RR tiesiogiai ar per signalines molekules kepenyse geba veikti genų transkripcijos lygmeniu ir taip reguliuoti lipogenezę, RR β -oksidaciją bei gliukozės apykaitą [130]. Taigi, remiantis šiomis studijomis, RR vaidmuo sukeltant OS bei inkstų kanalėlių pažeidimą nebūtinai yra tiesioginis.

6. INKSTŲ AKMENLIGĖS PAPLITIMAS IR SĄSAJA SU KITAIŠ ORGANIZMO SUTRIKIMAIŠ

JAV tyrėjų duomenimis, keletą dešimtmečių inkstų akmenligės paplitimas vis didėjo [131]. Kaip jau buvo minėta, NHANES nurodo, kad 2013–2014 metais inkstų akmenligės paplitimas siekė 10,1 proc. Vertinant 2010–2014 m. laikotarpį, vyrų populiacijoje inkstų akmenligės paplitimas išaugo nuo 10,6 proc. iki 10,9 proc., moterų populiacijoje – nuo 7,1 proc. iki 9,4 proc. [4]. Inkstų akmenligės pasikartojimo rizika per pirmuosius penkerius metus nuo pirmo epizodo padidėja 50 proc. Todėl šie duomenys turėtų skatinti nustatyti didelės rizikos asmenų grupes, ypač siekiant identifikuoti pagrindinius patogenezės elementus ir kurti prevencines priemones [132].

Epidemiologinių tyrimų duomenimis, inkstų akmenligė dažnai diagnozuojama esant ir kitų sveikatos sutrikimų: nutukimui, arterinei hipertenzijai, MS, II tipo CD, inkstų nepakankamumui. Todėl šiandien inkstų akmenligė vertinama kaip sisteminė liga, o ne lokalus pažeidimas. Be to, inkstų akmenis sudarančių cheminių komponentų įvairovė taip pat rodo, kad ligos etiologija yra skirtinga ir neapsiriboja vien tik inkstų ir šlapimo takų sistemos pažeidimais.

Dabartinėje mokslinėje literatūroje RR reikšmė inkstų akmenligės išsivystymui aiškinama dvejopai. Vieni moksliniai šaltiniai nurodo tiesioginį RR poveikį inkstų kanalėliams, druskų ir vandens apykaitai inkstuose, oksidaciniams ir uždegiminiams procesams, kaip jau ir buvo aptarta, o kiti žvelgia per MS prizmę.

7. AMONIO JONŲ APYKAITOS POKYČIAI SERGANT INKSTŲ AKMENLIGE

Inkstuose veikiančios buferinės sistemos palaiko pastovų bazių kiekį bei vandenilio jonų (H^+) koncentraciją. Rūgščių ir šarmų pusiausvyrai palaikyti svarbus ir amoniako (NH_3) susidarymas bei išskyrimas inkstuose. Veikiant inkstų glutaminazei, NH_3 atskyla nuo į inkstus atnešto glutamino, kuris deamininimo metu virsta glutamatu (Glu). NH_3 , susijungęs su H^+ , sudaro amonio jonus (NH_4^+), kurie palaiko šarmų rezervą. NH_4^+ negrįžta į organizmą, nes negali pereiti inkstų kanalėlių epitelinių ląstelių membranos, todėl yra pašalinamas su šlapimu. Tyrimų duomenimis, asmenims, kuriems rasta šlapimo rūgšties (uratinų) akmenų, NH_4^+ koncentracija šlapime yra 5–7 kartus mažesnė nei tiems, kuriems rasta kalcio druskų kilmės akmenų [133]. N. Abate ir kolegės iškėlė prielaidą, kad padidėjęs šlapimo rūgšties kiekis šlapime yra susijęs su sumažėjusia šlapimo pH reikšme (mažesnė kaip 5,5) dėl sutrikusio NH_4^+ išskyrimo, kurį sukėlė atsparumas insulinui [134]. Tyrimai in vitro taip pat atskleidė, kad inkstų kanalėlių epitelinės ląstelės ekspresuoja receptorius insulinui [135]. Insulinas skatina NH_4^+ gamybą proksimaliniuose kanalėliuose ir aktyvina Na^+/H^+ jonų siurblių. Taigi, išsivystęs atsparumas insulinui proksimaliniuose kanalėliuose sutrikdo NH_4^+ pernašą bei gamybą ir tai sumažina šlapimo pH, nes atsiranda daug laisvų H^+ jonų. Nors atsparumas insulinui negali visiškai paaiškinti šlapimo rūgšties akmenų susiformavimo priežasties, tačiau tai yra vienas iš mechanizmų šlapimo rūgščiai precipituotis ir formuoti inkstų akmenis [136].

Kitų mokslininkų nuomone, amoniogenezę ir NH_4^+ pernašą sutrikdo lipidų ir riebalų rūgščių perteklius inkstų proksimaliniuose kanalėliuose, nes apsunkinama glutamino pernaša per mitochondrijų membranas. Kita vertus, lipidų kaupimasis inkstuose ir inkstų kanalėliuose taip pat gali būti susijęs su sutrikusiu audinių jautrumu insulinui [137, 138].

8. METABOLINIO SINDROMO ĮTAKA AKMENŲ FORMAVIMUISI INKSTUOSE

Metabolinis sindromas (MS) diagnozuojamas remiantis gliukozės tolerancijos sutrikimu, arterine hipertenzija, sumažėjusia didelio tankio lipoproteinų cholesterolio koncentracija (DTL-Ch), padidėjusia TAG koncentracija, pilvinio tipo nutukimu (bet kurie trys iš penkių kriterijų patvirtina MS diagnozę, AHA/NHLBI 2005) [139]. MS sudarantys komponentai lemia šlapimo sudėties pokyčius: padidėja šlapimo rūgšties ir Ca^{2+} ekskrecija, sumažėja citrato šalinimas su šlapimu, sumažėja šlapimo pH, o tai sudaro sąlygas formuotis šlapimo rūgšties (uratiniams) bei kalcio oksalatiniams ir kalcio fosfatiniams akmenims [140]. Šlapimo rūgšties akmenys statistiškai reikšmingai dažniau randami pacientams, kuriems diagnozuotas MS [141].

C. Reichardo ir bendraautorių atlikto tyrimo duomenimis, retrospektyviai infraraudonųjų spindulių spektroskopijos metodu atrinkus 308 tiriamuosius, turinčius inkstų akmenų, paaiškėjo, kad iš jų bent 10 proc. akmenys buvo šlapimo rūgšties. Inkstų akmenys pagal procentinę turimų uratų dalį buvo suskirstyti į 10–20 proc., 30–50 proc., 60–90 proc. ir 100 proc. grupes. Autorių duomenimis, 100 proc. šlapimo rūgšties akmenys būdingesni vyresnio amžiaus, didesnį kūno masės indeksą, mažesnę šlapimo pH ir didesnę šlapimo rūgšties koncentraciją kraujo plazmoje turintiems asmenims, palyginti su tais, kurių akmenų uratinis komponentas tesudarė 10–20 proc. [142].

Kitos studijos duomenys parodė, kad asmenys, atitikę tris ir daugiau MS kriterijų, turėjo gerokai didesnę riziką susirgti inkstų akmenlige nei tie, kurie atitiko tik du [143]. Turkų populiacijoje taip pat buvo pastebėta, kad didesnis MS komponentų skaičius koreliuoja su didesne inkstų akmenų formavimosi rizika [144].

Dar vienas MS komponentas – sutrikusi glikemija nevalgius ar diagnozuotas II tipo CD. Net 43 proc. iš 3,1 mln. inkstų akmenlige sergančių JAV gyventojų yra diagnozuotas šio tipo CD. Iš jų 680 000 atvejų buvo priskirta prastai glikemijos kontrolei [145]. Pacientams, sergantiems II tipo CD, daug dažniau išsivysto inkstų akmenligė. Ypač dažnai randama šlapimo rūgšties akmenų [146].

Sutrikusi glikemija ir II tipo CD yra susiję su pakitusiu riebalinio audinio gebėjimu kaupti RR atsargas. Pilvo riebalinio audinio adipocitai, vystantis atsparumui insulinui, praranda gebėjimą adekvačiai kaupti RR. Laisvosios RR (tiksliau iš jų susidaręs acetil-kofermentas A), didindamos kepenyse gliukoneogenezės fermento – piruvato karboksilazės aktyvumą, skatina gliukozės sintezę ir mažina insulino klirensą [147]. Todėl didėja TAG, mažo tankio lipoproteinų cholesterolio (MTL-Ch) ir mažėja DTL-Ch koncentracija. Minėti pokyčiai lemia ankstyvą aterosklerozę [137].

Dislipidemija – dar vienas komponentas, papildantis MS diagnostikos kriterijų visumą. Tam tikri lipidų sudėties pokyčiai gali būti susiję su cheminių šlapimo komponentų pokyčiais ir padidėjusia inkstų akmenligės rizika. Teigiama, kad padidėjusi TAG ir bendrojo cholesterolio koncentracija turi įtakos būtent šlapimo rūgšties akmenų susiformavimui, o padidėjusi MTL-Ch koncentracija susijusi su didesniu šlapimo rūgšties bei natrio jonų išsiskyrimu su šlapimu [148].

MS galutinai nelemia uratinės inkstų akmenų kilmės. Tačiau pacientai, atitinkantys daugiau MS kriterijų, turi didesnę riziką, kad jiems susidarys šlapimo rūgšties, o ne kitos kilmės inkstų akmenys.

9. POLINESOČIŪJŲ RIEBALŲ RŪGŠČIŪ ŠAŠAJA SU INKSTŲ AKMENLIGE

Mokslinėje literatūroje PNRR įvardijamos kaip RR, pasižyminčios antiaterogeniniu poveikiu, bet kartu jos gali tapti lipidų peroksidacijos substratu. Kuo daugiau nesočiųjų jungčių turi RR, tuo lengviau ji oksiduojasi [149]. Todėl, vartojant PNRR kaip papildus, būtina su maistu gauti pakankamai antioksidantų – askorbo rūgšties, α tokoferolio, seleno, β karotenoidų ir kt.

Vyraujanti $\omega 6$ RR yra RR 20:4 $\omega 6$. Veikiama COX ir LOX, ji verčiama į PG, LT. Minėti eikozanoidai pasižymi aterogeniniu, uždegimą skatinančiu, trombogeniniu poveikiu. Tipinės $\omega 3$ RR yra RR 20:5 $\omega 3$ ir RR 22:6 $\omega 3$. Iš RR 20:5 $\omega 3$ ir RR 22:6 $\omega 3$ sintetinami eikozanoidai pasižymi priešingu veikimu nei eikozanoidai, sintetinami iš RR 20:4 $\omega 6$ [11]. RR 20:5 $\omega 3$ ir RR 22:6 $\omega 3$, kaip substratai COX, gali nukonkuruoti RR 20:4 $\omega 6$, todėl žuvų taukų, kuriuose gausu RR 20:5 $\omega 3$, vartojimas gali sumažinti iš RR 20:4 $\omega 6$ sintetinamų, uždegimą skatinančiu poveikiu pasižyminčių eikozanoidų sintezę. Toks organų apsauginis, uždegimo slopinamasis poveikis pasireiškia dėl dokoanoidų ir $\omega 3$ PNRR oksidacijos produktų – oksilipinų sintezės [150, 151].

Tuo būtų galima paaiškinti nedidelį aterosklerozės ir inkstų akmenligės paplitimą tarp Grenlandijos eskimų [152]. Remiantis šia hipoteze, eskimai turi mažesnę riziką susirgti inkstų akmenlige, nes eikozanoidų sintezė jų organizme vyksta iš dominuojančių $\omega 3$ PNRR.

Pasitelkiant eksperimentinių MS sergančių gyvūnų modelius pastebėta, kad papildai, kurių sudėtyje yra RR 20:5 $\omega 3$ ir RR 22:6 $\omega 3$, palankiai veikia inkstų funkciją, nes suintensyvėja būtent iš $\omega 3$ PNRR sintetinamų eikozanoidų – 5-hidroksieikozapentaeno rūgšties (5-HEPE), 12-HEPE, 15-HEPE, 18-HEPE gamyba [151]. Be to, iš $\omega 3$ PNRR sintetinami ir kiti lipidiniai mediatoriai (pvz., protektinai), kurie esant inkstų pažeidimui slopina neutrofilų infiltraciją, blokuoja TLR, skatinta makrofagų aktyvaciją [153].

Vis dėlto mokslinių tyrimų, kuriuose būtų vertinamas tiesioginis ryšys tarp konkrečių $\omega 3$ PNRR, $\omega 6$ PNRR bei iš jų sintetinamų eikozanoidų ir inkstų akmenligės, trūksta.

DARBO METODOLOGIJA

1. TIRIAMIEJI IR BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ TIPAS

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros laboratorijoje buvo atlikti du tyrimai, kuriuose nustatyta RR sudėtis sveikų savanorių trombocitų fosfolipidų membranoje ir pilvo riebaliniame audinyje inkstų akmenlige bei MS sergantiems pacientams.

Atsitiktiniame perspektyviajame sveikų vyrų trombocitų membranos RR sudėties sąsajos su OS žymenimis skerspjūvio tyrime, trukusiame dvejus metus, dalyvavo sveiki, atsitiktine tvarka atrinkti 79 savanoriai vyrai (vidutinis amžius $36,5 \pm 10,8$ m.), davę rašytinį sutikimą dalyvauti. Tiriamieji, kuriems buvo diagnozuota bet kuri širdies ar lėtinė liga arba yra turėję insultą ar venų trombinę emboliją, nebuvo įtraukti į tyrimą. Moterys taip pat nebuvo įtrauktos į šį tyrimą, nes vyrams anksčiau pasireiškia širdies ir kraujagyslių sutrikimai nei moterims [154]. Tyrimas atliktas gavus Vilniaus regiono Bioetikos komiteto leidimą (Nr. 15820-15-807-319) bei finansuotas Lietuvos mokslo tarybos (Nr. MIP-050/2015).

Atvejo ir kontrolės tyrimas, kuriame nagrinėta vyrų, sergančių inkstų akmenlige ir MS, pilvo riebalinio audinio RR sudėtis, truko 1,5 metų. Jame dalyvavo 71 vyras (vidutinis amžius $53,1 \pm 14,1$ m.), kuriems buvo diagnozuota inkstų akmenligė. Tiriamieji buvo hospitalizuoti Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose (atvejo grupė) ir savanoriškai raštu sutiko dalyvauti šiame tyrime. Kontrolinę sveikų asmenų grupę sudarė inkstų akmenlige nesergantys asmenys, kurie buvo suderinti su atvejo grupe pagal amžių bei lytį ($n = 100$). Visi pacientai, remiantis klinikiniais ir laboratoriniais kriterijais, buvo kruopščiai ištirti dėl MS diagnozės [155]. Šiam biomedicininiam tyrimui atlikti gauti Vilniaus regiono Bioetikos komiteto leidimai (Nr. 15820-15-807-319 ir Nr. 158200-5-053-056LP1). Tyrimas finansuotas Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondo (Nr. T-59/09/MTDS-150000-267) bei Lietuvos mokslo tarybos (Nr. MIP-111/2010).

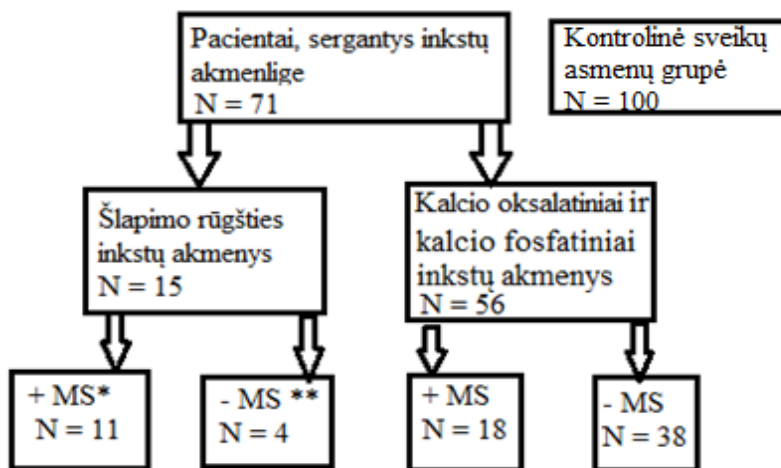
2. TIRIAMŲJŲ SUSKIRSTYMAS

Tiriant OS įtaką sveikų vyrų trombocitų membranos RR sudėčiai, pirmiausia tiriamieji buvo sugrupuoti pagal kraujo serumo MDA koncentraciją į kvartilius (Q). Q1 MDA koncentracija siekė $62,47-77,58$ $\mu\text{g/l}$ (imtis $N =$

20), Q2: 77,79–97,07 $\mu\text{g/l}$ (N = 20), Q3: 97,22–117,61 $\mu\text{g/l}$ (N = 20) ir Q4: 118,10–169,32 $\mu\text{g/l}$ (N = 19). Tada tyrimo dalyvių trombocitų membranos RR sudėtis lyginta su į kvartilius suskirstyta kraujo serumo MDA koncentracija bei apskaičiuota koreliacija tarp trombocitų membranos RR sudėties ir MDA koncentracijos kraujo serume.

Sveiki savanoriai taip pat toliau buvo sugrupuoti į kvartilius (Q) pagal trombocitų ir leukocitų (TLA) agregatų formavimosi procentą. Q1 TLA procentas siekė nuo 3,7 iki 8,3 (imtis N = 20), Q2: 8,4–9,5 (N = 19), Q3: 9,6–10,8 (N = 21) ir Q4: 10,9–14,5 (N = 19). Tada TLA formavimosi kvartiliai buvo lyginti su tiriamųjų trombocitų membranos RR spektru bei ieškota kintamųjų koreliacijos.

Pilvo riebalinio audinio RR sudėties tyrimo dalyviai, sergantys inkstų akmenlige ir MS, buvo suskirstyti į grupes pagal MS diagnozę ir inkstų akmenų tipą (14 pav.). Pilvo riebalinio audinio RR sudėtis buvo lyginta tarp skirtingų pacientų grupių, turinčių skirtingų rūšių inkstų akmenis, bei tarp pacientų ir kontrolinės sveikų asmenų grupės.



14 pav. Tyrimo dalyvių, sergančių inkstų akmenlige ir MS, pasiskirstymas. * – diagnozuotas metabolinis sindromas; ** – metabolinis sindromas nedidžiaguotas

3. TYRIMŲ METODIKA

3.1 Trombocitų išskyrimas

Tiriamųjų trombocitams gauti buvo paimta veninio kraujo į vakuuminį mėgintuvėlį su Na heparinu, centrifuguota 10 min. 3000 g. Steriliomis sąlygomis nusiurbta $\frac{3}{4}$ plazmos, nepaliečiant ląstelių ir pūkinio sluoksnio (angl. *buffy coat*). Likusi mėgintuvėlio dalis ($\frac{1}{4}$ plazmos, gausios trombocitų) išsiurbta ir sumaišyta su šaldymo terpe (Bi, Izraelis) santykiu 2:1. Toks mėginys užšaldytas šaldiklyje iki $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros. Taip paruoštas mėginys toliau saugotas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, iki trombocitai bus naudojami.

3.2 Trombocitų aktyvacijos žymenų tyrimas

Savanorių trombocitų funkcinis aktyvumas agonistais nestimuliuotame kraujyje su antikoaguliantu (EDTA) tirtas tėkmės citometrijos metodu ne vėliau negu per 10 minučių po kraujo paėmimo (BD FACS Canto, BD Biosciences, JAV). Duomenys analizuoti naudojant „BD FACS Diva“ programinę įrangą (versija 6.1.2). Leukocitų populiacijos (limfocitų, monocitų ir neutrofilų) identifikuotos pagal CD45/CD14 žymenų raiškos ypatumus: neutrofilai (CD45⁺, CD14⁻, didelė šoninė šviesos spindulio sklaida), monocitai (CD45⁺, CD14⁺, vidutinė šoninė šviesos spindulio sklaida) ir limfocitai (CD45⁺⁺, CD14⁻, maža šoninė šviesos spindulio sklaida). Tada apskaičiuota, koks procentas neutrofilų, monocitų ir limfocitų ekspresuoja CD42a žymenį. Toks žymenų derinys yra būdingas TLA ir laikomas adhezijos fazės rodikliu. Gauti tyrimų rezultatai išreikšti absoliučiais atvejų skaičiais (kiek tirtų trombocitų ekspresuoja žymenį), procentais (vertinant, kuri dalis tirtos populiacijos ekspresuoja žymenį) ir vidutiniu fluorescencijos intensyvumu (kaip stipriai švyti trombocitų populiacija, ekspresuojanti tiriamąjį žymenį). Trombocitų aktyvacijos žymenis nustatė doc. dr. R. Matuzevičienė.

3.3 Riebalų rūgščių išskyrimas ir nustatymas

3.3.1 Riebalų rūgščių išskyrimas

3.3.1.1 Lipidų ekstrakcija

Abiejuose tyrimuose dalyvavusių tiriamųjų RR buvo išskirtos taikant Folcho metodą [156]. Mėginys atšildytas ir supiltas į kolbą. Lipidų ekstrakcijai atlikti naudotas 10 ml chloroformo ir metanolio mišinys (santykiu 2:1). Taip paruoštas mėginys statytas į kratytuvą 30 min. kambario temperatūroje. Tada ekstraktas

per filtravimo popierių perfiltruotas į mėgintuvėlį su padalomis ir įpilta distiliuoto vandens (2 ml). Viskas gerai sumaišyta ir palikta per naktį nusistovėti. Kitą dieną mėgintuvėlio viršutinis (H₂O) sluoksnis nusiurbtas, o apatinis perfiltruotas per filtravimo popierių su bevandene Na₂SO₄ druska į metilinio kolbą. Taip paruoštas mėginys išgarintas naudojant rotacinį garintuvą.

3.3.1.2 Plonasluoksnė chromatografija

Tiriamųjų trombocitų membranos fosfolipidams gauti taikyta plonasluoksnė chromatografija silikageliu (Sil G-25 UV 254) [157]. Po garinimo į mėginį įpilta 300 μg chloroformo ir išmaišyta. Gautas mėginys chromatografiniu švirkštu perkeltas ant chromatografinės plokštelės su silikageliu ir panardintas į judriąją fazę (judriosios fazės sudėtis: heksanas + etilo eteris + acto rūgštis santykiu 70:30:1). Palikta frakcionuotis 1,5–2 val. Praėjus nurodytam laikui, chromatografinė plokštelė ištraukta ir palikta nudžiūti. Taip paruošta ši plokštelė vėl įdėta į chromatografinį indą su jodo kristalais gautoms frakcijoms išryškinti (trukmė – 2 val.). Išryškėjusi trombocitų membranos fosfolipidų frakcija nugramdyta nuo chromatografinės plokštelės į transesterifikacijos kolbą.

3.3.1.3 Riebalų rūgščių transesterifikacija

Abiejų tyrimų mėginiai po lipidų ekstrakcijos ir plonasluoksnės chromatografijos (pastaroji taikoma tik membranos fosfolipidams gauti) toliau yra transesterifikuojami.

Į mėginį transesterifikacijos kolboje įpilta 10 ml metanolio ir 1 ml druskos rūgšties. Transesterifikacijos kolba prijungta prie grįžtamojo šaldytuvo ir vykdyta transesterifikacija 2 val. 100 °C temperatūroje, naudojant verdančio vandens vonelę. Po transesterifikacijos kolbos turinys perpiltas į dalijimo piltuvą, įpilta 4 ml distiliuoto vandens. RR metilo esteriai išskirti įpilant 3 ml heksano. Dalijimo piltuvą su turiniu sumaišytas ir pastatytas, kad atsiskirtų frakcijos. Iš dalijimo piltuvo apatinis H₂O sluoksnis nupiltas, likęs sluoksnis su heksane ištirpusiais RR metilo esteriais per filtravimo popierių perpiltas į chromatografinį mėgintuvėlį su bevandene Na₂SO₄ druska. Taip paruoštas mėginys su RR metilo esteriais buvo naudojamas RR nustatyti taikant dujinės chromatografijos ir masių spektrometrijos metodą.

3.3.2 Riebalų rūgščių nustatymas

Po transesterifikacijos abiejų tyrimų RR sudėtis buvo nustatyta dujinės chromatografijos ir masių spektrometrijos metodu – „GCMS-QP2010

Ultra“ (Shimadzu), esant toms pačioms dujinės chromatografijos ir masių spektrometrijos sąlygoms. Gauti duomenys surinkti ir apdoroti „LabSolutions“ programine įranga (Shimadzu).

3.3.2.1 Dujinės chromatografijos ir masių spektrometrijos sąlygos

„GCMS-QP2010 Ultra“ kolonėlės Rtx-5MS ilgis – 30 m, vidinis skersmuo – 0,25 mm, nejudriosios fazės sluoksnio storis 0,25 μm . Judrioji fazė (nešančiosios dujos) – helio dujos. Dujinės chromatografijos tyrimo sąlygos pateikiamos 5 ir 6 lentelėse, masių spektrometrijos sąlygos – 7 lentelėje.

5 lentelė. Dujinės chromatografijos tyrimo sąlygos

Kolonėlės termostato temperatūra	80 °C
Injektoriaus temperatūra	250 °C
Injekcijos tipas	Su srauto dalijimu
Srauto greitis	35,0 cm/s
Srauto dalijimo santykis	1,0
Nešančiųjų dujų užsklandos srauto dalijimo santykis	10,0
Srauto valdymo režimas	Linijinis greitis
Valymo srautas	3,0 ml/min
Slėgis	58,8 kPa
Bendras srautas	4,8 ml/min
Srautas kolonėlėje	0,90 ml/min
Nešančiųjų dujų užsklandos laikas	2 min

6 lentelė. Kolonėlės termostato temperatūra




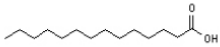
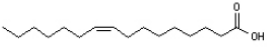
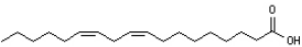
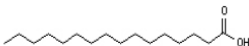
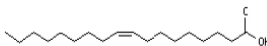
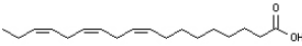
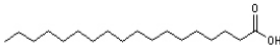
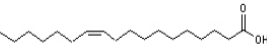
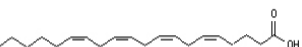
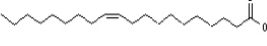
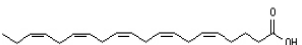
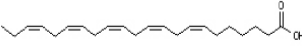
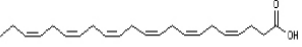
Dažnis	Temperatūra (°C)	Laikymo laikas (min)
-	80	1
6	310	5

7 lentelė. Masių spektrometrijos 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 s
Skenavimo greitis	2500
Masės intervalas m/z	29,00–500,00

Dujinės chromatografijos ir masių spektrometrijos metodu buvo nustatyta 13 RR (8 lentelė).

8 lentelė. Riebalų rūgštys, identifiкуotos trombocitų membranos fosfolipiduose ir pilvo riebaliniame audinyje

SRR*	MNRR**	PNRR***
		
14:0[#] (tetradekano / miristino) 	16:1^{##7} (9-heksadekano / palmitoleino) 	18:2^{ω6} (9,12-oktadekadieno / linolo) 
16:0 (heksadekano / palmitino) 	18:1^{ω9} (9-oktadekano / oleino) 	18:3^{ω3} (9,12,15-oktadekatrieno, α-linolenoleno) 
18:0 (oktadekano / stearino) 	18:1^{ω7} (11-oktadekano) 	20:4^{ω6} (5,8,11,14-eikozatetraeno / arachidono) 
	20:1^{ω9} (11-eikozano) 	20:5^{ω3} (5,8,11,14,17-eikozapentaeno) 
		22:5^{ω3} (7,10,13,16,19-dokozapentaeno) 
		22:6^{ω3} (4,7,10,13,16,19-dokozaheksaeno) 

SRR* – sočiosios riebalų rūgštys; MNRR** – monosočiosios riebalų rūgštys; PNRR*** – polinosočiosios riebalų rūgštys; # – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; ## – dvigubojo ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje

Abiejuose tyrimuose buvo apskaičiuota procentinė dalis kiekvienos iš 13 RR nuo bendro riebalų rūgščių kiekio (100 proc.), taip pat apskaičiuota bendroji SRR, MNRR, PNRR suma procentais, PNRR ω3 ir PNRR ω6 suma

procentais bei santykiai: PNRR ω_3 ir PNRR ω_6 , PNRR ir SRR, RR 18:2 ω_6 ir RR 20:4 ω_6 , RR 18:3 ω_3 ir RR 20:5 ω_3 bei RR 20:4 ω_6 ir RR 20:5 ω_3 .

3.4 Malono dialdehido koncentracijos kraujo serume nustatymas

Trombocitų membranos RR sudėties sąsajos su OS žymenimis tyrime dalyvavusių sveikų vyrų MDA koncentracija kraujo serume buvo nustatyta taikant G. A. Khoschoruro publikuotą metodą [158]. Po mėginio derivatizacijos su tiobarbitūro rūgštimi (TBR) gautas MDA-TBR junginys, pagal kurį, naudojant „Shimadzu Nexera X2 UHPLC“ sistemą (Shimadzu, Japonija), nustatyta MDA koncentracija kraujo serume. Gauti duomenys surinkti ir apdoroti „LabSolutions“ programine įranga (Shimadzu). MDA koncentraciją kraujo serume nustatė dr. A. Linkevičiūtė.

3.5 Cheminės inkstų akmenų sudėties analizė

Pacientų, sergančių inkstų akmenlige ir sutikusių dalyvauti vyrų, sergančių inkstų akmenlige ir MS, pilvo riebalinio audinio RR sudėties tyrime, inkstų akmenys buvo pašalinti chirurginiu būdu ir taikant Fourier transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopiją (BRUKER VERTEX 70) ištirta cheminė jų sudėtis, naudojant KBr lentelę [159]. Cheminės inkstų akmenų sudėties analizę atliko prof. dr. V. Šablinskas.

4. STATISTINĖ ANALIZĖ

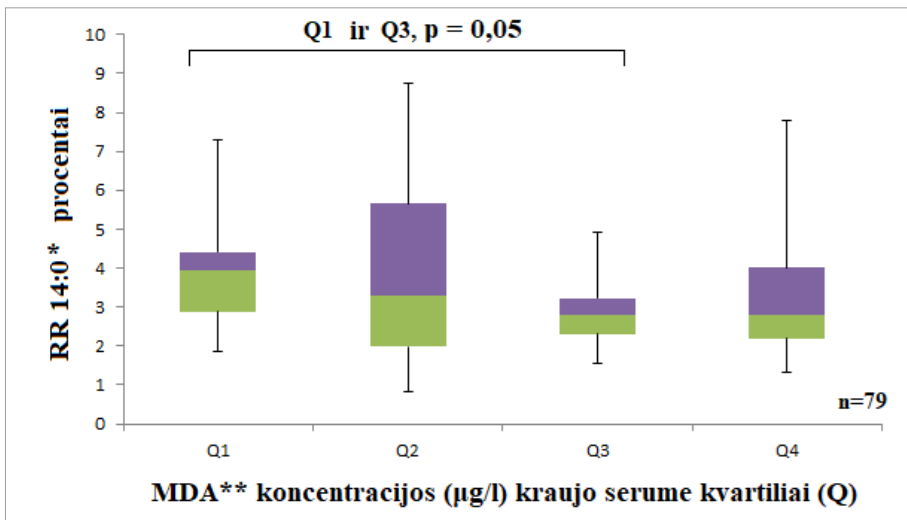
Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant „IBM SPSS“ (versija 21 ir 24) bei „Microsoft Excel“ 2013, 2016 programų paketus. Atliktų tyrimų kiekybinių duomenų atitiktis normaliam skirstiniui vertinta pagal Kolmogorovo ir Smirnovo bei Shapiro ir Wilko testus. Kiekybinių duomenų padėtis ir sklaidos dydžiai, pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, pateikti vidurkiu \pm standartiniu nuokrypiu. Duomenys, pasiskirstę ne pagal normalųjį skirstinį, išreikšti mediana, minimumu, maksimumu ir tarpkvartiliniu pločiu (TP). Pearsono χ^2 testas taikytas lyginant nepriklausomų grupių skirtumą tarp kategorinių duomenų. Ištirtų grupių duomenų, pasiskirsčiusių ne pagal normalųjį skirstinį, skirtumai buvo nustatyti taikant Manno ir Whitney U testą. Pagal normalųjį skirstinį pasiskirsčiusių kintamųjų vidurkiai buvo lyginti taikant ANOVA ir t testus. Koreliacijos tarp kintamųjų įvertintos naudojant Spearmano koreliacijos koeficientą. Skirtumas tarp dviejų imčių laikytas statistiškai reikšmingu, jei $p < 0,05$.

TYRIMŲ REZULTATAI

1. SVEIKŲ VYRŲ TROMBOCITŲ MEMBRANOS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ SUDĖTIES SAŠAJOS SU OKSIDACINIO STRESO ŽYMENIMIS TYRIMO REZULTATAI

1.1 Trombocitų membranos sočiųjų riebalų rūgščių sudėties palyginimas skirtinguose malono dialdehido koncentracijos kraujo serume kvartiliuose

Pastebėta tendencija, kad RR 14:0 šiek tiek daugiau rasta Q1, kai MDA koncentracija yra mažiausia, palyginti su Q3 ir Q4, kai MDA koncentracija didėja (Q1 ir Q3, $p = 0,05$; Q1 ir Q4, $p = 0,089$) (15 pav.).



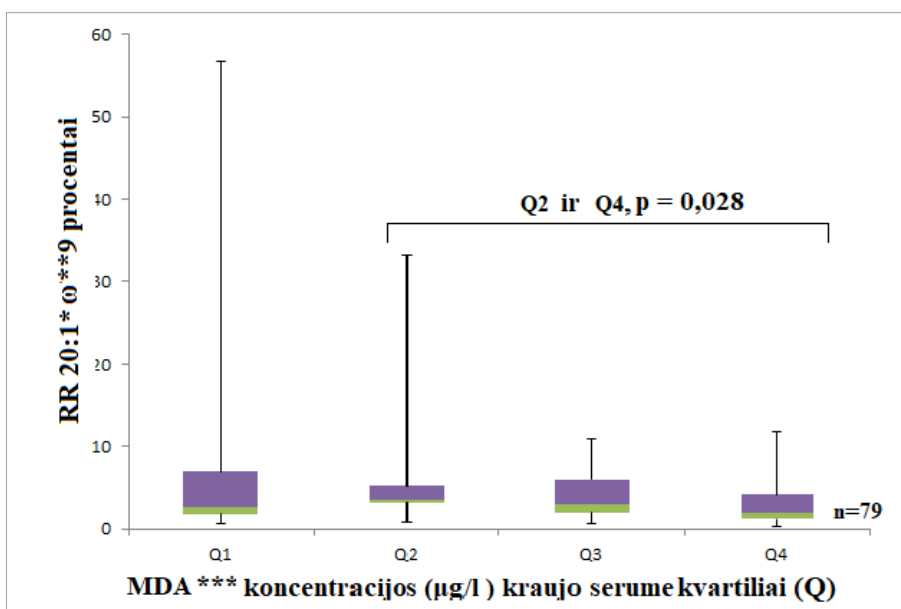
15 pav. RR 14:0 procentais palyginimas pagal kraujo serumo MDA koncentracijos ($\mu\text{g/l}$) kvartilius. Q1 ir Q3, $p = 0,05$; Q1 ir Q4, $p = 0,089$. $N = 79$. * – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius, ** – malono dialdehidas

SRR 16:0 sudaro didžiausią procentą trombocitų fosfolipidų membranoje (47 proc.). Jos pasiskirstymas yra šiek tiek didesnis pirmajame MDA koncentracijos Q, palyginti su Q2, Q3 ir Q4. Nors statistškai reikšmingo skirtumo tarp MDA koncentracijos Q1 ir Q4 nenustatyta ($p = 0,728$), tačiau šios RR didžiausias kiekis Q1 didina bendrosios SRR sumos procentą.

1.2 Trombocitų membranos mononesočiųjų riebalų rūgščių sudėties palyginimas skirtinguose malono dialdehido koncentracijos kraujo serume kvartiliuose

MNRR 16:1ω7 daugiausia aptikta Q1, kai MDA koncentracija mažiausia, lyginant su Q3 ($p = 0,021$). Pastebėta RR 18:1ω7 didėjimo tendencija, didėjant MDA koncentracijai (Q1 ir Q4, $p = 0,070$).

Didžiausią procentą iš MNRR trombocitų fosfolipidų membranoje sudarė RR 18:1ω9 (46,5 proc.). Tačiau statistiškai reikšmingai daugiau RR 20:1ω9 rasta Q2, lyginant su Q4 ($p = 0,028$), kai MDA koncentracija didžiausia (16 pav.).

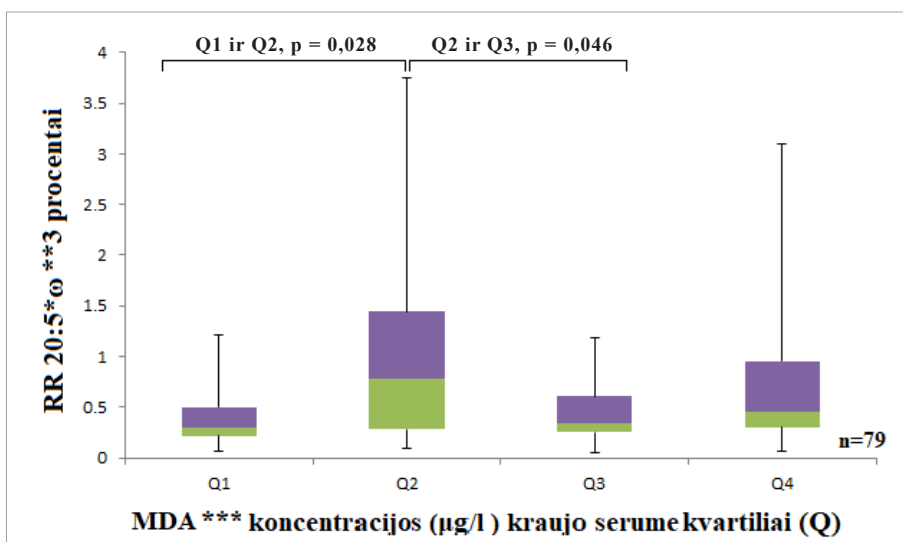


16 pav. RR 20:1ω9 procentais palyginimas pagal kraujo serumo MDA koncentracijos (μg/l) kvartilius. Q2 ir Q4, $p = 0,028$; $N = 79$. * – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius, ** – dvigubosio ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje, *** – malono dialdehidas

1.3 Trombocitų membranos polinesočiųjų riebalų rūgščių sudėties palyginimas skirtinguose malono dialdehido koncentracijos kraujo serume kvartiliuose

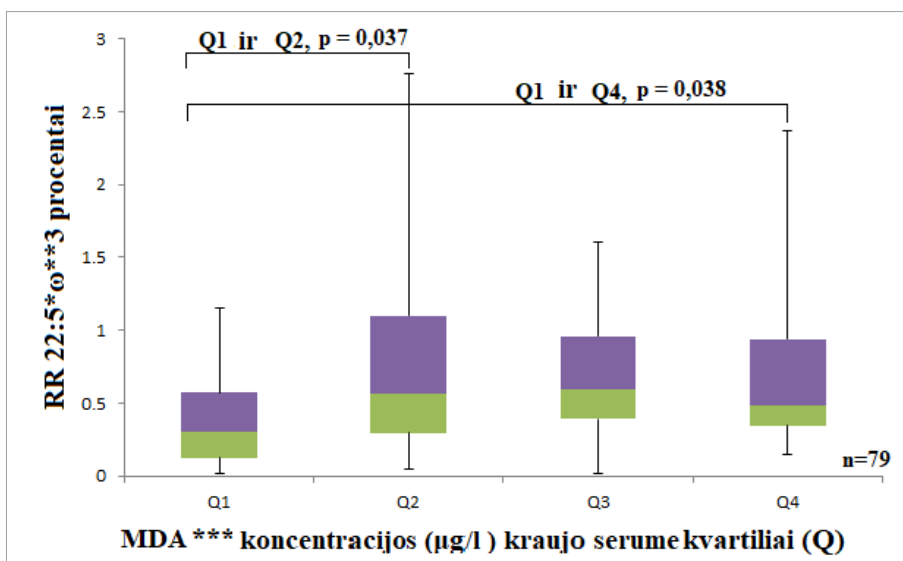
Apskaičiavus atskirai $\omega 3$ bei $\omega 6$ PNRR bendrąsias sumas pastebėta, kad esant didžiausioms MDA koncentracijos vėrtėms (Q4) $\omega 3$ ir $\omega 6$ RR bendrosios sumos didėja, o esant mažiausioms (Q1) – bendrosios sumos mažėja ($\omega 3$ $p = 0,184$, $\omega 6$ $p = 0,813$). Tačiau statistiškai reikšmingas skirtumas buvo rastas tik tarp $\omega 3$ bendrosios sumos Q1 ir Q2 kvartiliuose ($p = 0,024$).

Statistiškai reikšmingai mažiau PNRR 20:5 $\omega 3$ rasta Q1, esant mažiausiai MDA koncentracijai, lyginant su Q2 ($p = 0,028$) bei lyginant Q2 su Q3, kai MDA koncentracija yra didesnė ($p = 0,046$) (17 pav.).



17 pav. RR 20:5 $\omega 3$ procentais palyginimas pagal kraujo serumo MDA koncentracijos ($\mu\text{g/l}$) kvartilius. Q1 ir Q2, $p = 0,028$; Q2 ir Q3, $p = 0,046$. $N = 79$. * – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius, ** – dvigubosio ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje, *** – malono dialdehidas

PNRR 22:5 $\omega 3$ taip pat nustatyta statistiškai reikšmingai mažiau Q1, esant mažiausiai MDA koncentracijai, palyginti su Q2 ($p = 0,037$) ir Q4 ($p = 0,038$) (18 pav.).



18 pav. RR 22:5 ω 3 procentais palyginimas pagal kraujo serumo MDA koncentracijos ($\mu\text{g/l}$) kvartilius. Q1 ir Q2, $p = 0,037$; Q1 ir Q4, $p = 0,038$. $N = 79$. * – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius, ** – dvigubosio ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje, *** – malono dialdehididas

Esant didžiausiai MDA koncentracijai kraujo serume (Q4), PNRR 18:2 ω 6/PNRR 20:4 ω 6 santykis yra reikšmingai mažesnis, palyginti su mažiausios MDA koncentracijos kraujo serume kvartiliu (Q1) ($p = 0,038$) (9 lentelė).

9 lentelė. Trombocitų membranos RR sudėties palyginimas pagal kraujo serumo MDA koncentracijos ($\mu\text{g/l}$) kvartilius (Q1–Q4)

RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Mediana, minimumas, maksimumas, tarpkvartilinis plotis	MDA [□] koncentracijos ($\mu\text{g/l}$) kvartiliai				P reikšmė
		Q1* (n=20)	Q2* (n=20)	Q3# (n=20)	Q4## (n=19)	
RR 14:0 ^{××}	Med.	3,93	3,30	2,81	2,81	*,* p = 0,529
	Min.	1,88	0,81	1,54	1,34	*,* # p = 0,005
	Max.	7,28	8,75	4,92	7,79	*,* ## p = 0,089
	TP [§]	1,58	3,80	1,16	1,98	*,* # p = 0,231 * ## p = 0,428 # ## p = 0,627
RR 16:0	Med.	48,99	45,39	48,49	43,81	*,* p = 0,718
	Min.	20,53	32,72	37,43	29,32	*,* # p = 0,659
	Max.	65,11	59,53	63,15	63,39	*,* ## p = 0,728
	TP	18,73	13,94	9,54	18,87	*,* # p = 0,253 * ## p = 0,857 # ## p = 0,247

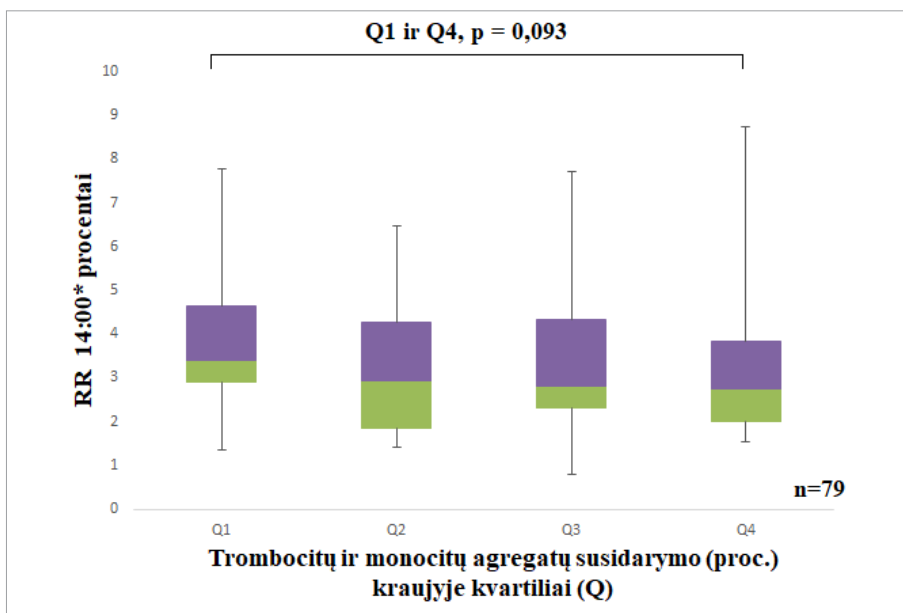
RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Mediana, minimumas, maksimumas, tarpkvartilinis plotis	MDA [□] koncentracijos (µg/l) kvartiliai				P reikšmė
		Q1* (n=20)	Q2* (n=20)	Q3# (n=20)	Q4## (n=19)	
RR 18:0	Med.	20,73	19,97	22,00	18,45	*,* p = 0,925
	Min.	8,76	11,52	16,96	11,89	*,*# p = 0,231
	Max.	26,65	27,54	43,87	28,60	*,,## p = 0,792
	TP	9,77	5,55	3,65	6,09	*,*# p = 0,060 *,,## p = 0,627 #,## p = 0,026
RR 16:1ω**7	Med.	1,63	1,37	1,12	1,59	*,* p = 0,327
	Min.	0,39	0,22	0,19	0,18	*,*# p = 0,021
	Max.	12,44	15,70	4,44	13,29	*,,## p = 0,444
	TP	3,18	2,09	1,01	1,35	*,*# p = 0,383 *,,## p = 0,879 #,## p = 0,134
RR 18:1ω7	Med.	1,06	1,01	1,27	1,38	*,* p = 0,989
	Min.	0,15	0,13	0,20	0,19	*,*# p = 0,718
	Max.	4,09	2,30	2,64	6,90	*,,## p = 0,070
	TP	0,67	1,19	1,05	0,97	*,*# p = 0,904 *,,## p = 0,158 #,## p = 0,247
RR 18:1ω9	Med.	7,31	5,69	6,79	9,79	*,* p = 0,841
	Min.	0,46	1,62	1,61	0,69	*,*# p = 0,968
	Max.	15,43	12,65	14,52	22,05	*,,## p = 0,283
	TP	7,36	8,09	5,40	7,04	*,*# p = 0,862 *,,## p = 0,120 #,## p = 0,204
RR 20:1ω9	Med.	2,65	3,56	2,92	1,98	*,* p = 0,512
	Min.	0,58	0,72	0,56	0,36	*,*# p = 0,799
	Max.	56,77	33,26	10,90	11,72	*,,## p = 0,204
	TP	6,45	2,29	4,78	3,30	*,*# p = 0,277 *,,## p = 0,028 #,## p = 0,224
RR 18:2ω6	Med.	5,08	4,33	6,19	6,75	*,* p = 0,738
	Min.	2,01	0,54	1,68	0,40	*,*# p = 0,862
	Max.	20,12	19,82	17,03	21,46	*,,## p = 0,901
	TP	6,11	7,92	8,24	9,21	*,*# p = 0,758 *,,## p = 0,967 #,## p = 0,999
RR 18:3ω3	Med.	1,10	1,96	1,58	1,82	*,* p = 0,369
	Min.	0,35	0,28	0,65	0,03	*,*# p = 0,289
	Max.	5,43	6,08	5,71	21,66	*,,## p = 0,569
	TP	2,23	2,37	1,75	1,93	*,*# p = 0,659 *,,## p = 0,607 #,## p = 0,792

RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Mediana, minimumas, maksimumas, tarpkvartilinis plotis	MDA [□] koncentracijos (µg/l) kvartiliai				P reikšmė
		Q1* (n=20)	Q2* (n=20)	Q3# (n=20)	Q4## (n=19)	
RR 20:4ω6	Med.	0,63	0,92	0,96	1,08	*,* # p = 0,201
	Min.	0,09	0,21	0,02	0,07	*,* # p = 0,478
	Max.	7,84	8,31	5,84	9,01	*,* ## p = 0,235
	TP	1,42	1,60	1,56	2,54	*,* ## p = 0,620 * ## p = 0,923 # ## p = 0,569
RR 20:5ω3	Med.	0,30	0,78	0,34	0,46	*,* # p = 0,028
	Min.	0,06	0,10	0,05	0,06	*,* # p = 0,698
	Max.	1,21	3,75	1,18	3,10	*,* ## p = 0,141
	TP	0,38	1,21	0,41	0,73	*,* ## p = 0,046 * ## p = 0,365 # ## p = 0,309
RR 22:5ω3	Med.	0,31	0,57	0,59	0,48	*,* # p = 0,037
	Min.	0,02	0,05	0,02	0,15	*,* # p = 0,052
	Max.	1,15	2,76	1,61	2,37	*,* ## p = 0,038
	TP	0,52	1,07	0,64	0,72	*,* # p = 0,820 * ## p = 0,923 # ## p = 0,923
RR 22:6ω3	Med.	0,37	0,97	0,68	0,70	*,* # p = 0,265
	Min.	0,02	0,06	0,03	0,13	*,* # p = 0,602
	Max.	2,40	3,58	2,24	3,95	*,* ## p = 0,141
	TP	1,09	1,80	0,64	1,67	*,* # p = 0,289 * ## p = 0,923 # ## p = 0,513
Σ*** SRR (RR 14:0 + RR 16:0 + RR 18:0)	Med.	73,42	68,98	74,56	65,95	*,* # p = 0,820
	Min.	31,17	49,60	57,28	45,78	*,* # p = 0,529
	Max.	93,00	87,77	90,51	92,59	*,* ## p = 0,607
	TP	27,50	23,72	15,79	26,18	*,* # p = 0,253 * ## p = 0,687 # ## p = 0,141
Σ MNRR	Med.	14,54	15,23	13,33	16,99	*,* # p = 0,883
	Min.	3,69	5,15	5,04	5,05	*,* # p = 0,383
	Max.	62,80	36,57	22,50	32,99	*,* ## p = 0,771
	TP	12,78	10,28	7,94	8,10	*,* # p = 0,341 * ## p = 0,687 # ## p = 0,158
Σ PNRR	Med.	9,80	13,89	11,15	13,09	*,* # p = 0,314
	Min.	3,31	4,04	3,83	1,33	*,* # p = 0,314
	Max.	34,22	33,89	26,42	34,97	*,* ## p = 0,336
	TP	7,32	12,82	8,62	19,59	*,* # p = 0,659 * ## p = 0,945 # ## p = 0,569

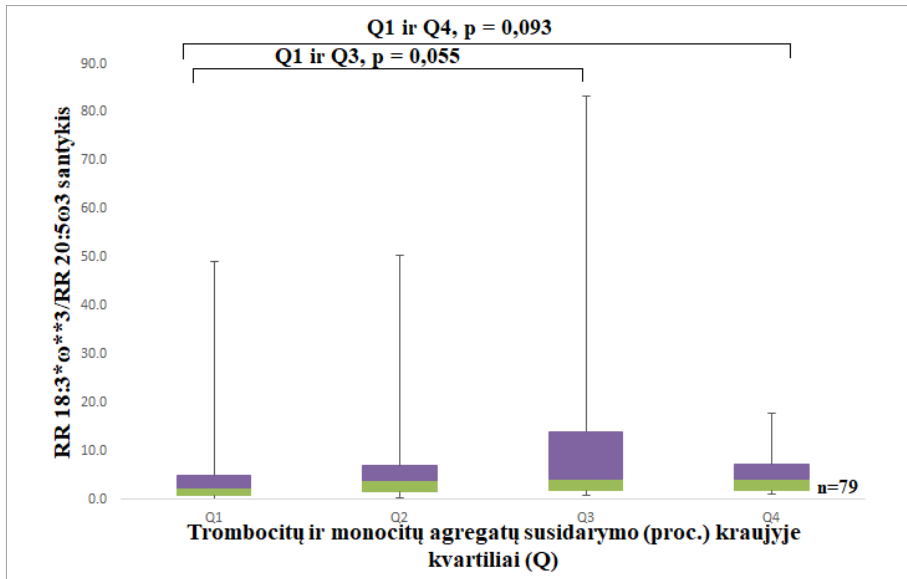
Siekiant nustatyti koreliaciją tarp MDA koncentracijos ir trombocitų membranos RR sudėties, buvo taikytas Spearmano testas, kuris parodė silpną, tačiau statistiškai reikšmingą atvirkštinę koreliaciją tarp RR 14:0 ir MDA koncentracijos ($r = -0,255$; $p = 0,023$) bei tarp MDA koncentracijos ir RR 18:2 ω 6/RR 20:4 ω 6 santykio ($r = -0,244$; $p = 0,034$) (11 lentelė).

1.4 Trombocitų membranos sočiųjų, mononesočiųjų ir polinesočiųjų riebalų rūgščių sudėties sąsąjū su trombocitų ir leukocitų agregatų formavimusi nustatymas

Lyginant disertacijos autorės gautus trombocitų membranos RR sudėties duomenis su trombocitų ir monocitų agregatų (TMA) susidarymo procentu buvo nustatyta, kad, didėjant agregatų susidarymo procentui, didėja MNRR ir PNRR bendrosios sumos bei mažėja SRR bendroji suma, tačiau skirtumai nėra statistiškai reikšmingi. Vis dėlto konstatuota RR 14:0 bei PNRR 18:3 ω 3/PNRR 20:5 ω 3 santykio didėjimo tendencija, lyginant mažiausią (Q1) ir didžiausią (Q4) TMA susidarymo procentą ($p = 0,093$) (19 pav. ir 20 pav.). Duomenys, gauti vertinant kitų TLA (granulocitų ir limfocitų) formavimosi procentą ir trombocitų membranos RR sudėties tarpusavio skirtumus, nebuvo statistiškai reikšmingi (10 lentelė).



19 pav. RR 14:0 procentais palyginimas pagal trombocitų ir monocitų agregatų susidarymo (proc.) kraujyje kvartilius. Q1 ir Q4, $p = 0,093$. $N = 79$. * – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius



20 pav. RR 18:3ω3/RR 20:5ω3 procentais palyginimas pagal trombocitų ir monocitų agregatų susidarymo (proc.) kraujyje kvartilius. Q1 ir Q3, p = 0,055; Q1 ir Q4, p = 0,093. N = 79. * – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; ** – dvigubosio ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje

10 lentelė. Tam tikrų trombocitų membranos RR palyginimas pagal TMA formavimosi (proc.) kvartilius

RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Mediana, minimumas, maksimumas, tarpkvartilinis plotis	TMA susidarymo procento kvartiliai				P reikšmė
		Q1* (n=20)	Q2 ^x (n=19)	Q3 [#] (n=21)	Q4 ^{##} (n=19)	
RR 14:0 ^x	Med.	3,39	2,93	2,81	2,76	[*] , ^x p=0,204
	Min.	1,34	1,42	0,81	1,54	[*] , [#] p=0,197
	Max.	7,79	6,48	7,70	8,75	[*] , ^{##} p=0,093
	TP ^s	1,75	2,43	2,03	1,85	^x , [#] p=0,936 ^x , ^{##} p=0,822 [#] , ^{##} p=0,791
Σ ^{**} SRR (RR 14:0 + RR 16:0 + RR 18:0)	Med.	77,45	63,57	70,64	73,04	[*] , ^x p=0,194
	Min.	45,78	49,06	31,17	49,11	[*] , [#] p=0,291
	Max.	87,77	93,00	92,59	92,46	[*] , ^{##} p=0,696 ^x , [#] p=0,872
	TP	16,55	27,75	25,31	18,02	^x , ^{##} p=0,298 [#] , ^{##} p=0,512

RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Mediana, minimumas, maksimumas, tarpkvartilinis plotis	TMA susidarymo procento kvartiliai				P reikšmė
		Q1* (n=20)	Q2 ^x (n=19)	Q3 [#] (n=21)	Q4 ^{##} (n=19)	
Σ MNRR	Med.	13,33	16,91	15,40	15,16	^{*,x} p=0,336
	Min.	5,15	3,69	5,04	5,05	^{*,#} p=0,449
	Max.	32,99	36,57	62,80	23,83	^{*,##} p=0,942
	TP	7,56	9,59	5,94	9,34	^{x,#} p=0,649 ^{x,##} p=0,233 ^{#,##} p=0,606
Σ PNRR	Med.	9,51	15,30	10,63	11,47	^{*,x} p=0,283
	Min.	4,28	3,31	1,33	2,49	^{*,#} p=0,648
	Max.	24,84	34,97	33,89	34,22	^{*,##} p=0,633
	TP	9,33	18,37	10,18	10,37	^{x,#} p=0,555 ^{x,##} p=0,599 ^{#,##} p=0,856
RR 18:3ω ^{***3} / RR 20:5ω3 santykis	Med.	2,21	3,91	4,06	4,16	^{*,x} p=0,184
	Min.	0,04	0,26	0,67	1,04	^{*,#} p=0,055
	Max.	49,00	50,44	83,31	17,83	^{*,##} p=0,093
	TP	4,15	5,47	12,24	5,47	^{x,#} p=0,294 ^{x,##} p=0,799 ^{#,##} p=0,587

SRR – sočiosios riebalų rūgštys; MNRR – mononesočiosios riebalų rūgštys; PNRR – polinesočiosios riebalų rūgštys; ◊ – riebalų rūgštys; □ – trombocitų ir monocitų agregatai; * – pirmas kvartilis (Q1); ^x – antras kvartilis (Q2); # – trečias kvartilis (Q3); ## – ketvirtas kvartilis (Q4); § – tarpkvartilinis plotis; ^{xx} – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; ^{**} – bendroji suma procentais; ^{***} – dvigubojo ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje

Taip pat nustatyta silpna, tačiau statistiškai reikšminga atvirkštinė koreliacija tarp TMA formavimosi ir RR 14:0 ($r = -0,222$; $p = 0,050$) (11 lentelė).

11 lentelė. Trombocitų membranos RR sudėties koreliacija su kraujo serumo MDA koncentracija ($\mu\text{g/l}$) ir TMA susidarymo procentu

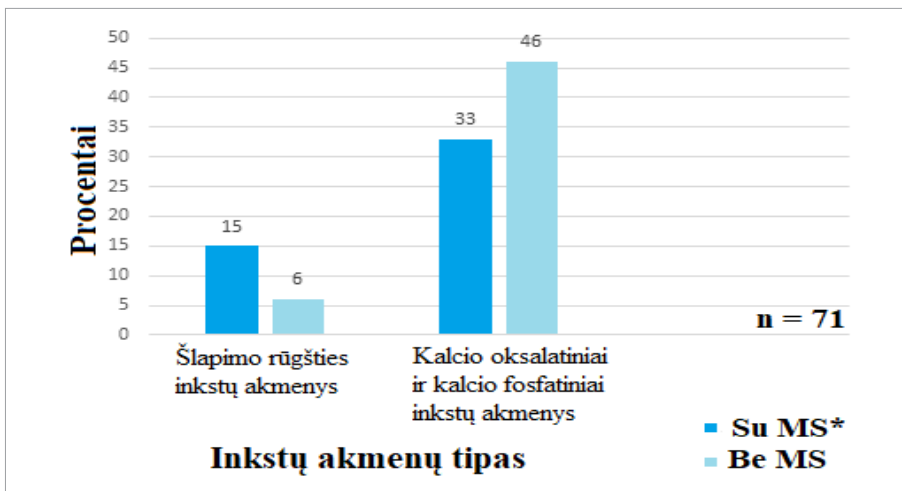
RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Spearmano r		P reikšmė	
	MDA* koncentracija ($\mu\text{g/l}$)	TMA** (proc.)	MDA koncentracija ($\mu\text{g/l}$)	TMA (proc.)
RR 14:0*	-0,255	-0,222	0,023	0,050
RR 18:2ω ^{xx6} / RR 20:4ω6 santykis	-0,244	–	0,034	–

◊ – riebalų rūgštys; * – malono dialdehididas; ** – trombocitų ir monocitų agregatai; ^x – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; ^{xx} – dvigubojo ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje

2. VYRŲ, SERGANČIŲ INKSTŲ AKMENLIGE IR METABOLINIŲ SINDROMU, PILVO RIEBALINIO AUDINIO RIEBALŲ RŪGŠČIŲ SUDĖTIES TYRIMO REZULTATAI

2.1 Pacientų, sergančių inkstų akmenlige, pasiskirstymas pagal inkstų akmenų tipą ir metabolinio sindromo diagnozę

Kalcio oksalatiniai ir kalcio fosfatiniai inkstų akmenys sudarė didžiausią dalį pacientams, sergantiems inkstų akmenlige (21 pav.), o šlapimo rūgšties (uratiniai) akmenys – mažiausią. Tolesniam tyrimui pacientai, sergantys inkstų akmenlige, buvo suskirstyti į dvi grupes. Pirmai grupei priskirti tiriamieji, kuriems diagnozuotas MS (32,4 proc.), antrai grupei – tiriamieji, kuriems nebuvo diagnozuotas MS (67,6 proc.). 70 proc. pacientų, kuriems buvo rasta šlapimo rūgšties inkstų akmenų, ir tik 41 proc. asmenų, kuriems rasta kalcio oksalatinų ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų, buvo diagnozuotas MS. Šis sindromas buvo du kartus dažnesnis asmenims, turintiems šlapimo rūgšties akmenų, nei pacientams, turintiems kalcio oksalatinų ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų. Be to, MS buvo statistiškai reikšmingai dažnesnis tiriamiesiems, turintiems šlapimo rūgšties inkstų akmenų, palyginti su asmenimis, kuriems rasta kalcio oksalatinų ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų ($p = 0,004$).



21 pav. Pacientų, sergančių inkstų akmenlige, pasiskirstymas pagal inkstų akmenų tipą ir MS. MS* – metabolinis sindromas

2.2 Inkstų akmenlige sergančių tiriamųjų grupių riebalų rūgščių sudėties palyginimas pagal inkstų akmenų tipą ir metabolinio sindromo diagnozę

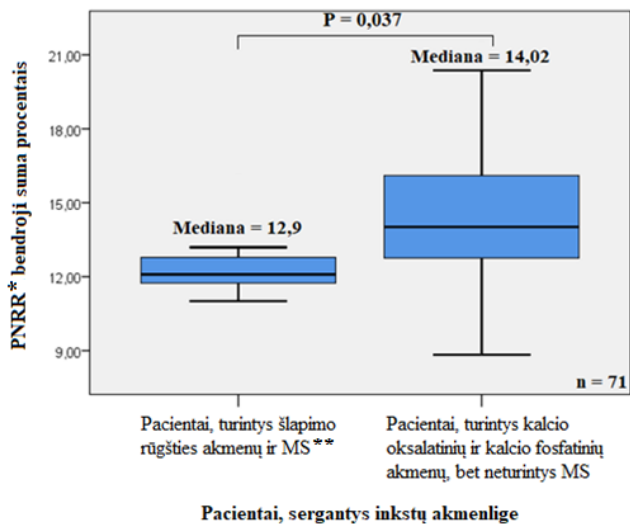
Visi pacientai, kuriems rasta šlapimo rūgšties bei kalcio oksalatinių ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų, buvo suskirstyti į dvi grupes: turinčių MS ir šio sindromo neturinčių (12 lentelė). Bendrosios sumos PNRR (22 pav.), ω6 PNRR (23 pav.) ir RR 18:2ω6 (24 pav.) procentai buvo statistiškai reikšmingai didesni pacientų, turinčių kalcio oksalatinių ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų ir nesergančių MS, palyginti su tiriamaisiais, kuriems diagnozuoti šlapimo rūgšties inkstų akmenys ir MS.

12 lentelė. Pacientų, turinčių šlapimo rūgšties inkstų akmenų ir MS, ir pacientų, turinčių kalcio oksalatinių ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų ir nesergančių MS, pilvo riebalinio audinio RR sudėties palyginimas

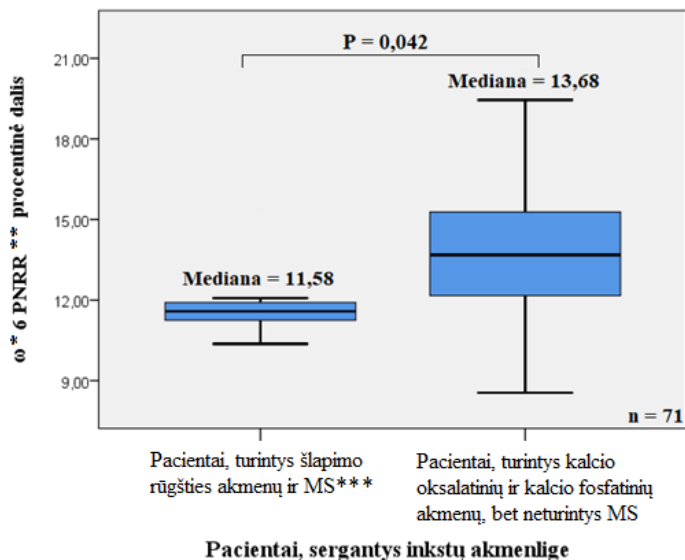
RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Pacientai, turintys šlapimo rūgšties inkstų akmenų (n=11)		Pacientai, turintys kalcio oksalatinių ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų (n=38)		P reikšmė
	Su MS [#]		Be MS		
	Vidurkis ± standartinis nuokrypis				
Σ*PNRR	12,61 ± 1,70	14,64 ± 2,88	12,61 ± 1,70	14,64 ± 2,88	p = 0,037
Σ ω**6	11,94 ± 1,6	13,97 ± 2,71	11,94 ± 1,6	13,97 ± 2,71	p = 0,042
RR 18:2***ω6	11,62 ± 1,57	13,55 ± 2,61	11,62 ± 1,57	13,55 ± 2,61	p = 0,042

PNRR – polinesočiosios riebalų rūgštys; ◊ – riebalų rūgštys; * – bendroji suma; ** – dvigubų ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje; *** – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; # – metabolinis sindromas

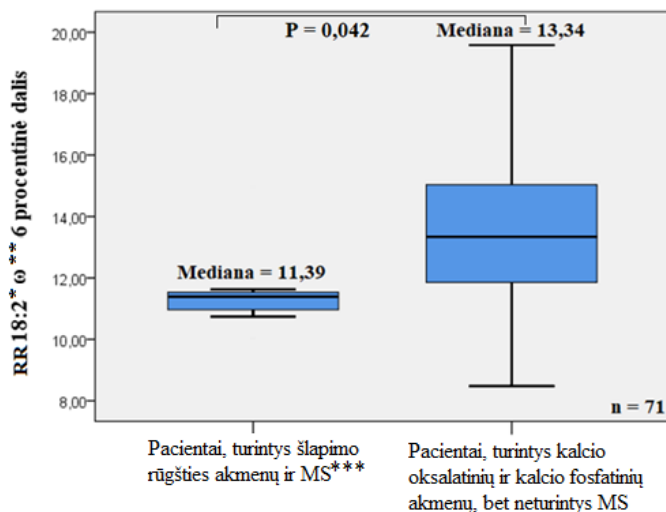
Kitų riebalų rūgščių (RR 14:0, RR 16:0, RR 18:0, RR 16:1ω7, RR 18:1ω9, RR 18:1ω7, RR 20:1ω9), išreikštų procentais nuo bendrosios sumos (100 proc.), vidurkis ir standartinis nuokrypis nebuvo statistiškai reikšmingi.



22 pav. Pacientų, kuriems nustatyta šlapimo rūgšties inkstų akmenų ir MS, ir MS neturinčių pacientų, kuriems rasta kalcio oksalatinų ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų, PNRR bendrosios sumos procentais palyginimas. $P = 0,037$. $N = 71$. * – polinesočiosios riebalų rūgštys, ** – metabolinis sindromas



23 pav. Pacientų, kuriems nustatyta šlapimo rūgšties inkstų akmenų ir MS, ir MS neturinčių pacientų, kuriems rasta kalcio oksalatinų ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų, $\omega 6$ PNRR procentinės dalies palyginimas. $P = 0,042$. $N = 71$. * – dvigubojio ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje, ** – polinesočiosios riebalų rūgštys, *** – metabolinis sindromas

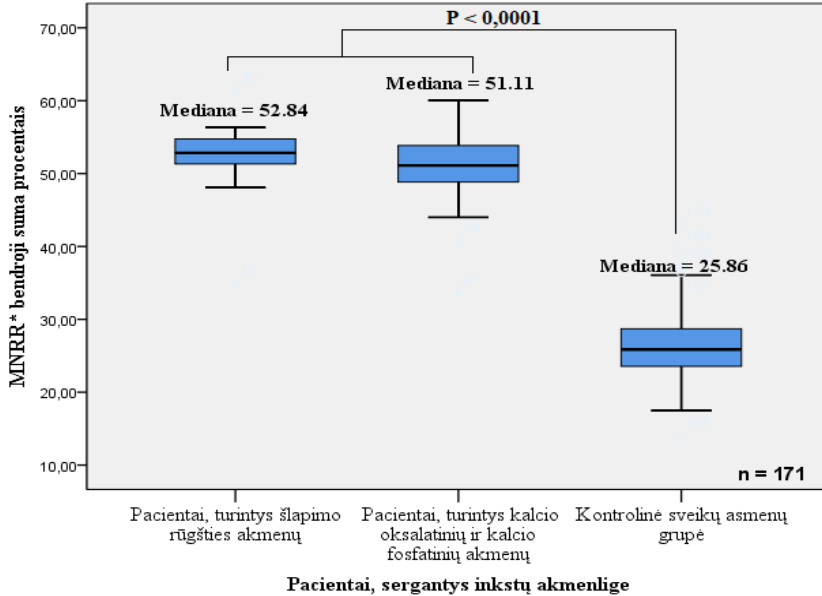


Pacientai, sergantys inkstų akmenlige

24 pav. Pacientų, kuriems nustatyta šlapimo rūgšties inkstų akmenų ir MS, ir šio sindromo neturinčių pacientų, kuriems rasta kalcio oksalatinių ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų, RR 18:2 ω 6 procentinės dalies palyginimas. $P = 0,042$. $N = 71$. * – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius, ** – dvigubojo ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje, *** – metabolinis sindromas

2.3 Pacientų, sergančių inkstų akmenlige, ir kontrolinės sveikų asmenų grupės riebalų rūgščių sudėties palyginimas

Tyrimo rezultatai labai skyrėsi visose pacientų grupėse, palyginti su kontroline sveikų asmenų grupe (13 lentelė). MNRR kiekis pacientams, kuriems rasta šlapimo rūgšties bei kalcio oksalatinių ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų, buvo du kartus didesnis nei kontrolinės sveikų asmenų grupės ($p < 0,0001$) (25 pav.) (RR 18:1 ω 9 buvo vyraujanti).



25 pav. Visų pacientų grupių ir kontrolinės sveikų asmenų grupės MNRR bendrosios sumos procentais palyginimas. $P < 0,0001$. $N = 171$. * – mononesočiosios riebalų rūgštys

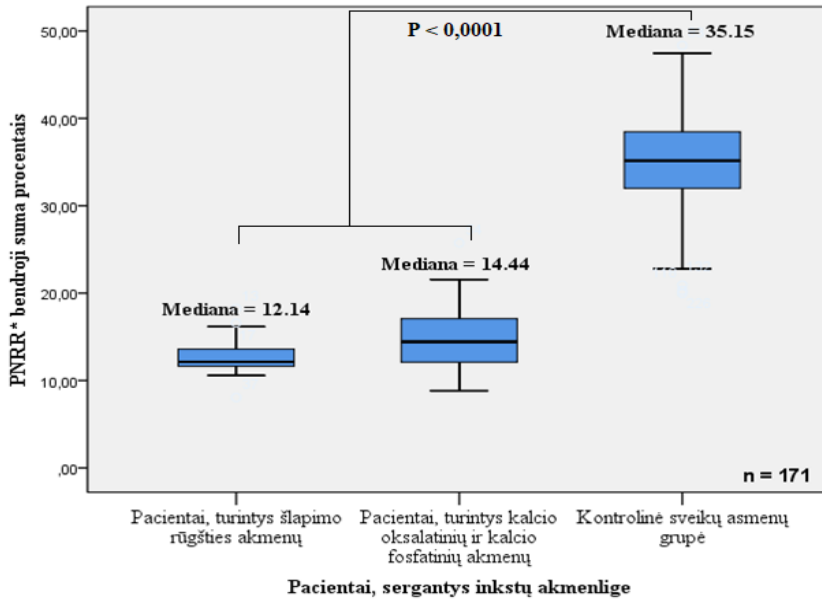
13 lentelė. Pacientų, sergančių inkstų akmenlige, ir kontrolinės sveikų asmenų grupės pilvo riebalinio audinio RR sudėties palyginimas

RR [⊖] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Šlapimo rūgštis akmenys* (n=15)	Kalcio oksalatiniai ir kalcio fosfatiniai akmenys † (n=56)	Kontrolinė sveikų asmenų grupė ‡ (n=100)	P reikšmė
	Vidurkis ± standartinis nuokrypis			
RR18:1 [⊖] * [⊖] **9	44,37±3,35	42,40±4,38	22,71±3,69	*, †‡, p < 0,0001
RR 20:1 [⊖] 9	1,09±0,21	1,03±0,56	0,56±0,48	*, †‡, p < 0,0001
RR 18:3 [⊖] 3	0,15±0,03	0,20±0,11	1,12±0,54	*, †‡, p < 0,0001
RR 22:5 [⊖] 3	0,19±0,09	0,20±0,15	0,39±0,27	*, †‡, p = 0,002
ω3/ω6 santykis	0,05±0,02	0,04±0,02	1,13±0,28	*, †‡, p < 0,0001
Σ*** SRR (RR 14:0 + RR 16:0 + RR 18:0)	34,67±3,03	33,55±2,81	32,14±5,29	*‡, p = 1,0 †‡, p = 0,608
Σ MNRR	53,07±3,54	51,78±3,84	26,2±4,27	*, †‡, p < 0,0001
Σ PNRR	12,66±2,47	14,67±3,47	35,13±4,84	*, †‡, p < 0,0001
PNRR/SRR santykis	0,37±0,085	0,44±0,12	1,13±0,29	*, †‡, p < 0,0001

RR [⊖] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Šlapimo rūgštis akmenys* (n=15)	Kalcio oksalatiniai ir kalcio fosfatiniai akmenys † (n=56)	Kontrolinė sveikų asmenų grupė ‡ (n=100)	P reikšmė
Σ ω3	0,63±0,26	0,7±0,44	4,5±1,46	*, †‡, p < 0,0001
Σ ω6	12,03±2,33	13,97±3,13	27,92±4,56	*, †‡, p < 0,0001
RR 14:0	3,33±0,74	3,56±3,5	4,5±2,34	p > 0,05
RR 16:0	24,88±1,74	24,8±2,04	21,91±2,4	*‡, p = 0,001 †‡, p < 0,0001
RR 18:0	6,06±1,34	5,19±1,09	6,49±1,05	*, †‡, p > 0,05 †‡, p < 0,0001
RR 16:1ω7	5,08±1,68	5,7±1,68	3,48±0,99	*‡, p = 0,003 †‡, p < 0,0001
RR 18:2ω6	11,75±2,3	13,58±2,99	22,59±3,98	*, †‡, p < 0,0001
RR 20:4ω6	0,28±0,1	0,39±0,24	5,33±1,11	*, †‡, p < 0,0001
RR 20:5ω3	0,09±0,05	0,11±0,07	1,06±0,68	*, †‡, p < 0,0001
RR 22:6ω3	0,19±0,12	0,19±0,15	1,93±0,73	*, †‡, p < 0,0001

SRR – sočiosios riebalų rūgštys; MNRR – mononesočiosios riebalų rūgštys; PNRR – polinesočiosios riebalų rūgštys; ⊖ – riebalų rūgštys; * – pacientai, turintys šlapimo rūgštis inkstų akmenų; † – pacientai, turintys kalcio oksalatinį ir kalcio fosfatinį inkstų akmenų; ‡ – kontrolinė grupė; × – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; ** – dvigubąjo ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje; *** – bendroji suma procentais

PNRR lygis buvo 2,4–2,8 karto mažesnis visose inkstų akmenligės pacientų grupėse, palyginti su kontroline sveikų asmenų grupe (p < 0,0001) (26 pav.). ω3 ir ω6 PNRR santykis buvo didesnis kontrolinėje sveikų asmenų grupėje nei pacientų, sergančių inkstų akmenlige. Bendroji SRR suma kiekvienoje pacientų grupėje buvo labai panaši lyginant su kontroline sveikų asmenų grupe. Pacientams, sergantiems inkstų akmenlige, rastas didesnis kiekis RR 16:0 (p = 0,001; p < 0,0001) ir panašus kiekis RR 14:0 (p > 0,05) kaip ir kontrolinėje sveikų asmenų grupėje. Tačiau pacientai, turintys kalcio oksalatinį ir kalcio fosfatinį inkstų akmenų, pasižymėjo mažesniu RR 18:0 kiekiu nei kontrolinės sveikų asmenų grupės tiriamieji (p < 0,0001).



26 pav. Visų pacientų grupių ir kontrolinės sveikų asmenų grupės PNRR bendrosios sumos procentais palyginimas. $P < 0,0001$. $N = 171$. * – polinesočiosios riebalų rūgštys

2.4 Pacientų, kuriems diagnozuota inkstų akmenligė su metaboliniu sindromu ir be metabolinio sindromo, bei kontrolinės sveikų asmenų grupės riebalų rūgščių sudėties palyginimas

Tolesniam tyrimui visi pacientai, sergantys inkstų akmenlige, buvo suskirstyti į dvi grupes: į tuos, kurie turi MS, ir į tuos, kurie šio sindromo neturi. Kiekviena grupė buvo lyginama su kontroline sveikų asmenų grupe (14 lentelė). MS turinčių pacientų RR 18:1ω9 kiekis buvo gerokai didesnis ($p = 0,041$) ir RR 16:1ω7 kiekis mažesnis ($p = 0,003$) negu pacientų be MS. Bendras MNRR kiekis buvo vienodas abiejose (su MS ir be MS) inkstų akmenligės pacientų grupėse ($p = 0,762$), tačiau du kartus didesnis negu kontrolinės sveikų asmenų grupės ($p < 0,0001$).

14 lentelė. Pacientų, sergančių inkstų akmenlige su MS ir be MS, bei kontrolinės sveikų asmenų grupės pilvo riebalinio audinio RR sudėties palyginimas

RR [◊] (procentai nuo bendro RR kiekio)	Pacientai (n=71)		Kontrolinė sveikų asmenų grupė ‡ (n=100)	P reikšmė
	Be MS* (n=48)	Su MS† (n=23)		
Vidurkis ± standartinis nuokrypis				
RR 18:1 [×] ω**9	40,79±7,52	43,77±4,61	22,71±3,69	*†, p = 0,041 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 20:1ω9	1,26±0,80	0,92±0,35	0,56±0,48	*†, p = 0,199 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 18:3ω3	0,22±0,17	0,21±0,13	1,12±0,54	*†, p = 0,858 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 22:5ω3	0,23±0,23	0,21±0,17	0,39±0,27	*†, p = 0,941 **‡, †‡, p < 0,0001
ω3/ω6 santykis	0,05±0,03	0,05±0,02	1,13±0,28	*†, p = 0,912 **‡, †‡, p < 0,0001
Σ ***SFA (RR 14:0 + RR 16:0 + RR 18:0)	34,54±3,89	33,62±2,88	32,14±5,29	*†, p = 1,0 **‡, p = 0,008 †‡, p = 0,518
Σ MUFA	51,04±4,93	52,30±3,91	26,19±4,27	*†, p = 0,762 **‡, †‡, p < 0,0001
Σ PUFA	14,42±3,08	14,07±3,78	35,13±4,84	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
PUFA/SFA santykis	0,42±0,1	0,42±0,13	1,13±0,29	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
Σ ω3	0,76±0,58	0,72±0,52	4,5±1,46	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
Σ ω6	13,67±2,82	13,36±3,34	27,91±4,56	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 14:0	3,8±1,13	3,3±0,81	4,49±2,34	*†, p = 1,0 **‡, p = 0,124 †‡, p = 0,029
RR 16:0	25,01±2,51	24,94±2,05	21,9±2,4	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 18:0	5,72±1,44	5,38±1,1	6,49±1,05	*†, p = 0,709 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 16:1ω7	6,23±2,41	5,03±1,65	3,48±0,99	*†, p = 0,003 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 18:2ω6	13,25±2,7	13,02±3,2	22,59±3,98	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 20:4ω6	0,42±0,3	0,34±0,23	5,33±1,11	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 20:5ω3	0,11±0,07	0,1±0,08	1,06±0,68	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001
RR 22:6ω3	0,19±0,15	0,19±0,17	1,92±0,73	*†, p = 1,0 **‡, †‡, p < 0,0001

SRR – sočiosios riebalų rūgštys; MNRR – mononesočiosios riebalų rūgštys; PNRR – poli-nesočiosios riebalų rūgštys; ◊ – riebalų rūgštys; * – pacientai, sergantys inkstų akmenlige be MS; † – pacientai, sergantys inkstų akmenlige su MS; ‡ – kontrolinė grupė; × – anglies atomų ir dvigubųjų ryšių skaičius; ** – dvigubosio ryšio padėtis tarp anglies atomų molekulėje; *** – bendroji suma procentais.

Be to, ω_3 PNRR kiekis kontrolinėje sveikų asmenų grupėje buvo apie 6,3 karto ($p < 0,0001$) didesnis, o ω_6 PNPP kiekis – 2 kartus didesnis nei abiejose pacientų, sergančių inkstų akmenlige, grupėse ($p < 0,0001$). ω_3/ω_6 PNRR santykis kontrolinėje sveikų asmenų grupėje taip pat buvo didesnis nei kiekvienoje pacientų grupėje ($p < 0,0001$).

REZULTATŲ APTARIMAS

Šiandien visame pasaulyje lėtinės neinfekcinės ligos (LNL) siekia epidemijos mastą. Šios ligos pažeidžia visų amžiaus grupių, regionų ir šalių žmones bei sudaro pagrindinę mirties ir negalios priežastį [160]. Visoms LNL grupėms, nepaisant skirtingų organų ir sistemų pažeidimų, būdingas bendras rizikos veiksnys, arba pradinis taškas, – tai kliniškai nebylus mažo laipsnio uždegimo procesas [161]. Uždegimas kartu su OS – tai esminiai procesai, lemiantys širdies ir kraujagyslių ligų, aterosklerozės bei inkstų pažeidimų vystymąsi ir progresavimą [162]. Todėl šiame disertaciniame darbe, remiantis atliktų tyrimų rezultatais, taip pat siekta paanalizuoti OS poveikį LNL patogenezei.

Duomenys parodė, kad sveikų savanorių trombocitų membranos fosfolipiduose didžiausią RR dalį sudaro SRR. Labai panašius SRR kiekio trombocitų membranoje rezultatus gavo ir kitų šalių mokslininkai [163–166]. Tyrėjai nustatė, kad RR 16:0 sudaro pagrindinę trombocitų membranos RR [167]. Šioje disertacijoje pristatyti tyrimo duomenys yra identiški. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad SRR, esančios ląstelių membranose, yra glaudžiai susijusios su signalo mechanizmais, pavyzdžiui, RR 14:00 ir RR 16:00 kovalentiniu būdu modifikuoja baltymus, kurie perduoda signalą, bei dalyvauja reguliuojant transkripcijos faktorių, darančių įtaką lipidų metabolizmui: cholesterolio, RR ir TAG biosintezę, lipoproteinų sudėtį, sekreciją ir klirensą (pvz., hepatocitų branduolio faktorius-4) bei uždegimo procesą (pvz., NK-κB) [23].

Tyrimė dalyvavusiems savanoriams daugiausia MNRR 16:1ω7 nustatyta, kai kraujo serumo MDA koncentracija buvo mažiausia, tikėtina, dėl to, kad šią RR intensyviau sintetina pats organizmas iš SRR 16:00, fermentui steroilkofermento A desaturazei-1 formuojant dvigubąjį ryšį molekulėje [168], ir (ar) papildomai RR 16:1ω7 buvo gauta su maistu (augalinės kilmės maistu bei aliejais). Tokiame maiste yra nemažai antioksidantų, pavyzdžiui, riebaluose tirpus α tokoferolio, kuris galėtų būti susijęs su minėtos RR didesniu kiekiu esant mažesnei MDA koncentracijai.

Remiantis mokslinėmis publikacijomis, MNRR 18:1ω9 sudaro didžiausią RR procentą trombocitų fosfolipidinėje membranoje iš visų MNRR [163, 164, 166]. Tokią pačią tendenciją atskleidė ir šio disertacinio darbo duomenys. Tokį RR 18:1ω9 kiekio padidėjimą, esant didžiausiai MDA koncentracijai kraujo serume, galima aiškinti kaip siekį sumažinti šio OS žymens koncentraciją arba

kaip kompensaciją, kai PNRR yra aktyviai naudojamos MDA sintezei, t. y. esant $\omega 3$ ir $\omega 6$ PNRR stokai, ima spartėti RR 18:1 ω 9 sintezė, kuri yra kitų $\omega 9$ PNRR, reikalingų ląstelės membranai, pirmtakas.

Pacientams, sergantiems inkstų akmenlige, nepriklausomai nuo inkstų akmenų tipo, taip pat buvo nustatytas du kartus didesnis MNRR kiekis pilvo riebaliniame audinyje nei kontrolinėje sveikų asmenų grupėje. Tai būtų galima aiškinti tuo, kad $\omega 3$ ir $\omega 6$ PNRR trūkumas sukelia kompensacinį MNRR sintezės padidėjimą, todėl padidėja $\omega 9$ PNRR gamyba. Kita vertus, pacientų, sergančių inkstų akmenlige, mityba galėjo būti labiau papildyta MNRR nei kontrolinės sveikų asmenų grupės.

Mityba, kurioje gausu MNRR, skatina geno, koduojančio antioksidacinius fermentus, raišką riebaliniame audinyje (pvz., GTPx ir CAT) ir taip sumažinamas OS. Taigi, labai tikėtina, jog MNRR padidėjimas yra susijęs su jų sintezės intensyvėjimu organizme. Padidėjęs SRR suvartojimas skatina fermento NADPH-oksidadzės gamybą nutukusių asmenų riebaliniame audinyje, o ši, savo ruožtu, skatina ROS sintezę ir slopina genų, koduojančių antioksidacinius fermentus, raišką [122, 169]. Remiantis mokslininkų gautais rezultatais, SRR turėtų būti pakeistos MNRR, siekiant sumažinti OS asmenims, sergantiems MS [124]. Be to, eksperimentiniai tyrimai rodo, kad SRR pakeitimas MNRR sumažina riebalinio audinio uždegimą bei atsparumą insulinui [170], vadinasi – ir riziką susirgti LNL.

MS buvo du kartus dažnesnis pacientams, kuriems buvo aptikta šlapimo rūgšties inkstų akmenų, negu pacientams, turintiems kalcio fosfatinių ir kalcio oksalatinių inkstų akmenų, bet skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Remiantis naujausiais mokslinių tyrimų duomenimis, MS yra glaudžiai susijęs su šlapimo rūgšties inkstų akmenų susidarymu [171–173]. Šiuose tyrimuose šlapimo rūgšties inkstų akmenys buvo būdingesni vyresnio amžiaus pacientams, turintiems padidėjusį kūno masės indeksą, sumažėjusį šlapimo pH bei padidėjusį šlapimo rūgšties kiekį šlapime [171].

Kanados mokslininkai lygino širdies ir kraujagyslių ligomis sergančių 734 ligonių, turinčių MS ir jo neturinčių, kraujo fosfolipidų RR sudėtį. Šie mokslininkai nustatė didesnę SRR (t. y. RR 16:0, RR 18:0) ir $\omega 6$ PNRR (t. y. RR 18:3 ω 6, RR 22:6 ω 6) kiekį bei sumažėjusius $\omega 3$ PNRR (t. y. RR 20:5 ω 3 ir RR 22:6 ω 3) kiekius pacientams, sergantiems MS, palyginti su pacientais be MS [174]. Tačiau šioje disertacijoje pateikti tyrimo duomenys parodė, kad inkstų akmenlige ir MS sergančių tiriamųjų bendras SRR procentas pilvo riebaliniame audinyje nesiskyrė nuo kontrolinės sveikų asmenų grupės, vis dėlto tiriamiesiems, kuriems nebuvo diagnozuotas MS, nustatytas didesnis SRR kiekis nei kontrolinės sveikų asmenų grupės pacientams ($p = 0,008$).

Statistiškai reikšmingai mažiau RR 20:5 ω 3 buvo rasta sveikų savanorių trombocitų membranos fosfolipiduose, esant mažiausiai kraujo serumo MDA koncentracijai, tačiau statistiškai reikšmingai daugiau RR 20:5 ω 3 buvo nustatyta, kai kraujo serumo MDA koncentracija buvo didesnė. Šie rezultatai leidžia iškelti hipotezę, kad suintensyvėjusi oksidacija organizme skatina trombocitus prijungti ir gaminti daugiau PNRR (pvz., RR 20:5 ω 3), tokiu būdu padidinama biologiškai aktyvių junginių gamyba bei toliau skatinami trombocitų būsenos pokyčiai. PNRR 20:5 ω 3 sumažina riziką susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, didindama PGI₃ gamybą. Pastarasis slopina trombocitų agregaciją, išemijos sukeltą miokardo pažeidimą ir aterosklerozę, skatina vazodilataciją ir neoangiogenezę. Be to, padidėjęs PGI₃ kiekis mažina TXA₂ gamybą. Kaip žinoma, TXA₂ turi priešingą poveikį širdies ir kraujagyslių sistemai: sukelia trombocitų aktyvaciją, vainikinių kraujagyslių spazmus bei kraujagyslių lygiųjų raumenų proliferaciją, kas gali sukelti aterosklerozinius kraujagyslių pažeidimus, o galiausiai – širdies ir kraujagyslių ligas [175]. PNRR 20:4 ω 6 ir PNRR 20:5 ω 3 veikia viena kitą antagonistiskai. RR 20:5 ω 3 konkuruoja su RR 20:4 ω 6 dėl fermento COX, kuri dalyvauja biologiškai aktyvių medžiagų sintezėje. Tokiu būdu iš RR 20:5 ω 3 sintetinami eikozanoidai slopina uždegimą ir trombo susidarymą, gali tiesiogiai slopinti trombocitų agregaciją. Tačiau iš RR 20:4 ω 6 gauti eikozanoidai pasižymi priešingu poveikiu [176–178].

Šio disertacinio tyrimo duomenys parodė, kad atskirų ω 3 ir ω 6 PNRR bendrosios sumos procentais, esant didžiausioms MDA koncentracijos vertėms kraujo serume, didėja, ir priešingai – esant mažiausioms kraujo serumo MDA koncentracijos vertėms, ω 3 ir ω 6 PNRR bendrosios sumos mažėja. Tačiau statistiškai reikšmingas skirtumas buvo rastas tik ω 3 PNRR bendrosios sumos Q1 ir Q2. Panašius rezultatus gavo ir D. Li su bendraautoriais [179]. Tokį rezultatą būtų galima aiškinti tuo, kad padidėjęs PNRR kiekis, esant didesnei MDA koncentracijai, galėtų būti trombocitų atsakas pasiruošti būsimam suaktyvėjimo procesui. Taigi, oksidacijos procesas bei padidėjusi MDA koncentracija yra veiksniai, skatinantys trombocitus sintetinti daugiau PNRR (t. y. RR 20:4 ω 6, RR 20:5 ω 3, RR 22:6 ω 3 ir kt.) iš BRR: RR 18:2 ω 6 ir RR 18:3 ω 3, veikiamos fermentų – desaturazių ir elongazių, įsiterps į trombocitų membranos fosfolipidinį dvisluoksnį ir vėliau bus panaudotos biologiškai aktyvių junginių sintezei, pavyzdžiui, uždegimą slopinančių ar uždegimą skatinančių eikozanoidų ir dokoanoidų gamybai.

Pacientams, sergantiems inkstų akmenlige, pilvo riebaliniame audinyje buvo nustatyta 2 proc. mažesnė bendroji PNRR suma nei kontrolinės sveikų

asmenų grupės tiriamiesiems ($p < 0,0001$). PNRR kiekis riebaliniame audinyje iš esmės atspindi žmogaus mitybą. Didžiąją dalį bendrosios PNRR sumos sudarė RR 18:2 ω 6 ir RR18:3 ω 3. Todėl daroma prielaida, kad pacientai, sergantys inkstų akmenlige, nepakankamai vartoja PNRR, o dėl tokio RR 18:2 ω 6 ir RR 18:3 ω 3 trūkumo gali sulėtėti ir kitų ω 3 ir ω 6 PNRR sintezė.

Tyrimo duomenimis, inkstų akmenlige sergančių pacientų pilvo riebaliniame audinyje taip pat buvo rastas didesnis RR16:1 ω 7 ir mažesnis RR 20:5 ω 3 kiekis nei kontrolinėje sveikų asmenų grupėje. Tačiau asmenims, kuriems diagnozuotas MS, nustatytas daug mažesnis RR 16:1 ω 7 kiekis, bet didesnis RR 18:1 ω 9 kiekis nei tiems, kuriems MS nebuvo diagnozuotas. Todėl gauti rezultatai dar kartą patvirtina, kad pacientai, sergantys inkstų akmenlige, suvartoja mažiau PNRR; vadinasi, padidėja MNRR sintezė ir dėl to, savo ruožtu, padidėja RR 16:1 ω 7 ir RR 18:1 ω 9 kiekis pilvo riebaliniame audinyje.

Vartojant didesnę PNRR, sutrinkdomas lipidų kaupimasis kepenyse bei riebaliniame audinyje pilvo srityje. Tačiau atvirkštinis procesas būdingas vartojant daugiau SRR [180]. Proksimalinių inkstų kanalėlių ląstelių kultūros *in vitro* duomenys parodė, kad PNRR (t. y. RR 18:3 ω 3, RR 20:5 ω 3) ir MNRR (t. y. RR 18:1 ω 9) sumažina OS ir slopina ETS, kuris sutrikdo baltymų, lipidų ir sterolių biosintezę bei viduląstelinio Ca^{2+} kaupimąsi, taip sukeldamas ląstelių apoptozę bei nekrozę. RR 18:3 ω 3, RR 20:5 ω 3 bei RR 18:1 ω 9 veikia mažindamos ETS rodiklių – fosforilinto eukariotų iniciacijos faktoriaus 2α , C/EBP homologinio baltymo ir gliukozės reguliuojamo baltymo 78 kiekį ląstelėje [128, 181].

Sveikų savanorių trombocitų membranos fosfolipidų RR 18:2 ω 6/RR 20:4 ω 6 santykis, esant didžiausiai kraujo serumo MDA koncentracijai, statistiškai reikšmingai mažesnis, lyginant su mažiausia MDA koncentracija kraujo serume. Remiantis šiais rezultatais galima teigti, kad RR 18:2 ω 6 konversija į RR 20:4 ω 6 yra intensyvesnė, esant didesnei kraujo serumo MDA koncentracijai. Galima manyti, kad ši konversija – tai trombocito pasiruošimas būsimai uždegimą skatinančių eikozanoidų gamybai ir trombocitų aktyvacijai, nes išskirti tromboksanai aktyvina trombocitus, o šie gali greičiau įsiterpti į kraujo krešėjimo procesą. Trombocitų membranoje esanti RR 20:4 ω 6 naudojama sintetinant TXA_2 , kuris, kaip žinoma, dalyvauja širdies ir kraujagyslių ligų patogenezėje, veikdamas per specifinius receptorius, susijungusius su G baltymo Gq subvienetu, taip skatindamas trombocitų agregaciją ir vazokonstrikciją [182, 183]. Vadinasi, padidėjusi MDA koncentracija kraujo serume galėtų būti veiksnys, lemiantis intensyvesnę TXA_2 susidarymą.

Be to, šio tyrimo rezultatai parodė RR 18:3 ω 3/RR 20:5 ω 3 santykio didėjimo tendenciją trombocitų membranoje, lyginant mažiausią ir didžiausią TMA susidarymo procentą. RR 18:3 ω 3 lėmė santykio didėjimą. Ši RR nėra sintetinama žmogaus organizme, ji gaunama tik su maistu – augaliniais aliejais. Taigi, RR 18:3 ω 3 atspindi konkretaus asmens mitybos racioną ir galiausiai bus verčiama į RR 20:5 ω 3. Eksperimentinis tyrimas parodė, kad, trombocitų membraną prisotinus RR 20:5 ω 3, sumažinamos trombocitų prokoaguliacinės savybės. RR 20:5 ω 3 kartu su RR 22:6 ω 3, iš kurių bus sintetintos uždegimą slopinančios biologiškai aktyvios medžiagos, sumažina riziką susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis [184]. Taigi, ω 3 PNRR per biocheminius mechanizmus gali reguliuoti procesus, susijusius su uždegimu: trombocitų aktyvaciją ir agregaciją bei vazokonstrikciją [185]. PNRR gali veikti tiesiogiai, pakeisdamos RR 20:4 ω 6 kaip substratą, gamindamos eikozanoidus ir taip slopindamos RR 20:4 ω 6 metabolizmą, arba netiesiogiai, veikdamos per genų raišką: aktyvuodamos peroksisomų proliferatoriaus aktyvintus receptorių α ir γ [13, 186, 187]. Be to, ω 3 PNRR slopina monocitų ir makrofagų uždegiminių citokinų (interleukino 1 β ir IL-6, TNF α) sekreciją, tokiu būdu slopinamas uždegimo procesas, kuris ir yra esminis sergant LNL [188].

Didėjant MDA koncentracijai, daugėja ir RR 22:5 ω 3 sveikų savanorių trombocitų fosfolipidų membranoje. Toks rezultatas gali būti aiškinamas suintensyvėjusiu RR metabolizmu sintetinant eikozano RR ir dokozano RR, kurios bus naudojamos kitų biologiškai aktyvių medžiagų sintezei bei trombocitų aktyvacijai. RR 22:6 ω 3 pasiskirstymo tendencija buvo identiška RR 22:5 ω 3, tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų nerasta. Tyrimas, kuriame į trombocitų membraną buvo įterpta RR 22:6 ω 3 ir matuota susidariusi MDA koncentracija, parodė, kad jei trombocito membranoje yra daugiau RR 22:6 ω 3, tai susidariusi MDA koncentracija taip pat yra didesnė. Autorių nuomone, membranoje esantys dideli ω 3 RR kiekiai, ypač RR 22:6 ω 3, galėtų būti susiję su intensyvesne lipidų peroksidacija [106]. Kiti mokslininkai taip pat tyrė RR 22:6 ω 3 poveikį trombocitams. Sveikiems vyrams buvo duodama maisto papildų, kuriuose gausu RR 22:6 ω 3, ir stebimas šios RR įtraukimas į trombocitų fosfolipidinę membraną bei trombocitų aktyvumas. Rezultatai parodė, kad didesnis RR 22:6 ω 3 kiekis trombocitų membranoje statistiškai reikšmingai sumažina trombocitų aktyvaciją ir sužadina antioksidacinį poveikį, didindamas α tokoferolio koncentraciją trombocituose. Tai būtų galima laikyti apsauginiu veiksniu nuo širdies ir kraujagyslių sutrikimų, susijusių su trombocitais [189, 190]. Šioje disertacijoje pristatomame sveikų individų tyrime reikšmingo oksidacijos poveikio nenustatyta. Didesnį oksidacijos

poveikį gali patvirtinti tik tyrimas, atliktas pacientams, kurių kraujo serume MDA koncentracija yra gerokai didesnė.

Inkstų akmenlige sergančius tiriamuosius suskirstę pagal inkstų akmenų kilmę ir MS, nustatėme, kad bendroji PNRR suma procentais, ω 6 PNRR bei RR 18:2 ω 6 kiekis procentais buvo daug didesni pacientų, kuriems nustatyti kalcio oksalatiniai ir kalcio fosfatiniai inkstų akmenys be MS, nei pacientams, turintiems šlapimo rūgšties inkstų akmenų ir MS. Šiuos rezultatus būtų galima aiškinti tuo, kad tiriamųjų, sergančių MS, PNRR metabolizmas yra sulėtėjęs ir (ar) galėjo būti sumažėjęs PNRR vartojimas su maistu. Be to, pacientams, sergantiems inkstų akmenlige, didesnis ω 6 PNRR kiekis procentais riebaliniame audinyje gali paskatinti gaminti daugiau biologiškai aktyvių medžiagų iš minėtų ω 6 PNRR. Nors šiame disertaciniame darbe ir nebuvo tirta konkrečiai eikozanoidų ir dokoanoidų koncentracija, tačiau remiantis moksliniais duomenimis galima teigti, kad eikozanoidai daro įtaką inkstų akmenligės patogenezei tiesiogiai ar netiesiogiai dalyvaudami uždegime, taip pažeisdami ir sutrikdydami inkstų kanalėlius bei jų funkciją.

Sveikų savanorių organizme buvo rasta statistiškai reikšminga atvirkštinė koreliacija tarp RR 14:0 trombocitų membranos fosfolipiduose ir MDA koncentracijos kraujo serume. Tokia pati koreliacija buvo nustatyta tarp RR 18:2 ω 6/RR 20:4 ω 6 santykio ir MDA koncentracijos kraujo serume. Statistiškai reikšminga atvirkštinė koreliacija taip pat buvo rasta tarp TMA formavimosi procento ir RR 14:0. Kiti mokslininkai nustatė tiesioginę koreliaciją tarp MNRR bei PNRR ir MDA koncentracijos kraujo serume bei atvirkštinę koreliaciją tarp SRR ir kraujo serumo MDA koncentracijos. Tyrėjai taip pat pastebėjo, kad sveikų asmenų lipidų peroksidacija yra intensyvesnė dėl trombocitų membranos fosfolipiduose esančio didesnio PNRR kiekio [191]. Nors šioje disertacijoje pristatomame tyrime negauta statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp kraujo serumo MDA koncentracijos ir trombocitų membranos fosfolipidų SRR, MNRR ir PNRR, tačiau buvo pastebėta, kad didėjant MDA koncentracijai šiek tiek didėja PNRR ir MNRR kiekis procentais, o mažėja SRR kiekis ir kad SRR kiekis procentais taip pat mažėja didėjant TMA formavimosi procentui.

Taigi, šioje disertacijoje pateikti tyrimų rezultatai leidžia teigti, kad OS gali daryti įtaką RR pokyčiams, ypač PNRR, kurios dalyvauja biologiškai aktyvių junginių sintezėje (pvz., eikozanoidų ir dokoanoidų), veikdamos uždegimo proceso patogenezę ir tokiu būdu darydamos tiesioginę ar netiesioginę įtaką LNL, tarp jų ir inkstų akmenligės, vystymuisi ir progresavimui.

IŠVADOS

1. Didėjant malono dialdehido koncentracijai kraujo serume, didėja mononesočiųjų ir polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis ir mažėja sočiųjų riebalų rūgščių kiekis trombocitų fosfolipidų membranoje.
2. Nustatytas padidėjęs polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis trombocitų fosfolipidų membranoje lemia padidėjusią trombocitų agregaciją.
- 3.1. Inkstų akmenlige sergančių pacientų, suskirstytų pagal inkstų akmenų tipus, pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių sudėtis nesiskiria.
- 3.2. Tiriamiesiems, sergantiems inkstų akmenlige ir suskirstytiems pagal inkstų akmenų tipus, nustatytas didesnis mononesočiųjų ir mažesnis polinesočiųjų riebalų rūgščių kiekis, palyginti su kontroline sveikų asmenų grupe.
- 4.1. Pacientams, sergantiems inkstų akmenlige be metabolinio sindromo požymių, nustatyta daugiau sočiųjų riebalų rūgščių pilvo riebaliniame audinyje nei kontrolinėje sveikų asmenų grupėje.
- 4.2. Pacientai, sergantys inkstų akmenlige ir metaboliniu sindromu, turėjo didesnę mononesočiųjų riebalų rūgščių kiekį pilvo riebaliniame audinyje nei pacientai, sergantys inkstų akmenlige be metabolinio sindromo.
- 4.3. Bendroji polinesočiųjų riebalų rūgščių suma pilvo riebaliniame audinyje buvo didesnė kalcio oksalatinių ir kalcio fosfatinių inkstų akmenų turintiems pacientams be metabolinio sindromo nei tiriamiesiems, kuriems diagnozuoti šlapimo rūgšties inkstų akmenys ir metabolinis sindromas.

DARBO TAŠOS KRYPTYS

Esant pažengusiam oksidaciniam stresui, tikslinga toliau tirti trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgščių sudėties bei trombocitų ir leukocitų agregatų formavimąsi asmenims, sergantiems širdies ir kraujagyslių ar kitomis lėtinėmis neinfekcinėmis ligomis. Tokiu būdu bus galima įvertinti riebalų rūgščių sudėties pokyčius ir juos palyginti su sveikų asmenų trombocitų membranos fosfolipidų riebalų rūgščių sudėtimi, ieškant naujų sąsajų su lėtiniu uždegimu bei oksidaciniu stresu – esminiais procesais lėtinių neinfekcinių ligų patogenezėje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. WHO | Noncommunicable diseases [Internet]. WHO. World Health Organization; 2018 [cited 2019 July 13]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>.
2. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388: 1659–724.
3. Carrera-Bastos P, Fontes-Villalba M, O’Keefe JHO, Lindeberg S, Cordain L. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Res Rep Clin Cardiol*. 2011; 2: 15–35.
4. Chen Z, Prosperi M, Bird VY. Prevalence of kidney stones in the USA: The National Health and Nutrition Evaluation Survey. *J Clin Urol*. 2019, 12(4): 296–302.
5. 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.
6. Vichova T, Motovska Z. Oxidative stress: Predictive marker for coronary artery disease. *Exp Clin Cardiol*. 2013 Spring; 18(2): e88–e91.
7. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Biomed Rep*. 2016 May; 4(5): 519–22.
8. Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res*. 2012 Mar; 129(3): 378–81.
9. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019 Jun; 34(6): 975–91.
10. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 15; 482(3): 419–25.
11. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2008 Mar; 47(2): 147–55.
12. Pashkovskaya AA, Vazdar M, Zimmermann L, Jovanovic O, Pohl P, Pohl EE. Mechanism of Long-Chain Free Fatty Acid Protonation at the Membrane-Water Interface. *Biophys J*. 2018 May 8; 114(9): 2142–51.
13. Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*. 2012 Mar; 142(3): S592–S99.

14. Calder PC, Yaqoob P. Understanding omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Postgrad Med.* 2009 Nov; 121(6): 148–57.
15. 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.
16. Hussein JS. Cell membrane fatty acids and health. *Int J Pharm Sci.* 2013; 5(3): 38–46.
17. White B. Dietary Fatty Acids. *Am Fam Physician.* 2009; 15: 80(4): 345–50.
18. Structure of cis and trans double bonds [Internet]. [Cited 2019 May 10]. Available from: <<http://www.fao.org/3/V4700E/V4700E07.htm>>
19. Everything about fat [Internet]. Cis-configuration and trans-configuration of double bonds in fatty acid chain. [Cited 2019 May 10]. Available from: <<https://www.sott.net/article/230686-Everything-About-Fat>>.
20. Reflection 8 – Lipids 1 [Internet]. Linolenic & Linoleic Acid. [Cited 2019 May 20]. Available from: <<https://biochemistry3rst.wordpress.com/tag/linoleic-acid/>>.
21. Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med.* 2015 Nov-Dec; 24(6): 931–41.
22. 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.
23. 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.
24. Salter AM. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Animal.* 2013 Mar 7; Suppl 1: 163–71.
25. 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.
26. Spiteller 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.
27. 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.

28. Massey KA, Nicolaou A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jun; 59(100): 45–55.
29. Higdon A, Diers AR, Oh JY, Landar A, Darley-Usmar VM. Cell signaling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J.* 2012 Mar 15; 442(3): 453–64.
30. Li P, Oh DY, Bandyopadhyay G, Lagakos WS, Talukdar S, Osborn O, et al. LTB₄ causes macrophage-mediated inflammation and directly induces insulin resistance in obesity. *Nat Med.* 2015 Mar; 21(3): 239–47.
31. Chandrasekharan JA, Sharma-Walia N. Lipoxins: nature’s way to resolve inflammation. *J Inflamm Res.* 2015; 8: 181–92.
32. Kohli P, Levy BD. Resolvins and protectins: mediating solutions to inflammation. *Br J Pharmacol.* 2009; 158(4): 960–71.
33. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Apr; 1851(4): 469–84.
34. Butkiewicz AM, Kemoni H, Dymicka-Piekarska V, Matowicka-Karna J, Radziwon P, Lipska A. Platelet count, mean platelet volume and thrombocytopenic indices in healthy women and men. *Thromb Res.* 2006; 118: 199–204.
35. Stepniewska J, Dołęgowska B, Cecerska-Heryć E, Gołembiewska E, Malinowska-Jędraszczyk A, Marchelek-Myśliwiec M. The activity of antioxidant enzymes in blood platelets in different types of renal replacement therapy: a cross-sectional study. *Int Urol Nephrol.* 2016; 48: 593–9.
36. Bounes VF, Mujalli A, Cenac C, Severin S, Le Faouder P, Chicanne G, et al. The importance of blood platelet lipid signaling in thrombosis and in sepsis. *Adv Biol Regul.* 2018 Jan; 67: 66–73.
37. Austin SK. Haemostasis. *Medicine.* 2013 Apr; 41(4): 208–11.
38. Li JL, Zarbock A, Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *J Exp Med.* 2017; 214(8): 2193.
39. Li J, Xia Y, Bertino AM, Coburn JP, Kuter DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion.* 2000; 40: 1320–9.
40. Picker SM. In-vitro assessment of platelet function. *Transfus Apher Sci.* 2011 Jun; 44(3): 305–19.
41. Klouche M. Diagnostic methods for platelet function analysis. *Transfus Med Hemother* 2007; 34: 20–32.
42. Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, Sato S, Kato T, Naohara T, et al. Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 2003; 43: 1038–46.

43. Apelseh TO, Hervig TA, Wetzel-Larsen T, Bruserud Ø. Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. *Transfusion* 2006; 46: 800–10.
44. Klüter H, Bubel S, Kirchner H, Wilhelm D. Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion* 1999; 39: 1179–84.
45. Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, et al. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev.* 2009 Sep; 29(5): 683–741.
46. Moncada S, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc.* 1979 Jan; 38(1): 66–71.
47. Gayle RB, Maliszewski ChR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards Ch, et al. Soluble CD39 Inhibits Platelet Function. *J Clin Invest.* 1998 May; 101(9): 1851–9.
48. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972; 175: 720–31.
49. 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.
50. 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): 1493–506.
51. Escribá PV, González-Rosb JM, Goñi FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sánchez-Magraner L, et al. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(3): 829–75.
52. Dolegowska B, Lubkowska A, De Girolamo L. Platelet lipidomic. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012 Apr-Jun; 26(2 Suppl 1): 23S–33S.
53. 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.
54. 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.

55. 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.
56. Kee MF, Myers DR, Sakurai Y, Lam WA, Qiu Y. Platelet mechanosensing of collagen matrices. *PLoS One*. 2015 Apr 27; 10(4): e0126624.
57. 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.
58. 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.
59. Larson MK, Tormoen GW, Weaver LJ, Luepke KJ, Ishan A. Patel, Hjelm 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.
60. Totani L, Evangelista V. Platelet–Leukocyte Interactions in Cardiovascular Disease and Beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30: 2357–61.
61. Fuentes E, Moore-Carrasco R, De Andrade Paes AM, Trostchansky A. Role of Platelet Activation and Oxidative Stress in the Evolution of Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2019 Jul 7; 107424841986143: 1–12.
62. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased Platelet Reactivity and Circulating Monocyte-Platelet Aggregates in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *JACC*. 1998; 31(2): 352–8.
63. Passacquale G, Vamadevan P, Pereira L, Hamid C, Corrigan V, Ferro A. Monocyte-Platelet Interaction Induces a Pro-Inflammatory Phenotype in Circulating Monocytes. *PLoS ONE*. 2011; 6(10): e25595.
64. Ashman N, Macey MG, Fan SL, Azam U, Yaqoob MM. Increased platelet-monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 2088–96.
65. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340: 115–26.
66. McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemostasis*. 2000; 86: 746–56.

67. Majumder B, Koganti S, Lowdell MW, Rakhit RD. Intracoronary platelet and monocyte activation status within platelet-monocyte complexes are determinants of inflammation in ST elevation myocardial infarction. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016; 64(1): 35–46.
68. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current biology.* 2014; 24(10): R453–R462.
69. 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.
70. 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.
71. Yoshikawa T, Naito Y. What Is Oxidative Stress? *J M A J.* 2002; 45(7): 271–6.
72. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol.* 2014 Aug 12; 5: 285.
73. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Apr; 33: 8–13.
74. Diebold L, Chandel NS. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic Biol Med.* 2016 Nov; 100: 86–93.
75. 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.
76. 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.
77. Matović V, Buha A, Đukić-Ćosić 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.
78. Bao W, Zhang Y, Zhang M, Bao A, Fei X, Zhang X, et al. Effects of ozone repeated short exposures on the airway/lung inflammation, airway hyper-responsiveness and mucus production in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. *Biomed Pharmacother.* 2018;101: 293–03
79. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc.* 1984; 65: 899–910.
80. Andjelkovic M, Buha Djordjevic A, Antonijevic E, Antonijevic B, Stanic M, Kotur-Stevuljevic J, et al. Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead

- Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16(274): 1–21.
81. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003 Oct 15; 552 (Pt 2): 335–44.
 82. 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.
 83. Vitamina E [Internet]. Vitamine E (α -tocopherol). [Cited 2019 June 13]. Available from: <<https://www.infoescola.com/bioquimica/vitamina-e/>>.
 84. Beta-carotene [Internet]. [Cited 2019 June 13]. Available from: <<https://lt.m.wikipedia.org/wiki/Vaizdas:Beta-carotene.png>>.
 85. Samoylenko A, Hossain JA, Mennerich D, Kellokumpu S, Hiltunen JK, et al. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19: 2157–96.
 86. Myung SK, Kim Y, Ju W, Choi HJ, Bae WK. Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol*. 2010; 21: 166–79.
 87. Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr*. 2011; 141: 989S–1009S.
 88. Sheikh-Ali M, Chehade JM, Mooradian AD. The antioxidant paradox in diabetes mellitus. *Am J Ther*. 2011; 18: 266–78.
 89. Agudo A, Cabrera L, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, et al. Fruit and vegetables intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutritional (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr*. 2007; 85: 1634–42.
 90. Kirsh VA, Peters U, Mayne ST, Subar AF, Chatterjee N, et al. Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99: 1200–9.
 91. Zhang CX, HO SC, Chen YM, Fu JH, Cheng SZ, et al. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *Int J Cancer*. 2009; 125: 181–8.
 92. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984; 219(1): 1–14.

93. Venero JL, Revuelta M, Atikieta L. Evidence for dopamine derived hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(1): 111–23.
94. Castellani RJ, Honda K, Zhu X, et al. Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Res Rev.* 2004; 3(3): 319–26.
95. Lipinski B, Pretorius E. Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron. *Hematol.* 2012; 17(4): 241–7.
96. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012; 46(4): 382–419.
97. Kanno T, Nakamura K, Ikai H, Kikuchi K, Sasaki K, Niwano Y. Literature review of the role of hydroxyl radicals in chemically-induced mutagenicity and carcinogenicity for the risk assessment of a disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide. *J Clin Biochem Nutr.* 2012; 51(1): 9–14.
98. Bielski BHJ, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the activity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 1983; 258(8): 4759–61.
99. Schneider C, Boeglin WE, Yin H, Porter NA, Brash AR. Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxyarachidonic acids generate a novel series of epoxidized products. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(4): 895–903.
100. Browne RW, Armstrong D. HPLC analysis of lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. *Clin Chem.* 2000; 46(6) (part1): 829–36.
101. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011; 111(10): 5944–72.
102. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998; 39(8): 1529–42.
103. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987; 25(4): 317–64.
104. Higdon A, Diers AR, Oh JY, Landar A, Darley-Usmar VM. Cell signaling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J.* 2012 Mar 15; 442(3): 453–64.
105. 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.
106. Véricel E, Polette A, Bacot S, Calzada C, Lagarde M. Pro- and anti-oxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J Thromb Haemost.* 2003 Mar; 1(3): 566–72.

107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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 F2 α and nitric oxide (NO). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Apr 15; 1019: 95–111.
111. 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: 169–74.
112. Massey K A, Nicolaou A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jun; 59(100): 45–55.
113. Hasanuzzaman M, Alam M, Rahman A, Nahar K, Fujita M. Exogenous Proline and Glycine Betaine Mediated Upregulation of Antioxidant Defense and Glyoxalase Systems Provides Better Protection against Salt-Induced Oxidative Stress in Two Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties. *Biomed Res Int.* 2014. 2014; ID 757219: 1–17.
114. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek.* 2004; 57(9-10): 453–5.
115. Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res.* 2012 Mar; 129(3): 378–81.
116. Fuentes E, Palomo I. Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging. *Life Sci.* 2016 Mar 1; 148: 17–23.
117. Yoshikawa T, Naito Y. What Is Oxidative Stress? *JMAJ.* 2002; 45(7): 271–6.
118. 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.

119. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: adipocyte biology adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 2007; 48: 1905–14.
120. Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17(4): 332–41.
121. Katsoulieiris E, Mabley JG, Samai M, Sharpe MA, Green IC, Chatterjee PK. Lipotoxicity in renal proximal tubular cells: Relationship between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress pathways. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(12): 1654–62.
122. Inoguchi T, Nawata H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets.* 2005; 6(4): 495–501.
123. Cooke AA, Connaughton RM, Lyons CL, McMorrow AM, Roche HM. Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *Eur J Pharm.* 2016; 12(785): 207–14.
124. Peña-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Perez-Martinez P, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, et al. Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *J Nutr Biochem.* 2013; 24(10): 1717–23.
125. Finucane OM, Lyons CL, Murphy AM, Reynolds CM, Klinger R, Healy NP, et al. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes.* 2015; 64(6): 2116–28.
126. Gunes O, Tascilar E, Sertoglu E, Tas A, Serdar MA, Kaya G, et al. Associations between erythrocyte membrane fatty acid compositions and insulin resistance in obese adolescents. *Chem Phys Lip.* 2014; 184: 69–75.
127. Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S, Tanaka Y, et al. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 402(2): 265–71.
128. Katsoulieiris E, Mabley JG, Samai M, Green IC, Chatterjee PK. α -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharm.* 2009; 623(1–3): 107–12.
129. Muoio DM, Neuffer PD. Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab.* 2012; 15(5): 595–605.
130. Jump DB, Tripathy S, Depner CM. Fatty Acid-Regulated Transcription Factors in the Liver. *Annu Rev Nutr.* 2013; 33: 249–69.

131. Sakhaee K. Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 304–309.
132. Romero V, et al. Kidney stones: a global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol* 2010; 12 (2/3): e86–96.
133. Sakhaee S, Adams-Huet B, Moe OW, Pak CYC. Pathophysiologic basis for normouricosuric uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int.* 2002; 62: 971–9.
134. Abate N, Chandalia M, Cabo-Chan AV, Moe OW, Sakhaee K. The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney Int.* 2004; 65: 386–92.
135. Li H, Klett DE, Littleton R, Elder JS, Sammon JS. Role of insulin resistance in uric acid nephrolithiasis. *World J Nephrol.* 2014; 3(4): 237–42.
136. Strohmaier WL, Wrobel BM, Schubert G. Overweight, insulin resistance and blood pressure (parameters of the metabolic syndrome) in uric acid urolithiasis. *Urol Res.* 2012; 40: 171–5.
137. Berglund L, Hyson D. Cholesterol absorption and the metabolic syndrome: a new look at an old area. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(8): 1314–6.
138. Jou YC, Fang CY, Chen SY, Chen FH, Cheng MC, Shen CH, et al. Proteomic Study of Renal Uric Acid Stone. *Urology.* 2012; 80(2): 260–6.
139. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new world-wide definition. *Lancet.* 2005; 366: 1059–62.
140. Sung TC, Seung IJ, Soon CM, Tae HK. Correlation of metabolic syndrome with urinary stone composition. *Int J Urol.* 2013; 20: 208–13.
141. Akman T, Binbay M, Erbin A, Tepeler A, Sari E, Kucuktopcu O, et al. The impact of metabolic syndrome on long-term outcomes of percutaneous nephrolithotomy (PCNL). *BJU Int.* 2012; 110(11): 1079–83.
142. Reichard C, Gill BC, Sarkissian C, De S, Monga M. 100% Uric Acid Stone Formers: What Makes Them Different? *Urology.* 2015; 85(2): 296–298.
143. Kabeya Y, Kato K, Tomita M, Katsuki T, Oikawa Y, Shimada A, et al. Associations of Insulin Resistance and Glycemic Control with the Risk of Kidney Stones. *Intern Med.* 2012; 51: 699–705.
144. Binbay M, Yuruk E, Akman T, Sari E, Yazici O, Ugurlu IM, et al. Updated epidemiologic study of urolithiasis in Turkey II: role of metabolic syndrome components on urolithiasis. *Urol Res.* 2012; 40: 247–52.
145. Weinberg AE, Patel CJ, Chertow GM, Leppert JT. Diabetic Severity and Risk of Kidney Stone Disease. *Eur Urol.* 2014; 65(1): 242–7.

146. Daudon M, Traxer O, Conort P, Lacour B, Jungers P. Type 2 Diabetes Increases the Risk for Uric Acid Stones. *JASN*. 2006; 17(7): 2026–33.
147. Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Atwood PV. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J*. 2008; 413: 369–87.
148. Torricelli FCM, Shubha K. De, Gebreselassie S, Li I, Sarkissian C, Monga M. Dyslipidemia and Kidney Stone Risk. *J Urol*. 2014; 191(3): 667–72.
149. Kaminskas A, Zieden B, Elving B, Kristenson M, Abaravicius A, Bergdahl B, et al. Adipose tissue fatty acids in men from two populations with different cardiovascular risk: the LiVicordia study. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999; 59: 227–32.
150. Schuchardt J Ph, Schmidt S, Kressel G, Willenberg I, Hammock B D, Hahn A, et al. Modulation of blood oxylipin levels by long chain omega -3 fatty acid supplementation in hyper and normolipidemic men. *PLEFA*. 2014; 90: 27–37.
151. Katakura M, Hashimoto M, Inoue T, Al Mamun A, Tanabe Y, Iwamoto R, et al. Omega-3 Fatty Acids Protect Renal Functions by Increasing Docosahexaenoic Acid-Derived Metabolite Levels in SHR.Cg-Leprcp/NDmcr Rats, a Metabolic Syndrome Model. *Molecules*. 2014; 19(3): 3247–63.
152. Buck AC, Davies RL, Harrison T. The protective role of eicosapentaenoic acid [EPA] in the pathogenesis of nephrolithiasis. *J Urol*. 1991; 146(1): 188–94.
153. Hong S, Lu Y. Omega-3 Fatty Acid-Derived Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution and Leukocyte Functions: Targeting Novel Lipid Mediator Pathways in Mitigation of Acute Kidney Injury. *Front Immunol*. 2013; 4: 13.
154. Fairweather DL. Sex differences in inflammation during atherosclerosis. *Clin Med Insights Cardiol*. 2014; 8 (Suppl 3): 49–59.
155. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005; 112: 2735–52.
156. 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.

157. Touchstone J.C. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appls.* 1995 Sep; 671(1-2): 169–95.
158. Khoschsorur G. A, Winklhofer-Roob B. M, Rabl H, Auer Th, Peng Z, Schaur R. J. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of Malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia.* 2000 Aug; 52(3-4): 181–4.
159. Hendrixson V, Šablinskis V, Leščiūtė D, Želvys A, Jankevičius F, Kučinskienė Z. Infrared Spectroscopical Approach in Kidney Stones Research. *Laboratorinė medicina.* 2008; 2 (38): 99–105.
160. Daar AS, Singer PA, Persad DL, Pramming SK, Matthews DR, Beaglehole R, et al. Grand challenges in chronic non-communicable diseases. *Nature.* 2007; 450: 494–6.
161. Shivappa N. Diet and Chronic Diseases: Is There a Mediating Effect of Inflammation? *Nutrients.* 2019; 11(7): 1639.
162. Jha JC, Ho F, Dan Ch, Jandeleit-Dahm K. A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes. *Clin Sci.* 2018; 132 (16): 1811–36.
163. 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.
164. 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.
165. Vognild E, Elvevoll EO, Brox J, Olsen RL, Barstad H, Aursand M, et al. 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.
166. 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.
167. 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.

168. Cruz MM, Lopes AB, Crisma AR, Sá RCC, Kuwabara WMT, Curi R, et al. Palmitoleic acid (16:1n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes. *Lip Health Dis.* 2018; 17: 55.
169. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein Kinase C–Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H Oxidase. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: S227–S32.
170. Finucane OM, Lyons CL, Murphy AM, Reynolds CM, Klinger R, Healy NP, et al. Monounsaturated fatty acid–enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome–mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes.* 2015; 64 (6): 2116–28.
171. Reichard C, Gill BC, Sarkissian C, De S, Monga M. 100% Uric Acid Stone Formers: What Makes Them Different? *Urology.* 2015; 85 (2): 296–8.
172. Cho ST, Jung SI, Myung SC, Kim TH. Correlation of metabolic syndrome with urinary stone Composition. *Int J Urol.* 2013; 20: 208–13.
173. Hendrixson V, Malyško E, Mažeikienė A, Šablinskas V, Pučetaitė M, Kasiulevičius V, Jankevičius F, Jakaitienė A, Želvys A, Jablonskienė V, Kučinskienė ZA. Prevalence of Metabolic Syndrome in Patients with Uric Acid and Calcium–based Kidney Stones. *GSTF J Adv Med Res.* 2014; 1(2): 1–7.
174. Nigam A, Frasure-Smith N, Lespe´rance F, Julien P. Relationship between n-3 and n-6 plasma fatty acid levels and insulin resistance in coronary patients with and without metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009; 19 (4): 264–70.
175. Onishi H, Saito Y. Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces cardiovascular events: relationship with the EPA / arachidonic acid ratio. *J Atheroscler Thromb.* 2013; 20: 861–77.
176. Li D, Wahlqvist ML, Sinclair AJ. Advances in n - 3 polyunsaturated fatty acids. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2019; 28(1): 1–5.
177. Cottin SC, Alsaleh A, Sanders TAB, Hall WL. Lack of effect of supplementation with EPA or DHA on platelet-monocyte aggregates and vascular function in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016; 26: 743–51.
178. Lagarde M, Liu M, Véricel E, Calzada C, Chen P, Driss F, et al. Docosahexaenoic acid, protectin synthesis: relevance against atherothrombogenesis. *Poc Nutr Soc.* 2014; 73: 186–9.

179. 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.
180. Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, Cedernaes J, Johansson HE, Larsson A, et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fatty acids causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes*. 2014; 63: 2356–68.
181. Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S, Tanaka Y, et al. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem and Biophys Res Commun*. 2010; 402 (2): 265–71.
182. Guichardant M, Bernoud-Hubac N, Calzada C, Véricel E. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids and oxidative stress within blood platelets. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018 Jun; 1863(6): 651–56.
183. Chen H. Role of thromboxane A2 signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins Other Lip Mediat*, 2018 Jan; 134: 32–7.
184. Larson MK, Tormoen GW, Weaver LJ, Luepke KJ, Patel IA, 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.
185. 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.
186. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *PNAS*. 1997; 94(9): 4318–23.
187. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006 Jun; 83(6 Suppl): 1505S–19S.
188. 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.
189. Véricel E, Colas R, Calzada C, Lê Q. H, Feugier N, Cugnet Ch, 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.

190. 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.
191. 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. *Bratisl Lek Listy.* 1998; 99: 245–9.

SANTRAUKA

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

1. INTRODUCTION

Chronic non-communicable diseases (CNCDs), also known as chronic diseases, tend to be of long duration and are the result of a combination of genetic, physiological, environmental and behavioural factors [1, 2]. Risk factors, such as tobacco use, physical inactivity, an unhealthy diet, and the harmful use of alcohol, all increase the risk of morbidity and mortality from CNCDs as well as the risk of developing another disease, the so-called disease of civilization, uronephrolithiasis [3]. The risk factors mentioned above and an increase in the caloric intake over the past 60–100 years contribute to an intensified generation and accumulation of reactive oxygen species, leading to the development of oxidative stress in the cell. Oxidative stress is therefore associated with obesity, type II diabetes [4], cardiovascular [5] and neurodegenerative diseases [6], thrombosis and increased platelet activity [7], and renal proximal tubular damage [8].

Phospholipids in cell membranes, especially their polyunsaturated fatty acids, are sensitive to oxidative stress and lipid peroxidation. Reactive oxygen species modify lipid composition and the structure and dynamics of cell membranes during lipid peroxidation. Under these conditions, the structure, activity, and physical properties of the cell itself may change, which can lead to alteration in the production of biologically active compounds that influence the inflammatory, atherogenic, and prothrombotic effects in the human body. Therefore, oxidative stress and lipid peroxidation-influenced alteration in the structure and dynamics of cell membrane lipids induce the development of cardiovascular [5] and neurodegenerative lesions, cancer, and ocular and renal degenerations, leading to the manifestation of CNCDs [9, 10].

1.1 Aim of the Study

To evaluate the importance of oxidation-induced fatty acid composition in healthy individuals and patients with uronephrolithiasis.

1.2 Tasks of the Study

1. To evaluate platelet membrane fatty acid composition in relation to blood serum malondialdehyde concentration.
2. To evaluate the association of platelet membrane fatty acid composition with platelet aggregation.
3. To determine and evaluate the composition of fatty acids in the abdominal adipose tissue of patients with uronephrolithiasis and a control group of healthy individuals.
4. To compare the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in the control group of healthy individuals and patients with uronephrolithiasis and with or without a diagnosed metabolic syndrome.

1.3 Scientific Novelty of the Study

Though the interest of researchers remains in how cell membrane phospholipids or adipose tissue fatty acid composition may themselves alter the activity of cells such as platelets, or the renal tubular function, there is still a lack of detailed studies on the composition of platelet membrane fatty acids as influenced by an oxidative stress marker – malondialdehyde – and the formation of platelet and leukocyte aggregates, as well as investigations into how abdominal adipose tissue fatty acid composition and metabolic syndrome may influence the formation of kidney stones of different origin. Therefore, these studies and their results are relevant today and encourage to seek for new links between the pathogenesis of CNCDs.

1.4 Practical Significance of the Study

The fatty acid spectrum of platelet membrane phospholipids and abdominal adipose tissue identified in these studies could be useful in assessing platelet readiness for future activation and the intensity of the synthesis of biologically active compounds, which, through a direct or indirect involvement in the inflammatory process, may influence the pathogenesis of uronephrolithiasis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study Design

Two studies were carried out at the laboratory of the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine of the Institute of Biomedical Sciences at the Faculty of Medicine of Vilnius University. The composition of fatty acids (FAs) in the platelet phospholipid membrane of healthy volunteers and abdominal adipose tissue of patients with uronephrolithiasis and metabolic syndrome (MS) were determined.

A randomized prospective cross-sectional study of the association of platelet membrane FA composition with markers of oxidative stress (OS) in healthy men (duration: 2 years) was carried out on a group of 79 volunteers (men) aged $36.5 \text{ years} \pm 10.8 \text{ years}$, who were apparently healthy (without any acute clinical condition) and gave their written consent to participate in the study. Individuals with any cardiac and chronic diseases or prior strokes or venous thromboembolisms were excluded from the study. Female subjects were not included in this study, as males usually have an earlier onset of the disease than their female counterparts [11]. The study protocol was approved by the Vilnius Regional Bioethics Committee (Approval No. 15820-15-807-319) and supported by the Research Council of Lithuania (Grant No. MIP-050/2015).

A case control study of abdominal adipose tissue FA composition in men with uronephrolithiasis and MS (duration: one and a half years) was carried out on a group of 71 men (average age 53.1 ± 14.1) suffering from kidney stone disease. The individuals (case group) were hospitalized at Vilnius University Hospital and gave their written consent to participate in the study. The control group (healthy individuals) had no history of kidney stone disease and was matched with cases for age and sex ($n = 100$). All patients were thoroughly examined in order to diagnose MS according to clinical and laboratory criteria [12]. The study protocol was approved by the Vilnius Regional Bioethics Committee (Approval No. 15820-15-807-319 and No. 158200-5-053-056LP1) and supported by Lithuanian State Science, Studies Foundation (Grant No. T-59/09/MTDS-150000-267) and Research Council of Lithuania (Grant No. MIP-111/2010).

Data analysis was carried out using the IBM SPSS software (version 21 and 24) and Microsoft Excel 2013, 2016.

2.2 Distribution of Individuals

In investigating OS influence on the FA composition of the platelet membrane, healthy volunteers were grouped into quartiles (Q) according to the concentration of blood serum malondialdehyde (MDA). Blood serum MDA concentration was 62.47–77.58 $\mu\text{g/l}$ ($n = 20$) in the first quartile (Q1), 77.79–97.07 $\mu\text{g/l}$ ($n = 20$) in the second quartile (Q2), 97.22–117.61 $\mu\text{g/l}$ ($n = 20$) in the third quartile, and 118.10–169.32 $\mu\text{g/l}$ ($n = 19$) in the fourth quartile (Q4). Then, the spectrum of the platelet membrane FA was compared with the concentration of blood serum MDA in quartiles, and the correlation between the platelet membrane FA spectrum and blood serum MDA concentration was calculated.

The individuals were then grouped into Q according to the percentage of platelet and leucocyte aggregate (PLA) formation. The percentage of PLA formation ranged from 3.7 to 8.3 ($n = 20$) in the first quartile (Q1), 8.4 to 9.5 ($n = 19$) in the second quartile (Q2), 9.6 to 10.8 ($n = 21$) in the third quartile (Q3), and 10.9 to 14.5 ($n = 19$) in the fourth quartile (Q4). The quartiles of PLA formation were then compared with the spectrum of platelet membrane FAs, and the correlation between the variables was measured.

Patients in the abdominal adipose tissue FA composition in men with uronephrolithiasis and MS study were divided into groups according to the diagnosis of MS and the types of kidney stones (Fig. 1). The composition of adipose tissue FA was compared within different groups of patients with different types of kidney stones and between the patients and the control group of healthy individuals.

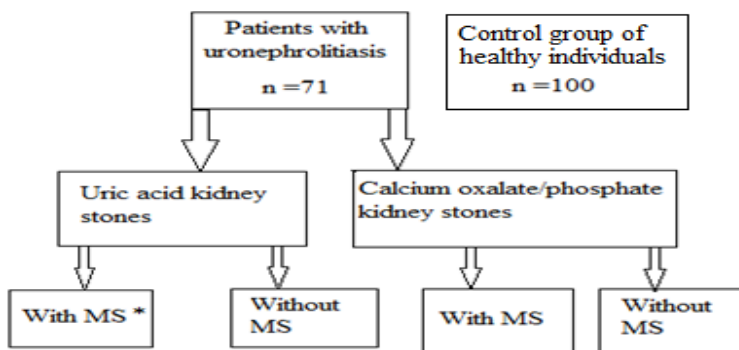


Figure 1. Distribution of patients with uronephrolithiasis and MS. * – metabolic syndrome.

2.3 Research Methodology

2.3.1 Platelet Extraction

For obtaining platelets from volunteers, blood samples were collected in a sodium heparin vacutainer tube and centrifuged immediately at 3000 g for 10 minutes. Then $\frac{3}{4}$ of the plasma was removed without touching the cell and the buffy coat. The remaining portion ($\frac{1}{4}$ of the plasma), rich in thrombocytes, was extracted and mixed with freezing media (BI, Israel) in a ratio of 2:1 and frozen at -80°C .

2.3.2 Determination of Platelet Activation Markers


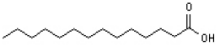

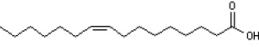

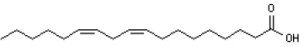
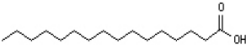
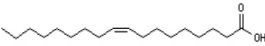
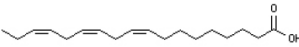
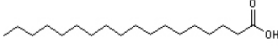
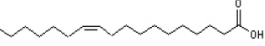
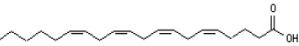
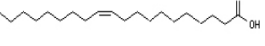
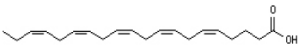
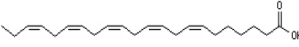
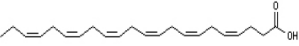
Flow cytometric analysis was performed on volunteers' platelet functional activity in agonist non-stimulated EDTA anticoagulated blood not later than 10 minutes after blood collection (BD FACS Canto, BD Biosciences, USA). Data analysis was carried out using BD FACS Diva software (version 6.1.2). Leukocyte populations (neutrophils, monocytes and lymphocytes) were identified according to CD45/CD14 expression: neutrophils (CD45 +, CD14 -, high side scattered light), monocytes (CD45 +, CD14 +, mean side scattered light) and lymphocytes (CD45 ++, CD14 -, low side scattered light). Then, the percentage of neutrophils, monocytes and lymphocytes expressing the CD42a marker was calculated. This combination of markers is characteristic for PLAs and was considered an indicator of the adhesion phase. The data that were obtained were expressed in absolute numbers (the number of studied platelets expresses the marker), percentages (a part of the studied population expresses the marker), and mean of fluorescence intensity (the fluorescent intensity of the platelet population expressing the marker). Markers of platelet functional activity were identified by Assoc Prof., MD PhD R. Matuzevičienė.

2.3.3 Extraction and Determination of Platelet Membrane Fatty Acids

Methyl esters of platelet membrane FAs and abdominal adipose tissue FAs were prepared using the Folch method [13]. Thin layer chromatography (Sil G-25 UV 254) was then performed to extract platelet phospholipids [14]. After an FA transesterification of the platelet membrane and abdominal adipose tissue, the FA spectrum of both studies was determined by gas chromatography/mass spectrometry with a GCMS-QP2010 Ultra manufactured by Shimadzu. Data were collected and processed using LabSolutions software (Shimadzu).

Table 1 shows the FAs investigated in both studies expressed as a percentage of total FAs.

Table 1. FAs of both studies analyzed by gas chromatography/mass spectrometry.

SFAs*	MUFAs**	PUFAs***
 14:0[#] (Tetradecanoic/ Myristic acid) 	 16:1^{ω##7} (9-hexadecenoic/ Palmitoleic acid) 	 18:2^{ω6} (9,12-octadecadienoic/ Linoleic acid) 
16:0 (Hexadecanoic/ Palmitic acid) 	18:1^{ω9} (9-octadecenoic/ Oleic acid) 	18:3^{ω3} (9,12,15- octadecatrienoic/ α -Linolenic acid) 
18:0 (Octadecanoic/ Stearic acid) 	18:1^{ω7} (11-octadecenoic/ Vaccenic acid) 	20:4^{ω6} (5,8,11,14- eicosatetraenoic/ Arachidonic acid) 
	20:1^{ω9} (11-eicosenoic/ Gondoic acid) 	20:5^{ω3} (5,8,11,14,17- eikosapentaenoic/ Timnodonic acid) 
		22:5^{ω3} (7,10,13,16,19- docosapentaenoic/ Clupanodonic acid) 
		22:6^{ω3} (4,7,10,13,16,19- docosahexaenoic/ Cervonic acid) 

* – saturated fatty acids; ** – monounsaturated fatty acids; *** – polyunsaturated fatty acids; # – number of carbon atoms and double bonds; ## – position of double bond between carbon atoms

The percentage of each of 13 FAs from the total fatty acid content (100%) was calculated in both studies, as well as the percentage of total SFAs, MUFAs, PUFAs, the percentage of PUFAs ω 3 and PUFAs ω 6, and ratios: PUFAs ω 3 and PUFAs ω 6, PUFAs and SFAs, C 18:2 ω 6 and C 20:4 ω 6, C 18:3 ω 3 and C 20:5 ω 3, C 20:4 ω 6 and C 20:5 ω 3

2.3.4 Determination of Malondialdehyde Concentration in the Blood Serum

The blood serum MDA concentration of volunteers in the study concerning the association of platelet membrane FA composition with markers of OS in healthy men was measured according to a method published by Khoschsorur G. A. et al. with minor modifications [15]. The sample preparation serves for the sample purge and for the derivatization of the analyte with thiobarbituric acid (TBA) into a detectable form, i.e., the MDA–TBA adduct. MDA concentration was determined by a Shimadzu Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu). Data were collected and processed using LabSolutions software (Shimadzu). Blood serum MDA concentration was determined by PhD A. Linkevičiūtė.

2.3.5 Chemical Analysis of the Composition of Kidney Stones

The kidney stones of patients who gave their written consent to participate in the abdominal adipose tissue FA composition in men with uronephrolithiasis and MS study were surgically removed, and the chemical composition of the stones was examined by a BRUKER VERTEX 70 Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer using a KBr tablet [16] and analyzed by Prof. PhD V. Šablinskas.

3. RESULTS

3.1 Results of Research Concerning the Association of Platelet Membrane Fatty Acid Composition with Markers of Oxidative Stress in Healthy Men

According to the data gathered in this study, there was a tendency for a slightly higher level of C 14:0 to be found in the Q1, which had a lower concentration of blood serum MDA than the Q3 and Q4, where the blood serum MDA concentration was higher (Q1 and Q3, $p = 0.05$; Q1 and Q4, $p = 0.089$) (Fig. 2).

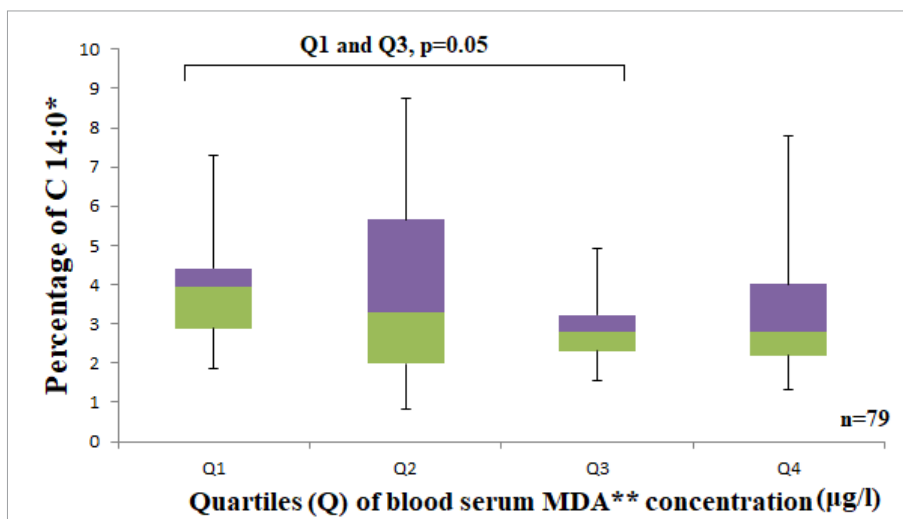


Figure 2. Box plots represent a comparison of the percentage of C 14:0 between quartiles of blood serum MDA concentration ($\mu\text{g/l}$). Q1 and Q3, $p = 0.05$; Q1 and Q4, $p = 0.089$. $n = 79$. * – number of carbon atoms and double bonds, ** – malondialdehyde.

C 16:0 made up the highest percentage of total FAs in the platelet phospholipid membrane (47%). The distribution of C 16:0 was slightly higher in the Q1 of blood serum MDA concentration than in the Q2, Q3, and Q4. Though there was no statistically significant difference between the Q1 and Q4 of C 16:0 ($p = 0.728$), it was observed that the highest percentage of C 16:0 in the Q1 increases the total percentage of saturated fatty acids (SFAs).

The study results showed that the highest level of C 16:1 ω 7 was found in the Q1, which also had a lower blood serum MDA concentration than the Q3 ($p = 0.021$). It was also noticed that the higher the level of C 18:1 ω 7, the higher the concentration of blood serum MDA (Q1 and Q4, $p = 0.070$).

The highest percentage of monounsaturated fatty acids (MUFAs) in the platelet phospholipid membrane consisted of C18:1 ω 9 (46.5%), but the differences were not statistically significant. However, the statistically significant data gathered during this study showed that more C 20:1 ω 9 was found in the Q2 than the Q4 ($p = 0.028$), where the concentration of blood serum MDA was the highest (Fig. 3).

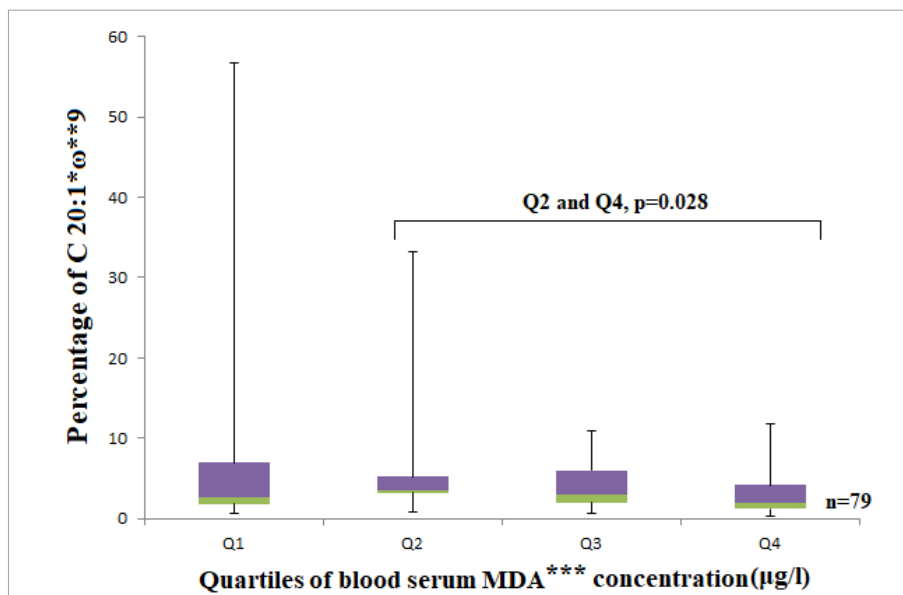


Figure 3. Box plots represent a comparison of the percentage of C 20:1 ω 9 between quartiles of blood serum MDA concentration ($\mu\text{g/l}$). Q2 and Q4, $p = 0.028$. $n = 79$. * – number of carbon atoms and double bonds, ** – position of a double bond between carbon atoms, *** – malondialdehyde.

Assessing the total sums of omega (ω) 3 and ω 6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) separately, it was observed that with the highest concentration of blood serum MDA (Q4), the total sums of ω 3 and ω 6 increase, and with the lowest concentration of blood serum MDA (Q1), the total sums decrease (ω 3 $p = 0.184$, ω 6 $p = 0.813$). However, a statistically significant difference was found only between the amount of ω 3 PUFAs ($p = 0.024$) in the Q1 and Q2.

A statistically significantly lesser level of C 20:5 ω 3 was found in the Q1, which had a lower blood serum MDA concentration than the Q2 ($p = 0.028$). But a statistically significantly higher level of C 20:5 ω 3 was observed in the Q2 than in the Q3, where the blood serum MDA concentration was higher ($p = 0.046$) (Fig. 4).

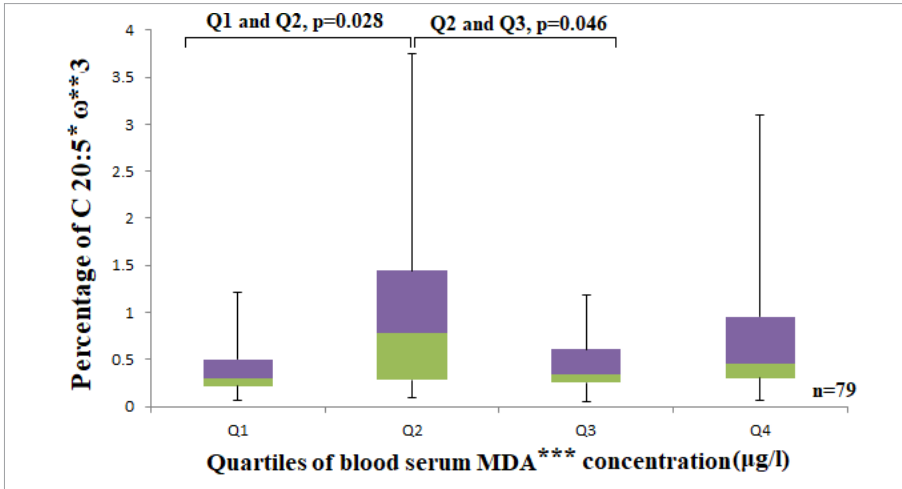


Figure 4. Box plots represent a comparison of the percentage of C 20:5 ω^*_{**3} between quartiles of blood serum MDA concentration ($\mu\text{g/l}$). Q1 and Q2, $p = 0.028$; Q2 and Q3, $p = 0.046$. $n = 79$. * – number of carbon atoms and double bonds, ** – position of a double bond between carbon atoms, *** – malondialdehyde.

Statistically significantly less C 22:5 ω^*_{**3} was observed in the Q1, which had the lowest blood serum MDA concentration, than in the Q2 ($p = 0.037$) and Q4, which had higher levels of blood serum MDA concentration ($p = 0.038$) (Fig. 5).

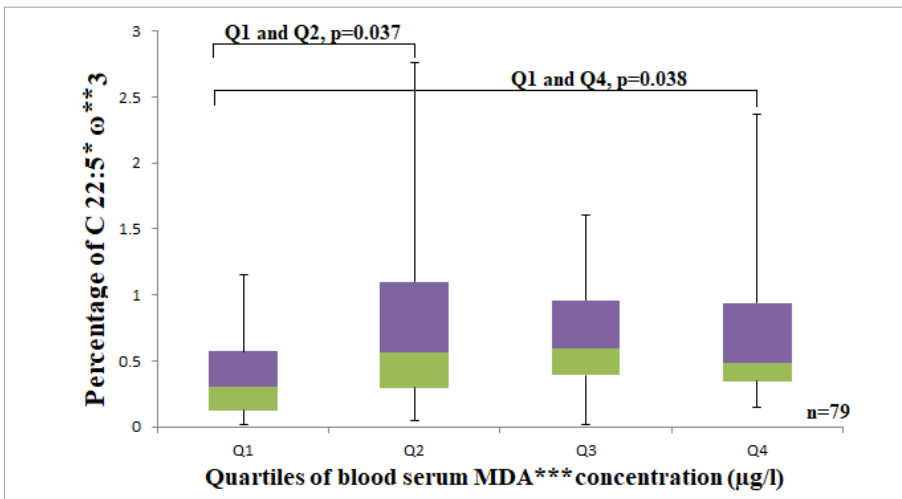


Figure 5. Box plots represent a comparison of the percentage of C 22:5 ω^*_{**3} between quartiles of blood serum MDA concentration ($\mu\text{g/l}$). Q1 and Q2, $p = 0.037$; Q1 and Q4, $p = 0.038$. $n = 79$. * – number of carbon atoms and double bonds, ** – position of a double bond between carbon atoms, *** – malondialdehyde.

These current study results also showed that at the highest concentration of blood serum MDA (Q4), the ratio of C 18:2 ω 6/C 20:4 ω 6, was statistically significantly lower than the lowest blood serum MDA concentration (Q1) ($p = 0.038$) (Table 2).

Table 2. Comparison of the composition of platelet membrane FAs between Qs of blood serum MDA concentration ($\mu\text{g/l}$).

FAs [◊] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum, interquartile range	Qs of MDA [□] concentration ($\mu\text{g/l}$)				P value
		Q1* (n=20)	Q2 ^x (n=20)	Q3 [#] (n=20)	Q4 ^{##} (n=19)	
C 14:0 ^{**}	Med.	3.93	3.30	2.81	2.81	* ^x p=0.529
	Min.	1.88	0.81	1.54	1.34	* [#] p=0.005
	Max.	7.28	8.75	4.92	7.79	* ^{##} p=0.089
	IQR [§]	1.58	3.80	1.16	1.98	* ^x p=0.231 ^x ^{##} p=0.428 [#] ^{##} p=0.627
C 16:0	Med.	48.99	45.39	48.49	43.81	* ^x p=0.718
	Min.	20.53	32.72	37.43	29.32	* [#] p=0.659
	Max.	65.11	59.53	63.15	63.39	* ^{##} p=0.728
	IQR	18.73	13.94	9.54	18.87	* ^x p=0.253 ^x ^{##} p=0.857 [#] ^{##} p=0.247
C 18:0	Med.	20.73	19.97	22.00	18.45	* ^x p=0.925
	Min.	8.76	11.52	16.96	11.89	* [#] p=0.231
	Max.	26.65	27.54	43.87	28.60	* ^{##} p=0.792
	IQR	9.77	5.55	3.65	6.09	* ^x p=0.060 ^x ^{##} p=0.627 [#] ^{##} p=0.026
C 16:1 ω ^{**7}	Med.	1.63	1.37	1.12	1.59	* ^x p=0.327
	Min.	0.39	0.22	0.19	0.18	* [#] p=0.021
	Max.	12.44	15.70	4.44	13.29	* ^{##} p=0.444
	IQR	3.18	2.09	1.01	1.35	* ^x p=0.383 ^x ^{##} p=0.879 [#] ^{##} p=0.134
C 18:1 ω 7	Med.	1.06	1.01	1.27	1.38	* ^x p=0.989
	Min.	0.15	0.13	0.20	0.19	* [#] p=0.718
	Max.	4.09	2.30	2.64	6.90	* ^{##} p=0.070
	IQR	0.67	1.19	1.05	0.97	* ^x p=0.904 ^x ^{##} p=0.158 [#] ^{##} p=0.247

FAs [∗] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum, interquartile range	Qs of MDA [□] concentration (µg/l)				P value
		Q1* (n=20)	Q2* (n=20)	Q3# (n=20)	Q4## (n=19)	
C 18:1ω9	Med.	7.31	5.69	6.79	9.79	* ^x p=0.841
	Min.	0.46	1.62	1.61	0.69	* [#] p=0.968
	Max.	15.43	12.65	14.52	22.05	* ^{##} p=0.283
	IQR	7.36	8.09	5.40	7.04	* ^x p=0.862 * ^{##} p=0.120 # ^{##} p=0.204
C 20:1ω9	Med.	2.65	3.56	2.92	1.98	* ^x p=0.512
	Min.	0.58	0.72	0.56	0.36	* [#] p=0.799
	Max.	56.77	33.26	10.90	11.72	* ^{##} p=0.204
	IQR	6.45	2.29	4.78	3.30	* ^x p=0.277 * ^{##} p=0.028 # ^{##} p=0.224
C 18:2ω6	Med.	5.08	4.33	6.19	6.75	* ^x p=0.738
	Min.	2.01	0.54	1.68	0.40	* [#] p=0.862
	Max.	20.12	19.82	17.03	21.46	* ^{##} p=0.901
	IQR	6.11	7.92	8.24	9.21	* ^x p=0.758 * ^{##} p=0.967 # ^{##} p=0.999
C 18:3ω3	Med.	1.10	1.96	1.58	1.82	* ^x p=0.369
	Min.	0.35	0.28	0.65	0.03	* [#] p=0.289
	Max.	5.43	6.08	5.71	21.66	* ^{##} p=0.569
	IQR	2.23	2.37	1.75	1.93	* ^x p=0.659 * ^{##} p=0.607 # ^{##} p=0.792
C 20:4ω6	Med.	0.63	0.92	0.96	1.08	* ^x p=0.201
	Min.	0.09	0.21	0.02	0.07	* [#] p=0.478
	Max.	7.84	8.31	5.84	9.01	* ^{##} p=0.235
	IQR	1.42	1.60	1.56	2.54	* ^x p=0.620 * ^{##} p=0.923 # ^{##} p=0.569
C 20:5ω3	Med.	0.30	0.78	0.34	0.46	* ^x p=0.028
	Min.	0.06	0.10	0.05	0.06	* [#] p=0.698
	Max.	1.21	3.75	1.18	3.10	* ^{##} p=0.141
	IQR	0.38	1.21	0.41	0.73	* ^x p=0.046 * ^{##} p=0.365 # ^{##} p=0.309
C 22:5ω3	Med.	0.31	0.57	0.59	0.48	* ^x p=0.037
	Min.	0.02	0.05	0.02	0.15	* [#] p=0.052
	Max.	1.15	2.76	1.61	2.37	* ^{##} p=0.038
	IQR	0.52	1.07	0.64	0.72	* ^x p=0.820 * ^{##} p=0.923 # ^{##} p=0.923

FAs [∗] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum, interquartile range	Qs of MDA [□] concentration (µg/l)				P value
		Q1* (n=20)	Q2* (n=20)	Q3# (n=20)	Q4## (n=19)	
C 22:6ω3	Med.	0.37	0.97	0.68	0.70	* ^x p=0.265
	Min.	0.02	0.06	0.03	0.13	* [#] p=0.602
	Max.	2.40	3.58	2.24	3.95	* ^{##} p=0.141
	IQR	1.09	1.80	0.64	1.67	^x #p=0.289 ^x ##p=0.923 [#] ##p=0.513
Total SFAs (C 14:0 + C 16:0 + C 18:0)	Med.	73.42	68.98	74.56	65.95	* ^x p=0.820
	Min.	31.17	49.60	57.28	45.78	* [#] p=0.529
	Max.	93.00	87.77	90.51	92.59	* ^{##} p=0.607
	IQR	27.50	23.72	15.79	26.18	^x #p=0.253 ^x ##p=0.687 [#] ##p=0.141
Total MUFAs	Med.	14.54	15.23	13.33	16.99	* ^x p=0.883
	Min.	3.69	5.15	5.04	5.05	* [#] p=0.383
	Max.	62.80	36.57	22.50	32.99	* ^{##} p=0.771
	IQR	12.78	10.28	7.94	8.10	^x #p=0.341 ^x ##p=0.687 [#] ##p=0.158
Total PUPAs	Med.	9.80	13.89	11.15	13.09	* ^x p=0.314
	Min.	3.31	4.04	3.83	1.33	* [#] p=0.314
	Max.	34.22	33.89	26.42	34.97	* ^{##} p=0.336
	IQR	7.32	12.82	8.62	19.59	^x #p=0.659 ^x ##p=0.945 [#] ##p=0.569
Σ*** ω3	Med.	2.81	4.53	3.60	4.20	* ^x p=0.024
	Min.	0.59	0.79	1.99	0.84	* [#] p=0.201
	Max.	9.37	13.00	6.83	25.46	* ^{##} p=0.184
	IQR	3.61	3.23	2.64	5.38	^x #p=0.076 ^x ##p=0.728 [#] ##p=0.687
Σ ω6	Med.	5.72	7.12	7.42	7.53	* ^x p=0.565
	Min.	2.25	1.14	1.84	0.49	* [#] p=0.779
	Max.	27.96	28.13	21.70	28.28	* ^{##} p=0.813
	IQR	6.61	8.92	8.51	11.29	^x #p=0.947 ^x ##p=0.901 [#] ##p=0.879
Ratio of ω3/ω6	Med.	0.43	0.67	0.53	0.45	* ^x p=0.149
	Min.	0.08	0.18	0.17	0.18	* [#] p=0.301
	Max.	2.57	5.15	2.03	8.21	* ^{##} p=0.296
	IQR	0.64	0.96	0.74	0.88	^x #p=0.547 ^x ##p=0.771 [#] ##p=0.945

FAs [∘] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum, interquartile range	Qs of MDA [□] concentration (µg/l)				P value
		Q1* (n=20)	Q2* (n=20)	Q3# (n=20)	Q4## (n=19)	
Ratio of PUFAs/ SFAs	Med.	0.15	0.19	0.15	0.20	* ^x p=0.429
	Min.	0.04	0.06	0.04	0.01	* [#] p=0.820
	Max.	0.70	0.67	0.46	0.70	* ^{##} p=0.428
	IQR	0.13	0.23	0.14	0.40	* [#] p=0.547 ^x ^{##} p=0.967 [#] ^{##} p=0.444
Ratio of C 18:2ω6/ C 20:4ω6	Med.	7.49	6.30	7.75	5.08	* ^x p=0.091
	Min.	2.57	0.54	2.29	0.99	* [#] p=0.659
	Max.	26.78	14.48	118	43.57	* ^{##} p=0.038
	IQR	11.20	6.72	9.74	4.40	* [#] p=0.192 ^x ^{##} p=0.749 [#] ^{##} p=0.204
Ratio of C 18:3ω3/ C 20:5ω3	Med.	4.20	1.62	4.46	3.15	* ^x p=0.076
	Min.	1.20	0.26	0.83	0.04	* [#] p=0.659
	Max.	14.68	49.00	50.44	83.31	* ^{##} p=0.531
	IQR	4.15	4.99	13.76	6.75	* [#] p=0.108 ^x ^{##} p=0.531 [#] ^{##} p=0.296
Ratio of C 20:4ω6/ C 20:5ω3	Med.	2.16	1.62	2.00	2.71	* ^x p=0.583
	Min.	0.39	0.58	0.29	0.09	* [#] p=0.820
	Max.	8.50	7.23	17.70	13.50	* ^{##} p=0.728
	IQR	4.93	2.28	2.42	3.65	* [#] p=0.398 ^x ^{##} p=0.247 [#] ^{##} p=0.813

SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; [∘] – fatty acids; [□] – malondialdehyde; * – first quartile (Q1); ^x – second quartile (Q2); # – third quartile (Q3); ## – fourth quartile (Q4); [§] – interquartile range; ^{xx} – number of carbon atoms and double bonds; ** – position of double bond between carbon atoms in the molecule; *** – total sum in percentages.

Spearman’s test showed a weak but statistically significant inverse correlation between C 14:0 and blood serum MDA concentration ($r = -0.255$; $p = 0.023$) and between the concentration of blood serum MDA and the ratio of C 18:2ω6/C 20:4ω6 ($r = -0.244$; $p = 0.034$) (Table 4).

Comparing the composition of platelet membrane FAs with the percentage of platelet and monocyte aggregate (PMA) formation, it was observed that with the increase in the formation of aggregates, the total sums of MUFAs

and PUFAs were higher separately and the total sum of SFAs was lower. The differences were not statistically significant, however. On the other hand, a tendency was observed for an increased level of C 14:0 and an increased ratio of C 18:3 ω 3/C 20:5 ω 3 in the Q1 and the Q4 of the formation of PMAs ($p = 0.093$) (Fig. 6 and 7). The same tendency was observed in the comparison of the ratio of C 18:3 ω 3/C 20:5 ω 3 between the Q1 and the Q3 of the formation of PMAs ($p = 0.055$) (Table 3). In terms of the mutual differences between the percentage of the formation of other PLAs (granulocytes and lymphocytes) and the platelet membrane FA spectrum, the data were not statistically significant.

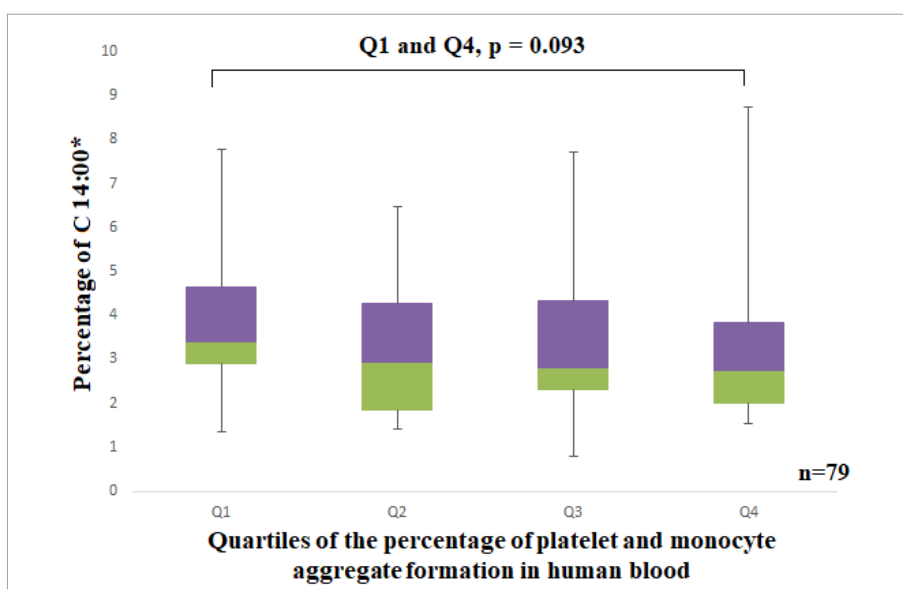


Figure 6. Box plots represent a comparison of the percentage of C 14:00 between quartiles of the percentage of PMA formation in human blood. Q1 and Q4, $p = 0.093$. $n = 79$. * – number of carbon atoms and double bonds.

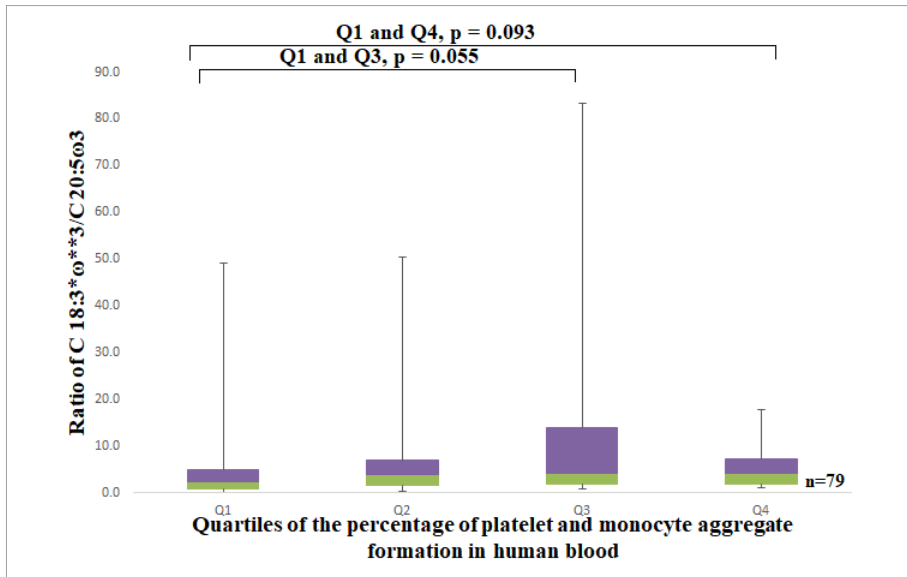


Figure 7. Box plots represent a comparison of the ratio of C 18:3ω³/C 20:5ω³ between quartiles of the percentage of PMA formation in human blood. Q1 and Q3, p = 0.055; Q1 and Q4, p = 0.093. n = 79. * – number of carbon atoms and double bonds, ** – position of a double bond between carbon atoms.

Table 3. Comparison of certain platelet membrane FAs between Qs of the percentage of the formation of PMAs.

FAs [∞] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum, interquartile range	Qs of percentage of PMA [□] formation				P value
		Q1* (n=20)	Q2 ^x (n=19)	Q3 [#] (n=21)	Q4 ^{##} (n=19)	
C 14:0 ^{xx}	Med.	3.39	2.93	2.81	2.76	*, [#] p=0.204
	Min.	1.34	1.42	0.81	1.54	*, [#] p=0.197
	Max.	7.79	6.48	7.70	8.75	*, ^{##} p=0.093
	IQR [§]	1.75	2.43	2.03	1.85	^x , [#] p=0.936 ^x , ^{##} p=0.822 ^{##} , ^{##} p=0.791
Total SFAs (C 14:0 + C 16:0 + C 18:0)	Med.	77.45	63.57	70.64	73.04	*, ^x p=0.194
	Min.	45.78	49.06	31.17	49.11	*, [#] p=0.291
	Max.	87.77	93.00	92.59	92.46	*, ^{##} p=0.696
	IRQ	16.55	27.75	25.31	18.02	^x , [#] p=0.872 ^x , ^{##} p=0.298 ^{##} , ^{##} p=0.512

FAs [∗] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum, interquartile range	Qs of percentage of PMA [□] formation				P value
		Q1* (n=20)	Q2 ^x (n=19)	Q3 [#] (n=21)	Q4 ^{##} (n=19)	
Total MUFAs	Med.	13.33	16.91	15.40	15.16	^{*,x} p=0.336
	Min.	5.15	3.69	5.04	5.05	^{*,#} p=0.449
	Max.	32.99	36.57	62.80	23.83	^{*,##} p=0.942
	IQR	7.56	9.59	5.94	9.34	^{x,##} p=0.233 ^{#,##} p=0.606
Total PUFAs	Med.	9.51	15.30	10.63	11.47	^{*,x} p=0.283
	Min.	4.28	3.31	1.33	2.49	^{*,#} p=0.648
	Max.	24.84	34.97	33.89	34.22	^{*,##} p=0.633
	IQR	9.33	18.37	10.18	10.37	^{x,##} p=0.555 ^{#,##} p=0.599 ^{#,##} p=0.856
Ratio of C18:3 ^{ω**3} / C 20:5 ^{ω3}	Med.	2.21	3.91	4.06	4.16	^{*,x} p=0.184
	Min.	0.04	0.26	0.67	1.04	^{*,#} p=0.055
	Max.	49.00	50.44	83.31	17.83	^{*,##} p=0.093
	IQR	4.15	5.47	12.24	5.47	^{x,##} p=0.294 ^{#,##} p=0.799 ^{#,##} p=0.587

SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; [∗] – fatty acids; [□] – platelet–monocyte aggregates; ^{*} – first quartile (Q1); ^x – second quartile (Q2); [#] – third quartile (Q3); ^{##} – fourth quartile (Q4); [§] – interquartile range; ^{**} – number of carbon atoms and double bonds; ^{**} – position of a double bond between carbon atoms in the molecule.

Calculations demonstrated that the correlation between the platelet membrane FA spectrum and the percentage of the formation of PMAs had a weak but statistically significant inverse correlation between the percentage of the formation of PMAs and C 14:0 ($r = -0.222$; $p = 0.050$) (Table 4).

Table 4. The correlation of the platelet membrane FA spectrum with blood serum MDA concentration and the percentage of PMA formation.

FAs [∗] (provided by percentage of total amount)	Spearman's rho		P value	
	MDA* concentration (µg/l)	Percentage of PMA** formation	MDA concentration (µg/l)	Percentage of PMA** formation
C 14:0 ^x	-0.255	-0.222	0.023	0.050
Ratio of C 18:2 ^{ω**6} / C 20:4 ^{ω6}	-0.244	-	0.034	-

[∗] – fatty acids; ^{*} – malondialdehyde; ^{**} – platelet–monocyte aggregates; ^x – number of carbon atoms and double bonds; ^{**} – position of a double bond between carbon atoms in the molecule.

3.2 Results of the Research of Abdominal Adipose Tissue Fatty Acid Composition in Men with Uronephrolithiasis and a Metabolic Syndrome

Fig. 8 shows the distribution of the patients with uronephrolithiasis by types of kidney stones and the presence of MS. Calcium-based kidney stones were the most common among the patients with nephrolithiasis, while uric acid stones were the least common. For further analysis, individuals with nephrolithiasis were divided into two groups: with MS (32.4%) and without MS (67.6%). Seventy percent of patients with uric acid kidney stones had MS, and only 41% of individuals with calcium-based kidney stones (involving both calcium oxalate and calcium phosphate) had MS. The frequency of MS of individuals with uric acid kidney stones was two times higher than that of patients with calcium-based kidney stones. Moreover, MS was found statistically significant in patients with uric acid kidney stones more frequently compared to individuals with calcium-based kidney stones ($p = 0.004$).

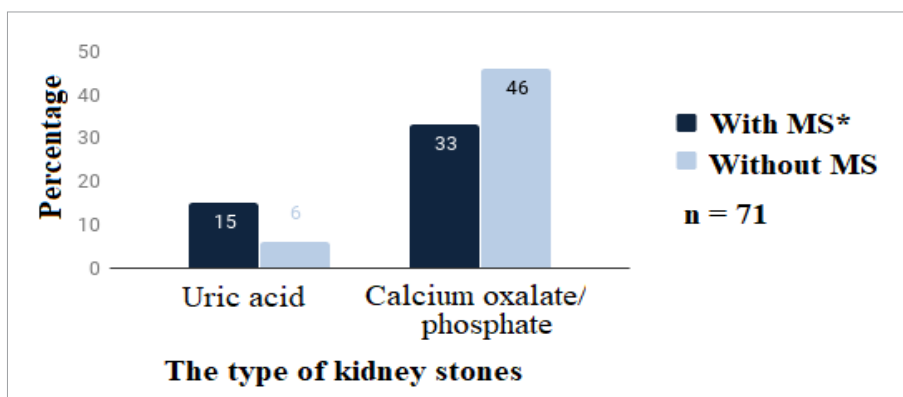


Figure 8. Diagram represents the percentage distribution of patients with uronephrolithiasis by type of kidney stones and MS. $n = 71$. * – metabolic syndrome.

According to the presence or absence of MS, all patients with uric acid and calcium-based kidney stones were subdivided into two groups: with and without MS (Table 5). The total PUFAs (Fig. 9), $\omega 6$ PUFAs (Fig. 10), and C 18:2 $\omega 6$ (Fig. 11) percentages were significantly higher in patients with calcium-based stones without MS than in the patients with uric acid kidney stones with MS.

Table 5. Comparison of adipose tissue FA composition between patients with uric acid kidney stones and MS and patients with calcium-based kidney stones without MS.

FAs (provided by percentage of total amount)	Uric acid (n=11)		Calcium oxalate/ phosphate (n=38)		P value
	With MS		Without MS		
	Mean ± Standard deviation				
Total PUFAs	12.61 ±1.70	14.64 ±2.88	12.61 ±1.70	14.64 ±2.88	p=0.037
Σ* ω**6	11.94 ±1.6	13.97 ±2.71	11.94 ±1.6	13.97 ±2.71	p=0.042
C18:2***ω6	11.62 ±1.57	13.55 ±2.61	11.62 ±1.57	13.55 ±2.61	p=0.042

FAs – fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; MS – metabolic syndrome; * – total sum; ** – position of a double bond between carbon atoms; *** – number of carbon atoms and double bonds.

Mean and standard deviation of other fatty acids (C 14:0, C 16:0, C 18:0, C 16:1ω7, C 18:1ω9, C 18:1ω7, C 20:1ω9), expressed as a percentage of the total sum, were not statistically significant

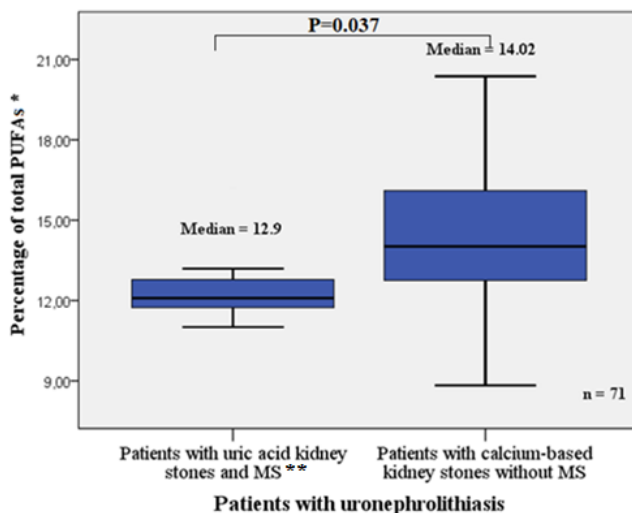


Figure 9. Box plots represent a comparison of the percentage of total PUFAs between patients with uric acid kidney stones and MS and patients with calcium-based kidney stones without MS. P = 0.037, n = 71. * – polyunsaturated fatty acids; ** – metabolic syndrome.

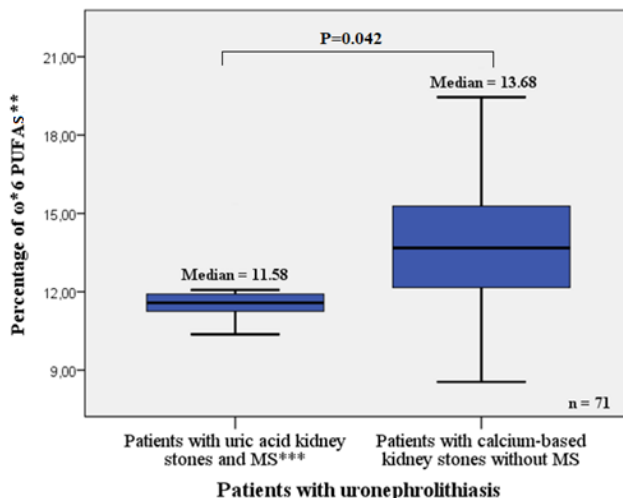


Figure 10. Box plots represent a comparison of the percentage of ω_6 PUFAs between patients with uric acid kidney stones and MS and patients with calcium-based kidney stones without MS. $P = 0.042$. $n = 71$. * – position of a double bond between carbon atoms; ** – polyunsaturated fatty acids; *** – metabolic syndrome.

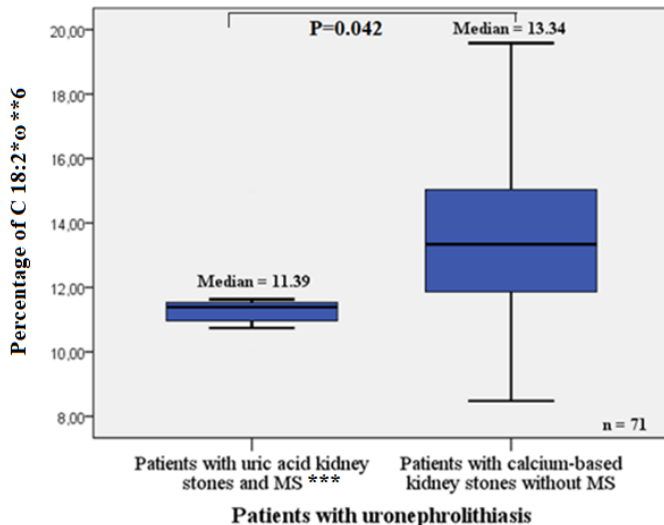


Figure 11. Box plots represent comparison of percentage of C 18:2 ω_6 between patients with uric acid kidney stones and MS and patients with calcium-based kidney stones without MS. $P = 0.042$. $n = 71$. * – number of carbon atoms and double bonds; ** – position of a double bond between carbon atoms; *** – metabolic syndrome.

The results were significantly different between all groups of patients and the control group of healthy individuals. The level of MUFAs in patients with uric acid and calcium-based stones was two times higher than it was in the control group of healthy individuals ($p < 0.0001$) (Fig. 12), (C 18:1 ω 9 was predominant). The level of PUFAs was 2.4–2.8 times lower in each group of patients with nephrolithiasis compared to healthy individuals in the control group ($p < 0.0001$) (Tab. 6) (Fig. 13). The ratio of ω 3 and ω 6 PUFAs was higher in the control group of healthy individuals than it was in patients with kidney stones. The total level of SFAs was almost the same in each group of patients with kidney stones compared to the control group of healthy individuals. Patients with nephrolithiasis had a higher level of SFA C 16:0 ($p = 0.001$; $p < 0.0001$) and a similar level of SFA C 14:0 ($p > 0.05$) compared to healthy individuals in the control group. The patients with calcium-based kidney stones had a lower level of SFA C 18:0 compared to the control group of healthy individuals ($p < 0.0001$), however.

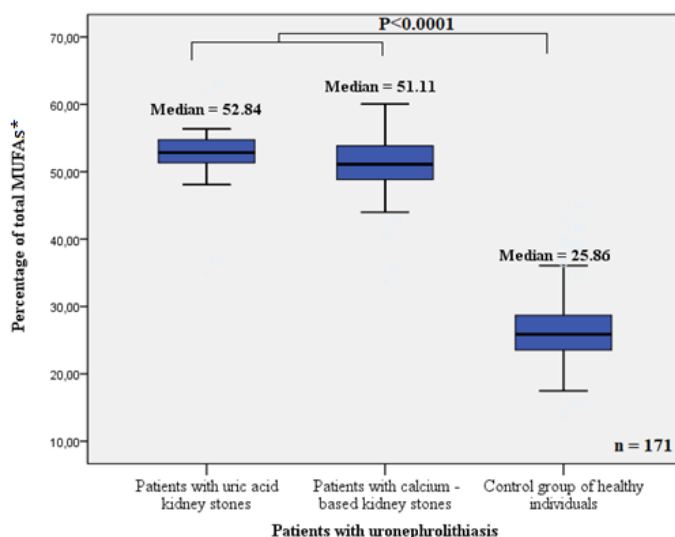


Figure 12. Box plots represent a comparison of the percentage of total MUFAs between all groups of patients and the control group of healthy individuals. $P < 0.0001$. $n = 171$. * – monounsaturated fatty acids.

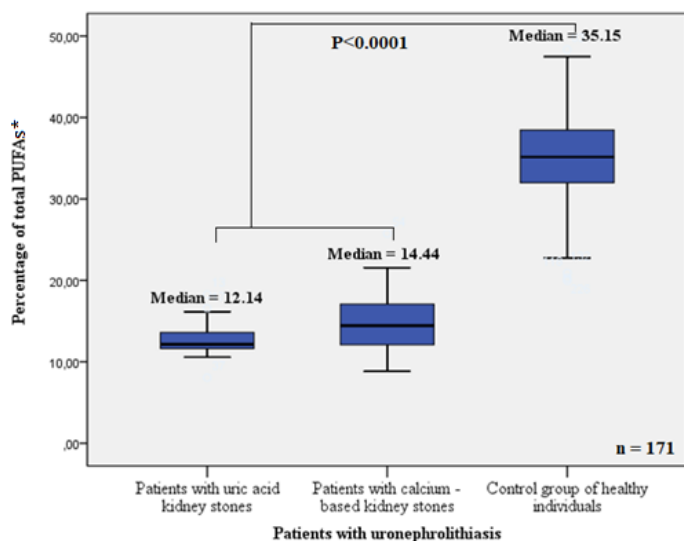


Figure 13. Box plots represent a comparison of the percentage of total PUFAs between all groups of patients and the control group of healthy individuals. $P < 0.0001$. $n = 171$. * – polyunsaturated fatty acids.

Table 6. Comparison of the composition of FAs in adipose tissue among patients with nephrolithiasis and the control group of healthy individuals.

FAs (provided by percentage of total amount)	Uric acid* (n=15)	Calcium oxalate/ phosphate† (n=56)	Control group of healthy individuals‡ (n=100)	P value
	Mean ± Standard deviation			
C 18:1*ω**9	44.37±3.35	42.40±4.38	22.71±3.69	*,†,‡,p<0.0001
C 20:1ω9	1.09±0.21	1.03±0.56	0.56±0.48	*,†,‡,p<0.0001
C 18:3ω3	0.15±0.03	0.20±0.11	1.12±0.54	*,†,‡,p<0.0001
C 22:5ω3	0.19±0.09	0.20±0.15	0.39±0.27	*,†,‡,p=0.002
Ratio of ω3/ω6	0.05±0.02	0.04±0.02	1.13±0.28	*,†,‡,p<0.0001
Total SFAs (C 14:0 + C 16:0 + C 18:0)	34.67±3.03	33.55±2.81	32.14±5.29	*,‡,p=1.0 †,‡,p=0.608
Total MUFAs	53.07±3.54	51.78±3.84	26.2±4.27	*,†,‡,p<0.0001
Total PUFAs	12.66±2.47	14.67±3.47	35.13±4.84	*,†,‡,p<0.0001
PUFAs/SFAs	0.37±0.085	0.44±0.12	1.13±0.29	*,†,‡, p<0.0001
Σ*** ω3	0.63±0.26	0.7±0.44	4.5±1.46	*,†,‡, p<0.0001
Σ ω6	12.03±2.33	13.97±3.13	27.92±4.56	*,†,‡, p<0.0001
C 14:0	3.33±0.74	3.56±3.5	4.5±2.34	p>0,05

FAs (provided by percentage of total amount)	Uric acid* (n=15)	Calcium oxalate/ phosphate† (n=56)	Control group of healthy individuals‡ (n=100)	P value
	Mean ± Standard deviation			
C 16:0	24.88±1.74	24.8±2.04	21.91±2.4	*-‡, p=0.001 †-‡, p<0.0001
C 18:0	6.06±1.34	5.19±1.09	6.49±1.05	*,†-‡, p>0.05 †-‡, p<0.0001
C 16:1ω7	5.08±1.68	5.7±1.68	3.48±0.99	*-‡, p=0.003 †-‡, p<0.0001
C 18:2ω6	11.75±2.3	13.58±2.99	22.59±3.98	*,†-‡, p<0.0001
C 20:4ω6	0.28±0.1	0.39±0.24	5.33±1.11	*,†-‡, p<0.0001
C 20:5ω3	0.09±0.05	0.11±0.07	1.06±0.68	*,†-‡, p<0.0001
C 22:6ω3	0.19±0.12	0.19±0.15	1.93±0.73	*,†-‡, p<0.0001

FAs – fatty acids; SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; * – patients with uric acid kidney stones; † – patients with calcium oxalate/phosphate kidney stones; ‡ – control group of healthy individuals; × – number of carbon atoms and double bonds; ** – position of double bond between carbon atoms in the molecule; *** – total sum in percentages.

For further analysis, all patients with nephrolithiasis were subdivided into two groups: with and without MS. Each of those groups was compared to the control group of healthy individuals (Tab. 7). Patients with MS had a significantly higher level of C 18:1ω9 ($p = 0.041$) and a lower level of C 16:1ω7 ($p = 0.003$) compared to kidney stone patients without MS. The total level of MUFAs was about equal in both groups of kidney stone patients with and without MS ($p = 0.762$) but approximately twofold higher compared to the control group of healthy people ($p < 0.0001$). The level of SFAs was significantly higher in kidney stone patients without MS compared to control ($p = 0.008$).

Moreover, the percentage of ω3 PUFAs in healthy individuals was about 6.3 times ($p < 0.0001$) higher, and the percentage of ω6 PUFAs about 2 times higher than that in both groups of patients with kidney stones ($p < 0.0001$). The ratio of ω3/ω6 PUFAs in the control group of healthy individuals was also higher than in each group of patients.

Table 7. Comparison of FA composition in adipose tissue between patients with kidney stones and the control group of healthy individuals.

FAs (provided by percentage of total amount)	Patients (n=71)		Control group of healthy individuals ‡ (n=100)	P value
	Without MS*	With MS†		
	Mean ± Standard deviation			
C 18:1*ω**9	40.79±7.52	43.77±4.61	22.71±3.69	*†, p=0.041 *‡, †‡ p<0.0001
C 20:1ω9	1.26±0.80	0.92±0.35	0.56±0.48	*†, p=0.199 *‡, †‡, p<0.0001
C 18:3ω3	0.22±0.17	0.21±0.13	1.12±0.54	*†, p=0.858 *‡, †‡, p<0.0001
C 22:5ω3	0.23±0.23	0.21±0.17	0.39±0.27	*†, p=0.941 *‡, †‡, p<0.0001
Ratio of ω3/ω6	0.05±0.03	0.05±0.02	1.13±0.28	*†, p=0.912 *‡, †‡, p<0.0001
Total SFAs (C 14:0 + C 16:0 + C 18:0)	34.54±3.89	33.62±2.88	32.14±5.29	*†, p=1.0 *‡, p=0.008 †‡, p=0.518
Total MUFAs	51.04±4.93	52.30±3.91	26.19±4.27	*†, p=0.762 *‡, †‡, p<0.0001
Total PUFAs	14.42±3.08	14.07±3.78	35.13±4.84	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
Ratio of PUFAs/SFAs	0.42±0.1	0.42±0.13	1.13±0.29	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
Σ***ω3	0.76±0.58	0.72±0.52	4.5±1.46	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
Σ ω6	13.67±2.82	13.36±3.34	27.91±4.56	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
C 14:0	3.8±1.13	3.3±0.81	4.49±2.34	*†, p=1.0 *‡, p=0.124 †‡, p=0.029
C 16:0	25.01±2.51	24.94±2.05	21.9±2.4	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
C 18:0	5.72±1.44	5.38±1.1	6.49±1.05	*†, p=0.709 *‡, †‡, p<0.0001
C 16:1ω7	6.23±2.41	5.03±1.65	3.48±0.99	*†, p=0.003 *‡, †‡, p<0.0001
C 18:2ω6	13.25±2.7	13.02±3.2	22.59±3.98	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
C 20:4ω6	0.42±0.3	0.34±0.23	5.33±1.11	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
C 20:5ω3	0.11±0.07	0.1±0.08	1.06±0.68	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001
C 22:6ω3	0.19±0.15	0.19±0.17	1.92±0.73	*†, p=1.0 *‡, †‡, p<0.0001

FAs – fatty acids; SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; * – kidney stone patients without MS; † – kidney stone patients with MS; ‡ – control group of healthy individuals; × – number of carbon atoms and double bonds; ** – position of double bond between carbon atoms in the molecule; *** – total sum in percentages.

4. DISCUSSION

CNCDs are nowadays reaching epidemic proportions worldwide. These diseases affect people of all ages, nationalities, and classes, causing the greatest global share of death and disability [17]. All groups of CNCDs, in spite of the different organs and systems involved, have been demonstrated to have a common risk factor, or starting point, in general low-grade, clinically silent inflammation [18]. Moreover, chronic renal and vascular OS in association with an enhanced inflammatory burden are processes that lead to the development and progression of cardiovascular diseases, atherosclerosis, and kidney lesions [19]. Therefore, based on the obtained results of this research, it was also sought to analyze the effect of OS on the pathogenesis of the manifestation of CNCDs in this dissertation.

Data gathered in this study showed that the highest percentage of FAs in the platelet phospholipid membrane consisted of SFAs. Other authors have obtained quite similar results [20–23]. Moreover, C16:0 was the main FA of the platelet membrane [24], as was observed in this study. According to recent scientific studies, higher levels of SFAs were detected in those cell membranes that are closely related to signalling mechanisms. C 14:0 and C 16:0 can covalently modify proteins associated with signal transmission and are involved in the regulation of transcription factors that influence lipid metabolism: cholesterol, FAs, and triacylglycerol biosynthesis; lipoprotein assembly, secretion and clearance (e.g., the hepatocyte nuclear factor-4), and inflammation (e.g., the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) [25].

C 16:1 ω 7 was at its highest level when the blood serum MDA concentration was at its lowest in the platelet phospholipid membrane of study volunteers. This was probably due to intensified C 16:1 ω 7 synthesis from SFA C 16:0 by stearoyl-CoA desaturase–1 during FA desaturation [26], and/or because C16:1 ω 7 was obtained from vegetable-based foods and oils. Such a diet contains a number of antioxidants, e.g., fat-soluble vitamin E (α tocopherol), leading to a higher level of C 16:1 ω 7 at a lower concentration of blood serum MDA.

According to scientific data, C 18:1 ω 9 accounts for the highest percentage of FA compared to other MUFAs [20, 21, 23]. The same tendency was observed in this study. This increase in C 18:1 ω 9 at the highest concentration of blood serum MDA can be interpreted as an intention to reduce the blood serum MDA level or as compensation by using PUFAs for active blood

serum MDA synthesis. The absence of $\omega 3$ and $\omega 6$ PUFAs may intensify the C 18:1 $\omega 9$ synthesis, as it is the precursor of other $\omega 9$ PUFAs required for cell membranes.

It was also found that there was twice the amount of MUFAs in the adipose tissue of patients with nephrolithiasis, regardless of the type of kidney stone, than in healthy individuals in the control group. Lack of $\omega 3$ and $\omega 6$ PUFAs causes a compensatory increase in the synthesis of MUFAs, which leads to an increased production of $\omega 9$ PUFAs. On the other hand, the diet of patients with nephrolithiasis may contain more MUFAs than the diet of healthy individuals in the control group.

Moreover, diets high in MUFAs promote the gene expression of antioxidant enzymes in adipose tissue (glutathione peroxidase, catalase, etc.) and thus reduce OS. According to this, the increase in MUFAs is related to the intensification of their synthesis in the human body. An increased dietary intake of SFAs in the adipose tissue of obese individuals stimulates the enzyme nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH-oxidase), which promotes the synthesis of reactive oxygen species and inhibits the expression of genes encoding antioxidant enzymes. Researchers therefore believe that SFAs should be replaced with MUFAs, since it would be an effective way to reduce OS for individuals with MS [27]. Furthermore, experiments on laboratory mice suggest that the replacement of SFAs by MUFAs reduces the inflammation in adipose tissue and insulin resistance, leading to a reduction in the risk of the development of CNCs [28].

Although, based on the data of this study, MS had occurred two times more frequently in individuals with uric acid kidney stones than in patients with calcium phosphate/oxalate kidney stones, this was not statistically significant. According to recent scientific data, MS is very much related to the formation of uric acid kidney stones [29–31]. Uric acid kidney stones in those studies were more common in older patients with a higher body mass index and lower urine pH and a higher uric acid level [29].

Canadian researchers compared the spectrum of FAs in blood phospholipids in 734 cardiovascular patients with and without MS. They found increased levels of SFAs (i.e., C 16:0, C 18:0) and $\omega 6$ PUFAs (i.e., C 18:3 $\omega 6$, C 22:6 $\omega 6$) and decreased amounts of $\omega 3$ PUFAs (i.e. C 20:5 $\omega 3$ and C 22:6 $\omega 3$) in patients with MS compared to patients without MS [32]. This study, however, showed that the total percentage of SFAs in the adipose tissue of individuals with MS did not differ from the control group of healthy individuals. Nevertheless, patients without MS had a higher level of SFAs than those of the control group of healthy individuals ($p = 0.008$).

According to the data obtained in this study, a statistically significantly lesser level of C 20:5 ω 3 was found at the lowest level of blood serum MDA concentration, but statistically significantly more C 20:5 ω 3 was observed when the concentration of blood serum MDA was at its higher level in the platelet phospholipid membrane. This result shows that increased oxidation stimulates platelets to synthesize more PUFAs (e.g., C 20:5 ω 3) and therefore increases the production of biologically active compounds and platelet activation. C 20:5 ω 3 is associated with a lower incidence of major coronary events. This effect of C 20:5 ω 3 in reducing the risk of cardiovascular diseases could be mediated by increased production of prostaglandin I₃ (PGI₃), inhibiting platelet aggregation; promoting vasodilatation, myocardial ischemic injury, and arteriosclerosis; and inducing neoangiogenesis. Furthermore, according to the study, an increased level of PGI₃ decreases thromboxane A₂ (TXA₂) production, which is known to have the opposite effect on the cardiovascular system: TXA₂ causes platelet activation, coronary spasms, and vascular smooth muscle cell proliferation, which can result in arteriosclerosis and, subsequently, cardiovascular events [33]. C 20:4 ω 6 and C 20:5 ω 3 antagonize each other. C 20:5 ω 3 competes with C 20:4 ω 6 in the cyclooxygenase (COX) pathway, leading to the formation of eicosanoids that are less pro-thrombotic and inflammatory, and may also directly inhibit platelet aggregation, which is something that the eicosanoids derived from C 20:4 ω 6 cannot do [34–36].

Data gathered in this study showed that the total sums of individual ω 3 and ω 6 were higher when blood serum MDA concentration was at the highest level and the total sums of individual ω 3 and ω 6 were lower when blood serum MDA concentration was at the lowest level. However, a statistically significant difference was found only in the Q1 and Q2 of the total sum of ω 3 FAs ($p = 0.024$). Similar results were obtained by D. Li et al. [37]. The increased level of PUFAs with a higher blood serum MDA concentration could be explained as a platelet response to prepare for future activation. The process of oxidation and the increased concentration of blood serum MDA are factors that stimulate platelets to synthesize more PUFAs (e.g., C 20:4 ω 6, C 20:5 ω 3, C 22:6 ω 3, etc.) from essential FAs: C 18:2 ω 6 and C 18:3 ω 3 by a series of desaturase and elongase enzymes, leading to an intensified synthesis of biologically active compounds, e.g., pro- or anti-inflammatory eicosanoids and docosanoids.

Patients with nephrolithiasis had a percentage of total PUFAs in adipose tissue two times lower than healthy individuals in the control group ($p < 0.0001$). The percentage of PUFAs in adipose tissue basically reflects the

human diet. C 18:2 ω 6 and C 18:3 ω 3 FAs represented a major percentage of total PUFAs. Therefore, it is assumed that individuals with nephrolithiasis had a lack of PUFAs in their diet. This lack of C 18:2 ω 6 and C 18:3 ω 3 can cause a slowdown of the synthesis of other ω 3 and ω 6 PUFAs.

It was also found that patients with nephrolithiasis had a higher level of C 16:1 ω 7 and a lower level of C 20:5 ω 3 in adipose tissue than healthy individuals in the control group. However, individuals with MS had significantly less C 16:1 ω 7 and more C 18:1 ω 9 than those who had not been diagnosed with MS. The results of this study can therefore confirm that individuals with nephrolithiasis consume a lower level of essential PUFAs; therefore, the synthesis of MUFAs increases, leading to increased levels of C 16:1 ω 7 and C 18:1 ω 9 in adipose tissue.

An increased dietary intake of PUFAs prevents lipid accumulation in the liver and the adipose tissue of the abdominal area. The reverse effect is, however, characteristic of SFAs [38]. In vitro data on a culture of proximal renal tubular cells showed that PUFAs (e.g., C 18:3 ω 3 and C 20:5 ω 3) and MUFA (e.g., C 18:1 ω 9) reduce OS and inhibit endoplasmic reticulum stress (ERS), which disrupts protein, lipid, and sterol biosynthesis and intracellular Ca²⁺ accumulation, leading to cell apoptosis and necrosis. C 18:3 ω 3, C 20:5 ω 3, and C 18:1 ω 9 protect against ERS, reducing the level of ERS indicators: the phosphorylated form of the eukaryotic initiation factor 2 α , C/EBP homologous protein, and glucose regulated protein 78 [39, 40].

The ratio of C 18:2 ω 6/C 20:4 ω 6 at the highest blood serum MDA concentration was statistically significantly lower than it was at the lowest blood serum MDA concentration in the platelet phospholipid membrane of healthy volunteers. According to this result, a more intensive conversion of C 18:2 ω 6 to C 20:4 ω 6 occurs with a higher concentration of blood serum MDA. This conversion could be considered the preparation of platelets for the synthesis of pro-inflammatory eicosanoids. Moreover, the thromboxanes, which are produced activate platelets, allow them to start the process of blood coagulation more quickly. C 20:4 ω 6, incorporated in the platelet membrane, is used for the synthesis of TXA₂, which is involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases in that it promotes platelet aggregation and vasoconstriction, acting through specific receptors coupled with the G-protein Gq [41, 42]. Therefore, a higher concentration of blood serum MDA could be a factor in the formation of a higher level of TXA₂.

Furthermore, an increased ratio of C 18:3 ω 3/C 20:5 ω 3 was noted when the lowest and the highest percentage of the formation of PMAs in healthy

volunteers were compared. Since C 18:3 ω 3 is not synthesized in the human body and obtained only with food (vegetable oils), it reflects the diet of a particular person and will eventually be converted to C 20:5 ω 3. An experimental study showed that when the platelet membrane is saturated with C 20:5 ω 3, platelet procoagulative properties can be reduced. Moreover, C 20:5 ω 3, in combination with C 22:6 ω 3, has a protective effect against cardiovascular diseases, since anti-inflammatory, biologically active compounds are synthesized from these FAs [43]. Consequently, ω 3 PUFAs can regulate processes associated with inflammation through multiple mechanisms: platelet activation and aggregation and vasoconstriction [44]. By changing C 20:4 ω 6 as a substrate in the production of eicosanoids, ω 3 PUFAs can act directly, thereby inhibiting the metabolism of C 20:4 ω 6, or indirectly, through gene expression: activating peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) α and γ [45–47]. Furthermore, ω 3 PUFAs suppress the secretion of monocyte/macrophage inflammatory cytokines (e.g., interleukin 1 β and interleukin 6, TNF α), thus inhibiting the inflammatory process, the cornerstone of CVDs [48].

According to the data obtained in this study, with the rise of blood serum MDA concentration, the level of C 22:5 ω 3 increases in the platelet phospholipid membrane as well. This result could be explained by the intensified metabolism of FAs, synthesizing more eicosanoic and docosanoic FAs, which will be used later for platelet activation. The distribution of C 22:6 ω 3 was similar to C 22:5 ω 3, and there were no statistically significant differences. A study in which C 22:6 ω 3 was incorporated into the platelet membrane and the blood serum MDA concentration was measured showed that when the platelet membrane contains more C 22:6 ω 3, the concentration of blood serum MDA is higher. According to the authors, a higher level of ω 3 PUFAs, particularly of C 22:6 ω 3, in the platelet phospholipid membrane could be related to lipid peroxidation [49]. Moreover, other researchers also studied the effect of C 22:6 ω 3 on platelets. Dietary supplements with C 22:6 ω 3 were given to healthy men. Then, the incorporation of C 22:6 ω 3 into the platelet phospholipid membrane and platelet activity were monitored. The study results showed that a higher level of C 22:6 ω 3 in the platelet membrane statistically significantly reduces platelet activity and induces an antioxidant effect, increasing platelet α tocopherol concentration. Accordingly, it could be regarded as a protective factor against platelet-related cardiovascular events [50, 51]. This study, which included only healthy individuals, did not show that oxidation had any significant effect. Only a study carried out with markedly

higher blood serum MDA concentration could confirm the effect of oxidation.

When individuals were grouped by origin of kidney stones and MS, it was found that the total percentages of PUFAs, ω 6 PUFAs, and C 18:2 ω 6 were significantly higher in the calcium oxalate/phosphate kidney stone group without MS versus the uric acid kidney stone group with MS. This can be explained by the fact that the metabolism of PUFAs in patients with MS is impaired. The lack of dietary intake of PUFAs may also be the case. Moreover, a higher percentage of ω 6 PUFAs in the adipose tissue of patients with uronephrolithiasis may lead to a larger amount of eicosanoids synthesized from those of ω 6 PUFAs. Though no specific concentrations of eicosanoids/docosanoids were studied, according to scientific data, these biologically active compounds can have a significant impact on the pathogenesis of nephrolithiasis, directly or indirectly participating in inflammation, thereby damaging the renal tubules and their function as well.

A statistically significant inverse correlation between C 14:0 and blood serum MDA concentration was found in the platelet phospholipid membrane. The same correlation was observed between the ratio of C 18:2 ω 6/C 20:4 ω 6 and the concentration of blood serum MDA. A statistically significant inverse correlation was also found between the percentage of the formation of PMAs and C 14:0. Some researchers have reported a direct correlation between MUFAs, PUFAs, and blood serum MDA concentration and an inverse correlation between SFAs and concentration of blood serum MDA. They also noticed that lipid peroxidation was much more intensive in healthy individuals. This data could be explained by an increased amount of PUFAs in the platelet phospholipid membrane [52]. Though there was no statistically significant correlation between blood serum MDA concentration and SFAs, MUFAs, and PUFAs in the platelet phospholipid membrane, it was nevertheless observed that with a higher blood serum MDA concentration, the level of MUFAs and PUFAs was slightly higher, while the level of SFAs was lower. Moreover, with a higher percentage of PMA formation, the level of SFAs was lower as well.

Thus, the results of these studies suggest that OS may cause an alteration in FAs, particularly PUFAs, which are involved in the synthesis of biologically active compounds (e.g. eicosanoids/docosanides), influencing the pathogenesis of the inflammatory process, thereby directly or indirectly affecting the development and progression of CNCs, including uronephrolithiasis.

5. CONCLUSIONS

1. An increased concentration of malondialdehyde in blood serum elevates the percentage of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the platelet phospholipid membrane, while the level of saturated fatty acids falls.
2. An increased level of polyunsaturated fatty acids in the platelet phospholipid membrane leads to increased platelet aggregation.
- 3.1. The fatty acid spectrum of the abdominal adipose tissue does not differ between the patients with uronephrolithiasis classified by types of kidney stones.
- 3.2. Patients with uronephrolithiasis classified by types of kidney stones have a higher percentage of monounsaturated fatty acids and a lower percentage of polyunsaturated fatty acids compared to the control group of healthy individuals.
- 4.1. Patients with uronephrolithiasis but without a metabolic syndrome have a higher level of saturated fatty acids in the abdominal adipose tissue than healthy individuals in the control group.
- 4.2. Patients with uronephrolithiasis and a metabolic syndrome have a higher percentage of monounsaturated fatty acids in the abdominal adipose tissue compared to those with uronephrolithiasis but without a metabolic syndrome.
- 4.3. The total percentage of polyunsaturated fatty acids was higher in patients with calcium oxalate/phosphate kidney stones without a metabolic syndrome than in patients with uric acid kidney stones and a metabolic syndrome.

6. REFERENCES

1. WHO | Noncommunicable diseases [Internet]. WHO. World Health Organization; 2018 [cited 2019 July 13]. Available from: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>.
2. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016; 388: 1659–724.
3. Carrera-Bastos P, Fontes-Villalba M, H O’Keefe JHO, Lindeberg S, Cordain L. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Res Rep Clin Cardiol*. 2011; 2: 15–35.
4. 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.
5. Vichova T, Motovska Z. Oxidative stress: Predictive marker for coronary artery disease. *Exp Clin Cardiol*. 2013 Spring;18(2): e88 – 91.
6. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Biomed Rep*. 2016 May; 4(5): 519–522.
7. Violi F, Pignatelli P. Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res*. 2012 Mar; 129(3): 378–81.
8. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019 Jun; 34(6): 975–991.
9. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 15; 482(3): 419–425.
10. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2008 Mar; 47(2): 147–55.
11. Fairweather DL. Sex differences in inflammation during atherosclerosis. *Clin Med Insights Cardiol*. 2014; 8 (Suppl 3): 49–59.
12. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005; 112: 2735–2752.
13. 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.

14. Touchstone J.C. Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *J Chromatogr B: Biomed Sci Apls.* 1995 Sep; 671(1-2): 169–95.
15. Khoschorur G. A, Winklhofer-Roob B. M, Rabl H, Auer Th, Peng Z, Schaur R. J. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of Malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia.* 2000 Aug; 52(3–4): 181–4.
16. Hendrixson V, Šablinskas V, Leščiūtė D, Želvys A, Jankevičius F, Kučinskienė Z. Infrared Spectroscopical Approach in Kidney Stones Research. *Laboratorinė medicina.* 2008; 2 (38): 99–105.
17. Daar AS, Singer PA, Persad DL, Pramming SK, Matthews DR, Beaglehole R, et al. Grand challenges in chronic non-communicable diseases. *Nature.* 2007; 450: 494–496.
18. Shivappa N. Diet and Chronic Diseases: Is There a Mediating Effect of Inflammation? *Nutrients.* 2019; 11(7): 1639.
19. Jha JC, Ho F, Dan Ch, Jandeleit-Dahm K. A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes. *Clin Sci.* 2018; 132 (16): 1811–1836.
20. 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.
21. 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.
22. Vognild E, Elvevoll EO, Brox J, Olsen RL, Barstad H, Aursand M, et al. 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.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. Cruz MM, Lopes AB, Crisma AR, Sá RCC, Kuwabara WMT, Curi R, et al. Palmitoleic acid (16:1n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes. *Lip Health Dis.* 2018; 17: 55.
27. Peña-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Perez-Martinez P, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, et al. Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *J Nutr Biochem.* 2013; 24(10): 1717–1723.
28. Finucane OM, Lyons CL, Murphy AM, Reynolds CM, Klinger R, Healy NP, et al. Monounsaturated fatty acid–enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome–mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes.* 2015; 64 (6): 2116–2128.
29. Reichard C, Gill BC, Sarkissian C, De S, Monga M. 100% Uric Acid Stone Formers: What Makes Them Different? *Urology.* 2015; 85 (2): 296–298.
30. Cho ST, Jung SI, Myung SC, Kim TH. Correlation of metabolic syndrome with urinary stone Composition. *Int J Urol.* 2013; 20: 208–213.
31. Hendrixson V, Malyško E, Mažeikienė A, Šablinskas V, Pučetaitė M, Kasiulevičius V, Jankevičius F, Jakaitienė A, Želvys A, Jablonskienė V, Kučinskienė ZA. Prevalence of Metabolic Syndrome in Patients with Uric Acid and Calcium–based Kidney Stones. *GSTF JAdv Med Res.* 2014; 1(2): 1–7.
32. Nigam A, Frasure-Smith N, Lespe´rance F, Julien P. Relationship between n-3 and n-6 plasma fatty acid levels and insulin resistance in coronary patients with and without metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009; 19 (4): 264–270.
33. Onishi H, Saito Y. Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces cardiovascular events: relationship with the EPA / arachidonic acid ratio. *J Atheroscler Thromb.* 2013; 20: 861–77.
34. Li D, Wahlqvist ML, Sinclair AJ. Advances in n - 3 polyunsaturated fatty acids. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2019; 28(1): 1–5.
35. Cottin SC, Alsaleh A, Sanders TAB, Hall WL. Lack of effect of supplementation with EPA or DHA on platelet-monocyte aggregates and vascular function in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016; 26: 743–751.

36. Lagarde M, Liu M, Véricel E, Calzada C, Chen P, Driss F, et al. Docosahexaenoic acid, protectin synthesis: relevance against atherothrombogenesis. *Poc Nutr Soc.* 2014; 73: 186–9.
37. 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.
38. Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, Cedernaes J, Johansson HE, Larsson A, et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fatty acids causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes.* 2014; 63: 2356–2368.
39. Katsoulis E, Mabley JG, Samai M, Green IC, Chatterjee PK. α -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharm.* 2009; 623(1–3): 107–112.
40. Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S, Tanaka Y, et al. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem and Biophys Res Commun.* 2010; 402 (2): 265–271.
41. Guichardant M, Bernoud-Hubac N, Calzada C, Véricel E. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids and oxidative stress within blood platelets. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018 Jun; 1863(6): 651–656.
42. Chen H. Role of thromboxane A₂ signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins Other Lip Mediat,* 2018 Jan; 134: 32–7.
43. Larson MK, Tormoen GW, Weaver LJ, Luepke KJ, Patel IA, Hjelm 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.
44. 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.
45. Calder C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J Nutr.* 2012; 142(3): 592S–599S.
46. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *PNAS.* 1997; 94(9): 4318–4323.

47. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun; 83(6 Suppl): 1505S–1519S.
48. 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.
49. 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.
50. Véricel E, Colas R, Calzada C, Lê Q. H, Feugier N, Cugnet Ch, 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.
51. 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.
52. 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. *Bratisl. Lek. Listy.* 1998; 99: 245–9.

7. LIST OF PUBLICATIONS

Published Articles

1. **Bikulčienė I**, Golubevaitė O, Žėkas V, Radzevičius M, Karčiauskaitė D, Matuzevičienė R, Hendrixson V, Mažeikienė A, Burokienė N, Kaminskas A, Kučinskienė Z A. Association of platelet membrane fatty acid composition with markers of oxidative stress in healthy men. *Med Sci Monit.* 2019; 25: 6405–6416.
2. **Bikulčienė I**, Vasiliauskaitė L, Kaminskas A, Hendrixson V, Jablonskienė V. Riebalų rūgščių vaidmuo inkstų akmenligės patogenezėje. *Laboratorinė medicina.* 2018; 20 (2): 168–171.
3. **Bikulčienė I**, Vasiliauskaitė L, Kučinskienė Z. A, Kaminskas A, Hendrixson V. Investigation of adipose tissue fatty acid composition in men with uronoprolithiasis and metabolic syndrome. *Med Sci Monit.* 2018; 24: 818–826.
4. **Bikulčienė I**, Kaminskas A. Kontraversiškas požiūris į omega – 6 riebalų rūgščių vartojimą. *Medicinos teorija ir praktika.* 2013; 19 (4): 390–392.

Oral Presentations

1. **I. Bikulčienė** (presenter), O. Golubevaitė, D. Karčiauskaitė, V. Hendrixson, A. Kaminskas, Z. A. Kučinskienė. The relationship between fatty acid composition of platelet membrane, blood serum malondialdehyde and body mass index in healthy men. The IV International conference “Evolutionary Medicine: Health And Diseases In a Changing Environment.” June 5–10, 2018, Vilnius, Lithuania.
2. **I. Bikulčienė** (presenter), L. Vasiliauskaitė, Z. A. Kučinskienė, A. Kaminskas, V. Hendrixson. Sergančiųjų inkstų akmenlige pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių tyrimas ir vertinimas. The IX Congress of Lithuanian Laboratory Medicine “Jaunųjų laboratorinės medicinos specialistų mokslo darbų apžvalga.” April 20, 2017, Šiauliai, Lithuania.

Poster Presentations

1. **I. Bikulčienė**, O. Golubevaitė, D. Karčiauskaitė, R. Matuzevičienė, A. Kaminskas, Z. A. Kučinskienė. “The interface between fatty acid composition of platelet membrane and platelet-leukocyte aggregates formation in healthy men.” The 87th European Atherosclerosis Society Congress. May 26–29, 2019, Maastricht, Netherlands.

2. **I. Bikulčienė**, O. Golubevaitė, V. Žėkas, M. Radzevičius, D. Karčiauskaitė, R. Matuzevičienė, V. Hendrixson, A. Kaminskas, A. Z. Kučinskienė. “The interface between platelet membrane fatty acid composition, blood serum malondialdehyde and percentage of platelet-leukocyte aggregates formation in healthy men.” International Scientific Conference on Medicine, February 22, 2019, Riga, Latvia.
3. **I. Bikulčienė**, O. Golubevaitė, D. Karčiauskaitė, V. Hendrixson, A. Kaminskas, Z. A. Kučinskienė. “The relationship between fatty acid composition of platelet membrane and blood serum malondialdehyde in healthy men.” The XIV Baltic Congress of Laboratory Medicine. May 10–12, 2018, Vilnius, Lithuania.
4. L. Vasiliauskaitė, **I. Bikulčienė**, Z. A. Kučinskienė, A. Kaminskas, V. Hendrixson. “Adipose tissue fatty acids composition in patients with nephrolithiasis.” The 85th European Atherosclerosis Society Congress. April 23–26, 2017, Prague, Czech Republic.
5. L. Vasiliauskaitė, **I. Bikulčienė**, Z. A. Kučinskienė, A. Kaminskas, V. Hendrixson. “Evaluation of adipose tissue fatty acid composition in patients with nephrolithiasis.” International conference “Open Readings 2017.” March 14–17, 2017, Vilnius, Lithuania.

Traineeship

The 10th International Atherosclerosis Research School. August 17–23, 2019, Prague, Czech Republic.

8. ABOUT THE AUTHOR

Name: Inga

Last name: Bikulčiienė

Present Position:

- Junior assistant, junior research associate at the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine of the Institute of Biomedical Sciences at the Faculty of Medicine of Vilnius University. 21 M. K. Čiurlionio St., Vilnius 03101.
- Doctor of Laboratory Medicine at the Vilnius District Central Polyclinic. 79 Laisvės Ave., Vilnius 06144

Phone number: +37061351641

Email: inga.bikulciene@mf.vu.lt

Education:

- 2015. Doctor of Laboratory Medicine. Vilnius University, Vilnius, Lithuania.
- 2010. Internship in a Medical Study Program. Vilnius University, Vilnius, Lithuania.
- 2010. Master's degree in Medicine, qualification of Doctor. Vilnius University, Vilnius, Lithuania.
- 2004. Ventos Secondary School, Mažeikiai, Lithuania.

Languages: Lithuanian (native speaker), English, Russian, and German.

Membership in societies:

- Lithuanian Society of Laboratory Medicine
- European Atherosclerosis Society

PADEKA

Visų pirma norėčiau padėkoti akad. prof. habil. dr. Zitai Aušrelei Kučinskienei už pasitikėjimą ir suteiktą galimybę atlikti mokslinį tiriamąjį darbą Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros laboratorijoje.

Nuoširdžiai ačiū mano mokslinio darbo konsultantui prof. (HP) dr. A. Kaminskui už palaikymą ir visakeriopą pagalbą įgyvendinant užsibrėžtus tikslus, už praktinius ir teorinius patarimus bei neišblėstančią motyvaciją susidūrus su netikėtais iššūkiais.

Esu labai dėkinga prof. dr. V. Hendrixson bei doc. dr. D. Karčiauskaitei už suteiktus tiriamųjų duomenis, kurie buvo panaudoti šioje disertacijoje, ir konsultavimą, taip pat prof. dr. V. Šablinskui, doc. dr. R. Matuzevičienei ir dr. A. Linkevičiūtei už metodinę pagalbą.

Galiausiai padėkos žodžius tariau gyd. D. Tamošiūnienei bei savo mylimam vyrui ir tėvams už pagalbą sudėtingose gyvenimo situacijose bei suteiktą galimybę toliau siekti savo užsibrėžto tikslo.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS IR JŲ KOPIJOS

1. STRAIPSNIAI

1. **Bikulčienė I**, Kaminskas A. Kontroversiškas požiūris į omega-6 riebalų rūgščių vartojimą. *Medicinos teorija ir praktika*. 2013; 19 (4): 390–392.
2. **Bikulčienė I**, Vasiliauskaitė L, Kučinskienė ZA, Kaminskas A, Hendrixson V. Investigation of adipose tissue fatty acid composition in men with uronephrolithiasis and metabolic syndrome. *Med Sci Monit*. 2018; 24: 818–826.
3. **Bikulčienė I**, Vasiliauskaitė L, Kaminskas A, Hendrixson V, Jablonskienė V. Riebalų rūgščių vaidmuo inkstų akmenligės patogenezėje. *Laboratorinė medicina*. 2018; 20 (2): 168–171.
4. **Bikulčienė I**, Golubevaitė O, Žėkas V, Radzevičius M, Karčiauskaitė D, Matuzevičienė R, Hendrixson V, Mažeikienė A, Burokienė N, Kaminskas A, Kučinskienė ZA. Association of platelet membrane fatty acid composition with markers of oxidative stress in healthy men. *Med Sci Monit*. 2019; 25: 6405–6416.

2. MOKSLINIAI PRANEŠIMAI

2.1 Žodiniai pranešimai

IX LLMD suvažiavimas ir mokslinė praktinė konferencija „Jaunųjų laboratorinės medicinos specialistų mokslo darbų apžvalga“, 2017 m. balandžio 20 d. Šiauliai, Lietuva.

1. **Bikulčienė Inga**, Vasiliauskaitė Laima, Kučinskienė Zita Aušrelė, Kaminskas Arvydas, Hendrixson Vaiva. Sergančiųjų inkstų akmenlige pilvo riebalinio audinio riebalų rūgščių tyrimas ir vertinimas.

IV Tarptautinė konferencija „Evoliucinė medicina: sveikata ir ligos besikeičiančioje aplinkoje“, 2018 m. birželio 5–10 d. Vilnius, Lietuva.

2. **Bikulčienė Inga**, Golubevaitė Orinta, Karčiauskaitė Dovilė, Hendrixson Vaiva, Kaminskas Arvydas, Kučinskienė Zita Aušrelė. The relationship between fatty acid composition of platelet membrane, blood serum malondialdehyde and body mass index in healthy men.

2.2 Stendiniai pranešimai

Tarptautinė konferencija „Open Readings 2017“, 2017 m. kovo 14–17d. Vilnius, Lietuva.

1. Vasiliauskaitė Laima, **Bikulčienė Inga**, Kučinskienė Zita Aušrelė, Kaminskas Arvydas, Hendrixson Vaiva. Evaluation of adipose tissue fatty acid composition in patients with nephrolithiasis.

LXXXV Europos aterosklerozės draugijos kongresas, 2017 m. balandžio 23–26 d. Praha, Čekija.

2. Vasiliauskaitė Laima, **Bikulčienė Inga**, Kučinskienė Zita Aušrelė, Kaminskas Arvydas, Hendrixson Vaiva. Adipose tissue fatty acids composition in patients with nephrolithiasis.

XIV Baltijos laboratorinės medicinos kongresas, 2018 m. gegužės 10–12 d. Vilnius, Lietuva.

3. **Bikulčienė Inga**, Golubevaitė Orinta, Karčiauskaitė Dovilė, Hendrixson Vaiva, Kaminskas Arvydas, Kučinskienė Zita Aušrelė. The relationship between fatty acid composition of platelet membrane and blood serum malondialdehyde in healthy men.

Tarptautinė mokslinė konferencija medicinos tema, 2019 m. vasario 22 d. Ryga, Latvija.

4. **Bikulčienė Inga**, Golubevaitė Orinta, Žėkas Vytautas, Radzevičius Mantas, Karčiauskaitė Dovilė, Matuzevičienė Rėda, Hendrixson Vaiva, Kaminskas Arvydas, Kučinskienė Zita Aušrelė. The interface between platelet membrane fatty acid composition, blood serum malondialdehyde and percentage of platelet-leukocyte aggregates formation in healthy men.

LXXXVII Europos aterosklerozės draugijos kongresas, 2019 m. gegužės 26–29 d. Maastrichtas, Nyderlandai.

5. **Bikulčienė Inga**, Golubevaitė Orinta, Karčiauskaitė Dovilė, Matuzevičienė Rėda, Kaminskas Arvydas, Kučinskienė Zita Aušrelė. The interface between fatty acid composition of platelet membrane and platelet-leukocyte aggregates formation in healthy men.

2.3 Stažuotė

X Tarptautinė aterosklerozės tyrimų mokykla (10th International Atherosclerosis Research school), Praha, Čekija, nuo 2019 m. rugpjūčio 17–23 d.

1

**Kontroversiškas požiūris
į omega-6 riebalų rūgščių vartojimą**

Inga Bikulčienė and Arvydas Kaminskas

KONTROVERSIŠKAS POŽIŪRIS Į OMEGA-6 RIEBALŲ RŪGŠČIŲ VARTOJIMĄ

CONTRAVERSAL APPROACH TO OMEGA-6 FATTY ACIDS CONSUMPTION

Inga Bikulčienė, Arvydas Kaminskas

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Vilnius University Faculty of Medicine, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine

SANTRAUKA

Reikšminiai žodžiai: omega-6 riebalų rūgštys, kardiovaskulinė liga.

Šiame straipsnyje pateikiama mokslinių publikacijų apžvalga apie tai, kad linolo rūgšties vartojimas ne visuomet susijęs su koronarinės širdies ligos rizikos mažinimu bei naudingumu ir saugumu vartojant didesnius šios riebalų rūgšties kiekius. Apžvelgtos studijos nurodo, kad omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių vartojimas neduoda aiškios klinikinės naudos ir nesumažina rizikos susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, nesumažina mirtingumo.

ABSTRACT

Key words: omega-6 fatty acids, cardiovascular disease.

This article reviews the scientific studies that suggest the consumption of linoleic acid not always reduces the risk of cardiovascular disease or provides safety and benefit of higher intakes. However, in spite of widespread enthusiasm for increasing PUFA in the diet, linoleic acid is unlikely to provide the intended benefits and may actually increase the risk of cardiovascular disease and death.

ĮVADAS

Per pastaruosius penkiasdešimt metų omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių vartojimas išaugo. Amerikos širdies asociacija ne tik palaiko tokią iniciatyvą, bet dar ir skatina padidinti linolo rūgšties vartojimą. Šios asociacijos žurnale paskelbtas straipsnis apie omega-6 riebalų rūgštis ir rizika susirgti širdies bei kraujagyslių ligoms teigiama, kad didesnis omega-6 riebalų rūgščių vartojimas yra saugus ir gali būti dar naudingesnis. Sumažinus linolo rūgšties vartojimą nuo dabartinio lygio, būtų labiau tikėtina didesnė rizika susirgti koronarine širdies liga. Tačiau atsiranda kontroversiškų nuomonių ir straipsnių, kuriuose abejojama šiuo linolo rūgšties poveikiu [1, 2].

Vienas tokių yra Izraelio mokslininkų paskelbtas straipsnis „Mityba ir liga – Izraelio paradoksas: galimas pavojus dėl per didelio omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių vartojimo“ [3]. Straipsnyje publikuojami duomenys, kad Izraelio populiacijoje pastebimas didžiausias polinesočiųjų/sočiųjų riebalų rūgščių mitybos santykis pasaulyje: omega-6

riebalų rūgščių suvartojimas yra 8 proc. didesnis nei JAV ir 10–12 proc. nei daugelyje Europos šalių. Izraelio populiacijoje daugiausia suvartojama sojų pupelių aliejaus. Maisto racione šio aliejaus yra dvigubai daugiau nei gyvūninės kilmės riebalų. Tačiau šalyje paradoksaliai didelis paplitimas kardiovaskulinių ligų, hipertenzijos, nuo insulino nepriklausomo cukrinio diabeto ir nutukimo – visos minėtos ligos siejamos su hiperinsulinemija, insulino rezistentiškumu ir grupuojamos kaip insulino rezistentiškumo sindromas ar sindromas X. Padidėjęs taip pat navikų paplitimas ir mirtingumas, ypač tarp moterų, palyginti su Vakarų šalimis. Studijoje teigiama, kad didelis omega-6 linolo rūgšties vartojimas gali pasunkinti hiperinsulinemiją ir padidinti insulino rezistentiškumą. Tyrėjų nuomone, linolo rūgštis veikia kaip substratas lipidų peroksidacijai ir laisvųjų radikalų susidarymui. Be to, galbūt dėl didesnio polinesočiųjų/sočiųjų riebalų rūgščių santykio mityboje ir riebaliniame audinyje Izraelio žydams reikia didesnio kiekio antioksidantų: vita-

Inga Bikulčienė
Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas
M. K. Čiurlionio g. 21, Vilnius
inga.bikulciene@mfm.vu.lt

mino E, seleno, vitamino C ir beta karoteno. Todėl Izraelio populiacijoje mityba, kurioje gausu omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių, nedavė naudos mažinant mirtingumą nuo širdies ligų [3]. Kitas pavyzdys – „Omega-6 riebalų rūgštys ir rizika susirgti širdies nepakankamumu. Gydytojų sveikatos studija“. Tai atvejo-kontrolės tyrimas, kuriame duomenys buvo renkami iš visiškai randomizuotos, dvigubai aklos, placebo kontroliuojamos gydytojų sveikatos studijos, siekusios įvertinti mažos dozės aspirino ir beta karoteno poveikį sergamumui kardiovaskulinėmis ligomis ir vėžio ligomis JAV gydytojas vyrams pirminėje prevencijoje. Papildoma atvejo-kontrolės tyrimą sudarė 788 tiriamieji ir 788 sveiki asmenys. Imty širdies nepakankamumo: su buvusiu praityje miokardo infarktu (MI) (n = 88) ir be miokardo infarkto (n = 700).

Tiriamoji medžiaga vertinta taikant sąlyginę logistinę regresiją, apskaičiuojant šansų santykį esant 95 proc. pasikliautinajam intervalui. Vertinant širdies nepakankamumo riziką, buvo sudaryti keturi plazmos fosfolipidų omega-6 riebalų rūgščių koncentracijos kvartiliai. Žemiausias kvartilis naudojamas kaip standartas. Papildomai buvo tiriamos individualios omega-6 riebalų rūgštys: linolo, gama linoleno, eikozadieno, dihomo-gama-linoleno, arachidono ir dokozatetraeno.

Studijos vidutinis dalyvių amžius buvo $58,7 \pm 8$ (nuo 40 iki 82 m.). Laikas iki širdies nepakankamumo pasireiškimo $17,1 \pm 6,1$ m. (nuo 0,4 iki 27,1 m.). Palyginti su žemiausiu kvartiliu, aukščiausias fosfolipidų omega-6 riebalų rūgščių kvartilis koreliuoja su mažesniu hipertenzijos ir cukrinio diabeto paplitimu bei didesniu fiziniu aktyvumu. Palyginus su kontroline asmenų grupe, tiriamieji turėjo didesnį KMI, dažnesni atrialinės fibriliacijos, koronarinės arterijos stentavimo, cukrinio diabeto ir hipertenzijos atvejai. Savo išvadose autoriai nurodė, kad, taikant sąlyginės logistinės regresijos modelį lygintiems veiksniams (amžius, rasė, gimimo metai, kraujo paėmimo laikas) ir KMI, rūkymui ir atrialinei fibriliacijai, nebuvu rasta aiškaus ryšio tarp bendros fosfolipidų omega-6 riebalų rūgščių koncentracijos ir rizikos susirgti širdies nepakankamumu, kai šansų santykis (esant 95 proc. pasikliautinajam intervalui) – 1.00 (standartas). Likusių trijų kvartilių šansų santykis – 0.85 (0.63, 1.14), 0.84 (0.63, 1.13) ir 0.87 (0.63, 1.20). P reikšmė lygi 0.39.

Papildomai buvo analizuojamas ryšys tarp bendros plazmos fosfolipidų omega-6 riebalų rūgščių koncentracijos ir rizikos pasireikšti širdies nepakankamumui su ar be anksčiau buvusiu miokardo infarktu. Analizė parodė, kad aiškaus ryšio nėra ir šansų santykis, tenkantis standartiniam nuokrypiui, esant širdies nepakankamumui su buvusiu MI – 0.84 (95 proc. PI: 0.57, 1.25), o be MI – 0.98 (95 proc. PI: 0.87, 1.11). Autoriai taip pat padarė išvadą, kad nėra įrodymų patvirtinti reikšmingą ryšį tarp atskirų

omega-6 riebalų rūgščių ir širdies nepakankamumo. Todėl remiantis atliktos studijos rezultatais, omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių vartojimas nesumažina rizikos susirgti širdies nepakankamumu, nepriklausomai nuo anksčiau įvykusio ar ne miokardo infarkto [4]. Didžiosios Britanijos žurnale Ramsdeno su bendraautorais mokslininkų publikuota atsitiktinių imčių kontroliuojama tyrimų metaanalizė, kurioje teigiama, kad omega-6 ir polinesočiųjų riebalų rūgščių mišinio vartojimas turi skirtingą poveikį koronarinės širdies ligos išsivystymo rizikai. Tai aštuonių studijų analizė, kuriose dalyvavo 11 275 asmenys.

Metaanalizė buvo vykdoma dviem kryptimis: pirmoje grupėje taikyta eksperimentinė dieta, kurioje gausu omega-3 ir omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių (imtis – 1706, keturi duomenų šaltiniai), ir kita dalyvių grupė, kuriems paskirta dieta, praturtinta tik omega-6 riebalų rūgštimis (imtis – 9569, keturi duomenų šaltiniai). Remiantis visais aštuonių tyrimų duomenimis, omega-3 ir omega-6 polinesočiųs riebalų rūgštys pakeitė transizomerinės formos ir sočiausias riebalų rūgštis. Vykdytoje analizėje buvo vertinama santykinė rizika, 95 proc. pasikliautinasis intervalas bei P reikšmė šių įvykių: nefatalinis MI, mirtys nuo koronarinės širdies ligos, nefatalinis MI ir mirtys nuo koronarinės širdies ligos bei mirtys dėl visų priežasčių. Didžiausias dėmesys kreipiamas į nefatalinį miokardo infarktą ir mirtis nuo koronarinės širdies ligos.

Metaanalizės rezultatai parodė, kad nefatalinio MI + mirčių nuo koronarinės širdies ligos, vartojant omega-3 ir omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių mišinius, jungtinė rizika sumažėjo 22 proc. (santykinė rizika (SR) 0.78; 95 proc. PI 0.65, 0.93; P = 0.005). Nefatalinio MI jungtinė rizika sumažėjo 27 proc. (SR 0.73; 95 proc. PI 0.54, 0.99; P = 0.04), mirčių nuo koronarinės širdies ligos – 19 proc. (SR 0.81; 95 proc. PI 0.641.03; P = 0.08) ir mirčių nuo visų priežasčių – 8 proc. (SR 0.92; 95 proc. PI 0.80, 1.60; P = 0.25). Eksperimentinė dieta, kurioje buvo vartojamos tik omega-6 polinesočiųsios riebalų rūgštys, jungtinė rizika nefataliniam MI + mirtys nuo koronarinės širdies ligos padidėjo 13 proc. (SR 1.13; 95 proc. PI 0.84, 1.53; P = 0.43). Tyrimuose, kuriuose omega-6 linolo rūgštis buvo pakeista į transizomerinės formos ir sočiausias riebalų rūgštis, mirtingumo rizika išaugo 16 proc. (SR 1.16; 95 proc. PI 0.95, 1.42). Remiantis vykdytos metaanalizės rezultatais, rizika nefataliniam miokardo infarktui ir mirtims nuo koronarinės širdies ligos, didesnė vartojant omega-6 nei omega-3/omega-6 polinesočiųjų riebalų rūgščių mišinius (P = 0.02). Straipsnio autorių nuomone, didesnis omega-6 linolo rūgšties vartojimas gali neduoti siekiamos naudos ir net padidinti koronarinės širdies ligos ir mirtingumo riziką [5].

Ramsdeno ir bendraautorių publikuotame straipsnyje pateikti duomenys apie Australijoje vykdytą studiją, analizuojančią linolo rūgšties efektą mirusiems nuo koronarinės

širdies ligos [2]. Duomenys buvo paimti iš atsitiktinių imčių kontroliuojamo tyrimo – Sidnėjaus širdies dietos studija – vykdyto nuo 1966 iki 1973 m. Tuo laikotarpiu detali duomenų analizė nebuvo atlikta dėl modernių statistinių metodų trūkumo. Todėl 2013 m. buvo surinkta nauja tyrėjų komanda iš JAV ir Australijos, kurie vėl išanalizavo originalius duomenis, lygindami mirties dažnius priklausomai nuo visų galimų priežasčių bei koronarinės širdies ligos.

Tyrimo dalyvavo 458 vyrai nuo 30 iki 59 metų, kurie neseniai turėjo koronarinį įvykį, tokį kaip širdies smūgis ar krūtinės anginos epizodas. Dalyviai atsitiktinai padalinti į dvi grupes. Tiriamoji grupė turėjo sumažinti sočiųjų riebalų (taukų, sviesto) vartojimą iki mažiau nei 10 proc. visos gaunamos energijos ir padidinti iki 15 proc. linolo rūgšties (saulėgrąžų aliejaus, margarino, pagaminto iš saulėgrąžų aliejaus) vartojimą. Kontrolinė asmenų grupė laikėsi jiems įprastos dietos.

Tyrimo dalyviai buvo reguliariai vertinami ir turėjo užpildyti mitybos dienoraščius 39 mėnesiams. Visi su dieta nesusiję veiksniai buvo vienodi abiem grupėms.

Rezultatai parodė, kad tiriamųjų (imtis = 221), kurių linolo rūgšties suvartojimas buvo didesnis, palyginti su kontroline asmenų grupe (imtis = 237), mirtingumo rizika dėl visų priežasčių buvo didesnė: visos priežastys 17,6 proc. prieš 11,8 proc., šansų santykis – 1,62 (95 proc. pasikliautinis intervalas nuo 1.00 iki 2.64), P reikšmė 0,05. Taip pat nuo koronarinės (16,3 proc. prieš 10,1 proc., ŠS 1.74 (PI nuo 1.04 iki 2.92)) ir kardiovaskulinės širdies ligų (17,2 proc. prieš 11 proc., ŠS 1.70 (PI nuo 1.03 iki 2.80)). Taigi remiantis autorių pateiktais studijos rezultatais, nėra naudinga pakeisti sočiausias riebalų rūgštis į omega -6 linolo rūgštį [5].

APIBENDRINIMAS

Šiame apžvalginiame straipsnyje pateikiami negausūs duomenys apie tai, kad omega-6 linolo rūgšties pakeitimas sočiosiomis riebalų rūgštimis neduoda aiškios klinikinės naudos ir nesumažina rizikos susirgti kardiovaskulinėmis ligomis bei nesumažina mirtingumo.

LITERATŪRA

- Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris – Etherton P, Rudel LL, Appel LJ, Engler MM, Engler MB, Sacks F. Omega – 6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association nutrition subcommittee of the council on nutrition, physical activity and metabolism; council on cardiovascular nursing; and council on epidemiology and prevention. *Circulation*, 2009; 119: 902–7.
- Ramsden Ch E, Zamora D, Leelarthaepin B, Majchrzak-Hong S F, Faurot K R, Suchindran CH M, Ringel A, Davis M J, Hibbeln J R. Use of dietary linoleic acid for secondary prevention of coronary heart disease and death: evaluation of recovered data from the Sydney Diet Heart Study and updated meta-analysis. *BMJ* 2013; 346:e8707 doi: 10.1136/bmj.e8707.
- Yam D, Eliraz A, Berry E. Diet and disease – the Israeli paradox:

possible dangers of a high omega – 6 polyunsaturated fatty acid diet. *Isr J Med*, 1996; 32: 1134–1143.

- Petrone A B, Weir N, Hanson N Q, Glynn R, Tsai M Y, Gaziano J M, Djousee L. Omega – 6 fatty acids and risk of heart failure in the Physicians’ Health study. *Am J Clin Nutr*, 2013; 97: 66–71.
- Ramsden Ch E, Hibbeln J R, Majchrzak S F, Davis J M. N – 6 Fatty acid-specific and mixed polyunsaturate dietary interventions have different effects on CHD risk: a meta-analysis of randomised controlled trials. *B J Nutr*, 2010; 104: 1586–1600.

Gautas 2013 m. lapkričio 18 d., aprobuotas 2013 m. gruodžio 12 d. Submitted November 18, 2013, accepted December 12, 2013.

2

**Investigation of adipose tissue fatty
acid composition in men with uronephrolithiasis
and metabolic syndrome**

Inga Bikulčienė, Laima Vasiliauskaitė, Zita Aušrelė Kučinskienė,
Arvydas Kaminskas and Vaiva Hendrixson

Received: 2017.07.19
Accepted: 2017.09.19
Published: 2018.02.09

Investigation of Adipose Tissue Fatty Acid Composition in Men with Uronephrolithiasis and Metabolic Syndrome

Authors' Contribution:
Study Design A
Data Collection B
Statistical Analysis C
Data Interpretation D
Manuscript Preparation E
Literature Search F
Funds Collection G

BCDEF Inga Bikulčienė
ABCDEF Laima Vasiliauskaitė
ABCDEF Zita Aušrelė Kučinskienė
ABCDEF Arvydas Kaminskas
ABDEFG Vaiva Hendrixson

Institute of Biomedical Science, Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology, and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

Corresponding Author: Inga Bikulčienė, e-mail: inga.bikulciene@mf.vu.lt
Source of support: The study was supported by the Lithuanian State Science and Studies Foundation (Grant No. T-59/09) and the Research Council of Lithuania (Grant No. MIP-111/2010)

Background: Fatty acids (FA) and their metabolites are closely related to some mechanisms involved in the development of uronephrolithiasis. The aim of this study was to evaluate the relationship between FA composition and type of kidney stones.





Material/Methods: Abdominal adipose tissue fatty acid methyl esters of 71 men with nephrolithiasis were identified by GC/MS, and the type of kidney stones was identified using FTIR infrared spectroscopy. Patients were divided into groups according to diagnosis of metabolic syndrome (MS) and type of kidney stone. The composition of FA was compared within different groups of patients with different types of kidney stones and between the patients and healthy individuals (control group) (n=100).

Results: Individuals with nephrolithiasis had a significantly higher level of monounsaturated fatty acids (MUFA) and a lower level of polyunsaturated fatty acids (PUFA) versus healthy individuals. Patients with MS had a higher level of 18:1 ω 9 and a lower level of 16:1 ω 7 than patients without MS. Individuals with nephrolithiasis, but without MS, had a higher level of saturated fatty acids (SFA) compared to controls. The level of PUFA was higher in the control group (p<0.0001) compared to individuals with uronephrolithiasis, with or without MS. PUFA, ω -6 PUFA, and 18:2 ω 6 were higher in patients with calcium-based kidney stones without MS versus patients with uric acid kidney stones with MS.

Conclusions: The levels of MUFA were significantly higher and the levels of PUFA were significantly lower in patients with uronephrolithiasis compared to controls.

MeSH Keywords: Fatty Acids • Kidney Calculi • Metabolic Syndrome X

Full-text PDF: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/906274>

 2547  4  7  29



Background

Nephrolithiasis is a multifactorial disease influenced by lifestyle and nutritional habits, as well as metabolic, environmental, and genetic factors. During recent decades, growth in the prevalence of nephrolithiasis has been observed in Western countries [1]. According to the *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), the prevalence of kidney stones reached 8.8% in the period 2007–2010. Kidney stone disease increased from 6.3% to 10.6% among men and from 4.1% to 7.1% among women [2]. The variety and complexity of the processes influencing stone formation prevents a single explanation for the etiology and pathogenesis of the disease, which in turn causes a lack of appropriate prevention measures. This fact is confirmed by the increasingly high recurrence rates of urolithiasis. Recurrence of nephrolithiasis over the first 5 years increases by 50% after the first episode. This has a significant impact on quality of life. Furthermore, the prevalence and incidence of kidney stone disease increased across the world throughout the 20th century. For example, in the USA the prevalence of the disease is approximately 10% (13% for men and 7% for women), which is a drastic increase from the 3% recorded in the period 1964–1972 [3]. European countries follow similar trends, and urolithiasis is becoming a major health care problem worldwide. It is acknowledged that the need for an individual-based treatment approach is now an important challenge [4].

Around 80% of all kidney stones are composed of calcium oxalate and calcium phosphate. Other cases of nephrolithiasis are caused by magnesium ammonium phosphate, cysteine, uric acid, and struvite kidney stones [2]. Nevertheless, most kidney stones are calcium phosphate monohydrate surrounding a calcium phosphate core [6].

According to some studies, fatty acids (FA) and their metabolites are closely related to some mechanisms involved in the development of nephrolithiasis [1,4–7]. Abdomen adipose tissue reflects the long-term consumption of FA. Metabolic processes in adipose tissue are quite slow, and acute health disorders have no influence on the composition of adipose tissue [8]. There is very little information and few comprehensive studies on the formation of different types of kidney stones as determined by factors influencing the composition of adipose tissue FA in the abdomen.

Several explanations concerning the impact of FA on the development of kidney stones are possible. According to some researchers, FA have a direct influence on renal tubules, crystal formation, the metabolism of salt and water in the kidneys, and on oxidative and inflammatory processes. Others declare that FA are more likely related to metabolic syndrome (MS). MS is defined by the following diagnostic criteria: glucose

intolerance, hypertension, decreased high-density lipoprotein (HDL) level, increased triacylglycerol (TAG) level, and visceral obesity [9]. Scientific data showing the relationship between MS and type of kidney stone is still controversial. According to some researchers, MS causes lower urine pH, higher calcium and uric acid excretion, and lower citrate excretion, leading to formation of uric acid and calcium-based stones [10]. According to others, MS is more closely related to uric acid stones, because patients with MS have significantly more formation of uric acid stones [11].

On the other hand, an excess of lipids and FA in renal proximal tubules could impede ammonium synthesis and transport because glutamine transport is interfered with through the mitochondrial membrane. Accumulation of lipids in kidney and renal tubules could also be associated with aberrant tissue sensitivity to insulin [7,12]. Abdominal adipose tissue adipocytes eventually lose their ability to store FA adequately. Because of insulin resistance, free FA interact with liver enzyme systems and induce glucose synthesis, decrease insulin clearance, increase TAG and low-density lipoprotein (LDL) levels, and decrease HDL level, accelerating early atherogenesis [7]. There is evidence that increased levels of TAG and cholesterol in the blood leads to the formation of uric acid stones. Increased concentration of LDL in the blood, on the other hand, increases Na^+ ion excretion and uric acid concentration in the urine [13].

Katsoulis et al. studied the effects of saturated palmitic fatty acid on proximal renal tubular cells *in vitro* and found that palmitic FA caused endoplasmic reticulum stress, which led to renal proximal tubular cell apoptosis. The opposite effect was noted when using α -linolenic FA, which decreased the concentration of proinflammatory substances and diminished cell apoptosis *in vitro* [14].

Moreover, it is thought that palmitic FA induces the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). Palmitic acid activates protein kinase C (PKC) family proteins through accumulation of intracellular diacylglycerol (DAG). Oleic FA and EPA induce diacylglycerol acyltransferase 2 gene expression and convert intracellular DAG to TAG, resulting in PKC gene suppression. Renal tubular cells are therefore protected from the harmful effect of palmitic acid [15]. Other authors have reported that the abundance of free FA exceeds the mitochondrial capability to oxidize them and consequently leads to the production of partially oxidized acylcarnitine with an excess of DAG, both of which predispose a person to insulin resistance [16]. FA directly or through signal molecules influence gene transcription in the liver and are capable of regulating lipogenesis, β -oxidation of FA, and glucose metabolism [17]. Nevertheless, the data concerning the relationship between the composition of FA in adipose tissue and nephrolithiasis remain contradictory.

Table 1. FA analyzed by gas chromatography – mass spectrometry.

SFA	MUFA	PUFA
14: 0 (miristic acid)	16: 1ω7 (9 – hexadecanoic/palmitoleic acid)	18: 2ω6 (9,12 – octadecadienoil/linoleic acid)
16: 0 (palmitic acid)	18: 1ω9 (9 – octadecanoic/oleic acid)	18: 3ω3 (9,12,15 – octadecatrienoic, α-linolenic acid)
18: 0 (stearic acid)	18: 1ω7 (11 – octadecanoic acid)	20: 4ω6 (5,8,11,14 – eicosatetraenoic/arachidonic acid)
	20: 1ω9 (11 – eicosanoic acid)	20: 5ω3 (5,8,11,14,17 – eicosapentaenoic acid)
		22: 5ω3 (7,10,13,16,19 – docosapentaenoic acid)
		22: 6ω3 (4,7,10,13,16,19 – docosahexaenoic acid)

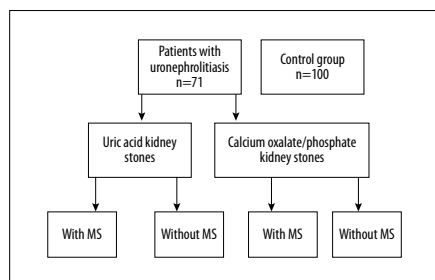


Figure 1. Doistribution of this study population.

We therefore designed this study to evaluate the relationship between the composition of abdominal adipose tissue FA and type of kidney stones.

Material and Methods

This case-control study (duration: 1.5 years) was carried out on a group of 71 men (average age 53.1±14.1) with kidney stone disease; enrolled individuals were hospitalized at Vilnius University Hospital and gave their written consent to participate in the study (case group). The control group had no history of kidney stone disease, and was matched with cases for age and sex (n=100). All patients were thoroughly examined to diagnose MS according to clinical and laboratory criteria [18]. The kidney stones of patients were removed and the chemical composition of the stones was examined using infrared spectroscopy.

The study protocol was approved by the Vilnius Regional Bioethics Committee (Approval No. 158200-5-053-056LP1).

The chemical composition of the stones was examined by a BRUKER VERTEX 70 Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer by using a KBr tablet [19].

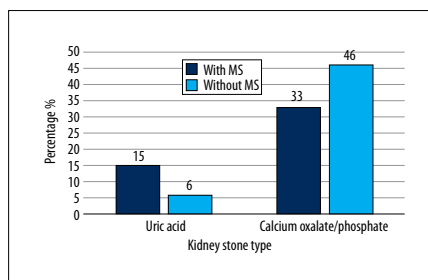


Figure 2. Diagram represents the percentage distribution of patients with uronephrolithiasis by type of kidney stones and MS. N=71.

Methyl esters of adipose tissue FA were prepared using the Folch method [20,21] and were identified by gas chromatography–mass spectrometry (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu) (Table 1). Individuals were divided into groups according to diagnosis of (MS) and type of kidney stone (Figure 1). The composition of adipose tissue FA was compared within different groups of patients with different types of kidney stones and between the patients and control individuals.

Statistical analysis

Data analysis was carried out using the IBM SPSS software (version 21) and Microsoft Excel 2013. Data are expressed as mean ± standard deviation. Differences between investigated groups were tested for significance using the Mann-Whitney U-test and the t test. Statistical significance was considered at p<0.05.

Results

Figure 2 shows the distribution of patients with uronephrolithiasis by type of kidney stones and presence of MS. Calcium-based kidney stones were the most common among the patients with

Table 2. Comparison of adipose tissue FA composition between patients with uric acid kidney stones and MS and the patients with calcium-based kidney stones without MS.

FA (provided by percentage of total amount)	Uric acid (n=11)		Calcium oxalate/phosphate (n=38)		P value
	With MS		Without MS		
Mean ± Standard deviation					
Total PUFA	12.61±1.70		14.64±2.88		p=0.037
Σ* ω**6	11.94±1.6		13.97±2.71		p=0.042
C 18: 2ω6***	11.62±1.57		13.55±2.61		p=0.042

PUFA – polyunsaturated fatty acids; Σ* – total sum; ω** – position of double bond between carbon atoms; C 18: 2ω6*** – number of carbon atoms and double bonds. Mean and standard deviation of other fatty acids (C 14: 0, C 16: 0, C 18: 0, C 16: 1ω7, C 18: 1ω9, C 18: 1ω7, C 20: 1ω9) were not statistically significant.

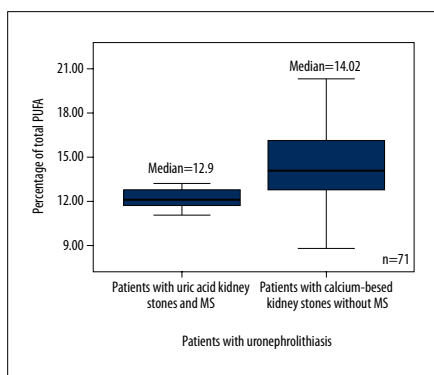


Figure 3. Box plots represent comparison of percentage of total PUFA between patients with uric acid kidney stones and MS, and the patients with calcium-based kidney stones without MS. P=0.037. N=71. PUFA – polyunsaturated fatty acid.

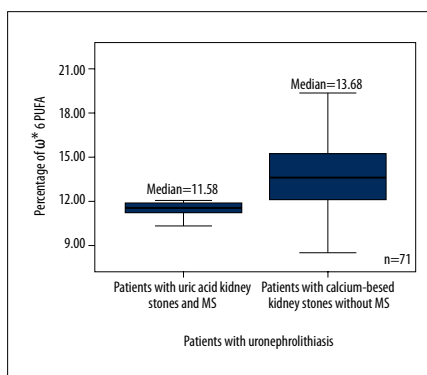


Figure 4. Box plots represent comparison of percentage of ω6 PUFA between patients with uric acid kidney stones and MS, and the patients with calcium-based kidney stones without MS. P=0.042. N=71. * – Omega; PUFA – polyunsaturated fatty acid.

nephrolithiasis, while uric acid stones were the least common. For further analysis, individuals with nephrolithiasis were divided into 2 groups: those with MS (32.4%) and those without MS (67.6%). Seventy percent of patients with uric acid kidney stones had MS, and only 41% of individuals with calcium-based kidney stones (involving both calcium oxalate and calcium phosphate) had MS. The frequency of MS of individuals with uric acid kidney stones was 2 times higher than that of patients with calcium-based kidney stones. Moreover, MS was significantly more frequent in patients with uric acid kidney stones compared to individuals with calcium-based kidney stones (Pearson chi-square=8.308, p=0.004).

According to the presence or absence of MS, all patients with uric acid and calcium-based kidney stones were subdivided into 2 groups: those with and without MS (Table 2). The total

PUFA (Figure 3), ω6 PUFA (Figure 4), and 18: 2ω6 (Figure 5) percentages were significantly higher in patients with calcium-based stones without MS compared to the patients with uric acid kidney stones with MS.

The results were significantly different between all groups of patients and the control group. The level of monounsaturated fatty acids (MUFA) in patients with uric acid and calcium-based stones was 2 times higher than it was in the control group (p<0.0001) (Figure 6), (18: 1ω9 was predominant). The level of PUFA was 2.4–2.8 times lower in each group of patients with nephrolithiasis compared to the control (p<0.0001) (Table 3) (Figure 7). The ratio of ω3 and ω6 PUFA was higher in the control group than in patients with kidney stones. The total level of SFA was almost the same in each group of patients with kidney stones compared to the

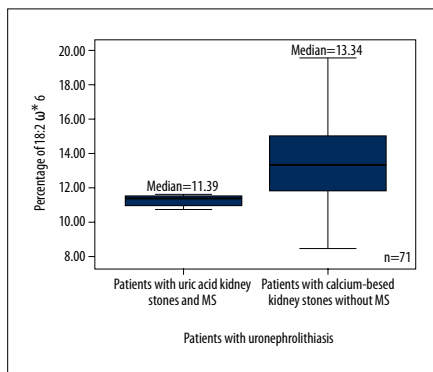


Figure 5. Box plots represent comparison of percentage of 18: 2 ω6 between patients with uric acid kidney stones and MS, and the patients with calcium-based kidney stones without MS. P=0.042. N=71. * – Omega; PUFA – polyunsaturated fatty acid.

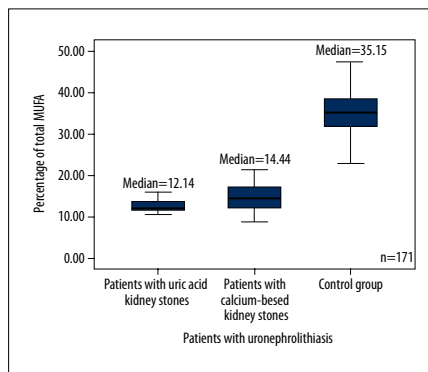


Figure 7. Box plots represent comparison of percentage of total PUFA between all groups of patients and the control group. P<0.0001. N=171. PUFA – polyunsaturated fatty acid.

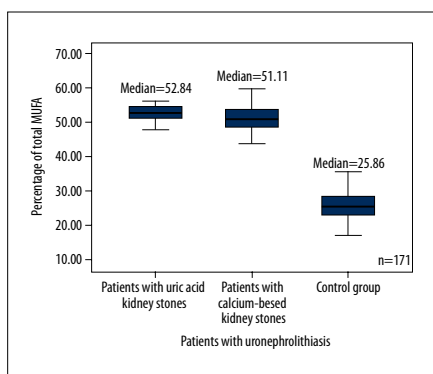


Figure 6. Box plots represent comparison of percentage of total MUFA between all groups of patients and the control group. P<0.0001. N=171. MUFA – monounsaturated fatty acids.

control group. Patients with nephrolithiasis had a higher level of SFA 16: 0 (p=0.001; p<0.0001) and a similar level of SFA 14: 0 (p>0.05) compared to the control group. However, the patients with calcium-based kidney stones had a lower level of SFA 18: 0 compared to the control group (p<0.0001).

For further analysis, all patients with nephrolithiasis were subdivided into 2 groups: those with and without MS. Each of those groups was compared to the control group (Table 4). Patients with MS had a significantly higher level of 18: 1ω9

(p=0.041) and a lower level of 16: 1ω7 (p=0.003) compared to kidney stone patients without MS. The total level of MUFA was equal in both groups of kidney stone patients with and without MS (p=0.762), but it was approximately 2-fold higher compared to the control group of healthy people (p<0.0001). The level of SFA was significantly higher in kidney stone patients without MS compared to controls (p=0.008).

Moreover, the percentage of ω3 PUFA in healthy individuals was about 6.3 times (p<0.0001) higher, and the percentage of ω6 PUFA was about 2 times higher than that in both groups of patients with kidney stones (p<0.0001). The ratio of ω3/ω6 PUFA in the control group was also higher than that in each group of patients.

Discussion

According to our data, MS occurred 2 times more frequently in individuals with uric acid kidney stones than in patients with calcium phosphate/oxalate kidney stones, but the difference was not statistically significant. According to recent scientific data, MS is very much related to the formation of uric acid kidney stones [22–24]. Uric acid kidney stones in those studies were more common in older patients with a higher body mass index (BMI) and lower urine pH and a higher uric acid level [22].

We found twice the amount of MUFA in the adipose tissue of patients with nephrolithiasis, regardless of the type of kidney stone, than in healthy individuals in the control group. Lack of ω3 and ω6 PUFA causes a compensatory increase in the synthesis of MUFA, which leads to increased production of ω9

Table 3. Comparison of the composition of FA in adipose tissue between patients with nephrolithiasis and the control group.

FA (provided by percentage of total amount)	Uric acid* (n=15)	Calcium oxalate/ phosphate# (n=56)	Control** (n=100)	P value
	Mean ± Standard deviation			
C 18: 1×ω**9	44.37±3.35	42.40±4.38	22.71±3.69	*.###p<0.0001
C 20: 1ω9	1.09±0.21	1.03±0.56	0.56±0.48	*.###p<0.0001
C 18: 3ω3	0.15±0.03	0.20±0.11	1.12±0.54	*.###p<0.0001
C 22: 5ω3	0.19±0.09	0.20±0.15	0.39±0.27	*.###p=0.002
Ratio of ω3/ω6	0.05±0.02	0.04±0.02	1.13±0.28	*.###p<0.0001
Total SFA (C 14: 0 + C 16: 0 + C 18: 0)	34.67±3.03	33.55±2.81	32.14±5.29	*.##p=1.0 #.##p=0.608
Total MUFA	53.07±3.54	51.78±3.84	26.2±4.27	*.###p<0.0001
Total PUFA	12.66±2.47	14.67±3.47	35.13±4.84	*.###p<0.0001
PUFA/SFA	0.37±0.085	0.44±0.12	1.13±0.29	*.###p<0.0001
Σ*** ω3	0.63±0.26	0.7±0.44	4.5±1.46	*.###p<0.0001
Σ ω6	12.03±2.33	13.97±3.13	27.92±4.56	*.###p<0.0001
C 14: 0	3.33±0.74	3.56±3.5	4.5±2.34	p>0.05
C 16: 0	24.88±1.74	24.8±2.04	21.91±2.4	*.##p=0.001 #.##p<0.0001
C 18: 0	6.06±1.34	5.19±1.09	6.49±1.05	*.##.##p>0.05 #.##p<0.0001
C 16: 1ω7	5.08±1.68	5.7±1.68	3.48±0.99	*.##p=0.003 #.##p<0.0001
C 18: 2ω6	11.75±2.3	13.58±2.99	22.59±3.98	*.###p<0.0001
C 20: 4ω6	0.28±0.1	0.39±0.24	5.33±1.11	*.###p<0.0001
C 20: 5ω3	0.09±0.05	0.11±0.07	1.06±0.68	*.###p<0.0001
C 22: 6ω3	0.19±0.12	0.19±0.15	1.93±0.73	*.###p<0.0001

SFA – saturated fatty acids; MUFA – monounsaturated fatty acids; PUFA – polyunsaturated fatty acids; * – patients with uric acid kidney stones; # – patients with calcium oxalate/phosphate kidney stones; ## – control group; C 18: 1× – number of carbon atoms and double bonds; ω** – position of double bond between carbon atoms in the molecule; Σ*** – total sum.

PUFA. On the other hand, the diet of patients with nephrolithiasis may contain more MUFA than the diet of healthy individuals in the control group.

Peña-Orihuela found that a diet higher in MUFA promotes the gene expression of antioxidant enzymes in adipose tissue (e.g., glutathione peroxidase and catalase) and thus reduces oxidative stress. Increased dietary intake of SFA in adipose tissue of obese individuals stimulates the enzyme NADPH – oxidase, which promotes the synthesis of reactive oxygen compounds and gene expression and inhibits expression of genes encoding antioxidant enzymes. Therefore, researchers believe that SFA should be replaced with MUFA since it would be an effective

way to reduce oxidative stress for individuals with MS [25]. Furthermore, experiments on laboratory mice suggest that replacement of SFA by MUFA reduces the inflammation in adipose tissue and insulin resistance as well [26].

Our study showed that individuals with nephrolithiasis had a percentage of total PUFA in adipose tissue 2 times lower than in the control group (p<0.0001). The percentage of PUFA in adipose tissue basically reflects the human diet. A major percentage of total PUFA represents linoleic and α-linolenic FA. We therefore assume that individuals with nephrolithiasis had a lack of PUFA in their diet, and this lack of linoleic and α-linolenic FA can cause a slowdown of the synthesis of other ω3 and ω6 PUFA.

Table 4. Comparison of FA composition in adipose tissue between patients with kidney stones and the control group.

FA (provided by percentage of total amount)	Patients (n=71)		Controls## (n=100)	P value
	Without MS* (n=48)	With MS* (n=23)		
Mean ± Standard deviation				
C 18: 1×ω**9	40.79±7.52	43.77±4.61	22.71±3.69	*,# p=0.041 *##,### p<0.0001
C 20: 1ω9	1.26±0.80	0.92±0.35	0.56±0.48	*,# p=0.199 *##,### p<0.0001
C 18: 3ω3	0.22±0.17	0.21±0.13	1.12±0.54	*,# p=0.858 *##,### p<0.0001
C 22: 5ω3	0.23±0.23	0.21±0.17	0.39±0.27	*,# p=0.941 *##,### p<0.0001
Ratio of ω3/ω6	0.05±0.03	0.05±0.02	1.13±0.28	*,# p=0.912 *##,### p<0.0001
Total SFA (C 14: 0 + C 16: 0 + C 18: 0)	34.54±3.89	33.62±2.88	32.14±5.29	*,# p=1.0 *## p=0.008 ### p=0.518
Total MUFA	51.04±4.93	52.30±3.91	26.19±4.27	*,# p=0.762 *##,### p<0.0001
Total PUFA	14.42±3.08	14.07±3.78	35.13±4.84	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
Ratio of PUFA/SFA	0.42±0.1	0.42±0.13	1.13±0.29	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
Σ***ω3	0.76±0.58	0.72±0.52	4.5±1.46	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
Σ ω6	13.67±2.82	13.36±3.34	27.91±4.56	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
C 14: 0	3.8±1.13	3.3±0.81	4.49±2.34	*,# p=1.0 *## p=0.124 ### p=0.029
C 16: 0	25.01±2.51	24.94±2.05	21.9±2.4	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
C 18: 0	5.72±1.44	5.38±1.1	6.49±1.05	*,# p=0.709 *##,### p<0.0001
C 16: 1ω7	6.23±2.41	5.03±1.65	3.48±0.99	*,# p=0.003 *##,### p<0.0001
C 18: 2ω6	13.25±2.7	13.02±3.2	22.59±3.98	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
C 20: 4ω6	0.42±0.3	0.34±0.23	5.33±1.11	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
C 20: 5ω3	0.11±0.07	0.1±0.08	1.06±0.68	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001
C 22: 6ω3	0.19±0.15	0.19±0.17	1.92±0.73	*,# p=1.0 *##,### p<0.0001

SFA – saturated fatty acids; MUFA – monounsaturated fatty acids; PUFA – polyunsaturated fatty acids; * – kidney stone patients without MS; # – kidney stone patients with MS; ## – control group; C 18: 1× – number of carbon atoms and double bonds; ω** – position of double bond between carbon atoms in the molecule; Σ*** – total sum.

Increased dietary intake of PUFA prevents lipid accumulation in the liver and the adipose tissue of the abdominal area. The reverse effect is, however, characteristic of SFA [28]. *In vitro* data on a culture of proximal renal tubular cells showed that PUFA (α -linolenic, EPA) and MUFA (oleic) reduce oxidative stress and inhibit endoplasmic reticulum stress, which can lead to cell apoptosis [15,27].

We also found that patients with nephrolithiasis had a higher level of 16:1 ω 7 and a lower level of EPA in adipose tissue than in the control group. However, individuals with MS had significantly less 16:1 ω 7 and more 18:1 ω 9 than those who had not been diagnosed with MS. Our results can therefore confirm that individuals with nephrolithiasis consume a lower level of essential PUFA; therefore, synthesis of MUFA increases, leading to increased levels of 16:1 ω 7 and 18:1 ω 9 in adipose tissue.

Canadian researchers compared the spectrum of FA in blood phospholipids in 734 cardiovascular patients with and without MS. They found increased levels of SFA (16:0, 18:0) and ω 6 PUFA (18:3 ω 6, 22:6 ω 6) and decreased amounts of ω 3 PUFA (20:5 ω 3 and 22:6 ω 3) in patients with MS compared to patients without MS [29]. Our study, however, showed that the total percentage of SFA in the adipose tissue of individuals with MS did not differ from that of the control group. Nevertheless, patients without MS had a higher level of SFA than did controls (34.54 \pm 3.89 versus 32.14 \pm 5.29, $p=0.008$).

When individuals were grouped by origin of kidney stones and MS, we also found that the total percentages of PUFA, ω 6 PUFA, and 18:2 ω 6 were significantly higher in the calcium oxalate/phosphate kidney stone group without MS versus the uric acid kidney stone group with MS. This can be explained

by the fact that the metabolism of PUFA in patients with MS is impaired. There may also be a lack of dietary intake of PUFA.

The higher percentage of ω 6 PUFA in the adipose tissue of patients with uronephrolithiasis may cause more eicosanoids to be synthesized from those PUFA. Although no specific concentrations of eicosanoids were studied, according to scientific data, eicosanoids can have a significant impact on the pathogenesis of nephrolithiasis, directly or indirectly participating in inflammation.

Conclusions

Our study results from the patients with uronephrolithiasis differed from results from the control group. Irrespective of MS diagnosis, all individuals with kidney stones had significantly higher percentages of MUFA and lower percentages of PUFA than did healthy individuals. The elevated level of MUFA was a result of the significantly higher percentage of 18:1 ω 9 FA in kidney stone patients with MS compared to patients without MS, and could be related to a potential disorder of PUFA metabolism specific to MS. One of the causes of MS, and the cause of increased acidity and changes in the chemical composition of urine, is the lower amount of PUFA, ω 6 PUFA, and 18:2 ω 6 in the adipose tissue of patients with uric acid kidney stones and MS compared to patients with calcium-based kidney stones and without MS. The results of our study show an elevated level of SFA in kidney stone patients without MS compared to the control group.

Conflict of interest

None.

References:

1. Sakhae K: Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008; 17: 304-9
2. Richman K, O'Bell J, Pareek G: The growing prevalence of kidney stones and opportunities for prevention. *R1 Med J*, 2014; 97(12): 31-34
3. Romero V, Akpinar H, Assimos DG: Kidney stones: A global picture of prevalence, incidence, and associated risk factors. *Rev Urol*, 2010; 12(2/3): e86-96
4. Bagga HS, Chi T, Miller J, Stoller ML: New insights into the pathogenesis of renal calculi. *Urol Clin North Am*, 2013; 40(1): 1-12
5. Moe OW: Kidney stones: Pathophysiology and medical management. *Lancet*, 2006; 367: 333-44
6. Xie B, Halter TJ, Borah BM, Nancollas GH: Aggregation of calcium phosphate and oxalate phases in the formation of renal stones. *Cryst Growth Des*, 2015; 15: 204-11
7. Hendrixson V, Chomanskis Z: Pathogenetic links in metabolic syndrome and urolithiasis. *Laboratorinė Medicina*, 2010; 12 (46): 87-94
8. Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H: Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76(4): 750-57
9. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: The metabolic syndrome - a new world-wide definition. *Lancet*, 2005; 366: 1059-62
10. Sung TC, Seung II, Soon CM, Tae HK: Correlation of metabolic syndrome with urinary stone composition. *Int J Urol*, 2013; 20: 208-13
11. Akman T, Binbay M, Erbin A et al: The impact of metabolic syndrome on long-term outcomes of percutaneous nephrolithotomy (PCNL). *B J U Int*, 2012; 110(11): 1079-83
12. Jou YC, Fang CY, Chen SY et al: Proteomic study of renal uric acid stone. *Urology*, 2012; 80(2): 260-66
13. Torricelli FCM, De SK, Gebreselassie S et al: Dyslipidemia and kidney stone risk. *J Urol*, 2014; 191(3): 667-72
14. Cooke AA, Connaughton RM, Lyons CL et al: Fatty acids and chronic low-grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *Eur J Pharm*, 2016; 12(785): 207-14
15. Soumura M, Kume S, Isshiki K et al: Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 402(2): 265-71
16. Muoio DM, Neuffer PD: Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab*, 2012; 15(5): 595-605
17. Jump DB, Tripathy S, Depner CM: Fatty acid - regulated transcription factors in the liver. *Annu Rev Nutr*, 2013; 33: 249-69

18. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR et al, American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute: Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 2005; 112(17): 2735–52
19. Hendrixson V, Šablinskas V, Leščiuėtė D et al: Infrared spectroscopical approach in kidney stones research. *Laboratorinė Medicina*, 2008; 2(38): 99–105
20. 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
21. Stoffel W, Chu F, Ahrens E: Analysis of long – chain fatty acids by gas – liquid chromatography. *Anal Chem*, 1959; 31(2): 307–8
22. Reichard C, Gill BC, Sarkissian C et al: 100% uric acid stone formers: What makes them different?. *Urology*, 2015; 85(2): 296–98
23. Cho ST, Jung SI, Myung SC, Kim TH: Correlation of metabolic syndrome with urinary stone Composition. *Int J Urol*, 2013; 20: 208–13
24. Hendrixson V, Malysko E, Mažeikiėnė A et al: Prevalence of metabolic syndrome in patients with uric acid and calcium – based kidney stones. *GSTF J Adv Med Res*, 2014; 1(2): 1–7
25. Peña-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zuniga OA et al: Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *J Nutr Biochem*, 2013; 24(10): 1717–23
26. Finucane OM, Lyons CL, Murphy AM et al: Monounsaturated fatty acid – enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome – mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes*, 2015; 64(6): 2116–28
27. Katsoulieris E, Mabley JG, Samai M et al: α -Linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharm*, 2009; 623(1–3): 107–12
28. Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J et al: Overfeeding polyunsaturated and saturated fatty acids causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes*, 2014; 63: 2356–68
29. Nigam AI, Frasure-Smith N, Lespérance F, Julien P: Relationship between n-3 and n-6 plasma fatty acid levels and insulin resistance in coronary patients with and without metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19 (4): 264–270

3

**Riebalų rūgščių vaidmuo
inkstų akmenligės patogenezėje**

Inga Bikulčienė, Laima Vasiliauskaitė, Arvydas Kaminskas,
Vaiva Hendrixson and Valerija Jablonskienė

Laboratorinė medicina.
2018, t. 20, Nr. 2(78), p. 168–172.

Riebalų rūgščių vaidmuo inkstų akmenligės patogenezėje

Inga Bikulčienė
Laima Vasiliauskaitė
Arvydas Kaminskas
Valerija Jablonskienė
Vaiva Hendrixson

Santrauka

Inkstų akmenligė – tai daugiaveiksnė liga, kurios išsivystimui svarbi gyvensena, medžiagų apykaitos, aplinkos ir genetinė predispozicija, netgi geografiniai ypatumai. Dalis inkstų akmenligės patogenezės mechanizmų yra susiję su riebalų rūgščių ar jų metabolitų apykaita.

Inkstų kanalėlių epitelinės ląstelės ekspresuoja receptorių insulinui. Išsivysčius atsparumui insulinui, proksimaliniuose inkstų kanalėliuose sutrinka amonio jonų pernaša bei gamyba. Dėl padidėjusios laisvųjų vandenilio jonų koncentracijos sumažėja šlapimo pH ir formuojasi uratiniai akmenys.

Metabolinį sindromą sudarantys komponentai lemia šlapimo sudėties pokyčius: padidėja šlapimo rūgšties ir kalcio jonų ekskrecija, sumažėja citrato šalinimas su šlapimu ir šlapimo pH, todėl susidaro sąlygos formotis uratiniais ir kalcio oksalatiniais ar fosfatiniais inkstų akmenims.

Eikozapentaeno ir dokozaheksaeno riebalų rūgštys pasižymi organus saugančiu ir uždegimą slopinančiu poveikiu, kai suintensyvėja būtent iš omega 3 sintetinamų eikozanoidų ir jų oksidacijos produktų sintezė.

Socijų riebalų rūgščių ir jų metabolitų kaupimasis ląstelėse sukelia oksidacinį bei endoplazminio tinklo stresą. Šie procesai lemia inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelių apoptozę. Priešingu poveikiu pasižymi mononesočiosios ir polinesočiosios riebalų rūgštys – mažindamos endoplazminio tinklo pažeidimą sukėlusių žymenų koncentraciją bei ląstelių apoptozę *in vitro*.

Ši literatūros apžvalga rodo, kad vis didėja susidomėjimas lipidų, riebalų rūgščių ir jų metabolitų sąsajomis su inkstų akmenligės patogenezė, o tai skatina ieškoti naujų patogenezės ryšių.

Reikšminiai žodžiai: inkstų akmenligė, metabolinis sindromas, riebalų rūgštys.

ĮVADAS

JAV tyrimų duomenimis, keletą dešimtmečių inkstų akmenligės paplitimas vis didėjo [1]. Remiantis NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), 2007–2010 metais inkstų akmenligės paplitimas siekė 8,8 %. Vyrų populiacijoje inkstų akmenligės paplitimas išaugo nuo 6,3 % iki 10,6 %, moterų populiacijoje – nuo 4,1 % iki 7,1 % [2].

Inkstų akmenligės pasikartojimo rizika per pirmuosius penkerius metus nuo pirmo epizodo padidėja 50 %. Tai turėtų skatinti nustatyti didelės rizikos asmenų grupes, sutelkiant visus pajėgumus pagrindinių patogenezės elementų identifikavimui ir prevencinių priemonių kūrimui [3].

Remiantis epidemiologinių tyrimų duomenimis, inkstų akmenligė dažnai diagnozuojama esant ir kitiems sveikatos sutrikimams: nutuki-

Biomedicinos mokslų institutas,
Vilniaus universiteto
Medicinos fakultetas
Institute of Biomedical Science,
Faculty of Medicine, Vilnius University
El. paštas: inga.bikulciene@mf.vu.lt

mui, arterinei hipertenzijai, metaboliniam sindromui (MS), II tipo cukriniam diabetui (CD), inkstų nepakankamumui. Todėl šiandienos mokslinėje literatūroje inkstų akmenligė vertinama kaip sisteminė liga, o ne lokalus pažeidimas. Be to, inkstų akmenis sudarančių cheminių komponentų įvairovė taip pat byloja apie skirtingą ligos etiologiją ir neapsiriboją vien inkstų ir šlapimo takų sistemos patologija.

Remiantis dabartiniais mokslinės literatūros duomenimis, riebalų rūgščių reikšmė inkstų akmenligės išsivystymui aiškinama dvejopai. Vieni moksliniai šaltiniai nurodo tiesioginį riebalų rūgščių poveikį inkstų kanalėliams, druskų ir vandens apykaitai inkstuose, oksidaciniams ir uždegiminiams procesams, o kiti žvelgia per MS prizmę.

DRUSKŲ APYKAITOS POKYČIAI SERGANT INKSTŲ AKMENLIGE

Inkstuose veikiančios buferinės sistemos palaiko pastovų bazių kiekį bei vandenilio jonų (H^+) koncentraciją. Viena iš jų – tai amoniako (NH_3) susidarymas inkstuose. Veikiant inkstų glutaminazei, amoniakas atskyla nuo į inkstus atneštos glutamino aminorūgšties (Gln), kuri deamininimo metu virsta glutamatu (Glu). NH_3 , susijungęs su H^+ , sudaro amonio jonus (NH_4^+), kurie palaiko sarmų rezervą. NH_4^+ nesugrįžta į organizmą, nes negali pereiti inkstų kanalėlių epitelinio ląstelių membranos, todėl yra pašalinamas su šlapimu. Tyrimų duomenimis, asmenims, kuriems identifikuoti uratiniai akmenys, NH_4^+ koncentracija šlapime yra 5–7 kartus mažesnė nei tiems, kuriems identifikuoti kalcio druskų kilmės akmenys [4]. N. Abate ir kolegos iškėlė prielaidą, kad padidėjęs šlapimo rūgšties kiekis šlapime yra susijęs su sumažėjusia šlapimo pH reikšme (mažiau kaip 5,5) dėl sutrikusio NH_4^+ išskyrimo, kurį sukėlė atsparumas insulinui [5]. Tyrimai *in vitro* parodė, kad inkstų kanalėlių epitelinės ląstelės ekspresuoja receptorių insulinui [6]. Insulinas skatina NH_4^+ gamybą proksimaliniuose kanalėliuose ir aktyvina Na^+/H^+ jonų siurbli. Taigi, išsivystęs atsparumas insulinui proksimaliniuose kanalėliuose sutrikdo NH_4^+ pernašą bei gamybą ir tai sumažina šlapimo pH, nes atsiranda daug laisvų H^+ jonų. Nors atsparumas insulinui negali visiškai paaiškinti uratinų akmenų susidarymo priežasties, tačiau tai yra vienas iš šlapimo rūgšties precipitacijos ir ink-

stų akmenų susidarymo mechanizmų [7].

Kitų mokslininkų nuomone, amoniogenezė ir NH_4^+ pernaša sutrikdo lipidų ir riebalų rūgščių perteklius inkstų proksimaliniuose kanalėliuose, nes sunkinama Gln pernaša per mitochondrijų membranas. Kita vertus, lipidų kaupimasis inkstuose ir inkstų kanalėliuose taip pat gali būti susijęs su sutrikusiu audinių jautrumu insulinui [8, 9].

METABOLINIO SINDROMO ĮTAKA AKMENŲ FORMAVIMUISI INKSTUOSE

Metabolinis sindromas (MS) diagnozuojamas remiantis: gliukozės tolerancijos sutrikimu, arterine hipertenzija, sumažėjusia didelio tankio lipoproteinų (DTL) cholesterolio koncentracija, padidėjusia triacilglicerolių (TAG) koncentracija, pilviniu nutukimu (bet kurie trys iš penkių kriterijų patvirtina MS diagnozę, AHA/NHLBI 2005) [10]. MS sudarantys komponentai lemia šlapimo sudėties pokyčius: padidėja šlapimo rūgšties ir kalcio jonų ekskrecija, sumažėja citrato šalinimas su šlapimu ir šlapimo pH, o tai sudaro sąlygas formuotis uratiniais ir kalcio oksalatiniais akmenimis [11]. Pasak T. Akman ir bendraautorų, šlapimo rūgšties akmenys statistiškai reikšmingai dažnesni esant diagnozuotam MS [12].

C. Reichard ir bendraautorai atliko tyrimą, kuriam retrospektyviai infraraudonųjų spindulių spektroskopijos metodu atrinko 308 tiriamųjų, turinčių inkstų akmenų, kuriuos sudarė bent 10 % šlapimo rūgšties. Inkstų akmenys pagal procentinę turimų uratų dalį buvo suskirstyti į 10–20 %, 30–50 %, 60–90 % ir 100 % grupes. C. Reichard duomenimis, 100 % uratiniai akmenys būdingesni vyresnio amžiaus, didesnį kūno masės indeksą (KMI), mažesnį šlapimo pH ir didesnę šlapimo rūgšties koncentraciją kraujo plazmoje turintiems asmenims, palyginti su pacientais, kurių akmenų uratinis komponentas tesudarė 10–20 % [13].

Japonijos tyrėjai nustatė, kad sveiki asmenys, atitike tris ir daugiau MS kriterijų, turėjo daug didesnį riziką susirgti inkstų akmenlige nei tie, kurie atitiko tik du [14]. Turku populiacijoje didesnis MS komponentų skaičius taip pat koreliuoja su didesne inkstų akmenų formavimosi rizika [15].

Kitas MS komponentas – sutrikusi glikemija nevalgius ar diagnozuotas

II tipo CD. Net 43 % iš 3,1 mln. inkstų akmenlige sergančių JAV gyventojų yra diagnozuotas II tipo CD. Iš jų 680 000 atvejų buvo priskirti prastai glikemijos kontrolei [16]. Tiems, kurie serga II tipo CD, daug dažniau išsivysto inkstų akmenligė. Ypač dažnai randami uratinės kilmės akmenys [17].

Sutrikusi glikemija ir II tipo CD yra susiję su pakitusiu riebalinio audinio gebėjimu kaupti riebalų rūgštis. Pilvo riebalinio audinio adipocitai, vystantis atsparumui insulinui, praranda gebėjimą adekvačiai kaupti riebalų rūgštis. Laisvosios riebalų rūgšties (tiksliau iš jų susidaręs acetyl-CoA), didindamos kepenyse gliukoneogenezės fermento piruvatkarboksilazės aktyvumą, skatina gliukozės sintezę ir mažina insulino klirensą [18]. Todėl didėja TAG, mažo tankio lipoproteinų (MTL) cholesterolio ir mažėja DTL cholesterolio koncentracija. Minėti pokyčiai lemia ankstyvą aterosklerozę [8].

Dislipidemija – dar vienas komponentas, papildantis MS diagnostinių kriterijų visumą. Tam tikri lipidų sudėties pokyčiai gali būti susiję su cheminių šlapimo komponentų pokyčiais ir padidėjusia inkstų akmenligės rizika. Teigiama, kad padidėjusi TAG ir bendrojo cholesterolio koncentracija turi įtakos būtent uratinų akmenų formavimuisi, o padidėjusi MTL cholesterolio koncentracija susijusi su gausesniu šlapimo rūgšties bei Na^+ jonų išsiskyrimu su šlapimu [19].

MS diagnozę galutinai nelemia uratinės inkstų akmenų kilmės. Tačiau pacientai, atitinkantys didesnę MS kriterijų skaičių, turi didesnę uratinės kilmės inkstų akmenų susidarymo riziką, palyginti su kitos kilmės inkstų akmenų formavimosi rizika.

POLINESOČIOSIOS RIEBALŲ RŪGŠTYS IR INKSTŲ AKMENLIGĖ

Mokslinėje literatūroje polinesočiosios riebalų rūgštys (PNRR) įvardijamos kaip pasižyminčios antiaterogeniniu poveikiu, bet kartu jos gali tapti lipidų peroksidacijos substratu. Kuo daugiau nesocijų jungčių turi riebalų rūgštis – tuo ji lengviau oksiduojasi [20]. Todėl, vartojant PNRR kaip papildus, būtina su maistu gauti pakankamai antioksidantų – vitamino C, tokoferolio, seleno, karotenoidų ir kt.

Vyraujanti omega-6 (ω -6) riebalų rūgštis (RR) yra arachidono rūgštis (AR). Veikiama ciklooksigenazės ir lipooksigenazės, AR verčiama prostaglandiniais, leukotrienais. Minėti eiko-

zanoidai pasižymi aterogeniniu, uždegimu palaikančiu, trombogeniniu poveikiu. Tipinės omega-3 (ω -3) RR yra eikozapentaeno (20:5 ω -3) ir dokozaheksaeno (22:6 ω -3). Iš RR 20:5 ω -3 ir RR 22:6 ω -3 sintetinami eikozanoidai pasižymi priešingu veikimu nei eikozanoidai, sintetinami iš AR [21]. RR 20:5 ω -3 ir RR 22:6 ω -3, kaip ciklooksigenazės substratai, gali nukonkuruoti AR, todėl žuvų taukų, kuriuose gausu RR 20:5 ω -3, vartojimas gali sumažinti iš AR sintetinamų uždegimui palankių poveikiu pasižyminčių eikozanoidų sintezę. Toks organų apsauginis, uždegimo slopinamasis poveikis pasiireškia dėl dokozanoidų ir ω -3 PNRR oksidacijos produktų – oksilipinų sintezės [22, 24].

Tuo būtų galima paaiškinti nedidelį aterosklerozės ir inkstų akmenligės paplitimą tarp Grenlandijos eskimų [23]. Remiantis šia hipoteze, eskimai turi mažesnę riziką susirgti inkstų akmenlige, nes eikozanoidų sintezė jų organizme vyksta iš dominuojančių ω -3 PNRR.

Pasitelkiant MS sergančių eksperimentinių gyvūnų modelių pastebėta, kad papildai, kurių sudėtyje yra RR 20:5 ω -3 ir RR 22:6 ω -3, palankiai veikia inkstų funkciją, nes sustensyvoja būtent iš ω -3 PNRR sintetinamų eikozanoidų – 5-hidroksi-eikozapentaeno rūgšties (5-HEPE), 12-HEPE, 15-HEPE, 18-HEPE – gamybą [24]. Be to, iš ω -3 PNRR sintetinami ir kiti lipidiniai mediatoriai (pvz., protektinai), kurie inkstų pažeidimo atveju slopina neutrofilų infiltraciją, blokuoja tiesioginių antigenų atpažinimo receptorių – TLR (angl. *toll-like receptors*), skatina makrofagų aktyvumą [25]. Vis dėlto mokslinių tyrimų, kuriuose būtų vertinamas tiesioginis ryšys tarp konkrečių ω -3 PNRR, ω -6 PNRR bei iš jų sintetinamų eikozanoidų ir inkstų akmenligės, vis dar stinga.

Riebalų rūgščių įtaka oksidaciniam stresui

Šiandienos mokslinės literatūros duomenimis, nutukimas yra susijęs su hipoksija, oksidaciniu stresu ir netgi su mechaniniu pažeidimu, sukeltu adipocitų hipertrofijos. Adipocitų hipertrofija ir vėlesnė riebalinio audinio disfunkcija sukelia uždegimą ir oksidacinį stresą MS sergantiems pacientams [26, 27]. Be to, vis dažniau vartojama lipotoksiškumo sąvoka, kuri apibrėžia sočiųjų riebalų rūgščių (SRR) ir jų metabolitų kaupimąsi ląstelėse, įvairiais patogeneziniais mechanizmais sukeliantį oksidacinį bei endoplazminio tinklo stresą (angl. *endoplasmic reticulum stress*) [28].

Oksidacinį stresą nutukusių pacientų organizme sukelia reaktyvūs deguonies radikalai, sintetinami riebaliniame audinyje. Manoma, kad to priežastis yra padidėjusi nikotinamidadenindinukleotido redukuotos formos oksidazės (NADPH-oksidadė), kuri dalyvauja reaktyvių deguonių junginių gamyboje, geno raida riebaliniame audinyje bei sumažėjusi antioksidaciniu veikimu pasižyminčių fermentų genų raida. NADPH-oksidadė geno raidą skatina SRR perteklius riebaliniame audinyje [29]. Nutukusiems asmenims būdinga pilvo riebalinio audinio disfunkcija, kai kraujyje cirkuliuoja vis daugiau laisvųjų endogeninių SRR, o gebėjimas kaupti egzogenines RR taip pat yra sutrikęs [30].

Tyrimų *in vitro* duomenimis, pasitelkiant proksimalinių inkstų kanalėlių ląstelių kultūras nustatyta, kad PNRR (α -linoleno (18:3 ω -3), 20:5 ω -3) ir mononesočiosios riebalų rūgštys (MNRR) (oleino (18:1 ω -9) mažina oksidacinį stresą bei slopina endoplazminio tinklo stresą, kuris gali sukelti ląstelių apoptozę [31, 32].

P. Peña-Orihuela duomenimis, didesnis MNRR kiekis maiste skatina riebaliniame audinyje esančių antioksidacinių fermentų (glutathionperoksidazės, katalazės ir kt.) genų raidą ir tokiu būdu sumažina oksidacinį stresą. O didesnis su maistu gaunamų SRR kiekis nutukusių asmenų riebaliniame audinyje skatina fermento NADPH-oksidadės, atsakingo už reaktyvių deguonių junginių sintezę, genų raidą bei slopina genų, koduojančių antioksidacinius fermentus, raidą. Tyrėjai mano, kad asmenų, kuriems diagnozuotas MS, dietos SRR pakeitimas MNRR būtų efektyvus būdas mažinti oksidacinį stresą [33]. Atlikti eksperimentai su laboratorinėmis pelėmis leidžia daryti prielaidą, kad SRR pakeitimas MNRR turėtų mažinti uždegimą riebaliniame audinyje ir kartu atsparumą insulinui [34].

E. Katsoulis ir kolegos tyrė palmítico (16:0) SRR poveikį proksimalinių inkstų kanalėlių ląstelėms *in vitro*. Tyrėjai nustatė, kad RR 16:0 sukelia endoplazminio tinklo stresą, kuris lemia inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelių apoptozę. Priešingai veikia RR 18:3 ω -3 – ji sumažina endoplazminio tinklo pažeidimą sukėlusiu žymenų koncentraciją bei ląstelių apoptozę *in vitro* [28].

O. Gunes ir bendraautoriai siekė įvertinti eritrocitų membranos RR sudėties ir atsparumo insulinui ryšį tirdami nutukusių (daliai jų nustatytas atsparumas insulinui) ir normalaus

svorio turkų tautybės paauglių grupes. Šie tyrėjai nustatė statistiškai reikšmingai didesnę palmitoleino (16:1 ω -7) ir mažesnę RR 20:5 ω -3 koncentraciją nutukusių paauglių grupėje, palyginti su kontrolinės grupės paaugliais. Netgi suskirstyti pagal atsparumą insulinui nutukę paaugliai statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo sveikųjų pagal RR 16:1 ω -7 ir RR 20:5 ω -3 koncentraciją [35].

Japonijos mokslininkai pagrindė kitą molekulinį RR 16:0 oksidacinio poveikio mechanizmą. Tyrėjų duomenimis, inkstų kanalėlių ląstelių kultūrose RR 16:0 didina monocitų chemotakso baltymo (MCP-1) raidą. Mechanizmas grindžiamas RR 16:0 gebėjimu didinti vidulastelinį DAG koncentraciją, dėl to skatinama proteinkinazės C (PKC) šeimos baltymų aktyvacija. Nustatyta, kad RR 18:1 ω -9 ir RR 20:5 ω -3, aktyvindamos fermento diacilglicerolaciltransferazės geno raidą, paverčia intralastelinis DAG į TAG ir tokiu būdu slopina PKC aktyvumą. Todėl išvengiama inkstų kanalėlių ląstelių pažeidimo [31]. Yra duomenų, kad laisvųjų RR perteklius viršija mitochondrijų galimybes vykdyti RR β -oksidaciją, todėl susidaro iš dalies oksiduotas acilkarmitinas bei didesnės DAG koncentracijos, lemiančios atsparumą insulinui [36]. RR tiesiogiai ar per signalines molekules kepenyse geba veikti genų transkripcijos lygmeniu ir taip reguliuoti lipogenezę, RR β -oksidaciją bei gliukozės apykaitą [37]. Taigi, remiantis šiomis studijomis, RR vaidmuo sukeliant oksidacinį stresą nebūtinai yra tiesioginis.

APIBENDRINIMAS

Inkstų akmenligė – tai daugiaveiksni liga, kai proksimaliniuose inkstų kanalėliuose sutrikdoma NH_4^+ pernaša ir gamyba. Padidėja šlapimo rūgšties, kalcio ir natrio jonų ekskrecija, sumažėja citrato šalinimas su šlapimu, dėl to sumažėja šlapimo pH. Detalių mokslinių tyrimų apie riebalų rūgščių ir jų metabolitų vaidmenį inkstų akmenligės patogenezėje nėra daug. Juose yra aprašomas neigiamas sočiųjų riebalų rūgščių poveikis inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelėms (sukelia jų apoptozę), taip pat priešingas mononesočiųjų ir polinesočiųjų riebalų rūgščių poveikis ląstelių pažeidimui, nurodoma ir padidėjusi rizika formuotis šlapimo rūgšties inkstų akmenims sergant metaboliniu sindromu. ◆

Gauta: 2018 02 12
Priimta spaudai: 2018 06 28

Summary

THE ROLE OF FATTY ACIDS IN PATHOGENESIS OF URONEPHROLITHIASIS

Inga Bikuldienė, Laima Vasiliauskaitė, Arvydas Kaminskas, Valerija Jablonskienė, Vaiva Hendrixson

Uronephrolithiasis is a multifactorial disease influenced by lifestyle, metabolic, environmental, genetic factors, and nutritional habits. Variety of chemical compounds in kidney stones refers to different causes of nephrolithiasis. Some mechanisms of the development of kidney calculi are related to fatty acids and their metabolites.

Epithelial cells of the renal tubules express insulin receptors. The developed insulin resistance causes disturbance of transport and production of ammonium ions in the proximal kidney tubules. Due

to increased free hydrogen ions, urine pH decreases leading to the formation of uric acid kidney stones.

Metabolic syndrome has been associated with changes in urinary constituents, including increased uric acid and calcium excretion, decreased citrate excretion and lower urinary pH. These changes lead to increased risk of uric acid and calcium oxalate/phosphate kidney calculi formation.

Eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids have organ – protective and anti – inflammatory effects. This impact occurs only when eicosanoids and their oxida-

tion products are intensively synthesized from omega-3 polyunsaturated fatty acids.

The accumulation of saturated fatty acids and their metabolites within the cell has been associated with oxidative and endoplasmic reticulum stress. These processes cause apoptotic cell death of renal proximal tubule. Monounsaturated and polyunsaturated fatty acids have been observed to have the opposite effect – reducing the endoplasmic reticulum damage and cell apoptosis *in vitro*.

The aim of this literature review is to expose an increasing interest in relationship between lipids, fatty acids and their metabolites with the pathogenesis of uronephrolithiasis and promotes to search for new links of pathogenesis of kidney stones formation.

Keywords: kidney calculi, metabolic syndrome, fatty acids.

LITERATŪRA

- Sakhaee K. Nephrolithiasis as a systemic disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 304–9.
- Richman K, O'Bell J, Pareek G. The growing prevalence of kidney stones and opportunities for prevention. *R I Med J* 2014; 97(12): 31–4.
- Bagga HS, Chi T, Miller J, Stoller ML. New insights into the pathogenesis of renal calculi. *Urol Clin North Am* 2013; 40(1): 1–12.
- Sakhaee S, Adams-Huet B, Moe OW, Pak CYC. Pathophysiologic basis for normouricosuric uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int* 2002; 62: 971–9.
- Abate N, Chandalia M, Cabo-Chan AV, Moe OW, Sakhaee K. The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney Int* 2004; 65: 386–92.
- Li H, Klett DE, Littleton R, Elder JS, Sammon JS. Role of insulin resistance in uric acid nephrolithiasis. *World J Nephrol* 2014; 3(4): 237–42.
- Strohmaier WL, Wrobel BM, Schubert G. Overweight, insulin resistance and blood pressure (parameters of the metabolic syndrome) in uric acid urolithiasis. *Urol Res* 2012; 40: 171–5.
- Berglund L, Hyson D. Cholesterol absorption and the metabolic syndrome: a new look at an old area. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(8): 1314–6.
- Jou YC, Fang CY, Chen SY, Chen FH, Cheng MC, Shen CH, et al. Proteomic study of renal uric acid stone. *Urology* 2012; 80(2): 260–6.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059–62.
- Sung TC, Seung IJ, Soon CM, Tae HK. Correlation of metabolic syndrome with urinary stone composition. *Int J Urol* 2013; 20: 208–13.
- Akman T, Binbay M, Erbin A, Tepeler A, Sari E, Kucuktopcu O, et al. The impact of metabolic syndrome on long-term outcomes of percutaneous nephrolithotomy (PCNL). *BJU Int* 2012; 110(11): 1079–83.
- Reichard C, Gill BC, Sarkissian C, De S, Monga M. 100% uric acid stone formers: what makes them different? *Urology* 2015; 85(2): 296–8.
- Kabeya Y, Kato K, Tomita M, Katsuki T, Oikawa Y, Shimada A, et al. Associations of insulin resistance and glycoemic control with the risk of kidney stones. *Intern Med* 2012; 51: 699–705.
- Binbay M, Yuruk E, Akman T, Sari E, Yazici O, Ugurlu IM, et al. Updated epidemiologic study of urolithiasis in Turkey II: role of metabolic syndrome components on urolithiasis. *Urol Res* 2012; 40: 247–52.
- Weinberg AE, Patel CJ, Chertow GM, Leppert JT. Diabetic severity and risk of kidney stone disease. *Eur Urol* 2014; 65(1): 242–7.
- Daudon M, Traxer O, Conort P, Lacour B, Jungers P. Type 2 diabetes increases the risk for uric acid stones. *JASN* 2006; 17(7): 2026–33.
- Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 2008; 413: 369–87.
- Torricelli FCM, De Shubha K, Gebreselassie S, Li I, Sarkissian C, Monga M. Dyslipidemia and kidney stone risk. *J Urol* 2014; 191(3): 667–72.
- Kaminskas A, Zieden B, Elving B, Kristenson M, Abaravicius A, Bergdahl B, et al. Adipose tissue fatty acids in men from two populations with different cardiovascular risk: the LiVicordia study. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 227–32.
- Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 2008; 47(2): 147–155.
- Schuchardt JP, Schmidt S, Kressel G, Willenberg I, Hammock BD, Hahn A, et al. Modulation of blood oxylipin levels by long chain omega-3 fatty acid supplementation in hyper and normolipidemic men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2014; 90(2–3): 27–37.
- Buck AC, Davies RL, Harrison T. The protective role of eicosapentaenoic acid [EPA] in the pathogenesis of nephrolithiasis. *J Urol* 1991; 146(1): 188–94.
- Katakura M, Hashimoto M, Inoue T, Al Mamun A, Tanabe Y, Iwamoto R, et al. Omega-3 fatty acids protect renal functions by increasing docosahexaenoic acid-derived metabolite levels in SHR. *Cg-Leprec/NDmc rats, a metabolic syndrome model. Molecules* 2014; 19(3): 3247–63.
- Hong S, Lu Y. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. *Front Immunol* 2013; 4: 13.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: adipocyte biology adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007; 48: 1905–14.
- Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(4): 332–41.
- Katsoulis E, Mabley JG, Samai M, Sharpe MA, Green IC, Chatterjee PK. Lipotoxicity in renal proximal tubular cells: relationship between endoplasmic reticulum stress and oxidative stress pathways. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(12): 1654–62.
- Inoguchi T, Nawata H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dys-

- function and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 2005; 6(4): 495–501.
30. Cooke AA, Connaughton RM, Lyons CL, McMorrow AM, Roche HM. Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *Eur J Pharm* 2016; 12(785): 207–14.
31. Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S, Tanaka Y, et al. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402(2): 265–71.
32. Katsoulis E, Mabley JG, Samai M, Green IC, Chatterjee PK. α -linolenic acid protects renal cells against palmitic acid lipotoxicity via inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharm* 2009; 623(1–3): 107–12.
33. Peña-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Perez-Martinez P, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, et al. Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *J Nutr Biochem* 2013; 24(10): 1717–23.
34. Finucane OM, Lyons CL, Murphy AM, Reynolds CM, Klinger R, Healy NP, et al. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion and insulin resistance despite obesity. *Diabetes* 2015; 64(6): 2116–28.
35. Gunes O, Tascilar E, Sertoglu E, Tas A, Serdar MA, Kaya G, et al. Associations between erythrocyte membrane fatty acid compositions and insulin resistance in obese adolescents. *Chem Phys Lip* 2014; 184: 69–75.
36. Muoio DM, Neuffer PD. Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab* 2012; 15(5): 595–605.
37. Jump DB, Tripathy S, Depner CM. Fatty acid-regulated transcription factors in the liver. *Annu Rev Nutr* 2013; 33: 249–69.
-

**Association of platelet membrane fatty acid composition
with markers of oxidative stress in healthy men**

Inga Bikulčienė, Orianta Golubevaitė, Vytautas Žėkas, Mantas Radzevičius,
Dovilė Karčiauskaitė, Rėda Matuzevičienė, Vaiva Hendrixson, Asta Mažeikienė,
Neringa Burokienė, Arvydas Kaminskas and Zita Aušrelė Kučinskienė

Received: 2019.01.11
Accepted: 2019.04.23
Published: 2019.08.26

Association of Platelet Membrane Fatty Acid Composition with Markers of Oxidative Stress in Healthy Men

Authors' Contribution:
Study Design A
Data Collection B
Statistical Analysis C
Data Interpretation D
Manuscript Preparation E
Literature Search F
Funds Collection G

ABCDE 1 Inga Bikulčienė
BCDF 1 Orianta Golubevaitė
AB 1 Vytautas Žekas
B 1 Mantas Radzevičius
ABCDEF 1 Dovilė Karčiauskaitė
ABCD 1 Rėda Matuzevičienė
DE 1 Vaiva Hendrixson
B 1 Asta Mažeikienė
B 2 Neringa Burokienė
ACD 1 Arvydas Kaminskas
ADG 1 Zita Aušrelė Kučinskienė

1 Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology, and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

2 Clinics of Internal Diseases, Family Medicine and Oncology, Faculty of Medicine, Institute of Clinical Medicine, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

Corresponding Author: Inga Bikulčienė, e-mail: inga.bikulciene@mf.vu.lt
Source of support: This study was supported by the Research Council of Lithuania (Grant No. MIP-050/2015)

Background: Platelet membranes are extremely susceptible to peroxidation, forming a variety of lipid peroxides, including malondialdehyde (MDA), which has been implicated in the etiology of cardiovascular diseases. Moreover, platelet-leukocyte aggregates (PLAs) are known to contribute to advanced endothelial injury and atherogenesis.





Material/Methods: Fatty acid (FA) methyl esters of the platelet membranes of 79 apparently healthy men without any acute clinical condition at the time of the study were identified by GC/MS. MDA was measured by HPLC in blood serum, and PLAs were analyzed by whole-blood flow cytometry. Individuals were divided into quartiles according to MDA concentration and percentage of PLAs formation. The composition of platelet membrane FAs was compared to MDA concentration and the percentage of PLAs formation in apparently healthy individuals.

Results: In quartiles (Q) with higher MDA concentration, percentage of C 16: 1ω7 (Q₁ vs. Q₃, p=0.021), C 20: 1ω9 (Q₂ vs. Q₄, p=0.028) and C 20: 5ω3 (Q₂ vs. Q₄, p=0.046) was lower. However, C 22: 5ω3 (Q₁ vs. Q₄, p=0.038) and total ω3 (Q₁ vs. Q₂, p=0.024) were higher.

Conclusions: MDA and the formation of platelet-monocyte aggregates stimulate the incorporation of monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids in platelet phospholipid membranes, which may be a hallmark for a changed level of biologically active compounds required for the activation of future platelets.

MeSH Keywords: Malondialdehyde • Oxidative Stress • Platelet Activation

Full-text PDF: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/915111>

 3416  4  4  48



Background

Oxidative stress and lipid peroxidation are closely associated with a large number of pathophysiological processes. Formed during oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) attack biomolecules, disrupt cellular functions, and cause inflammation or even cell apoptosis [1,2]. Research shows that oxidative stress is associated with increased platelet activation, thrombosis [3,4], and cardiovascular diseases [5]. One of the main targets for ROS is phospholipids of the cell membrane, especially polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [6].

During lipid peroxidation, especially of PUFAs, malondialdehyde (MDA) is formed as a degradation product of lipid oxidation. MDA is considered an important biomarker of oxidative stress [7]. MDA is also associated with carcinogenic and cytotoxic effects on the cell, as well as the pathogenesis of diabetes mellitus and neurodegenerative and cardiovascular diseases [8–10].

In vivo, MDA can be produced as a by-product from omega 3 (ω 3) or omega 6 (ω 6) PUFAs by enzymatic processes during the biosynthesis of thromboxane A2 or generated from bicycle endoperoxides by nonenzymatic processes during lipid peroxidation [11,12]. The number of MDA molecules that can maximally be formed depends on the number of double bonds (since the methylene group between the double bonds is used to form MDA), e.g., arachidonic acid (C 20: 4 ω 6) could provide 3 MDA molecules, while eicosapentaenoic acid (C 20: 5 ω 3) could provide a maximum of 4 MDA molecules per PUFA molecule [13]. Moreover, biological MDA exists primarily in 2 forms, i.e., free or covalently bound to/conjugated with proteins and nucleic acids, lipoproteins, and certain amino acids [14].

Human platelets are known to a main source of MDA formation in human blood [13]. According to scientific data, platelets play a key role in protecting against haemorrhage, as well as in inflammatory processes associated with atherosclerosis, homeostasis, and thrombosis [15].

Phospholipids account for 65% of all platelet lipids [16]. Therefore, platelet function and activity are closely related to the composition of the phospholipid membrane. Due to the changes in platelet membrane FAs, the synthesis of biologically active eicosanoids with pro-inflammatory or anti-inflammatory effects may increase [17].

Vascular inflammation plays an essential role in endothelial injury and activation of atherogenesis. Platelets and platelet-leucocyte aggregates (PLAs) are known to contribute to this ongoing endothelial injury, resulting in platelet-dependant thrombosis, especially in acute coronary syndromes [18–20]. Therefore, platelets activated by oxidative stress and

accompanied by lipid peroxidation of the phospholipid membrane are closely associated with the risk of cardiovascular diseases.

To explore how processes of lipid peroxidation and platelet activation might be modified when the composition of platelet membrane FA changes, we designed our study to determine the relationship between the changes in the composition of platelet membrane FAs, blood serum MDA concentration, and PLA formation. This research could be useful in evaluating platelet preparation for the next activation phase and assessing the synthesis intensity of biologically active compounds (e.g., eicosanoids/docosanoids).

Material and Methods

Study design

This study (duration: 2 years) was carried out on a group of 79 volunteers (men) aged 36.5 years \pm 10.8 years, who were apparently healthy (without any acute clinical condition) and who gave their written consent to participate in the study. Individuals with any cardiac and chronic diseases or prior stroke or venous thromboembolism were excluded from the study. Female subjects were not included in this study, as males usually have earlier onset of the disease than their female counterparts [21]. The research was carried out at the laboratory of the Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology, and Laboratory Medicine of the Institute of Biomedical Sciences at the Faculty of Medicine of Vilnius University. The study protocol was approved by the Vilnius Regional Bioethics Committee (Approval No. 15820-15-807-319) and was supported by the Research Council of Lithuania (Grant No. MIP-050/2015).

Platelet extraction

Blood samples were collected in a sodium heparin Vacutainer tube and centrifuged immediately at 3000 g for 10 min. Then, $\frac{3}{4}$ of the plasma was removed without touching the cell and foam layer. The remaining portion ($\frac{1}{4}$ of the plasma), rich in thrombocytes, was extracted and mixed with freezing media (BI, Israel) in a ratio 2: 1 and frozen at -80°C .

Extraction and determination of platelet membrane FAs

Methyl esters of platelet membrane FAs were prepared using the Folch method [22]. Thin-layer chromatography (Sil G-25 UV₂₅₄) was then performed to extract platelet phospholipids [23]. After FA transesterification, the FA spectrum was determined by gas chromatography/mass spectrometry with a GCMS-QP2010 Ultra manufactured by Shimadzu. Data were collected and processed

Table 1. FAs analyzed by gas chromatography/mass spectrometry.

SFAs*	MUFAs**	PUFAs***
14: 0* Myristic acid	16: 1ω*7 9-hexadecenoic/Palmitoleic acid	18: 2ω6 9,12-octadecadienoic/Linoleic acid
16: 0* Palmitic acid	18: 1ω*9 9-octadecenoic/Oleic acid	18: 3ω3 9,12,15-octadecatrienoic/α-Linolenic acid
18: 0 Stearic acid	18: 1ω7 11-octadecenoic/Vaccenic acid	20: 4ω6 5,8,11,14-eicosatetraenoic/Arachidonic acid
	20: 1ω9 11-eicosenoic/Gondoic acid	20: 5ω3 5,8,11,14,17-eikosapentaenoic/Timnodonic acid
		22: 5ω3 7,10,13,16,19-docosapentaenoic/Clupanodonic acid
		22: 6ω3 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic/Cervonic acid

* Saturated fatty acids; ** monounsaturated fatty acids; *** polyunsaturated fatty acids; * number of carbon atoms and double bonds; % position of double bond between carbon atoms.

using LabSolutions software (Shimadzu). Table 1 shows the FAs investigated in this study expressed as a percentage of total FAs.

Determination of MDA concentration in blood serum

Blood serum MDA concentration was measured using a method published by Khoschsorur et al. [24] with minor modifications. The sample preparation serves for the sample purge and for the derivatisation of the analyte with thiobarbituric acid (TBA) into a detectable form, i.e., the MDA-TBA adduct. MDA concentration was determined by a Shimadzu Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu). Data were collected and processed using LabSolutions software (Shimadzu).

Determination of platelet activation markers

Flow cytometric analysis was performed on platelet functional activity in agonist non-stimulated EDTA anticoagulated blood not later than 10 min after blood collection (BD FACS Canto, BD Biosciences, USA). Data analysis was carried out using BD FACS Diva software (version 6.1.2). Leukocyte populations (neutrophils, monocytes, and lymphocytes) were identified according to CD45/CD14 expression: neutrophils (CD45+, CD14-, high side scattered light), monocytes (CD45+, CD14+, mean side scattered light) and lymphocytes (CD45+, CD14-, low side scattered light). Then, the percentage of neutrophils, monocytes and lymphocytes expressing the CD42a marker was calculated. This combination of markers is characteristic for PLAs and was considered an indicator of adhesion phase. The data that were obtained were expressed in absolute numbers (the number of studied platelets tagged with the marker), percentages (a part of the studied population tagged with the marker), and mean of fluorescence intensity (fluorescence intensity of platelet population with tagged marker).

Distribution of volunteers

First, individuals participating in this study were grouped into quartiles according to the concentration of blood serum MDA. Blood serum MDA concentration was 62.47–77.58 µg/l (n=20) in the first quartile (Q1), 77.79–97.07 µg/l (n=20) in the second quartile (Q2), 97.22–117.61 µg/l (n=20) in the third quartile, and 118.10–169.32 µg/l (n=19) in the fourth quartile (Q4). Then, the spectrum of platelet membrane FA was compared with the concentration of blood serum MDA in quartiles, and the correlation between the platelet membrane FA spectrum and blood serum MDA concentration was calculated.

Second, volunteers were grouped into quartiles according to the percentage of PLA formation. The percentage of PLAs formation ranged from 3.7 to 8.3 (n=20) in the first quartile (Q1), 8.4 to 9.5 (n=19) in the second quartile (Q2), 9.6 to 10.8 (n=21) in the third quartile (Q3), and 10.9 to 14.5 (n=19) in the fourth quartile (Q4). The quartiles of PLAs formation were then compared with the spectrum of platelet membrane FA, and the correlation between the variables was measured.

Statistical analysis

Data analysis was carried out using IBM SPSS software (version 24) and Microsoft Excel 2016. Data are expressed as median, minimum, and maximum. Differences between the groups were tested for significance using the Mann-Whitney *U* test and the Spearman's rank correlation coefficient for assessing the correlation between variables. *P*<0.05 was considered statistically significant.

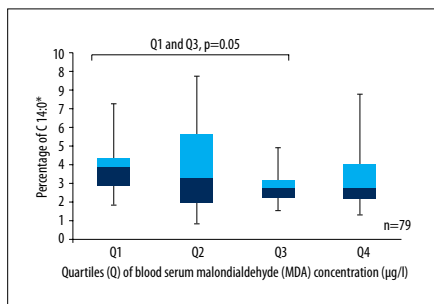


Figure 1. Box plots represent a comparison of the percentage of C 14: 0 between quartiles of blood serum MDA concentration. Q1 and Q3, $p=0.05$; Q1 and Q4, $p=0.089$. $N=79$. * Number of carbon atoms and double bonds.

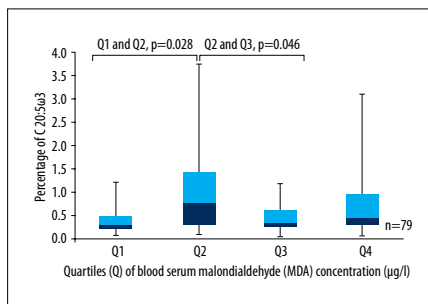


Figure 3. Box plots represent a comparison of the percentage of C 20: 5 ω 3 between quartiles of blood serum MDA concentration. Q1 and Q2, $p=0.028$; Q2 and Q3, $p=0.046$. $N=79$.

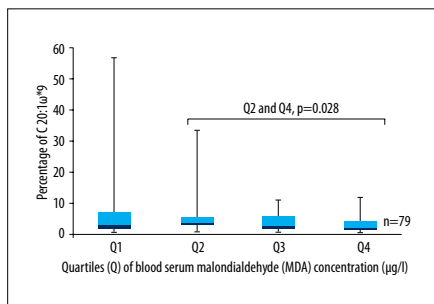


Figure 2. Box plots represent a comparison of the percentage of C 20: 1 ω 9 between quartiles of blood serum MDA concentration. Q2 and Q4, $p=0.028$. $N=79$. * Position of double bond between carbon atoms.

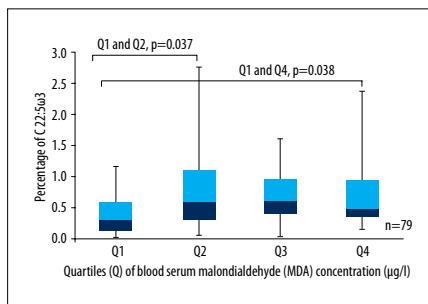


Figure 4. Box plots represent a comparison of the percentage of C 22: 5 ω 3 between quartiles of blood serum MDA concentration. Q1 and Q2, $p=0.037$; Q1 and Q4, $p=0.038$. $N=79$.

Results

According to our data, there was a tendency for a higher level of C 14: 0 to be found in the first quartile, which had a lower concentration of blood serum MDA than the third and fourth quartiles, where blood serum MDA concentration was higher (Q1 and Q3, $p=0.05$; Q1 and Q4, $p=0.089$) (Figure 1).

C 16: 0 made up the highest percentage of total FAs in the platelet phospholipid membrane (47%). The distribution of C 16: 0 was slightly higher in the first quartile of blood serum MDA concentration than in the second, third, and fourth quartiles. Although there was no statistically significant difference between Q1 and Q4 of C 16: 0 ($p=0.728$), it was observed that the highest percentage of C 16: 0 in the first quartile increases the total percentage of saturated fatty acids (SFAs).

Our results showed that the highest level of C 16: 1 ω 7 was found in the first quartile, which also had a lower blood serum MDA concentration than the third quartile ($p=0.021$). It was also noticed that the higher the level of C 18: 1 ω 7, the higher the concentration of blood serum MDA (Q1 and Q4, $p=0.070$).

The highest percentage of MUFAs in platelet phospholipid membrane consisted of C18: 1 ω 9 (46.5%), but the differences were not statistically significant. However, our data showed that significantly more C 20: 1 ω 9 was found in the second quartile than in the fourth quartile ($p=0.028$), where the concentration of blood serum MDA was the highest (Figure 2).

Assessing the total sums of ω 3 and ω 6 PUFAs separately, we observed that with the highest concentration of blood serum MDA (Q4), the total sums of ω 3 and ω 6 increase, and with the

lowest concentration of blood serum MDA (Q1), the total sums decrease ($\omega 3$ $p=0.184$, $\omega 6$ $p=0.813$). However, a statistically significant difference was found only between the amount of $\omega 3$ PUFAs ($p=0.024$) in the first and second quartiles.

Statistically significantly less C 20: 5 ω 3 was found in the first quartile, which had a lower blood serum MDA concentration than the second quartile ($p=0.028$), but statistically significantly more C 20: 5 ω 3 was observed in the second quartile than in the third quartile, where blood serum MDA concentration was higher ($p=0.046$) (Figure 3).

Statistically significantly less C 22: 5 ω 3 was observed in the first quartile, which had the lowest blood serum MDA concentration, than in the second ($p=0.037$) and fourth quartiles, which had higher levels of blood serum MDA concentration ($p=0.038$) (Figure 4).

Our study results also showed that at the highest concentration of blood serum MDA (Q4), the ratio of C 18: 2 ω 6/C 20: 4 ω 6 was statistically significantly lower than the lowest blood serum MDA concentration (Q1) ($p=0.038$) (Table 2).

Spearman's test showed a weak but statistically significant inverse correlation between C 14: 0 and blood serum MDA concentration ($r=-0.255$; $p=0.023$) and between the concentration of blood serum MDA and the ratio of C 18: 2 ω 6/C 20: 4 ω 6 ($r=-0.244$; $p=0.034$) (Table 3).

Comparing the composition of platelet membrane FAs with the percentage of PMA formation, it was observed that with the increase in the formation of aggregates, the total sums of MUFAs and PUFAs were higher separately and the total sum of SFAs was lower, but the differences were not statistically significant. However, the tendency was observed for an increased level of C 14: 0 and an increased ratio of C 18: 3 ω 3/C 20: 5 ω 3 in the first and the fourth quartiles of the formation of PMAs ($p=0.093$). The same tendency was observed in the comparison of the ratio of C 18: 3 ω 3/C 20: 5 ω 3 between the first and the third quartiles of the formation of PMAs ($p=0.055$) (Table 4). In terms of the mutual differences between the percentage of the formation of other PLAs (granulocytes and lymphocytes) and platelet membrane FA spectrum, the differences were not statistically significant.

Calculations demonstrated that the correlation between the platelet membrane FA spectrum and the percentage of the formation of PMAs had a weak but statistically significant inverse correlation between the percentage of the formation of PMAs and C 14: 0 ($r=-0.222$; $p=0.050$) (Table 3).

Discussion

According to our data, the highest percentage of FAs in the platelet phospholipid membrane consisted of SFA. Other authors have obtained very similar results [25–28]. Moreover, C16: 0 is reported to be the main FA of the platelet membrane [29], as was observed in our study. According to recent scientific studies, SFA higher levels were detected in those cell membranes that are closely related to signalling mechanisms. C 14: 0 and C 16: 0 can covalently modify proteins associated with signal transmission [30].

One of the MUFAs we analyzed, C 16: 1 ω 7, was at its highest level when blood serum MDA concentration was at the lowest. This was probably due to intensified C 16: 1 ω 7 synthesis from SFA C 16: 0 by stearyl-CoA desaturase – 1 during FA desaturation [31], and/or C16: 1 ω 7 was obtained from vegetable food and oils. Such a diet contains a number of antioxidants, e.g., fat-soluble vitamin E (tocopherol), leading to a higher level of C 16: 1 ω 7 at a lower concentration of blood serum MDA.

C 18: 1 ω 9 accounts for the highest percentage of FA compared to other MUFAs [25,26,28]. The same tendency was observed in our data. This increase in C 18: 1 ω 9 at the highest concentration of blood serum MDA can be interpreted as an intention to reduce blood serum MDA level or as compensation by using PUFA for active blood serum MDA synthesis. The absence of $\omega 3$ and $\omega 6$ PUFAs may intensify C 18: 1 ω 9 synthesis, as it is the precursor of other $\omega 9$ PUFAs required for cell membranes.

According to our data, statistically significantly less C 20: 5 ω 3 was found at the lowest level of blood serum MDA concentration, but statistically significantly more C 20: 5 ω 3 was observed when the concentration of blood serum MDA was at its higher level. This result shows that increased oxidation stimulates platelets to synthesize more PUFAs (e.g., C 20: 5 ω 3) and therefore increases the production of biologically active compounds and platelet activation. C 20: 5 ω 3 is associated with a lower incidence of major coronary events. This effect of C 20: 5 ω 3 in reducing the risk of cardiovascular diseases could be mediated by increased production of prostaglandin I₃ (PGI₃), inhibiting platelet aggregation; promoting vasodilatation, myocardial ischemic injury, and arteriosclerosis; and inducing neoangiogenesis. Furthermore, an increased level of PGI₃ decreases thromboxane A₂ (TXA₂) production, which is known to have the opposite effect on the cardiovascular system: TXA₂ causes platelet activation, coronary spasms, and vascular smooth muscle cell proliferation that can result in arteriosclerosis and, subsequently, cardiovascular events. [32]. C 20: 4 ω 6 and C 20: 5 ω 3 antagonize each other. C 20: 5 ω 3 competes with C 20: 4 ω 6 in the cyclooxygenase (COX) pathway, leading to the formation of eicosanoids that are less pro-thrombotic and inflammatory and may also directly inhibit platelet aggregation to a greater degree than the eicosanoids derived from C 20: 4 ω 6 [33–35].

Table 2. Comparison of the composition of platelet membrane FA between quartiles of blood serum MDA concentration.

FA [®] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum	Quartiles of MDA [®] concentration				P value
		Q1* (n=20)	Q2 [§] (n=20)	Q3 [¶] (n=20)	Q4 (n=19)	
C 14: 0\$§	Med.	3.93	3.30	2.81	2.81	* [§] p=0.529
	Min.	1.88	0.81	1.54	1.34	** [¶] p=0.005
	Max.	7.28	8.75	4.92	7.79	* p=0.089 [§] p=0.231 [¶] p=0.428 p=0.627
C 16: 0	Med.	48.99	45.39	48.49	43.81	* [§] p=0.718
	Min.	20.53	32.72	37.43	29.32	* [¶] p=0.659
	Max.	65.11	59.53	63.15	63.39	* p=0.728 [§] p=0.253 [¶] p=0.857 p=0.247
C 18: 0	Med.	20.73	19.97	22.00	18.45	* [§] p=0.925
	Min.	8.76	11.52	16.96	11.89	* [¶] p=0.231
	Max.	26.65	27.54	43.87	28.60	* p=0.792 [§] p=0.060 [¶] p=0.627 p=0.026
C 16: 1ω**7	Med.	1.63	1.37	1.12	1.59	* [§] p=0.327
	Min.	0.39	0.22	0.19	0.18	** [¶] p=0.021
	Max.	12.44	15.70	4.44	13.29	* p=0.444 [§] p=0.383 [¶] p=0.879 p=0.134
C 18: 1ω7	Med.	1.06	1.01	1.27	1.38	* [§] p=0.989
	Min.	0.15	0.13	0.20	0.19	* [¶] p=0.718
	Max.	4.09	2.30	2.64	6.90	* p=0.070 [§] p=0.904 [¶] p=0.158 p=0.247
C 18: 1ω9	Med.	7.31	5.69	6.79	9.79	* [§] p=0.841
	Min.	0.46	1.62	1.61	0.69	* [¶] p=0.968
	Max.	15.43	12.65	14.52	22.05	* p=0.283 [§] p=0.862 [¶] p=0.120 p=0.204
C 20: 1ω9	Med.	2.65	3.56	2.92	1.98	* [§] p=0.512
	Min.	0.58	0.72	0.56	0.36	* [¶] p=0.799
	Max.	56.77	33.26	10.90	11.72	* p=0.204 [§] p=0.277 [¶] p=0.028 p=0.224
C 18: 2ω6	Med.	5.08	4.33	6.19	6.75	* [§] p=0.738
	Min.	2.01	0.54	1.68	0.40	* [¶] p=0.862
	Max.	20.12	19.82	17.03	21.46	* p=0.901 [§] p=0.758 [¶] p=0.967 p=0.999

Table 2 continued. Comparison of the composition of platelet membrane FA between quartiles of blood serum MDA concentration.

FA [®] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum	Quartiles of MDA [®] concentration				P value
		Q1* (n=20)	Q2 [§] (n=20)	Q3 [¶] (n=20)	Q4 (n=19)	
C 18: 3ω3	Med.	1.10	1.96	1.58	1.82	* [§] p=0.369
	Min.	0.35	0.28	0.65	0.03	* [¶] p=0.289
	Max.	5.43	6.08	5.71	21.66	* p=0.569 [§] p=0.659 [¶] p=0.607 p=0.792
C 20: 4ω6	Med.	0.63	0.92	0.96	1.08	* [§] p=0.201
	Min.	0.09	0.21	0.02	0.07	* [¶] p=0.478
	Max.	7.84	8.31	5.84	9.01	* p=0.235 [§] p=0.620 [¶] p=0.923 p=0.569
C 20: 5ω3	Med.	0.30	0.78	0.34	0.46	* [§] p=0.028
	Min.	0.06	0.10	0.05	0.06	* [¶] p=0.698
	Max.	1.21	3.75	1.18	3.10	* p=0.141 [§] p=0.046 [¶] p=0.365 p=0.309
C 22: 5ω3	Med.	0.31	0.57	0.59	0.48	* [§] p=0.037
	Min.	0.02	0.05	0.02	0.15	* [¶] p=0.052
	Max.	1.15	2.76	1.61	2.37	* p=0.038 [§] p=0.820 [¶] p=0.923 p=0.923
C 22: 6ω3	Med.	0.37	0.97	0.68	0.70	* [§] p=0.265
	Min.	0.02	0.06	0.03	0.13	* [¶] p=0.602
	Max.	2.40	3.58	2.24	3.95	* p=0.141 [§] p=0.289 [¶] p=0.923 p=0.513
Total SFAs (C 14: 0+C 16: 0+C 18: 0)	Med.	73.42	68.98	74.56	65.95	* [§] p=0.820
	Min.	31.17	49.60	57.28	45.78	* [¶] p=0.529
	Max.	93.00	87.77	90.51	92.59	* p=0.607 [§] p=0.253 [¶] p=0.687 p=0.141
Total MUFAs	Med.	14.54	15.23	13.33	16.99	* [§] p=0.883
	Min.	3.69	5.15	5.04	5.05	* [¶] p=0.383
	Max.	62.80	36.57	22.50	32.99	* p=0.771 [§] p=0.341 [¶] p=0.687 p=0.158
Total PUFAs	Med.	9.80	13.89	11.15	13.09	* [§] p=0.314
	Min.	3.31	4.04	3.83	1.33	* [¶] p=0.314
	Max.	34.22	33.89	26.42	34.97	* p=0.336 [§] p=0.659 [¶] p=0.945 p=0.569

Table 2 continued. Comparison of the composition of platelet membrane FA between quartiles of blood serum MDA concentration.

FA [®] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum	Quartiles of MDA [®] concentration				P value
		Q1* (n=20)	Q2 [§] (n=20)	Q3 [¶] (n=20)	Q4 (n=19)	
Σ*** ω3	Med.	2.81	4.53	3.60	4.20	*,\$p=0.024
	Min.	0.59	0.79	1.99	0.84	*#p=0.201
	Max.	9.37	13.00	6.83	25.46	*#p=0.184 \$#p=0.076 %p=0.728 %p=0.687
Σ ω6	Med.	5.72	7.12	7.42	7.53	*\$p=0.565
	Min.	2.25	1.14	1.84	0.49	*#p=0.779
	Max.	27.96	28.13	21.70	28.28	*#p=0.813 \$#p=0.947 %p=0.901 %p=0.879
Ratio of ω3/ω6	Med.	0.43	0.67	0.53	0.45	*\$p=0.149
	Min.	0.08	0.18	0.17	0.18	*#p=0.301
	Max.	2.57	5.15	2.03	8.21	*#p=0.296 \$#p=0.547 %p=0.771 %p=0.945
Ratio of PUFAs/SFAs	Med.	0.15	0.19	0.15	0.20	*\$p=0.429
	Min.	0.04	0.06	0.04	0.01	*#p=0.820
	Max.	0.70	0.67	0.46	0.70	*#p=0.428 \$#p=0.547 %p=0.967 %p=0.444
Ratio of C 18: 2ω6/C 20: 4ω6	Med.	7.49	6.30	7.75	5.08	*\$p=0.091
	Min.	2.57	0.54	2.29	0.99	*#p=0.659
	Max.	26.78	14.48	118	43.57	*#p=0.038 \$#p=0.192 %p=0.749 %p=0.204
Ratio of C 18: 3ω3/C 20: 5ω3	Med.	4.20	1.62	4.46	3.15	*\$p=0.076
	Min.	1.20	0.26	0.83	0.04	*#p=0.659
	Max.	14.68	49.00	50.44	83.31	*#p=0.531 \$#p=0.108 %p=0.531 %p=0.296
Ratio of C 20: 4ω6/C 20: 5ω3	Med.	2.16	1.62	2.00	2.71	*\$p=0.583
	Min.	0.39	0.58	0.29	0.09	*#p=0.820
	Max.	8.50	7.23	17.70	13.50	*#p=0.728 \$#p=0.398 %p=0.247 %p=0.813

SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; [®] fatty acids;[®] malondialdehyde; * quartile 1 (Q1); [§] quartile 2 (Q2); [¶] quartile 3 (Q3); ^{||} quartile 4 (Q4); ^{§§} number of carbon atoms and double bonds; ** position of double bond between carbon atoms in the molecule; *** total sum.

Table 3. The correlation of platelet membrane FA spectrum with blood serum MDA concentration and percentage of PMA formation.

FAs [®] (provided by percentage of total amount)	Spearman's rho		P value	
	MDA [®] concentration	PMAs ^{**}	MDA concentration	PMAs
C 14: 0 [§]	-0.255	-0.222	0.023	0.050
Ratio of C 18: 2 ^{ω5/6} /C 20: 4 ^{ω6}	-0.244	-	0.034	-

[®] Fatty acids; ^{*} malondialdehyde; ^{**} platelet-monocyte aggregates; [§] number of carbon atoms and double bonds; ^{§§} position of double bond between carbon atoms in the molecule.

Table 4. Comparison of certain platelet membrane FAs between quartiles of PMA formation.

FAs [®] (provided by percentage of total amount)	Median, minimum, maximum	Quartiles of percentage of PMA ^{&} formation				P value
		Q1 [*] (n=20)	Q2 [§] (n=19)	Q3 [¶] (n=21)	Q4 [‡] (n=19)	
C 14: 0 ^{§§}	Med.	3.39	2.93	2.81	2.76	^{*§} p=0.204
	Min.	1.34	1.42	0.81	1.54	^{*‡} p=0.197
	Max.	7.79	6.48	7.70	8.75	^{§¶} p=0.936
Total SFAs (C 14: 0+C 16: 0+C 18: 0)	Med.	77.45	63.57	70.64	73.04	^{*§} p=0.194
	Min.	45.78	49.06	31.17	49.11	^{*‡} p=0.291
	Max.	87.77	93.00	92.59	92.46	^{§¶} p=0.696
Total MUFAs	Med.	13.33	16.91	15.40	15.16	^{*§} p=0.336
	Min.	5.15	3.69	5.04	5.05	^{*‡} p=0.449
	Max.	32.99	36.57	62.80	23.83	^{§¶} p=0.942
Total PUFAs	Med.	9.51	15.30	10.63	11.47	^{*§} p=0.283
	Min.	4.28	3.31	1.33	2.49	^{*‡} p=0.648
	Max.	24.84	34.97	33.89	34.22	^{§¶} p=0.633
Ratio of C 18: 3 ^{ω**3} /C 20: 5 ^{ω3}	Med.	2.21	3.91	4.06	4.16	^{*§} p=0.184
	Min.	0.04	0.26	0.67	1.04	^{*‡} p=0.055
	Max.	49.00	50.44	83.31	17.83	^{§¶} p=0.093
						^{§¶} p=0.294
						^{§¶} p=0.799
						^{‡¶} p=0.587

SFAs – saturated fatty acids; MUFAs – monounsaturated fatty acids; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; [®] fatty acids; [&] platelet-monocyte aggregates; ^{*} quartile 1 (Q1); [§] quartile 2 (Q2); [¶] quartile 3 (Q3); [‡] quartile 4 (Q4); ^{§§} number of carbon atoms and double bonds; ^{**} position of double bond between carbon atoms in the molecule.

Our data showed that the total sums of individual $\omega 3$ and $\omega 6$ were higher when blood serum MDA concentration was at the highest level, when the total sums of individual $\omega 3$ and $\omega 6$

were lower, and when blood serum MDA concentration was at the lowest level. However, a statistically significant difference was found only in the first and second quartiles of the

total sum of $\omega 3$ FA ($p=0.024$). Similar results were obtained by Li et al. [36]. The increased level of PUFAs, with a higher blood serum MDA concentration, could be explained as a platelet response to prepare for the future activation process. Therefore, the oxidation process and the increased blood serum MDA concentration are factors that stimulate platelets to synthesize more PUFAs (e.g., C 20: 4 ω 6, C 20: 5 ω 3, and C 22: 6 ω 3) from essential FAs: C 18: 2 ω 6 and C 18: 3 ω 3 by a series of desaturase and elongase enzymes, leading to intensified synthesis of biologically active compounds, e.g., pro- or anti-inflammatory eicosanoids and docosanooids.

According to our data, with the rise of blood serum MDA concentration, the level of C 22: 5 ω 3 increases in platelet phospholipid membranes. This result could be explained by intensified metabolism of FA, synthesizing more eicosanoic and docosanoic FA, which will be later used for platelet activation. The tendency of docosahexaenoic FA (C 22: 6 ω 3) distribution was similar to that of C 22: 5 ω 3, but there were no statistically significant differences. The experiment in which C 22: 6 ω 3 was incorporated into the platelet membrane and the blood serum MDA concentration was measured showed that when the platelet membrane contains more C 22: 6 ω 3, the concentration of blood serum MDA is higher. It was previously reported that a higher level of $\omega 3$ PUFA in platelet phospholipid membrane, particularly in C 22: 6 ω 3, could be related to lipid peroxidation [37]. Moreover, other researchers also studied the effect of C 22: 6 ω 3 on platelets. Dietary supplements with C 22: 6 ω 3 were given to healthy men. Then, the incorporation of C 22: 6 ω 3 into the platelet phospholipid membrane and platelet activity were monitored. The study results showed that a higher level of C 22: 6 ω 3 in the platelet membrane statistically significantly reduces platelet activity and induces an antioxidant effect, increasing platelet vitamin E concentration. Accordingly, it could be regarded as a protective factor against platelet-related cardiovascular events [38, 39]. Our study, which included only healthy individuals, did not show any significant oxidation effect. Only a study carried out with a markedly higher blood serum MDA concentration could confirm the significant effect of oxidation.

We also found that the ratio of C 18: 2 ω 6/C 20: 4 ω 6 at the highest blood serum MDA concentration was statistically significantly lower than it was at the lowest blood serum MDA concentration. According to this result, more intensive conversion of C 18: 2 ω 6 to C 20: 4 ω 6 occurs with a higher concentration of blood serum MDA. This conversion could be considered as the preparation of platelets for the synthesis of pro-inflammatory eicosanoids. Moreover, the thromboxanes that are produced activate platelets, allowing them to start the process of blood coagulation more quickly. C 20: 4 ω 6, incorporated in platelet membrane, is used for the synthesis of TXA₂, which is involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases in

that it promotes platelet aggregation and vasoconstriction, acting through specific receptors coupled with the G-protein Gq [40,41]. Therefore, a higher concentration of blood serum MDA could be a factor in the formation of a higher level of TXA₂.

In our study, an increased ratio of C 18: 3 ω 3/C 20: 5 ω 3 was noted when the lowest and the highest percentage of the formation of PMAs were compared. Since C 18: 3 ω 3 is not synthesized in the human body and is obtained only with food (vegetable oils), it reflects the diet of a particular person and eventually will be converted to C 20: 5 ω 3. An experimental study showed that when the platelet membrane is saturated with C 20: 5 ω 3, platelet procoagulative properties can be reduced. Moreover, C 20: 5 ω 3 in combination with C 22: 6 ω 3 has a protective effect against cardiovascular diseases, since anti-inflammatory biologically active compounds are synthesized from these FAs [42]. Consequently, $\omega 3$ PUFA can regulate processes associated with inflammation through multiple mechanisms: platelet activation and aggregation and vasoconstriction [43]. By changing C 20: 4 ω 6 as a substrate in the production of eicosanoids, $\omega 3$ PUFA can act directly, thereby inhibiting the metabolism of C 20: 4 ω 6, or indirectly through gene expression, activating peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) α and γ [44-46]. Furthermore, $\omega 3$ PUFAs inhibit the secretion of monocyte/macrophage inflammatory cytokines (interleukins, TNF) [47].

Our results show a statistically significant inverse correlation between C 14: 0 and blood serum MDA concentration. The same correlation was observed between the ratio of C 18: 2 ω 6/C 20: 4 ω 6 and the concentration of blood serum MDA. A statistically significant inverse correlation was also found between the percentage of the formation of PMAs and C 14: 0. Some researchers reported a direct correlation between MUFAs, PUFAs, and blood serum MDA concentration and an inverse correlation between SFAs and concentration of blood serum MDA. They also noticed that lipid peroxidation was much more intensive in healthy individuals. This data could be explained by an increased amount of PUFAs in the platelet phospholipid membrane [48]. Although we did not find a statistically significant correlation between blood serum MDA concentration and SFAs, MUFAs, and PUFAs in the platelet phospholipid membrane, we found that with a higher blood serum MDA concentration, the level of MUFA and PUFAs was slightly higher, while the level of SFAs was lower. Moreover, with a higher percentage of PMA formation, the level of SFAs was lower as well.

Conclusions

The results of our study in healthy men showed that increasing levels of blood serum MDA concentration and percentage of PMA formation are factors that stimulate the incorporation

of MUFA and PUFA into the platelet phospholipid membrane and may play a role in increasing the level of biologically active compounds (eicosanoids/docosanoids) required for further platelet activation. Though we hypothesize that the alteration of cell membrane composition caused by oxidative stress may modify platelet response to activation, further

human studies are needed to confirm the significant effect of oxidation on platelets.

Conflicts of interest

None.

References:

1. Yoshikawa T, Naito Y: What is oxidative stress? *JMAJ*, 2002; 45(7): 271–76
2. Ito K, Suda T: Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014; 15(4): 243–56
3. Violi F, Pignatelli P: Platelet oxidative stress and thrombosis. *Thromb Res*, 2012; 129(3): 378–81
4. Fuentes E, Palomo I: Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging. *Life Sci*, 2016; 148: 17–23
5. Vichova T, Motovska Z: Oxidative stress: Predictive marker for coronary artery disease. *Exp Clin Cardiol*, 2013; 18(2): e88–91
6. Gaschler MM, Stockwell BR: Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017; 482(3): 419–25
7. Grotto D, Maria LS, Valentini J et al: Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova*, 2009; 32: 169–74
8. 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; 15(2): 99–106
9. Garcia SC, Grotto D, Bulcão RP et al: Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug Chem Toxicol*, 2013; 36(3): 306–12
10. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V et al: Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, 2010; 44(10): 1125–71
11. Massey KA, Nicolaou A: Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med*, 2013; 59(100): 45–55
12. 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
13. Tsikas D: Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*, 2017; 524: 13–30
14. Tsikas D, Rothmann S, Schneider JY 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 F2α and nitric oxide (NO). *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2016; 1019: 95–111
15. Colksen Y, Muderrisoglu H: The role of mean platelet volume in predicting thrombotic events. *Clin Chem Lab Med*, 2012; 50(4): 631–34
16. Dolegowska B, Lubkowska A, De Girolamo L: Platelet lipidomic. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2012; 26(2 Suppl. 1): 235–335
17. Schmitz G, Ecker J: The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*, 2008; 47(2): 147–55
18. Ashman N, Macey MG, Fan SL et al: Increased platelet–monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18: 2088–96
19. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999; 340: 115–26
20. McEver RP: Adhesive interactions of leukocytes, platelets and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemostasis*, 2000; 86: 746–56
21. Fairweather DL: Sex differences in inflammation during atherosclerosis. *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, 2014; 8(Suppl. 3): 49–59
22. 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
23. Touchstone JC: Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl*, 1995; 671(1–2): 169–95
24. Khoschorur GA, Winkhofer-Roob BM, Rabl H et al: Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of Malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. *Chromatographia*, 2000; 52(3–4): 181–84
25. De Castro J, Hernández-Hernández A, Rodríguez MC et al: Comparison of changes in erythrocyte and platelet phospholipid and fatty acid composition and protein oxidation in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Platelets*, 2007; 18(1): 43–51
26. Lin S, Li T, Liu X et al: Abnormal octadeca-carbon fatty acids distribution in erythrocyte membrane phospholipids of patients with gastrointestinal tumor. *Medicine (Baltimore)*, 2017; 96(24): e7189
27. Vognild E, Elvevoll EO, Brox J et al: 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; 33(4): 427–36
28. Walker CG, West AL, Browning LM 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; 7(8): 6281–93
29. 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; 136(3): 565–69
30. Calder PC: Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2015; 39(1 Suppl.): 185–325
31. Cruz MM, Lopes AB, Crisma AR et al: Palmitoleic acid (16: 1n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes. *Lipids Health Dis*, 2018; 17: 55
32. Onishi H, Saito Y: Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces cardiovascular events: Relationship with the EPA/arachidonic acid ratio. *J Atheroscler Thromb*, 2013; 20: 861–77
33. Li D, Wahlqvist ML, Sinclair AJ: Advances in n-3 polyunsaturated fatty acids. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2019; 28(1): 1–5
34. Cottin SC, Alsaleh A, Sanders TAB, Hall WL: Lack of effect of supplementation with EPA or DHA on platelet-monocyte aggregates and vascular function in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2016; 26: 743–51
35. Lagarde M, Liu M, Véricel E et al: Docosahexaenoic acid, protectin synthesis: Relevance against atherothrombogenesis. *Poc Nutr Soc*, 2014; 73: 186–89
36. Li D, Turner A, Sinclair AJ: Relationship between platelet phospholipid FA and mean platelet volume in healthy men. *Lipids*, 2002; 37(9): 901–6
37. Véricel E, Polette A, Bacot S et al: Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J Thromb Haemost*, 2003; 1(3): 566–72
38. Véricel E, Colas R, Calzada C et al: Moderate oral supplementation with docosahexaenoic acid improves platelet function and oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Thromb Haemost*, 2015; 114(2): 289–96
39. Guillot N, Caillet E, Laville M et al: Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: Effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J*, 2009; 23(9): 2909–16
40. Guichardant M, Bernoud-Hubac N, Calzada C, Véricel E: Oxygenation of polyunsaturated fatty acids and oxidative stress within blood platelets. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018; 1863(6): 651–56
41. Chen H: Role of thromboxane A2 signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2018; 134: 32–37
42. Larson MK, Tormoen GW, Weaver LJ 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; 304(3): C273–79
43. Molfino A, Gioia G, Rossi Fanelli F, Muscaritoli M: The role for dietary omega-3 fatty acids supplementation in older adults. *Nutrients*, 2014; 6(10): 4058–73

44. Calder C: Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr*, 2012; 142(3): 592S-99S
45. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA et al: Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *PNAS*, 1997; 94(9): 4318-23
46. Calder PC: n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*, 2006; 83(6 Suppl.): 1505S-19S
47. Simopoulos AP: Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: Nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother*, 2006; 60(9): 502-7
48. Kivanová J, Beno I, Ondreicka R et al: Relation between fatty acid composition, vitamin E and malondialdehyde levels, and activity of antioxidant enzymes in the blood. *Bratisl Lek Listy*, 1998; 99: 245-49

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 20 egz.