

Laboratorinė medicina.
2021, t. 23, Nr. 2(88), p. 96–101.

DTL oksidacija ir jos ryšys su aterosklerozės rizikos žymenimis sveikų vyrų populiacijoje

Linus Černiauskas¹
Klaudija Meškėnaitė²
Neringa Burokienė³
Rėda Matuzevičienė^{1,2}
Asta Mažeikienė²
Zita Kučinskienė^{1,2}
Dovilė Karčiauskaitė^{1,2}

Santrauka

Įvadas. Didelio tankio lipoproteinai pasižymi antiaterogeninėmis bei antioksidacinėmis savybėmis, kurios padeda slopinti aterosklerozės vystymąsi bei apsaugo kitus lipoproteinus nuo oksidacinių pažeidimų. Pirminiai lipidų peroksidacijos produktai – hidroperoksidaai serume daugiausia susiję su didelio tankio lipoproteinų dalelėmis. Manoma, jog šios dalelės prisijungia hidroperoksidas iš kitų lipoproteinų dalelių ir taip jas apsaugo, kad nesikaupytų lipidų peroksidacijos produktai, kurie gali lemti šių dalelių oksidaciją ir paskatinti aterosklerozės vystymąsi.

Tiriamieji ir metodai. Tirti 43 sveiki vyrai, kuriems nustatyti antropometriniai rodikliai: KMI, liemens apimtis bei serumo lipidų apykaitos (B-Ch, DTL-Ch, MTL-Ch, TAG), uždegimo (dj-CRB), lipidų oksidacijos (hidroperoksidaai, MDA), antioksidantų (karotenoidai) rodikliai. Karotenoidai ir MDA ištirti efektyviosios skysčių chromatografijos metodu, o hidroperoksidaai – modifikuotu d-ROM testu Fe-ROM.

Rezultatai. Didžioji dalis (75,89 %) serumo hidroperoksidų yra susiję su DTL frakcija. Serumo hidroperoksidų koncentraciją ir DTL frakcijos hidroperoksidų koncentraciją sieja stiprus tiesioginis teigiamas ryšys ($r = 0,651$, $p = 0,001$). Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp bendrojo cholesterolio koncentracijų medianų ir likopeno koncentracijų medianų skirtingose DTL frakcijos hidroperoksidų koncentracijos grupėse ($p < 0,05$). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp amžiaus, KMI, liemens apimtys, TAG, MTL-Ch, DTL-Ch, dj-CRB, MDA bei karotenoidų koncentracijų skirtingose DTL frakcijos hidroperoksidų koncentracijos grupėse neaptikta ($p > 0,05$).

Išvados. DTL yra pagrindinė kraujo serumo lipoproteinų dalelė, su kuria susijusi didžioji dalis serumo hidroperoksidų. Nustatyti statistiškai reikšmingi serumo B-Ch ir karotenoido likopeno koncentracijų medianų skirtumai skirtingose hidroperoksidų koncentracijos grupėse.

Reikšminiai žodžiai: didelio tankio lipoproteinų oksidacija, aterosklerozė, hidroperoksidaai.

Oksidacinis stresas ir reaktyvūs deguonies bei azoto junginiai

Oksidacinį stresą organizme sukelia oksidatorių bei organizmo antioksidacinės gynybos sistemos disbalansas.

Vieni pagrindinių junginių, lemiančių oksidacinį stresą, yra reaktyvūs deguonies jginiai (angl. *reactive oxygen species*, ROS) bei reaktyvūs azoto junginiai (angl. *reactive nitrogen species*, RNS) [1]. Reaktyviems deguonies jginiams priskiriami: superoksido anijono ($O_2^{\cdot-}$), peroksi- ($ROO^{\cdot}$), hidrok-

¹Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras

Vilnius University Hospital Santaros Clinics, Center of Laboratory Medicine
El. paštas: linas.cerniauskas@santa.lt

²Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

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

³Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Klinikinės medicinos instituto Vidaus ligų, šeimos medicinos ir onkologijos klinika

Clinics of Internal Diseases, Family Medicine and Oncology, Faculty of Medicine, Vilnius University

si- (OH[•]), hidroperoksi- (HOO[•]) radikalai bei neradikaliniai dariniai – vandenilio peroksidas (H₂O₂), singuletinis deguonis (¹O₂), ozonas (O₃), hipochlorito rūgštis (HClO). Reaktyviems azoto junginiams priskiriami: azoto oksido (NO[•]), azoto dioksido (NOO[•]) radikalai bei neradiklinės molekulės – nitrito rūgštis (HNO₂), nitroksianijonas (NO[•]), peroksinitritas (ONOO[•]) [2, 3]. Normaliomis fiziologinėmis sąlygomis šie junginiai yra greitai inaktyvuojami organizmo antioksidacinės sistemos: antioksidacinių fermentų (katalazė, glutationo peroksidazė (GSHPx), superoksido dismutazė (SOD), glutaredoksinai (GTX)) bei antioksidantų (vitaminai C, E, karotenoidai, šlapimo rūgštis, ubichinonas (kofermentas Q10), redukuotas glutatonas (GSH), lipoinė rūgštis) [4]. Sutrikus šių junginių inaktyvacijos procesui, ROS bei RNS perteklius dalyvauja lipidų, nukleorūgščių bei baltymų oksidacijos procesuose [1, 5]. Žinoma, jog oksidacinio streso sukeltos biomolekulių pažeidos lemia širdies ir kraujagyslių ligų, aterosklerozės, cukrinio diabeto, lėtinės obstrukcinės plaučių ligos, lėtinio inkstų nepakankamumo, vėžio, neurologinių ligų vystymąsi bei organizmo senėjimo procesus [3, 5, 6]. Nepaisant turimų žinių apie oksidacinio streso ryšį su įvairiomis ligomis, šiuo metu nėra patikimų metodų tiesiogiai įvertinti ROS bei RNS dėl šių molekulių trumpo gyvavimo laiko ir mažos koncentracijos biologiniuose mėginiuose. Dėl šių priežasčių oksidaciniam stresui įvertinti taikomi ROS bei RNS oksidacijos reakcijų su kitomis molekulėmis produktai.

Oksidacinio streso žymuo – hidroperoksidai

Vienas pagrindinių reaktyvių deguonies bei azoto junginių taikinių yra lipidai, esantys įvairiose biologinėse membranose bei lipoproteinuose [1]. Hidroksilo radikalas (OH[•]) yra pats stipriausias, reaktyviausias ir svarbiausias ROS radikalas, dalyvaujantis lipidų peroksidacijos reakcijose [1, 3]. Biologinėse membranose ir lipoproteinuose esančios polinesočiosios riebalų rūgštys (PNRR) turi nesočiuosius dvigubus ryšius, kuriuos oksiduoja hidroksilo radikalas (OH[•]) ir vyksta lipidų peroksidacijos procesas. Ši procesą galima suskirstyti į tris reakcijų grupes: pradėties, sklaidimo ir baigties. Hidroperoksidai, kurie susidaro sklaidimo reakcijų metu, ir yra pagrindiniai pirminiai lipidų peroksidacijos produktai. Hidroperoksido grupė gali būti prijungta prie įvairių lipidų molekulių: riebalų rūgščių, trigliceridų,

fosfolipidų bei sterolių. Palyginti su laisvaisiais radikalais, lipidų hidroperoksidai yra stabilesni, todėl jų koncentracija gali būti nustatoma įvairiuose biologiniuose mėginiuose [7–10]. Šis pritaikymas ištirtas atliekant įvairius mokslinius bei klininius tyrimus: Arguelles su kolegomis nustatė, jog pelių kraujo serumo lipidų peroksidų koncentracijos koreliuoja su įvairių audinių lipidų hidroperoksidų koncentracijomis ($p < 0,005$) [8]; Baci ir bendraautorai, tyrinėdami pacientus, sergančius plaučių, krūties ir žarnyno vėžiu, nustatė, jog serumo lipidų hidroperoksidų koncentracijos statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp skirtingo tipo vėžio sergančių pacientų grupių ir buvo didžiausios plaučių vėžio grupėje ($p < 0,001$) [9]; Ramy su kolegomis, tirdami 90 sveikų ir asfiksiją patyrusių naujagimių kraujo serumą, nustatė, kad lipidų peroksidų koncentracija buvo didesnė asfiksiją patyrusių naujagimių grupėje ($p < 0,001$) [10]. Ito su kolegomis pritaikė diakrono reaktyvių deguonies metabolitų (d-ROM) testą kraujo plazmos hidroperoksidų koncentracijai įvertinti ir parodė, jog didžioji dalis plazmos hidroperoksidų yra susijusi su didelio tankio lipoproteinų dalelėmis. Dėl galimybės nustatyti hidroperoksides įvairiuose rutininuose klinikuose biologiniuose mėginiuose, manoma, kad hidroperoksidų koncentracija yra naudingas žymuo siekiant įvertinti oksidacinį stresą [2].

DTL oksidacija ir hidroperoksidai

DTL dalelės yra pagrindinės antiaterogeninės lipoproteinų dalelės žmogaus kraujyje dėl jų vykdomos atvirkštinės cholesterolio pernašos. Šios pernašos metu perteklinis cholesterolis iš periferinių audinių ląstelių yra pasisavinamas DTL dalelių ir pernešamas į kepenis, kur metabolizuojamas. Tokiu būdu DTL dalelės apsaugo nuo perteklinio cholesterolio kaupimosi arterijų sienelėje, kuris lemia aterosklerozės patogenezę [11]. DTL dalelėms taip pat būdingos antioksidacinės bei endotelio apsauginės funkcijos, kurios yra svarbios endotelio ląstelių barjero integralumui bei apsaugant kitus lipoproteinus nuo oksidacijos [12–14]. Kaip jau minėta, Ito su kolegomis, tyrinėdami lipidų hidroperoksidų pasiskirstymą kraujo plazmos frakcijose, nustatė, jog didžioji dalis lipidų hidroperoksidų yra susijusi su DTL dalelėmis [2]. Panašias išvadas, analizuojami ankstesnių tyrimų duomenis ir tyrinėdami lipidų peroksidų pasiskirstymą kraujo plazmoje, pada-

rė ir Bowry su kolegomis [15]. Manoma, jog iš DTL iš MTL dalelių tiesiogiai arba dėl CEPB (cholesterolio esterius nešančio baltymo) aktyvumo yra pernešami lipidų hidroperoksidai, o DTL dalelės veikia tarsi kempinė, kuri sugeria oksiduotus lipidus iš MTL [16]. Dalis susikaupusių lipidų hidroperoksidų DTL dalelėse yra redukuojami dėl ApoA-I redukciskai aktyvių Met^{122,148} liekanų. Tokiu būdu lipidų hidroperoksidai yra paverčiami neaktyviais lipidų hidroksidais [12, 13]. Besikaupiant lipidų hidroperoksidsams DTL dalelėse bei vykstant DTL dalelių oksidacijai gali būti sutrikdomos šių dalelių funkcijos. ApoA-I yra pagrindinis DTL dalelėse esantis apoproteinas, kuris dalyvauja ląstelinės cholesterolio pernašos į DTL daleles procese bei pasižymi antioksidacinėmis savybėmis [11–13]. Nustatyta, kad ApoA-I molekulių ir antrinio lipidų oksidacijos produkto malono dialdehido (MDA) aduktai slopina ląstelinės cholesterolio išnašos procesą [17]. ApoA-I dalyvaujant oksidacijos-redukcijos reakcijose, jo Met grupės oksiduojamos ir susidaro redukciskai neaktyvūs metionino sulfoksidas ir metionino sulfonas [18]. Todėl gali būti sutrikdoma antiaterogeninė bei antioksidacinė DTL dalelių funkcijos. Tikėtina, jog didesnis lipidų hidroperoksidų kiekis DTL dalelėse gali lemti šių dalelių disfunkciją ir padidinti aterosklerozės riziką.

TIRIAMIEJI IR METODAI

Tiriamoji imtis

Tiriamųjų imtį sudarė sveiki, ūminėmis ir lėtinėmis ligomis nesergantys vyrai ($n=43$, vidutinis amžius $41,7 \pm 7,2$ metų). Visi tyrimo dalyviai buvo supažindinti su tyrimu ir užpildė informuoto asmens sutikimo formą. Tiriamiesiems asmenims buvo išmatuoti ūgio, svorio, liemens apimtys rodikliai. Buvo paimti veninio kraujo ėminiai – 3,5 ml kraujo paimta į mėgintuvėlį su serumo skiriamuoju geliu. Mėgintuvėliuose esančiam kraujui sukrešėjus, ėminiai nucentrifuguoti 3000 g 10 min. ir atsiskyręs kraujo serumas iškart naudojamas lipidų apykaitos rodikliams bei CRB nustatyti, o kitiems tyrimams dalis serumo užšaldyta –80 °C.

Lipidų apykaitos rodiklių bei CRB nustatymas

Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro klinikinės biochemijos labora-

torijoje (VUL SK LMC KBL) tiriamiesiems buvo atlikti lipidų apykaitos rodiklių tyrimai. Bendrojo cholesterolio (B-Ch), trigliceridų (TAG), MTL cholesterolio (MTL-Ch), DTL cholesterolio (DTL-Ch) koncentracijos buvo nustatytos imunocheminiais metodais, C reaktyviojo baltymo (CRB) koncentracijos – imunoturbidimetrijos metodu. Tyrimai atlikti analizatoriumi „Architect c8000“ (Abbot, JAV), naudojant to paties gamintojo reagentus.

Lipidų peroksidų nustatymas serume bei DTL frakcijoje

Hidroperoksidų koncentracijos nustatymo tyrimai atlikti mokslinėje Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros laboratorijoje. Visi reagentai išgityti iš „Sigma-Aldrich“, JAV.

Serumas atšildytas kambario temperatūroje. DTL frakcija atskirta cheminio nusodinimo būdu pašalinant ApoB turinčius lipoproteinus – kraujo serumas sumaišomas su 20 % polietilenglikolio (PEG) vandeninio tirpalo santykiu (2,5 : 1), inkubuojama kambario temperatūroje 20 min. ir centrifuguojama 30 min. 4 C 10000 aps/min. Tyrimui naudojamas nusiurbtas supernatantas.

Hidroperoksidų koncentracijai kraujo serume bei DTL frakcijoje nustatyti naudotas modifikuotas diakrono reaktyvių deguonies metabolitų (d-ROM) testas pagal Ito ir bendraautorų publikuotą metodiką [2]. Trumpai: 186 l 0,1M acetato buferio (pH 4,8), kurio sudėtyje yra 100 M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, inkubuojama 96-ių šulinėlių plokštelėje 37 C. 10 l 100 mM N,N'-dietil-p-fenilendiamino ir 4 l serumo įpilama į šulinėlius. Chromogeninio reakcijos produkto sugertis 505 nm bangos ilgyje yra matuojama spektrofotometru MULTISKAN SKY (Thermo Fisher Scientific, JAV) 3 minutes, praėjus 2 min. nuo serumo įpylimo. Neigiama kontrolė – 186 l 0,1M acetato buferio su 100 M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, 10 l 100 mM N,N'-dietil-p-fenilendiamino, 4 l vandens. Rezultatai yra išreiškiami kaip milioptinio tankio pokytis (mOT/min) per 3 min., praėjus 2 min. po serumo įpylimo į mišinį. Rezultatai apdorojami programa MsExcel (Microsoft, JAV) ir perskaičiuojami į M tert-butilo peroksido pagal kalibracinės kreivės rezultatus, kai 1 mOT/min atitinka 285,50 M tert-butilo peroksido. Visi matavimai kartoti tris kartus,

1 lentelė. **Hidroperoksidų koncentracija serume bei DTL frakcijoje. Duomenys pateikiami medianomis ir tarpkvartiliniais dydžiais (IQR).**

Table 1. **Hydroperoxide concentrations in serum and HDL fraction. Data is given as medians and interquartile range (IQR).**

Analitė	Serumas	DTL frakcija	P
Hidroperoksidų koncentracija (M tert-butilo peroksido)	73,54 (20,61)	55,81 (9,66)	p < 0,05

duomenų analizei naudotas matavimų vidurkis.

Malono dialdehido bei karotenoidų koncentracijos nustatymas

Malono dialdehido ir karotenoidų koncentracijos nustatymo tyrimai atlikti mokslinėje Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros laboratorijoje. Visi reagentai išgityti iš „Sigma-Aldrich“, JAV.

Serumas atšildytas kambario temperatūroje. Malono dialdehido (MDA) ir karotenoidų (zeaksantino, kantaksantino, -kantaksantino, -karoteno, -karoteno, likopeno ir bendra karotenoidų koncentracija) koncentracijos buvo nustatytos efektyviosios skysčių chromatografijos metodais.

Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta duomenų analizės programa SPSS 25.0 (IBM, JAV). Rezultatai pateikiami kaip me-

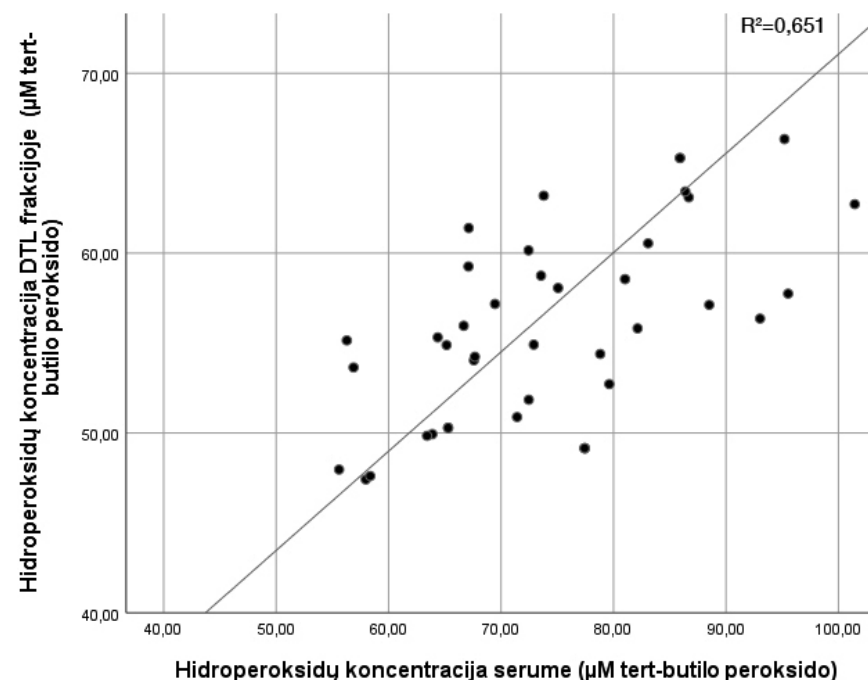
dianos ir tarpkvartilinis dydis, jei nurodyta kitaip. Dviem grupėms palyginti naudojamas neparametrinis Mann ir Vitnio (*Mann-Whitney*) U kriterijus, trims ar daugiau grupių palyginti – neparametrinis Kruskalo ir Voliso (*Kruskal-Wallis*) kriterijus. Spirmano (*Spearman*) koreliacijos koeficientas naudotas siekiant įvertinti ryšius tarp tiriamųjų analizių. Taikytas pasiklivimo lygmuo p = 0,05.

REZULTATAI

Hidroperoksidų koncentracija serume bei DTL frakcijoje

Hidroperoksidų koncentracijos kraujo serume ir DTL frakcijoje statistiškai reikšmingai skyrėsi ir didesnė koncentracija buvo kraujo serumo mėginiuose (1 lentelė). Taip pat nustatyta, kad didžioji dalis serumo organinių peroksidų – 75,89 % – yra DTL frakcijoje.

Hidroperoksidų koncentracijoms serume ir DTL frakcijoje būdingas statistiškai reikšmingas stiprus ryšys (r = 0,651, p = 0,001) (žr. pav.).



Pav. **Hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje priklausomybės nuo hidroperoksidų koncentracijos serume grafikas**

Fig. **Hydroperoxide concentration in HDL fraction and hydroperoxide concentration in serum scatterplot graph**

2 lentelė. Tiriamųjų klinikinių, lipidų apykaitos bei uždegimo rodiklių duomenų pasiskirstymas pagal hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje tertilių grupes. Duomenys pateikiami vidurkiais ir standartiniais nuokrypiais ($\pm$ SD) arba medianomis ir tarpkvartiliniais dydžiais (IQR).

Table 2. Distribution of patients' clinical, lipid and inflammation marker data among hydroperoxide concentration in HDL fraction tertile groups. Data is presented as means and standard deviations ($\pm$ SD) or medians and interquartile range (IQR).

Kintamasis	Hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje grupės			P
	1 tertilis (47,42 – 53,90] (μ M tert-butilo peroksido), n = 14)	2 tertilis (53,90 – 58,62] (μ M tert-butilo peroksido), n = 15)	3 tertilis (58,62 – 98,28] (μ M tert-butilo peroksido), n = 14)	
Amžius (m.) (vidurkis)	37,86 ($\pm$ 7,9)	43,6 ($\pm$ 5,8)	43,5 ($\pm$ 6,7)	NR
KMI (kg/m ²) (mediana)	25,1 (9,09)	26,5 (4,47)	28,1 (7,34)	NR
Liemens apimtis (cm) (mediana)	86,5 (19)	89 (18)	93 (21)	NR
TAG (mmol/l) (mediana)	0,98 (1,27)	1,56 (0,74)	1,76 (1,53)	NR
B-Ch (mmol/l) (mediana)	4,65 (0,84)	5,58 (1,59)	5,59 (1,24)	p = 0,018
MTL-Ch (mmol/l) (mediana)	2,98 (0,68)	3,70 (1,45)	3,48 (1,31)	NR
DTL-Ch (mmol/l) (mediana)	1,09 (0,53)	1,19 (0,42)	1,25 (0,30)	NR
dj-CRB (mg/l) (mediana)	0,38 (1,15)	0,92 (1,58)	0,93 (0,93)	NR

NR – statistiškai nereikšminga, KMI – kūno masės indeksas, TAG – trigliceridai, B-Ch – bendrasis cholesterolis, MTL-Ch – mažo tankio lipoproteinų cholesterolis, DTL-Ch – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis, dj-CRB – didelio jautrumo C reaktyvusis baltymas.

NR – statistically insignificant, KMI – body mass index, TAG – triglycerides, B-Ch – total cholesterol, MTL-Ch – low-density lipoprotein cholesterol, DTL-Ch – high-density lipoprotein cholesterol, dj-CRB – high-sensitivity C-reactive protein.

Hidroperoksidų koncentracija DTL frakcijoje ir klinikiniai, lipidų apykaitos bei uždegimo rodikliai

Pagal hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje tertilių grupes tiriamieji suskirstyti į tris grupes. Šių grupių pacientų klinikiniai, lipidų apykaitos bei uždegimo rodiklių duomenys pateikiami 2 lentelėje.

Pastebėti statistiškai reikšmingi bendrojo cholesterolio medianų skirtumai tarp DTL frakcijos hidroperoksidų tertilių grupių. Atikus papildomą analizę nustatyta, kad bendrojo cholesterolio koncentracija statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp 1 ir 2

(4,65 mmol/l vs. 5,58 mmol/l, p = 0,033) bei 1 ir 3 (4,65 mmol/l vs. 5,59 mmol/l, p = 0,005) DTL frakcijos hidroperoksidų tertilių grupių. Taip pat nustatytas vidutinio stiprumo statistiškai reikšmingas tiesioginis ryšys tarp bendrojo cholesterolio koncentracijos ir hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje (r = 0,651, p = 0,021). Nors statistiškai reikšmingų skirtumų tarp kitų analizių koncentracijų medianų skirtingose DTL frakcijos hidroperoksidų tertilių grupėse nebuvo, tačiau matoma tendencija KMI, liemens apimtys, TAG, DTL-Ch, dj-CRB medianoms didėti didėjant DTL frakcijos hidroperoksidų tertilių grupių numeriui, t. y. ir didėjant hidroperoksidų koncentracijai grupėje.

Hidroperoksidų koncentracija DTL frakcijoje ir karotenoidų bei MDA koncentracija

Tiriamieji pagal hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje tertilių grupes suskirstyti į tris grupes. Šių grupių klinikiniai, lipidų apykaitos bei uždegimo rodiklių duomenys pateikiami 3 lentelėje.

Nustatyti statistiškai reikšmingi likopeno koncentracijų medianų skirtumai tarp DTL frakcijos hidroperoksidų tertilių grupių. Ištyrus skirtumus tarp šios analizės medianų grupių, nustatyta, kad koncentracijų medianos statistiškai reikšmingai skiriasi tarp 1 ir 2 (0,61 mol/l vs. 0,31 mol/l,

3 lentelė. Tiriamųjų karotenoidų bei malono dialdehido duomenų pasiskirstymas pagal hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje tertilių grupes. Duomenys pateikiami medianomis ir tarpkvartiliniais dydžiais (IQR).

Table 3. Distribution of patients' carotenoid and malondialdehyde concentration medians among hydroperoxide concentration in HDL fraction tertile groups. Data is presented as medians and interquartile range (IQR).

Kintamasis	Hidroperoksidų koncentracijos DTL frakcijoje grupės			P
	1 tertilis (47,42 – 53,90] (μ M tert-butilo peroksido), n = 14)	2 tertilis (53,90 – 58,62] (μ M tert-butilo peroksido), n = 15)	3 tertilis (58,62 – 98,28] (μ M tert-butilo peroksido), n = 14)	
Zeaksantinas (mol/l)	0,01 (0,01)	0,01 (0,02)	0,01 (0,01)	NR
Kantaksantinas (mol/l)	0,07 (0,08)	0,32 (0,06)	0,18 (0,73)	NR
-kriptoksantinas (mol/l)	0,08 (0,08)	0,06 (0,09)	0,08 (0,10)	NR
-karotenas (mol/l)	0,30 (0,32)	0,16 (0,19)	0,21 (0,17)	NR
-karotenas (mol/l)	0,81 (0,69)	0,51 (0,46)	0,65 (0,18)	NR
Likopenas (mol/l)	0,61 (0,26)	0,31 (0,21)	0,66 (0,43)	p = 0,001
Bendra karotenoidų koncentracija (mol/l)	2,19 (1,43)	1,37 (1,21)	1,69 (1,23)	NR
MDA (mol/l)	79,11 (26,81)	111,43 (49,47)	92,26 (65,41)	NR

NR – statistiškai nereikšminga, MDA – malono dialdehidas.

NR – statistically insignificant, MDA – malondialdehyde.

$p = 0,001$) bei 2 ir 3 ($0,31 \text{ mol/l}$ vs. $0,65 \text{ mol/l}$, $p = 0,004$) DTL frakcijos hidroperoksidų tertilių grupių. Nors statistikai reikšmingų skirtumų tarp MDA koncentracijos medianų skirtingose DTL frakcijos hidroperoksidų tertilių grupėse nenustatyta, tačiau pastebima, kad didžiausia MDA koncentracijos mediana būdinga 2 tertilio DTL frakcijos hidroperoksidų grupei.

REZULTATŲ APITARIMAS IR DISKUSIJA

Tyrimo metu nustatyta, kad didžioji dalis serumo hidroperoksidų susitelkę DTL frakcijoje, nes 75,89 % serumo hidroperoksidų kiekio nustatyta atskirtoje DTL frakcijoje. Panašius rezultatus gavo ir Ito su kolegomis, kurie atlikę tyrimą nustatė, kad 104 % serumo hidroperoksidų susikaupę DTL frakcijoje. Rezultatų skirtumą būtų galima paaiškinti skirtingais DTL dalelių atskyrimo metodais – mūsų tyrime naudotas cheminis nusodinimo metodas, o Ito ir kolegų – efektyvioji skysčių chromatografija [2]. Dėl prastesnio cheminio nusodinimo metodo efektyvumo gautos hidroperoksidų reikšmės yra mažesnės, nes dalis hidroperoksidų galėjo būti nusodinta iš serumo, veikiamo polietilenglikoliu. Ito ir bendraautoriai nustatė stiprų tiesioginį ryšį tarp serumo ir DTL frakcijos hidroperoksidų koncentracijų ($r = 0,981$, $p = 0,001$) [2]. Šie duomenys taip pat sutampa su mūsų tyrimo duomenimis: nustatytas statistiškai reikšmingas stiprus tiesioginis ryšys tarp serumo hidroperoksidų ir DTL frakcijos hidroperoksidų koncentracijos ($r = 0,651$, $p = 0,001$). Remiantis šiais rezultatais galima daryti išvadą, jog didžioji dalis serume esančių hidroperoksidų yra pernešami DTL dalelių, kurios, greičiausiai, yra šių peroksidų kaupimo vieta. Šią prielaidą sustiprina ir žinios apie CEPB biologinį aktyvumą, dėl kurio vyksta dvipusiai cholesterolio esterių bei trigliceridų, kuriuose gali būti oksiduotų riebalų rūgščių liekanų, mainai tarp DTL ir kitų lipoproteinų dalelių.

Kadangi tyrime naudotas Fe-ROM testas yra d-ROM testo modifikacija, todėl tikslinga mūsų rezultatus lyginti su d-ROM testo rezultatais dėl metodikų panašumo. Vyresnis amžius yra nepriklausomas aterosklerozės rizikos veiksnys. Tyrimo metu nebuvo pastebėta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp amžiaus vidurkių skirtingose DTL frakcijos hidroperoksidų

tertilių grupėse ($p < 0,05$). Brunelli ir kolegos bei Fukui ir bendraautoriai, nagrinėję ryšį tarp amžiaus grupių ir d-ROM testo rezultatų, nenustatė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp amžiaus grupių ir d-ROM testo rezultatų [19, 20]. Literatūroje taip pat aptinkama KMI ir hidroperoksidų sąsają duomenų, kurie atitinka mūsų gautus rezultatus, o duomenų apie liemens apimties ir hidroperoksidų sąsąją nepavyko aptikti. Kogawa ir kolegos, tyrę paauglių KMI ir hidroperoksidų sąsąją, nenustatė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp hidroperoksidų koncentracijų, suskirstę paauglius pagal KMI grupes [21]. Ištyrę 1 992 sveikus asmenis, Sugiura su kolegomis nenustatė statistiškai reikšmingo ryšio tarp d-ROM testo reikšmių ir KMI [22]. Sąsąją tarp hidroperoksidų koncentracijos serume ir KMI nebuvimą galima paaiškinti tuo, jog hidroperoksidų koncentracija greičiausiai priklauso nuo organizmo antioksidacinės sistemos pajėgumo, kuris normalaus svorio bei antsvorio turinčių žmonių gali būti vienodas. Literatūroje nėra aprašyta daug tyrimų, kuriuose gilintasi į hidroperoksidų bei lipidų apykaitos rodiklių sąsąją. Fukui su kolegomis, tyrę d-ROM testo rezultatų sąsąją su DTL-Ch, MTL-Ch ir TAG koncentracijomis, bei Masaki su bendraautoriais, analizavę d-ROM testo rezultatų sąsąją su DTL-Ch bei MTL-Ch, statistiškai reikšmingų ryšių nenustatė [20, 23]. Šių tyrimų rezultatai sutampa su mūsų gautaisiais. Lipidų apykaitos rodiklių sąsąją su hidroperoksidų koncentracija nebuvimą gali lemti tai, jog pagrindiniai lipidų apykaitos rodikliai yra pagrįsti cholesterolio bei trigliceridų matavimu, o hidroperoksida daugiausia susidaro iš laisvų riebalų rūgščių lipidų peroksidacijos metu. Ateityje tyrėjams derėtų nagrinėti sąsąją tarp serume ar DTL sudėtyje esančių riebalų rūgščių kiekio bei sudėties ir hidroperoksidų koncentracijos. Lėtinis uždegimas gali skatinti aterosklerozės vystymąsi, o oksiduoti lipidai bei lipoproteinai yra vieni pagrindinių aterosklerozę lemiančių veiksnių [20]. Atlikta tyrimų, kuriuose buvo įvertintos uždegimo žymens CRB ir hidroperoksidų koncentracijos sąsąjos: Fukui su kolegomis nustatė statistiškai reikšmingą silpną tiesioginį ryšį tarp dj-CRB ir d-ROM testo rezultatų ($r = 0,194$, $p < 0,001$) [20]. Masaki ir bendraautoriai nustatė statistiškai reikšmingą stiprų ryšį tarp dj-CRB ir hidroperoksidų koncentracijų ($r = 0,604$, $p < 0,001$) [23]. Mūsų tyrimo bei literatūroje aptinkamų rezultatų nesutapimą gali lemti maža

mūsų tyrimo imtis, nors ir pastebėjome tendenciją didėti dj-CRB koncentracijų medianoms, didėjant hidroperoksidų koncentracijai serume. Norint patikimiau įvertinti dj-CRB ir hidroperoksidų sąsąją, rekomenduojama naudoti didesnę tiriamųjų skaičių. Nors MDA yra galutinis lipidų peroksidacijos produktas ir susidaro vykstant lipidų hidroperoksidų persitvarkymo reakcijoms, šio tyrimo metu nenustatyta sąsąją tarp šių dviejų rodiklių. Tokie rezultatai tikėtini, nes tiriamoji imtis buvo sveiki vyrai ir tikėtina, kad jų organizmo antioksidacinė gynybinė sistema efektyviai neutralizuoja minėtus junginius, todėl realaus ryšio tarp šių dviejų analizių įvertinti nepavyko. Taip pat literatūroje nepavyko aptikti kitų tyrėjų publikuotų duomenų apie šių rodiklių ryšį. Antioksidantai slopina lipidų oksidaciją ir didesnis jų kiekis organizme slopina aterosklerozės vystymąsi [24, 25]. Karotenoidai yra lipiduose tirpūs antioksidantai, kurie į žmogaus organizmą patenka su maistu. Dėl tirpumo riebaluose jie geba apsaugoti lipidus nuo lipidų peroksidacijos [26]. Nors mūsų tyrime pastebėta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp karotenoido likopeno koncentracijos medianų skirtingose hidroperoksidų koncentracijos grupėse, tačiau ne visiems tiriamiesiems buvo nustatytos karotenoidų koncentracijos, dėl to sumažėjus tiriamųjų skaičiui grupėse tyrimo rezultatus vertinti sunku. Vertinti sunku ir dėl to, kad literatūroje stinga analogiškų tyrimų. Rekomenduojama ieškoti karotenoidų ir hidroperoksidų sąsąją tiriant didesnes imtis.

IŠVADOS

Didžioji dalis (75,89 %) serumo hidroperoksidų yra susijusi su DTL frakcija. Serumo hidroperoksidų koncentraciją ir DTL frakcijos hidroperoksidų koncentraciją sieja stiprus tiesioginis teigiamas ryšys ($r = 0,651$, $p = 0,001$). Nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp bendrojo cholesterolio koncentracijų medianų ir likopeno koncentracijų medianų skirtingose DTL frakcijos hidroperoksidų koncentracijos grupėse. Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp amžiaus, KMI, liemens apimties, TAG, MTL-Ch, DTL-Ch, dj-CRB, MDA bei karotenoidų koncentracijų skirtingose DTL frakcijos hidroperoksidų koncentracijos grupėse neaptikta. ♦

Gauta: 2021 05 20
Priimta spaudai: 2021 06 29

Summary

HDL OXIDATION AND ITS RELATION TO ATHEROSCLEROSIS RISK MARKERS IN HEALTHY MEN

Linās Černiauskas, Klaudija Meškėnaitė, Neringa Burokienė, Rėda Matuzevičienė, Asta Mažeikienė, Žita Kučinskienė, Dovilė Karčiauskaitė

Introduction. High-density lipoproteins have antiatherogenic, antioxidant properties which help to attenuate the development of atherosclerosis. Hydroperoxides are mainly associated with HDL particles in serum. Currently, it is hypothesized that HDLs may accumulate hydroperoxide molecules by absorbing them from other lipoproteins. Because of this removal of excess hydroperoxide molecules other lipoproteins are protected from the accumulation of lipid peroxidation products which may prevent further oxidation and progression of atherosclerosis.

Materials and methods. 43 healthy men were included into the study. The

anthropometric measurements of waist circumference, BMI and blood serum lipid (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides), inflammation (hs-CRP), lipid oxidation (hydroperoxides, MDA) and antioxidant (carotenoid) markers were evaluated. Carotenoid and MDA concentrations were evaluated by liquid chromatography and hydroperoxides were measured using modified d-ROM test – Fe-ROM.

Results. The majority (75.89%) of serum hydroperoxides are associated with the HDL fraction. There was a strong positive correlation between serum hydroperoxide and HDL fraction hydroperoxide

concentrations ($r=0.651$, $p=0.001$). There were statistically significant differences between serum concentrations of total cholesterol and lycopene medians among different HDL fraction hydroperoxide concentration groups ($p<0.05$). There were no statistically significant differences found between age, waist circumference, BMI, serum concentrations of HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, malondialdehyde and carotenoids among different HDL fraction hydroperoxide concentration groups ($p>0.05$).

Conclusions. High-density lipoproteins are associated with the majority of serum hydroperoxides. There were statistically significant differences between serum concentration of total cholesterol and carotenoid lycopene medians among different hydroperoxide concentration groups.

Keywords: high-density lipoproteins, atherosclerosis, hydroperoxides.

LITERATŪRA

- Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants (Basel)* 2019; 8(3): 72.
- Ito F, Ito T, Suzuki C, Yahata T, Ikeda K, Hamaoka K. The application of a modified d-ROMs test for measurement of oxidative stress and oxidized high-density lipoprotein. *Int J Mol Sci* 2017; 18(2): 454.
- Kadziauskas J. *Biochemijos pagrindai*. Vilnius: Vilniaus universitetas, 2012; p. 446–51.
- D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, et al. The role of oxidative stress in cardiac disease: from physiological response to injury factor. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 5732956.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 757–72.
- Siti H, Kamisah Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol* 2015; 71: 40–56.
- 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.
- Argüelles S, Garcia S, Maldonado M, Machado A, Ayala A. Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2004; 1674(3): 251–59.
- Balci H, Genc H, Papila C, Can G, Papila B, Yanardag H, et al. Serum lipid hydroperoxide levels and paraoxonase activity in patients with lung, breast, and colorectal cancer. *J Clin Lab Anal* 2012; 26(3): 155–60.
- Ramy N, Al Sharany W, Mohamed M, Madani H, Saleh E, Aly H. Lipid peroxides in the serum of asphyxiated neonates. *J Perinatol* 2016; 36(10): 849–52.
- Wang H, Garruti G, Liu M, Portincasa P, Wang D. Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: recent advances in reverse cholesterol transport. *Ann Hepatol* 2017; 16: 27–42.
- Kontush A, Chapman M. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21(4): 312–8.
- Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin* 2017; 8: 66–77.
- Christoffersen C, Nielsen L. Apolipoprotein M. *Curr Opin Lipidol* 2013; 24(4): 295–300.
- Bowry V, Stanley K, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89(21): 10316–20.
- Shao B, Heinecke J. HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50(4): 599–601.
- Shao B, Pennathur S, Pagani I, Oda M, Witztum J, Oram J, et al. Modifying apolipoprotein A-I by malondialdehyde, but not by an array of other reactive carbonyls, blocks cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. *J Biol Chem* 2010; 285(24): 18473–84.
- Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen Y-R, et al. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system. *Circ Res* 2016; 119(5): e39–75.
- Brunelli E, La Russa D, Pellegrino D. Impaired oxidative status is strongly associated with cardiovascular risk factors. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 1–11.
- Fukui T, Yamauchi K, Maruyama M, Yasuda T, Kohno M, Abe Y. Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. *Hypertens Res* 2011; 34(9): 1041–5.
- Kogawa T, Kashiwakura I. Relationship between obesity and serum reactive oxygen metabolites in adolescents. *Environ Health Prev Med* 2013; 18(6): 451–7.
- Sugiura T, Dohi Y, Takase H, Yamashita S, Tanaka S, Kimura G. Increased reactive oxygen metabolites is associated with cardiovascular risk factors and vascular endothelial damage in middle-aged Japanese subjects. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 475–82.
- Masaki N, Sato A, Horii S, Kimura T, Toya T, Yasuda R, et al. Usefulness of the d-ROMs test for prediction of cardiovascular events. *Int J Cardiol* 2016; 222: 226–32.
- Aziz MA, Diab AS, Mohammed AA. Antioxidant categories and mode of action. In: Shalaby E, ed. *Antioxidants*. IntechOpen, 2019.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1): 9–19.
- Obana A, Gohto Y, Nakazawa R, Moriyama T, Gellermann W, Bernstein PS. Effect of an antioxidant supplement containing high dose lutein and zeaxanthin on macular pigment and skin carotenoid levels. *Sci Rep* 2020; 10(1): 10262.