

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická**

**Stanovení aktivit desaturáz a elongázy ve VLDL frakci  
EDTA plazmy diabetiků**

**Bc. Novotná Veronika**

**Diplomová práce  
2009**

## **Prohlášení autora**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 28. 4. 2009

.....

Veronika Novotná

Poděkování:

Děkuji panu doc. Ing. Alexandru Čeganovi, CSc. za vedení, vstřícnost, cenné rady, poskytnutou literaturu a čas, který mi věnoval při zpracování mé diplomové práce.

Zároveň chci poděkovat své rodině a všem přátelům za podporu během mého studia.

## **ABSTRAKT**

Předložená diplomová práce vyšetřuje vztahy mezi glykovaným hemoglobinem a enzymy, lipoproteiny, lipidy a mastnými kyselinami, s cílem přispět k rozšíření poznatků o diagnostice diabetes mellitus.

Pro přesnější vyhodnocení jednotlivých vzorků byli pro tuto práci anonymní pacienti rozděleni do tří skupin podle glykovaného hemoglobinu na zdravé jedince, středně nemocné diabetiky a těžce nemocné diabetiky. Jako hlavní analytická metoda byla zvolena plynová chromatografie s použitím plynového chromatografu firmy Hewlett – Packard 5890.

Po zhodnocení naměřených výsledků lze konstatovat, že na řadu našich sledovaných parametrů u diabetiků má značný vliv medikamentózní léčba (např. hypolipidemika využívaná pro léčbu cévních komplikací diabetu). Tento vliv se projevuje tím, že některé nasycené a nenasycené mastné kyseliny mají u jednotlivých skupin pacientů opačný průběh, než jsme očekávali, aktivita  $\Delta 9$ -desaturázy je normalizována a hladiny triglyceridů, LDL- a HDL-cholesterolu se pohybují v referenčních mezích.

Klíčová slova: diabetes mellitus, mastné kyseliny, glykovaný hemoglobin, plynová chromatografie, léčba

## **ABSTRACT**

The hereby presented paper investigates a connection between glycosidic hemoglobin and enzymes, lipoproteins, lipids and fatty acids. The aim is to enrich and expand the knowledge of the diabetes mellitus diagnostics.

To evaluate the samples more accurately, anonymous patients were split into three separate groups, according to the measured glycosidic hemoglobin on healthy specimen, middle-diabetics and heavily diseased diabetics. A gas chromatography with the Hewlett – Packard 5890 gas chromatograph was used as a main analytical method.

After evaluating the measurements, a declaration can be made, that medicamental treatment (such as hypolipidemics, used for vascular complication of the diabetes) has an extensive influence on significant number of the observed diabetic's parameters. This influence demonstrates itself with a fact, that some of the saturated and non-saturated fatty acids have contrary progression, from what was expected. The  $\Delta^9$ -desaturase activity is normalized and the levels of triglycerides, LDL and HDL cholesterol are stabilized in referential limits.

Key words: diabetes mellitus, fatty acids, glycosidic hemoglobin, gas chromatography, treatment

## Obsah

1 Úvod	9
2 Cíle práce	11
3 Teoretická část	12
3.1 Anatomie a funkce jater	12
3.2 Lipidy	13
3.2.1 Fyziologicky významné lipidy	13
3.2.1.1 Cholesterol	13
3.2.1.2 Fosfolipidy	14
3.2.1.3 Triglyceridy	14
3.2.1.4 Mastné kyseliny	14
3.2.2 Metabolismus lipoproteinů	15
3.3 Langerhansovy ostrůvky pankreatu	17
3.3.1 Glukagon	17
3.3.2 Somatostatin	17
3.3.3 Inzulín	18
3.4 Diabetes mellitus	19
3.4.1 Diabetes mellitus 1. typu	19
3.4.2 Diabetes mellitus 2. typu	20
3.4.3 Inzulínová rezistence	21
3.4.3.1 Primární inzulínová rezistence	21
3.4.3.2 Sekundární inzulínová rezistence	22
3.4.4 Diabetes mellitus a poruchy metabolismu lipidů	22
3.5 Desaturázy a elongázy	23
3.5.1 Stearoyl-CoA desaturáza 1 (SCD-1)	24
3.5.2 Vliv potravních tuků na SCD	25
3.5.3 SCD a obezita	25
3.5.4 SCD a rakovina	26
3.5.5 SCD a deficiencie esenciálních mastných kyselin	27
3.5.6 Pomocné metody využívané při sledování aktivity SCD	27
3.5.6.1 Tělesná skladba a rozložení tělesného tuku v organizmu	27
3.5.6.2 <sup>1</sup> HMRS pro kvantitativní analýzu u pacientů se steatózou	27
3.5.6.3 Orální glukózový toleranční test	27

3.5.6.4	Euglykemický hyperinzulinemický clamp	28
3.5.6.5	Analytické postupy	28
3.6	Chromatografie	29
3.6.1	Princip chromatografie	29
3.6.2	Základní typy chromatografie	29
3.6.2.1	Chromatografie adsorpční	29
3.6.2.2	Chromatografie rozdělovací	30
3.6.2.3	Iontově-výměnná chromatografie	30
3.6.2.4	Gelové permeační chromatografie	31
3.6.3	Chromatografie na tenké vrstvě	31
3.6.4	Plynová chromatografie	32
4	Experimentální část	34
4.1	Popis výběru jedinců do souboru	34
4.2	Metoda tenkovrstevné chromatografie	35
4.2.1	Přístrojové vybavení	35
4.2.2	Používaný materiál	35
4.2.3	Pracovní postup	37
4.2.3.1	Extrakce lipidů	37
4.2.3.2	Chromatografie a identifikace kyselinou fosfomolybdenovou	37
4.2.3.3	Izolace jednotlivých složek lipidů	38
4.2.3.4	Extrakce lipidů z jednotlivých vrstev	38
4.2.3.5	Stanovení koncentrace jednotlivých složek sérových lipidů se standardem	38
4.3	Metoda plynové chromatografie	39
4.3.1	Přístrojové vybavení	39
4.3.2	Používaný materiál	39
4.3.3	Pracovní postup	41
4.3.3.1	Chromatografie na tenké vrstvě	41
4.3.3.2	Derivatizace - převedení na methylestery	41
4.3.3.3	Plynová chromatografie	41
5	Výsledková část	43
5.1	Celkové lipidy vs. jednotlivé frakce lipidů	43

5.2	Vliv potravy na aktivitu $\Delta 9$ -desaturázy ve VLDL frakci u zdravých jedinců	44
5.3	Vyhodnocení HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, TG ve VLDL frakci	45
5.4	Vyhodnocení nenasycených mastných kyselin ve VLDL frakci a porovnání s LDL frakcí	47
5.5	Vyhodnocení nasycených mastných kyselin ve VLDL frakci a porovnání s LDL frakcí	49
5.6	Vyhodnocení desaturáz a elongázy ve VLDL frakci a porovnání s LDL frakcí	51
6	Diskuze	54
7	Závěr	58
8	Literatura	60
9	Přílohy	64
9.1	Statistické zpracování výsledkových dat	64
9.2	Tabulky naměřených dat	65
9.3	Seznam tabulek a obrázků	79
9.3.1	Seznam vyobrazení	79
9.3.2	Seznam tabulek	80
9.3.3	Seznam zkratk	80



# 1 Úvod

Diabetes mellitus je velký medicínský, sociální a ekonomický problém v zemích s takzvaným západním životním stylem. Tento životní styl je charakteristický nízkou pohybovou aktivitou s postupným vznikem obezity a nakonec vznikem diabetes mellitus 2. typu s následnými diabetickými komplikacemi, které vedou ke zkrácení života i zhoršení jeho kvality. Prevalence tohoto metabolického onemocnění se pohybuje přibližně v rozmezí 6 - 7,5 %. Až třetina nemocných však zůstává nedignostikována a v době záchyty má nejméně 20 % diabetiků již pokročilé mikro- a makrovaskulární komplikace. Diabetik je ohrožen předčasným rozvojem aterosklerózy se všemi jejími orgánovými projevy. Diabetes je dnes nejčastější příčinou chronické renální insuficience. Včasná diagnostika diabetu může zabránit vzniku těchto komplikací, nebo je oddálit.

U diabetiků dochází ke zvyšování hladiny glukózy a glykovaného hemoglobinu v krvi. Glykovaný hemoglobin se vyjadřuje jako procentuální zastoupení celkového hemoglobinu a dává představu o průměrné glykémii za posledních 6-8 týdnů.

V závislosti na změnách hladin glukózy a glykovaného hemoglobinu se mění těž množství nenasycených a nasycených mastných kyselin, dochází k narušení lipidového metabolismu, jako je snižování HDL-cholesterolu a naopak zvyšování LDL částic o malé hustotě a triglyceridových vrstev, a nastávají i další změny v krvi, které se nejlépe odhalují biochemickým vyšetřením. Zvláštním případem je sledování aktivit desaturáz ( $\Delta 9$ -desaturáza,  $\Delta 6$ -desaturáza a  $\Delta 5$ -desaturáza) a elongáz. Kombinace těchto enzymů hraje důležitou roli při biosyntéze nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem.

Publikovaných prací zabývajících se problematikou desaturáz a elongáz ve vztahu k diabetikům není příliš mnoho. Většina doposud vydaných publikací byla zaměřena spíše na testování aktivit desaturáz (hlavně  $\Delta 9$ -desaturázy) u krys.

Předložená práce vyšetřuje vztahy mezi glykovaným hemoglobinem a enzymy, lipoproteiny, lipidy a mastnými kyselinami, s cílem přispět k rozšíření poznatků o diagnostice diabetu.

Pracovali jsme s anonymními vzorky EDTA plazmy diabetiků z Oddělení klinické biochemie Krajské nemocnice Pardubice a.s., které byly následně odeslány na chromatografickou analýzu na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Eberhard-Karl-Universität v Tübingenu v rámci Grantu evropské unie s názvem CARE-MAN. Pacienti byli poté rozděleny do tří skupin podle hladin glukózy a glykovaného hemoglobinu na zdravé

jedince, středně nemocné diabetiky a těžce nemocné diabetiky. Po provedeném měření získaná data byla zpracována graficky i statisticky.

Část studie byla prováděna na Katedře biologických a biochemických věd metodou tenkovrstevné chromatografie, která je možnou metodikou využívanou v problematice analýzy lipidů. Pro druhou část studie hrála důležitou roli plynová chromatografie, pomocí které jsme získali informace o nasycených a nenasycených mastných kyselinách a s tím analogicky i informace o aktivitách desaturáz a elongázy.

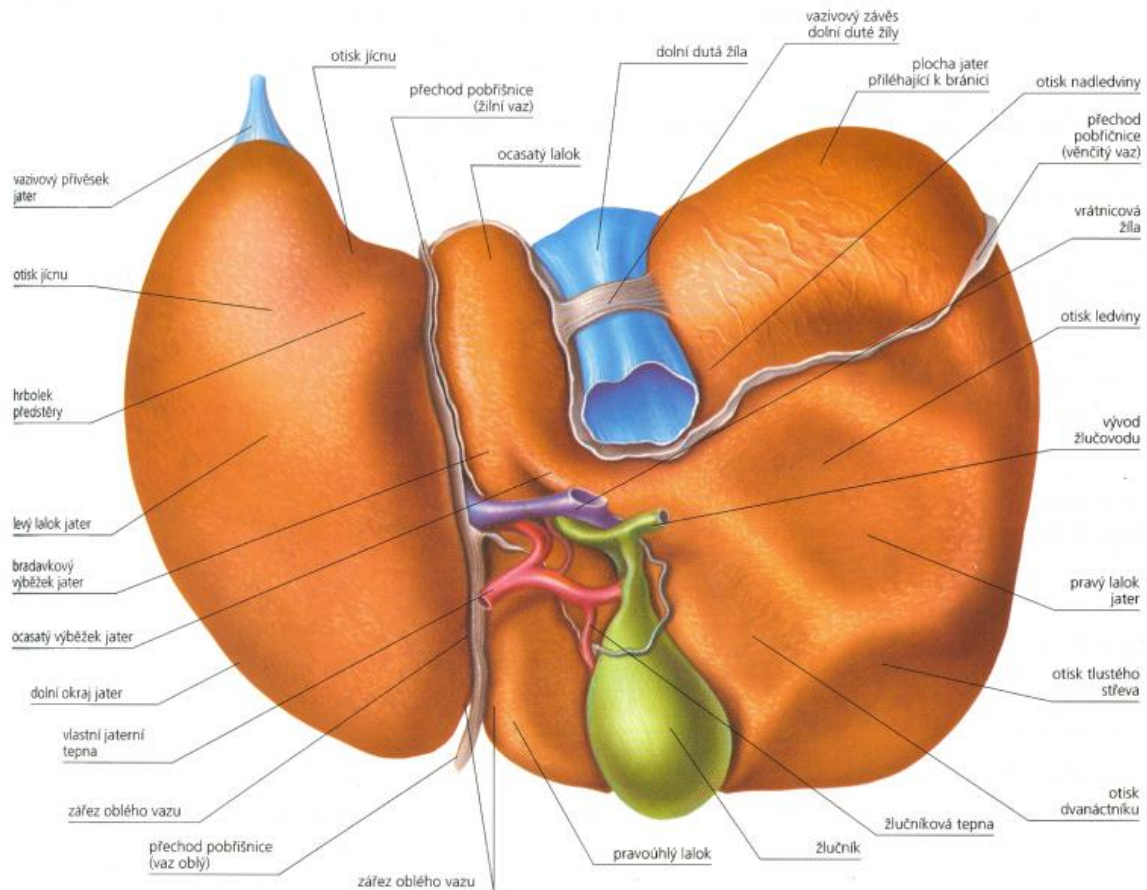
## 2 Cíle práce

Cílem práce je rozšířit poznatky o parametrech, které slouží pro diagnostiku metabolického onemocnění - diabetes mellitus. Pro tuto studii byly zvoleny následující cíle:

- A. Stanovit nasycené a nenasycené mastné kyseliny ve VLDL a LDL frakci lipidů za pomoci plynové chromatografie.
- B. Vypočítat aktivity  $\Delta 9$ -desaturázy,  $\Delta 6$ -desaturázy,  $\Delta 5$ -desaturázy a elongázy ve VLDL a LDL frakci lipidů.
- C. Všechny parametry výše uvedené zhodnotit z hlediska použitelnosti pro diagnostiku diabetu a statisticky zpracovat.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Anatomie a funkce jater



**Obr. 3.1 Anatomie jater**

**Zdroj:** Atlas anatomie [Svojtka & Vašut, Praha, 1996] [ISBN 80-7180-092-9]

Játra představují orgán, který je naprosto nezbytný pro život. Protéká jimi za 1 minutu asi 1500 ml krve a mají jak oběh funkční (portální), tak oběh nutritivní (a. hepatica). Základní funkční jednotkou je jaterní lalůček. Lokalizace nejdůležitějších enzymů v tomto lalůčku určuje i charakter metabolických pochodů, které se v něm odehrávají. Funkce jater je mnohočetná. Mezi nezbytné funkce patří produkce žluči, detoxikační funkce, tvorba močoviny, glukostatická funkce, produkce tepla, syntéza plazmatických bílkovin a faktorů významných pro hemokoagulaci, produkce angiotenzinogenu. V jaterní tkáni jsou též produkovány lipoproteiny typu VLDL a HDL, probíhá zde desaturace a elongace mastných kyselin a játra se podílí zásadním způsobem na metabolismu cholesterolu (Trojan a spol., 2003).

## 3.2 Lipidy

Lipidy jsou heterogenní skupinou sloučenin, které mají přímo či nepřímo vztah k mastným kyselinám. Jejich společnou vlastností je relativní nerozpustnost ve vodě (způsobená přítomností velkých uhlovodíkových zbytků v jejich molekulách) a dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech jako ether, chloroform a benzen. Mezi lipidy patří tuky, oleje, vosky a příbuzné sloučeniny.

Lipidy jsou důležitou složkou potravy nejen pro svou vysokou energetickou hodnotu, ale i pro obsah esenciálních mastných kyselin a v tucích rozpustných vitamínů, které jsou obsaženy v lipidové složce přirozené potravy. V těle slouží jako vydatný zdroj energie, jako tepelný izolátor a umožňují rychlé šíření depolarizačních vln podél myelinizovaných nervových vláken (Murray a spol., 2002).

Játra jsou ústředním orgánem metabolismu lipidů (cholesterolu, fosfolipidů, triglyceridů) a lipoproteinů. Lipoproteiny jež jsou uvnitř hydrofobní a zevně hydrofilní, umožňují jejich transport v plazmě.

### 3.2.1 Fyziologicky významné lipidy

#### 3.2.1.1 Cholesterol

Cholesterol se nachází v buněčných membránách a je prekurzorem žlučových kyselin a steroidních hormonů. Je syntetizován v játrech, tenkém střevě a dalších tkáních. Část se získá střevním vstřebáváním a do jater se dostává jako součást chylomikronových zbytků.

Cholesterol se v játrech syntetizuje hlavně z acetyl-koenzymu A (CoA) v mikrozomech a v cytozolu. Cholesterol v potravě a hladovění tuto syntézu tlumí, zatímco biliární pištěl či podvaz žlučovodu, a také střevní lymfatická pištěl ji zvyšují.

Cholesterol v membránách a ve žluči je přítomen skoro výlučně jako volný cholesterol. Žluč představuje jedinou významnou cestu pro exkreci cholesterolu. V plazmě a některých tukových tkáních jako játra, nadledvinky, kůže, nalezneme též estery cholesterolu (cholesterol esterifikovaný mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem). Estery cholesterolu jsou ještě více nepolární než volný cholesterol a jsou proto ještě méně rozpustné ve vodě.

Zvýšená hladina cholesterolu v krvi (hypercholesterolemie) zvyšuje riziko vzniku arteriosklerózy a ischemické choroby srdeční. Úprava hladiny částic LDL v krvi pro potlačení rozvoje aterosklerózy vyžaduje poměrně radikální úpravu skladby přijímané potravy.

### 3.2.1.2 Fosfolipidy

Fosfolipidy představují heterogenní skupinu sloučenin. Musí obsahovat jednu nebo více skupin kyseliny fosforečné a další polární skupinu, kterou může být heterogenní báze jako cholin nebo ethanolamin. To je pak doplněno nejméně jedním radikálem mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Fosfolipidy jsou mnohem složitější co do chemické reaktivity než cholesterol a jeho estery. Jsou důležitou součástí buněčných membrán a účastní se řady chemických reakcí. Nejhojnějším fosfolipidem v plazmě a většině buněčných membrán je fosfatidy cholin (lecitin).

### 3.2.1.3 Triglyceridy

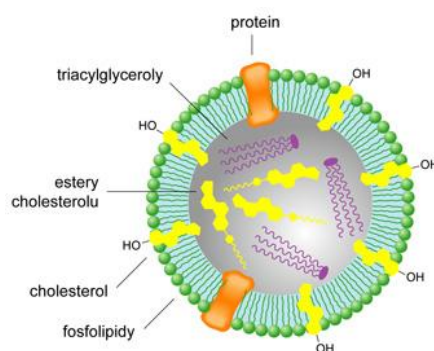
Triglyceridy jsou jednodušší sloučeniny než fosfolipidy. Jejich kostru tvoří glycerol, jehož hydroxylové skupiny jsou esterifikovány mastnými kyselinami. Přírodní triglyceridy obsahují řadu rozličných mastných kyselin. Slouží jako zásoba energie i jako prostředník jejího transportu ze střeva a jater do periférních tkání (Sherlock, Dooley, 2002).

### 3.2.1.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (FA) jsou strukturní součástí lipidů, které spolu s bílkovinami a sacharidy představují základní stavební kameny živé hmoty (Nelson a Cox, 2005). Jsou to buď nasycené, nebo nenasycené karboxylové kyseliny s uhlíkovým řetězcem od 2 do 36 atomů. U vyšších živočichů a rostlin dominují FA se 16 a 18 uhlíkovými atomy, tj. kyselina palmitová, stearová, olejová a linolová. Kyseliny s řetězcem kratší než 14 a delším než 22 uhlíkových atomů představují minoritní část. Většina FA má sudý počet atomů uhlíku, vzhledem k syntéze z dvouuhlíkatých jednotek. Přibližně polovina FA je nenasycených, s 1 - 6 dvojnými vazbami. Vícenenasycené FA (PUFA) jsou charakterizovány pentadienovým uspořádáním dvojných vazeb (Gunstone, 1994).

Mastné kyseliny jsou syntetizovány v cytoplazmě z dvouuhlíkatých nebo tříuhlíkatých prekurzorů za účasti přenašeče acylových skupin, NADPH a acetyl-CoA-karboxylázy. V mikrozomálním systému se účastní elongace malonyl-CoA, v mitochondriálním systému acetyl-CoA. Odbourávání FA  $\beta$ -oxidací v mitochondriích je doprovázeno uvolňováním energie. V lidské plazmě a tkáních bylo identifikováno asi 60 FA, z biologického hlediska jsou relevantní pouze některé z nich. Složení FA je charakteristické jak pro jednotlivé živočišné druhy, tak i pro jednotlivé tkáně (Nelson a Cox, 2005).

### 3.2.2 Metabolismus lipoproteinů



**Obr. 3.2 Krevní lipoprotein**

**Zdroj:** [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/figures/lipoproteiny\\_krevni.01.jpg](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/figures/lipoproteiny_krevni.01.jpg)

Lipoproteiny jsou klíčové pro oběh a metabolismus lipidů. Jsou to částice, které lze ultracentrifugací rozdělit na základě rozdílné hustoty. Tak se též odvozuje jejich názvosloví. Jejich povrch je tvořen apolipoproteiny různých typů (tab. 3.1), volným cholesterolem, triglyceridy a vitaminy rozpustnými v tucích (Sherlock, Dooley, 2002). Jádrem částice tvoří neuspořádané nepolární triacylglyceroly a estery cholesterolu (Štern a spol., 2005).

**Tab. 3.1 Charakteristika lipoproteinů**

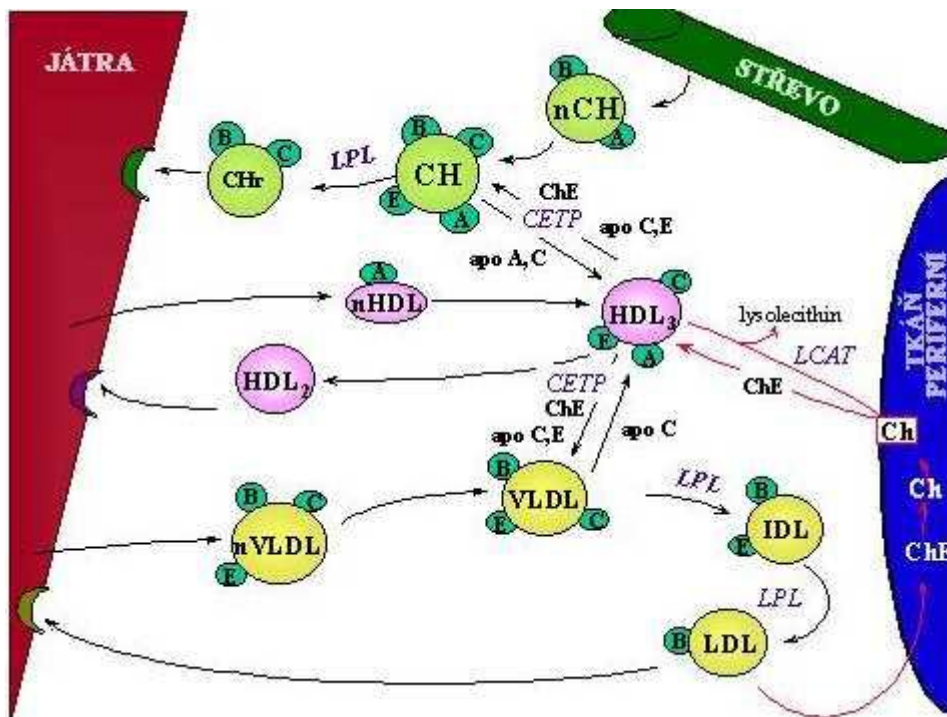
Lipoproteiny	Apolipoproteiny	Zdroj	Transportuje
chylomikrony	B48, AI, C-II, E	střevo	tuk z potravy
VLDL	B100, C-II, E	játra	triglyceridy a cholesterol z jater
LDL	B100	z VLDL	cholesterol
HDL	A-I, A-II	periferní tkáň	cholestrylester

Tuk z potravy se vstřebává v tenkém střevě a je ukládán do chylomikronů. Ty se dostávají do krevního oběhu, kde jsou z nich triglyceridy odstraňovány působením lipoproteinové lipázy. Ve tkáni jsou pak tyto triglyceridy spotřebovány nebo uskladněny. Chylomikronové zbytky jsou vychytávány v játrech pomocí proteinu charakterem blízkého LDL receptoru. Cholesterol pak vstupuje do metabolických řetězců nebo do plazmatických membrán, nebo je vyloučen do žluči.

V rámci endogenní metabolické dráhy opouštějí cholesterol a triglyceridy játra uvnitř VLDL. V cirkulaci jsou triglyceridy opět odstraňovány působením lipoproteinové lipázy.

Částice VLDL se tím zmenšují, vznikají nejprve lipoproteiny s přechodnou (intermediate) hustotou (IDL), a pak LDL – hlavní nosiče cholesterolu. Dominantní úlohu v odstraňování LDL hrají LDL receptory na hepatocytech.

HDL jsou částice zprostředkující odsun cholesterolu z periferních tkání. HDL cholesterol je buď zachycen v játrech nebo se začlení do IDL, čímž vznikne zralý LDL. Tento mechanismus odstraňování periferního cholesterolu je velmi důležitý, jak dokazuje ochranný účinek vysoké hladiny HDL-cholesterolu proti ischemické koronární nemoci (Sherlock, Dooley, 2002). Nejmenší částice HDL se značí HDL<sub>3</sub>, obohacením o další cholesterol se mění na HDL<sub>2a</sub>. Z těchto částic výměnou cholesterolu za triglyceridy z VLDL vznikají HDL<sub>2b</sub>, které se po hydrolýze triglyceridu jaterní lipázou mění znovu na HDL<sub>3</sub> (Racek a spol.,2006).



**Obr. 3.3 Metabolismus lipoproteinů**

**Zdroj:** [www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/lipoprot/lipoprot.htm](http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/lipoprot/lipoprot.htm)

**Zkratky:** CH – chylomikron, n – nascentní, Ch – cholesterol, ChE – ester cholesterolu, LPL – lipoproteinová lipáza, LCAT – lecitin-cholesterolacyltransferáza, CETP – cholesterylestertransferující protein



### 3.3 Langerhansovy ostrůvky pankreatu

Langerhansovy ostrůvky pankreatu jsou endokrinní žlázou, která je roztroušena uvnitř pankreatu (Trojan a spol., 2003). V dospělém pankreatu jich je kolem jednoho milionu. Skládají se z kompaktní masy asi 3000 endokrinních buněk v jednom ostrůvku, které jsou od exokrinní tkáně pankreatu odděleny tenkým kolagenním pouzdem. Ostrůvky jsou přímo zásobovány arteriální krví jednou nebo více arteriálami, které ústí do husté sítě kapilár prostupujících celý ostrůvek. Ostrůvky dostávají 5 až 10krát více krve na objemovou jednotku než exokrinní tkáň pankreatu. Podél krevních cév vstupují do ostrůvků sympatická i parasympatická nervová vlákna (Bartoš a spol., 2000).

Langerhansovy ostrůvky jsou tvořeny čtyřmi typy buněk. Buňky A (alfa) produkují *glukagon*, buňky B (beta) *inzulín*, buňky D (delta) *somatostatin* a buňky F produkují *pankreatický polypeptid (PP)*, jehož funkce není známá.

#### 3.3.1 Glukagon

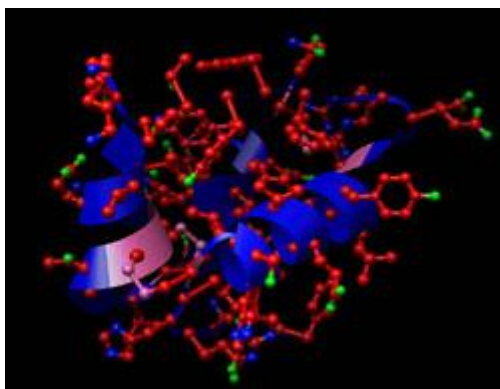
Glukagon vzniká v A-buňkách z prekurzoru, který je 5krát větší než vlastní glukagon a dává kromě glukagonu vznik dalším peptidům, z nichž některé silně stimulují sekreci inzulínu. Glukagon je peptid o molekulové hmotnosti 3485 a obsahuje 29 aminokyselin (Trojan a spol., 2003). Glukagon je hlavní katabolický, kontraregulační hormon, který působí proti metabolickým účinkům inzulínu. Primárně působí na játra, kde zvyšuje produkci glukózy, takže stimuluje glykogenolýzu a glukoneogenezi. Současně v játrech brzdí syntézu mastných kyselin a tvorbu triacylglycerolů. Zvyšuje oxidaci mastných kyselin s následnou tvorbou ketolátek. Z diagnostického hlediska je důležité vědět, že glukagon stimuluje přímo sekreci inzulínu a tedy i C-peptidu (Bartoš a spol., 2000).

#### 3.3.2 Somatostatin

Somatostatin vzniká v D buňkách z pre-pro-somatostatinu (116 aminokyselin), ze kterého vzniká pro-somatostatin (28 aminokyselin, přítomný hlavně ve střevě) a pak vlastní somatostatin, cyklický peptid o 14 aminokyselinách (Trojan a spol., 2003).

Somatostatin tlumí sekreci růstového hormonu. Jeho účinky jsou převážně inhibiční, a to jak tlumením sekrece inzulínu a glukagonu, tak tlumením sekrece žaludeční a pankreatické šťávy.

### 3.3.3 Inzulín



**Obr. 3.4 Struktura inzulínu**

**Zdroj:** <http://www.mte.cz/inzulin.htm>

**červeně:** uhlík; **zeleně:** kyslík; **modře:** dusík; **růžově:** síra; **modrorůžová stuha:** bílkovinná kostra

Objevitelem inzulínu se stal lékař Frederick Grant Banting. Svůj výzkum s pokusy na psech začal v roce 1921. Za pomoci svých asistentů, studenta medicíny Ch. Besta a biochemika J.B. Collipa, se mu podařilo extrahovat z hovězího pankreasu účinný inzulín, který však zpočátku nazývali "isletin".

Inzulín je specifický glykoprotein, který má stěžejní úlohu v udržování glukózové homeostázy. Gen pro inzulín je lokalizován na krátkém raménku 11. chromozomu a jeho expresí (tj. transkripcí, translací a posttranslačními modifikacemi) vzniká inzulín. Intermediárním produktem v biosyntéze inzulínu je nejdříve pre-proinzulín, který je účinkem proteáz v endoplazmatickém retikulu přeměňován na proinzulín. Proinzulín se skládá z inzulínového řetězce A, spojovacího peptidu a inzulínového řetězce B. Při konverzi na inzulín, která probíhá v sekrečních granulích beta buněk, je proinzulín rozštěpen proteázami na C-peptid a inzulín v ekvimolárním poměru.

*Celková denní produkce inzulínu* je u zdravého člověka asi 30–40 j. Z toho asi polovina připadá na bazální sekreci a druhá polovina na stimulovanou sekreci inzulínu.

*Bazální sekrece inzulínu* se u zdravého člověka pohybuje mezi 0,25–1,5 j. za hodinu. Inzulín se uvolňuje trvale ve dne i v noci, nezávisle na příjmu potravy, v malých dávkách v 5-15 minutových intervalech. Význam bazální sekrece tkví v blokádě nadměrné jaterní produkce glukózy a zajištění normální glykémie v podmínkách na lačno.

*Stimulovaná sekrece (prandiální)* představuje inzulín vyplavovaný při příjmu potravy a hraje stěžejní roli v regulaci postprandiální glykémie (Bartoš a spol., 2000).

Inzulín snižuje glykémii tím, že usnadňuje (facilituje) vstup glukózy do buněk. Zvyšuje počet glykózových transportérů, což je podstatou *první* (rychlé, nastávající v sekundách) *fáze* účinku inzulínu. Kromě glukózy se zvyšuje i vstup aminokyselin a draslíku do buněk. V *druhé fázi* (střední – nastávající v minutách) inzulín stimuluje proteosyntézu a inhibuje rozpad proteinů a zesiluje tvorbu glykogenu v játrech (aktivuje enzym glykogensyntázu). Tak se zvyšuje ukládání glukózy do zásob v podobě jaterního glykogenu. V *poslední* (pozdní fázi, nastávající v hodinách) inzulín stimuluje tvorbu tuku (aktivuje lipogenetické enzymy).

Mechanismus působení inzulínu spočívá ve vazbě na specifické receptory v membránách buněk cílových tkání (játra, svaly, tuková tkáň). Inzulínové receptory jsou glykoproteiny složené ze dvou částí: extracelulární část váže inzulín a intracelulární část se po vazbě na extracelulární část fosforyluje. Receptory se při nadbytku inzulínu spotřebovávají. Tomuto spotřebování receptorů se říká inhibiční regulace (down regulation) (Trojan a spol., 2003).

## **3.4 Diabetes mellitus**

### **3.4.1 Diabetes mellitus 1. typu**

Obvykle se označuje IDDM, diabetes mellitus závislý na inzulínu. Postihuje většinou mladé lidi, proto dřívější označení juvenilní. Jde o skutečný defekt tvorby inzulínu, vyvolaný postupnou destrukcí  $\beta$ -buněk Langerhansových ostrůvků. Za příčinu se považuje autoimunitní proces, vyprovokovaný snad virovým onemocněním či chemickou modifikací těchto buněk u jedinců s diabetickou predispozicí. Na destrukci  $\beta$ -buněk pankreatu se nepochybně podílejí i volné radikály, resp. reaktivní formy kyslíku. Vliv dědičnosti není tak vyjádřen jako u diabetu 2. typu, existuje však vazba na určité HLA genotypy (Racek a spol., 2006).

Glukóza kolující v krvi není schopna bez inzulínu pronikat v dostatečném množství do buněk a nemůže být využita k získání energie. Hladina krevního cukru stoupá nad normální hodnoty. Vyšší hladina glykémie (tj. nad 5,6 mmol/l na lačno, nad 6,7 mmol/l za 1 hodinu po jídle) se nazývá hyperglykémie. Přestoupí-li glykémie určitou hodnotu – tzv. ledvinný práh pro glukózu – nejsou již ledviny schopny cukr v krvi udržet a začnou jej vylučovat do moče. Dochází ke glykosurii. Od glykosurie, nadměrného močení a nálezu cukru v moči, byl odvozen i název onemocnění úplavice cukrová, diabetes mellitus.

Hodnota ledvinného prahu je individuální pro každého člověka, mění se v průběhu dne i během života, průměrně se pohybuje kolem 10 mmol/l.

Při nedostatku inzulínu nejsou strávené cukry využity. Organismus není schopen využít jako energetický zdroj ani glukózu vyrobenou v játrech (glukoneogeneze). Organismus musí energii získávat z náhradních zdrojů, z tuků a bílkovin. Rozpadem tuků (lipolýza) vznikají mastné kyseliny, které se v játrech přeměňují na ketolátky, aceton, kyselinu betahydroxymáseľnou a acetoctovou. Část ketolátek je využívána jako energetický zdroj v organizmu a jejich nadbytek je vylučován močí – ketonurie.

Na začátku onemocnění se postupně snižuje produkce inzulínu a stoupá hladina krevního cukru. Cukr bez inzulínu není využit jako zdroj energie a nemocný se proto cítí unavený. Stoupne-li glykémie nad hodnotu ledvinného prahu, je glukóza vylučována do moče. K vyloučení určitého množství osmoticky aktivního cukru je však třeba zvýšeného množství tekutin. To je příčinou nadměrného močení – polyurie, často i v noci – nykturie. Ztráta tekutin vede k pocitu žízně a nutí k nadměrnému pití – polydypsii. Úsilí o udržení vyrovnané acidobazické rovnováhy vyvolává prohloubené dýchání s typickým kyselým jablečným zápachem vydechaného vzduchu (Bělobrádková, Brázdová, 2006).

### **3.4.2 Diabetes mellitus 2. typu**

Diabetes mellitus 2. typu (dříve označovaný jako diabetes mellitus nezávislý na inzulínu – NIDDM nebo také jako diabetes dospělého věku) je heterogenním syndromem. Diabetes mellitus typu 2 vzniká nejčastěji po 40. roce života a vedle dědičnosti podporuje jeho vznik obezita, nedostatek pohybové aktivity a stresové situace. Diabeteci 2. typu představují nejméně 85% z celkového počtu diabetiků, bývají to nejčastěji lidé středního a vyššího věku a až 90% všech diabetiků 2. typu trpí nadváhou nebo obezitou společně s řadou laboratorních odchylek v metabolismu, proto také základem léčby je dietní a pohybový režim s redukcí hmotností (Votey, Peters, 2008).

Diabetes mellitus typu 2 je chronické onemocnění s familiárním výskytem. Podstatou metabolického syndromu je nepoměr mezi tvorbou a sekrecí inzulínu a odpovědí periferních tkání na inzulín. Jedné se o tak zvanou inzulínovou rezistenci. Není jasné, který moment je primární (American Diabetes Association). Diabeteci 2. typu mohou mít hladinu inzulínu v krvi vysokou, normální i sníženou.

Nemocní s diabetem mellitus typu 2 nejsou životně závislí na podávání exogenního inzulínu. Na počátku onemocnění při převaze inzulínové rezistence jsou léčeni dietou, pohybem a v případě nutnosti perorálními antidiabetiky. Pokud převládne inzulínová

insuficience (dojde k vyčerpání rezerv sekrece inzulínu), vyžádá si také léčbu inzulínem.

Proces insuficience sekrece inzulínu ale nevede k úplné ztrátě  $\beta$ -buněk.

Mezi klinické příznaky zahrnujeme žízeň, polydipsii, polyurii, noční močení, hubnutí, únavu, zvracení, zhoršení zrakové ostrosti, opakující se infekce urogenitální a kožní, porucha vědomí až komatózní stav. Nebývá sklon k acidóze.

Výjimečné postavení má diabetes s označením MODY (maturity onset diabetes of the young), tedy diabetes mellitus 2. typu zachycený v časném věku. Tento typ diabetu má všechny znaky diabetu mellitus typu 2, odlišuje se však svojí autozomálně dominantní dědičností.

### **3.4.3 Inzulínová rezistence**

Inzulínová rezistence zvyšuje nároky tkání na dodávku inzulínu. Vysokou hladinou inzulínu (hyperinzulinemií) se organizmus snaží bariéru IR překonat. V momentě, kdy již  $\beta$ -buňky nárokům na vysokou sekreci inzulínu nestačí, vzniká stav relativního nedostatku inzulínu (ani hyperinzulinémie nezajistí normoglykémii). Tehdy se projeví porucha metabolismu glukózy v podobě poruchy glukózové tolerance nebo diabetes mellitus 2. typu (Bělobrádková, Brázdová, 2006).

Rezistence u NIDDM má charakter kombinované receptorové a postreceptorové poruchy, na jejímž vzniku se může podílet defekt na kterékoliv úrovni v kaskádě dějů, počínaje vazbou inzulínu na inzulínový receptor a konče aktivací efektorových systémů, jako jsou transportéry glukózy a intracelulární enzymy.

Příčiny inzulínové rezistence mohou být primární (geneticky determinované) nebo sekundární.

#### **3.4.3.1 Primární inzulínová rezistence**

Protože NIDDM je onemocnění s častým familiárním výskytem, pravděpodobně s polygenní dědičností, předpokládá se přítomnost genových mutací odpovědných za vznik inzulínové rezistence. U malé části NIDDM hraje roli polymorfismus genu pro IRS-1 (insulin receptor substance 1), glykogensyntetázu a glukokinázu či mutace mitochondriální DNA kódující gen pro tRNA. Kvantitativně zcela nevýznamnou složku představují mutace genu pro inzulínový receptor.

### **3.4.3.2 Sekundární inzulínová rezistence**

Sekundární inzulínová rezistence naproti tomu zcela pravidelně provází a dále komplikuje metabolickou situaci u NIDDM. Vzniká nejčastěji vlivem hormonálních a metabolických příčin. Uplatňuje se například hyperinzulinémie, která vede k down regulaci receptorů, hyperglykémie (toxický efekt glukózy), zvýšení volných mastných kyselin a kontraregulačních hormonů, poruchy acidobazické rovnováhy, hyperosmolarita, protilátky proti inzulínovým receptorům a inzulínu a další vlivy. Mezi další potenciální mechanismy vedoucí k inzulínové rezistenci u diabetiků patří i snížená denzita kapilár v kosterním svalu a typ svalových vláken (Bartoš a spol., 2000).

Příčina IR u DM 2. typu není zatím jednoznačně objasněna. S největší pravděpodobností se uplatní jak primární IR, tak i sekundární IR. Předpokládá se i podíl jiných genetických odchylek, u DM 2. typu hlavně v distribuci intraabdominálního tuku (Bělobrádková, Brázdová, 2006).

Klinicky důležitými faktory, které se podílejí na vzniku inzulínové rezistence a jejím prohlubování je dekompenzace cukrovky, přejídání a obezita, psychický stres, nedostatečná fyzická aktivita a některé léky a kouření (Bartoš a spol., 2000).

### **3.4.4 Diabetes mellitus a poruchy metabolismu lipidů**

Inzulínová rezistence a diabetes 2. typu souvisejí s propojením vzájemného vztahu plazmatických lipidů a lipoproteinových abnormalit, které zahrnují snížení HDL-cholesterolu, převahu LDL částic o malé hustotě a zvýšení triglyceridových vrstev. Každý z těchto dyslipidemických rysů souvisí se vzrůstajícím rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Stoupající jaterní sekrece VLDL částic bohatých na triglyceridy a snižující se odstraňování VLDL zdá se být hlavní závažností v patofyziologii dyslipidemií (Krauss, 2004).

Mezi významné aspekty, které jsou pro patogenezi hyperlipoproteinémií u diabetiků typické, patří schopnost inzulínu regulovat syntézu VLDL v játrech. Inzulín zvyšuje degradaci apoB v cytozolu, a proto stavy, kdy je inzulínu málo, nebo kdy není funkční, vedou k vyšším koncentracím tohoto apoproteinu. Inzulín dále snižuje syntézu proteinu MTP (microsomal triglyceride transfer protein), jehož úkolem je mikrozomální transfer triacylglycerolů.

Dále v důsledku poruchy reverzního transportu cholesterolu za fyziologických podmínek a při hypertriacylglycerolémii vznikají malé denzní LDL částice, které se v současnosti považují za jedny z vůbec nejvíce aterogenních.

Pro diabetiky 2. typu je nejcharakterističtější zvyšování koncentrace triacylglycerolů a pokles koncentrace HDL-cholesterolu.

Pacient s diabetem 2. typu má, jak již bylo řečeno, inzulínovou rezistenci, v jejímž důsledku pak dochází k hyperinzulinémii a po určitém čase u části nemocných i k hyperglykémii, zejména ve vztahu k příjmu energetických substrátů (častá je situace, kdy tyto nemocní mají normální glykémii nalačno, avšak nedokáží se vyrovnat s příjmem energetických substrátů obsahujících sacharidy; proto se někdy diabetes 2. typu nazývá též postprandiální nemoc). Inzulínová rezistence u diabetu 2. typu vede k poklesu lipoproteinové lipázy v periferních tkáních, důsledkem pak je i pokles hydrolýzy triacylglycerolů jak ve VLDL, tak v chylomikronech, a také snížená clearance VLDL a chylomiker; proto tak často nacházíme vedle zvýšených koncentrací triacylglycerolů rovněž zvýšené částice VLDL. Současně s tím stoupá endogenní lipáza v tukové tkáni, což vede ke zvýšené nabídce mastných kyselin pro hepatocyty; díky tomu se pak zvyšuje i syntéza VLDL, respektive triacylglycerolů, které jsou hlavní lipidovou součástí VLDL.

U diabetiků jsou rovněž důležité strukturální změny LDL-cholesterolu. Zejména u diabetiků 2. typu jsou zvláště nebezpečné vyšší hladiny malých denzních LDL částic. Ty jsou totiž pravděpodobně náchylnější k oxidaci, a malé denzní LDL částice jsou mnohem více aterogenní než velké LDL částice. Stoupá také poměr cholesterol/lecitin, lyzinové zbytky apoB jsou více glykovány a jsou také náchylnější k peroxidaci, stejně jako již zmíněné malé denzní LDL částice.

U diabetu 1. typu vede nedostatek inzulínu k poklesu lipoproteinové lipázy a ke vzestupu lipázy endogenní v tukové tkáni. Důsledkem je zvýšení přísunu volných mastných kyselin do jater a vzestup syntézy VLDL v játrech. Zvýšeny jsou rovněž glykace a peroxidace lipoproteinů (Perušičová, Anděl, 1999).

### **3.5 Desaturázy a elongázy**

Biosyntéza nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem probíhá kombinací aktivit desaturačních enzymů a elongačních enzymů.

Desaturázy jsou enzymy patřící do třídy oxidoreduktáz, které katalyzují odštěpení dvou vodíků z nasycené mastné kyseliny (resp. z acyl-CoA) za vzniku dvojné vazby v *cis*-konfiguraci. S výjimkou bakterií jsou nové dvojné vazby zavedené do molekuly monoenoové mastné kyseliny od sebe odděleny methylenovou skupinou. U živočichů jsou

dodatečné dvojn  vazby v zdy zaváděny mezi existující dvojnou vazbu a karboxylovou skupinu.

 ivo ichov  mají pouze  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$ ,  $\Delta^6$ ,  $\Delta^9$  desaturázy, kter  neumo n j  zaveden  dvojn  vazby za polohu 9. V důsledku toho nemohou být linoleát ( $\omega 6$ ) a  $\alpha$ -linolen t ( $\omega 3$ ) syntetizovány a musí být dodávány potravou. Naz v j  se esenci ln  mastné kyseliny.

Co se týká neesenciální mastné kyselin, mohou být vytvořeny z nasycených mastných kyselin v řadě tk n , včetně jater. Prvn  dvojn  vazba zaveden  do mastné kyseliny je téměř v zdy v poloze  $\Delta 9$ . Konverzi palmitoyl-koenzym A na palmitoleyl-koenzym A nebo stearoyl-koenzym A na oleoyl-koenzym A katalyzuje  $\Delta^9$ -desaturáza v endoplazmatick m retikulu. Jde o typick  monooxygenázový systém obsahující cytochrom  $b_5$  (Murray a spol., 2002).

Obecn  se jedná o aerobn  proces vy žaduj c  molekul rn  kyslík, NAD(P)-cytochrom  $b_5$  reduktázu a elektronov  akceptor cytochrom  $b_5$ . Elektrony proud  z NAD(P)H pomocí cytochrom  $b_5$  reduktázy k cytochromu  $b_5$ , k SCD a  kone n  k  $O_2$ , kter  se redukuje na  $H_2O$  (Paton a Ntambi, 2008).



Elongázy jsou enzymy, které v endoplazmatick m retikulu prodlu j  nasycené i nenasycené mastné kyseliny a to tak, že se na acyl-CoA aduje malonyl-CoA (prodlouřen  od karboxylového konce) a poté následuje redukce pomocí NADPH. V mitochondriálním systému se na acyl-CoA aduje acetyl-CoA, jedná se v podstatě o obrácenou  $\beta$ -oxidaci. Pou iv j  se pro syntézu strukturních lipidů v mitochondriích.

Desaturační a elongační systémy jsou eliminovány při hladovění, podáváním glukagonu a adrenalinu a při nedostatku inzulínu při diabetes mellitus typu 1 (Murray a spol., 2002).

### 3.5.1 Stearoyl-CoA desaturáza 1 (SCD-1)

SCD-1 je jaterní enzym nezbytn  pro biosyntézu nenasycených mastných kyselin z nasycených mastných kyselin, které jsou nepostradateln  pro syntézu esterů cholesterolu a cholesterolu v organizmu (Chu a spol., 2006).

SCD-1 je tedy kl čov m enzymem, kter  je zodpov dn  za přeměnu kyseliny palmitov  (16:0) a kyseliny stearov  (18:0) na palmitolejovou (16:1) a olejovou kyselinu (18:1), a naopak. Poměr palmitolejov /palmitov  kyselina (16:1 / 16:0) je nazýván



*desaturačním indexem*. Jedná se o důležitý ukazatel při stanování aktivity SCD-1 (Kao-Borengassera spol., 2008).

Podle některých studií bylo zjištěno, že jaterní SCD-1 index aktivity negativně koreluje se ztukováním jater (steatózou) a pozitivně s inzulinovou rezistencí u obézních lidí (Stefan a spol., 2008).

Desaturáza  $\Delta 9$  celkově ovlivňuje složení mastných kyselin fosfolipidů a triglyceridů. Účinky na skladbu fosfolipidů jsou důležité při udržování pružnosti buněčné membrány, poškození má za následek různé druhy nemocí jako je kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes mellitus typu 2, hypertenze, neurologická onemocnění, porucha imunity a rakovina (Ntambi, 1999).

SCD-1 byla také objevena jako složka nové metabolické reakce na hormon leptin. Proto se SCD-1 ukázala být důležitým metabolickým kontrolním bodem a inhibítorem, jeho exprese může být výhodná pro léčbu obezity, diabetu a dalších metabolických chorob (Paton a Ntambi, 2008). SCD-1 může také chránit buňky před lipotoxicitou, která může být způsobena nasycenými mastnými kyselinami ve vysokém množství (Risérus a spol., 2004).

### **3.5.2 Vliv potravních tuků na SCD**

Studie prováděné na krysách prokázaly, že činnost SCD byla snížena v krysích játrech během hladovění a diabetu a naopak byla rapidně indukována do vyšších úrovní na základě zpětného napájení stravou s vysokým obsahem uhlohydrátů, nebo po podání inzulinu. Stravy bohaté na nasycené mastné kyseliny nebo cholesterol též indukovaly desaturační činnost. Na druhou stranu polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jako kyselina linoleová (18:2n-6) snížily činnost SCD. PUFA, hlavně řada n-3, vykazují tedy prospěšný účinek na snižování plazmových lipidů a lipoproteinů (Ntambi, 1999).

### **3.5.3 SCD a obezita**

Výskyt obezity dramaticky vzrůstá v posledních letech. Stává se jedním z nejvíce naléhavých celosvětových problémů, které ovlivňují zdraví lidí. Na světě žije více než 1 miliarda lidí s nadváhou, z toho je jich 300 milionů obézních. Hlavní příčinou obezity je nadměrná spotřeba a nevhodné stravovací návyky, doprovázené nedostatečným pohybem. Není to ovšem jen problém „estetický“, obezita je spojena s výskytem celé škály chorob.

Pro definici obezity je obvykle využíván Body Mass Index. Podle indexu je hodnota vyšší než 25 bodů vyhodnocena jako nadváha. Za obézního člověka je považován ten, jehož hodnota indexu BMI překračuje 30 bodů. Ovšem při spojení s rizikovými faktory, jako je

například cukrovka 2. typu, je obezita stanovena již při hodnotě 28 bodů. Je ovšem třeba vzít na vědomí, že i když index BMI souvisí s obsahem tuku v těle, neměří se přímo. Proto jeho vypovídací schopnost může být někdy zkreslená, zvláště u lidí, kteří mají hodně svaloviny. (Cohen a spol. 2003).

Obezita spolu s dalšími faktory jako hyperlipidémie, inzulinová rezistence a jaterní steatóza je mezníkem pro metabolický syndrom, komplex metabolických změn. Strava bohatá jak na jednoduché cukry a jak na nasycené tuky je považována za faktor vysvětlující rozvoj inzulinové rezistence u laboratorních zvířat i lidské populace (Roger Gutiérrez-Juárez a spol., 2006). Zvýšená přístupnost mastných kyselin způsobuje odumírání buněk, dysfunkci  $\beta$ -buněk a diabetes (Bush a spol., 2005).

Aktivita SCD-1 je vyžadována pro indukci jaterní inzulinové rezistence při stravě obohacené o nasycené mastné kyseliny. Ačkoliv Roger Gutiérrez-Juárez ve svých studiích prokázal, že deficit SCD-1 u myši zlepšuje glukózovou toleranci a citlivost na inzulin, tyto charakteristické metabolické vlastnosti mohou být vedlejší vedle souvisejících změn v energetické rovnováze a v lipidovém metabolismu. Ve skutečnosti chronický deficit SCD-1 sám o sobě vede ke změnám v tělesné váze a v uvolňování energie. To vše má vážný vliv na inzulinovou citlivost (Roger Gutiérrez-Juárez a spol., 2006).

SCD-1 hraje tedy důležitou roli v jaterní inzulinové rezistenci a nejspíš i v potenciální léčbě obezity a metabolického syndromu (Dobrzym a spol., 2005).

### **3.5.4 SCD a rakovina**

Regulace činnosti SCD může také ovlivnit vznik a růst rakoviny. Existují hromadící se důkazy, které podporují domněnku, že změna v saturaci mastné kyseliny C18 je závažná v postupu tvorby rakoviny. Vyšší hodnota olejových kyselin v maligních buňkách zodpovídá za zvýšenou pružnost membrány. Všeobecně vede zvýšená pružnost membrány ke zvýšené látkové výměně buňky a také k vyšší rychlosti dělení, tedy k rysům příznačným pro rakovinné buňky (Li a spol., 1994). Stearové kyseliny brzdí výskyt samovolných prsních nádorů u myši a růst karcinogenem-indukovaných prsních nádorů u kryš. Stearová kyselina také zabraňuje vývoji prsní rakoviny in vitro. A tak jeden eventuální mechanismus anti-rakovinné činnosti jistých tříd mastných kyselin, jako jsou sterculic kyselina (8-(2-octylcyclopropenyl)oktanová kyselina) a thiomastné kyseliny, má modifikovat poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin skrze redukování činnosti SCD (Ntambi, 1999).

### **3.5.5 SCD a deficiencie esenciálních mastných kyselin**

Esenciální mastné kyseliny (dále EFA) jsou potřebné pro normální funkci prsních tkání a nedostatek EFA ve stravě zapříčiňuje lidské a zvířecí nemoci známé jako deficiencie esenciálních mastných kyselin. V kůži se to projevuje jako bolestivé šupinaté léze doprovázené chronickou epidermální hyperproliferací, abnormální diferenciací a abnormální funkcí kožní bariéry. Tyto symptomy jsou dále doprovázeny relativním nadbytkem mononenasyčených mastných kyselin, hlavně oleátů a palmitoleátů, nasvědčující zvýšenou aktivitu SCD. Vážnost symptomů je snížena při léčbě kyselinou linolovou, která redukuje hladiny C18:1 a C16:1 pravděpodobně snížením činnosti SCD (Marcelo a spol., 1992).

### **3.5.6 Pomocné metody využívané při sledování aktivity SCD**

#### **3.5.6.1 Tělesná skladba a rozložení tělesného tuku v organismu**

Tělesný tuk je měřitelný pomocí bioelektrických impedančních metod (RJL, Detroit, MI, USA). Celkový, stejně jako tělesný a podkožní břišní tuk, je také měřitelný pomocí T1-váhové rychle rotující echo techniky s 1,5 T zobrazením celého těla (Magnetom Sonata, Siemens Medical Solution, Erlangen, Germany) (Machann a spol., 2005).

#### **3.5.6.2 <sup>1</sup>HMRS pro kvantitativní analýzu u pacientů se steatózou jater**

Steatóza jater je měřitelná protonovou magnetickou rezonanční spektroskopií (<sup>1</sup>HMRS). NMR-spektroskopii lze s výhodou použít k analýze látek v jednodušších směsích, protože se jedná o rychlou a nedestruktivní analytickou metodu. Kvantitativní analýza je založena na přímé úměrnosti mezi plochami píků, resp. integrálními intenzitami signálů v NMR-spektru a koncentrací látky, která signál poskytuje (Stefan a spol., 2005).

#### **3.5.6.3 Orální glukózový toleranční test**

Všichni testovaní jednotlivci podstupují 75g orální glukózový toleranční test (oGTT). Během prováděného testu odebíráme pacientovi vzorek venózní plazmy po 0, 30, 60, 90 a 120 minutách pro stanovení plazmové glukózy a inzulínu. Glukózová tolerance je určována od roku 1997 v souladu s diagnostickými kritérii Světové zdravotní organizace (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997). Citlivost na inzulín se vypočítává z hodnot glukózy a inzulínu naměřených během oGTT, jak Matsuda a DeFronzo navrhli (Matsuda, DeFronzo, 1999).

### 3.5.6.4 Euglykemický hyperinzulinemický clamp

Euglykemický hyperinzulinemický clamp je nejužívanější metoda zjištění inzulínové rezistence. Koncentrace inzulínu je klemповána na určité hladině (50 - 5000 mU/l) podáním exogenního inzulínu. Množství exogenní glukózy, které musí být podáno, aby se udržela absolutní euglykémie, vyjadřuje citlivost na inzulín. Čím nižší je potřeba exogenní glukózy, odpovídající jejímu nižšímu perifernímu využití, tím vyšší je inzulínová rezistence pacienta (Racek a spol., 2006).

### 3.5.6.5 Analytické postupy

#### *Plazmová a sérová glukóza, inzulín, volné mastné kyseliny a lipidy*

K určení sérové glukózy se používá tzv. bedside test ( prováděný u lůžka pacienta) za použití bedside glukózového analyzátoru (glukózo-oxidázová metoda; YSI, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, CO, USA). Pro měření inzulínu a celkových volných mastných kyselin (FFA) a lipoproteinů, je krev umístěna na led po odebrání, okamžitě transportována do laboratoře a následně analyzována. Plazmový inzulín je možné určit pomocí mikročasticové enzymové immunoassay Bayer Centaur (Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany) a celkové sérové FFA koncentrace pomocí enzymatické metody (WAKO Chemicals, Neuss, Germany). Sérové koncentrace celkového, HDL- a LDL-cholesterolu mohou být měřeny standardní kalorimetrickou metodou s využitím Bayer analyzátoru (Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany).

#### *Mastné kyseliny v VLDL-TG frakci*

Vzorek odebíraný na lačno je stočen, ihned zamrazen a uskladněn při teplotě -80°C pro následnou analýzu vzorku obsahující mastné kyseliny. Prvně je VLDL frakce odseparována od HDL- a LDL- cholesterolové frakce ultracentrifugací. K tomu je třeba přidat 1,5 ml sodno-chloridového roztoku (1,006 g/mol) k 1,5 ml lidské plazmy. Pak následuje ultracentrifugace při otáčkách 40 000 rpm, teplotě 10°C po dobu 18 hodin s využitím Optima™ Preparative ultracentrifuge (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, CA, USA). Potom hlavní vrstva (VLDL frakce) je oddělena a použita pro další analýzy. VLDL frakce je rozdělena pomocí tenkovrstevné chromatografie do 5 subfrakcí – TG, diglyceridy, FFA, estery cholesterolu a fosfolipidy. Pak je VLDL-TG frakce vyškrábána z TLC desky a přenesena do vialky se zátkou pro přímou transesterifikaci. Methylestery nasycených kyselin jsou měřeny pomocí plynové chromatografie s plamenovou ionizační detekcí.

### *Výpočet indexu desaturázové aktivity*

Poměr C18:1, n-9 / C18:0 stejně jako poměr 20:4 n-6 / 20:3 n-6 a 18:3 n-6 / 18:2 n-6 se vypočítává jako index jaterní SCD-1 ( $\Delta^9$ ),  $\Delta^5$  a  $\Delta^6$  desaturázové aktivity (Stefan a spol., 2001).

## **3.6 Chromatografie**

### **3.6.1 Princip chromatografie**

Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Látky se dělí na základě jejich rozdílné migrace v systému dvou fází, zakotvené (stacionární) a pohyblivé (mobilní).

K rozdílu v migraci dochází na základě rozdílné adsorpce, rozdělovací, výměny iontů nebo efektu molekulárního síta. Podle těchto dělicích pochodů dělíme chromatografii na rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnou, gelovou a afinitní. Síly uplatňující se při tomto procesu mají povahu fyzikální (elektrostatické interakce mezi ionty a dipóly, van der Waalsovy síly,  $\pi$ -interakce) i chemickou.

Stacionární fázi obvykle tvoří tuhý sorbent (prášek nebo pórovitý materiál) nebo kapalina zachycená na nosiči. Touto stacionární fází protéká fáze mobilní, představovaná kapalinou nebo plynem, takže se setkáváme s dvojicemi fází: tuhá látka – plyn, tuhá látka – kapalina, kapalina – plyn a kapalina – kapalina. Podle skupenství mobilní fáze rozeznáváme chromatografii plynovou a kapalinovou (Gasparič a Churáček, 1981).

### **3.6.2 Základní typy chromatografie**

#### **3.6.2.1 Chromatografie adsorpční**

Adsorpční kapalinová chromatografie LSC využívá mezimolekulových přitažlivých sil mezi stacionární fází a analytem.

Jako adsorbenty v LSC se používají zrnité materiály na bázi silikagelu, který jeví kyselé vlastnosti, a méně často na bázi oxidu hlinitého, který má zásadité vlastnosti a někdy uplatňuje nevhodné katalytické účinky. Pro dobrou adsorpci je nutný velký povrch těchto adsorbentů. Kulovité částice adsorbentu v sobě obsahují póry. Částicí adsorbentu může být kulička zhotovená z toho materiálu, kterou prostupují póry v celém objemu, nebo může jít o adsorbent s povrchovou pórovitostí, který obsahuje kulovité inertní jádro, na jehož povrchu je adsorbent.

Využívány jsou také jiné materiály (aktivní uhlí, celulóza, uhličitan vápenatý). Adsorpční aktivita adsorbentu je dána jeho polaritou a počtem adsorpčních míst. Přítomnost vody v systému snižuje jeho aktivitu, neboť se váže na adsorpční místa.

Rozpouštědlo i rozpuštěné látky soutěží o místa na povrchu stacionární fáze. Proto je vhodná volba rozpouštědla důležitá pro eluci analytu. Adsorpční chromatografie je užitečná pro separaci nízko a středně polárních vzorků relativní molekulové hmotnosti do 1000. Nevýhodou této techniky jsou zkreslené píky (s rozmytou frontou nebo chvostující) (Klouda, 2003).

### **3.6.2.2 Chromatografie rozdělovací**

V rozdělovací kapalinové chromatografii LLC se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. Mobilní fáze unáší analyty, stacionární fází je kapalina zakotvená na pevném nosiči. Retenční čas analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné v každé z obou fází rozdílné polarity.

Rozhodující podmínkou v LLC je vzájemná nemísitelnost mobilní a stacionární fáze. To v praxi často nelze zcela splnit, a tak hrozí vymývání stacionární fáze z kolony. Proto se nyní nejčastěji používají jako stacionární fáze kapaliny, které jsou chemicky vázány na nosič. Nosičem je silikagel nebo sklo. Póry prostupují celým objem kuličky nosiče nebo mohou být povrchové. Stacionární fáze se kotví různými reakcemi, například silanizací silanolových skupin trialkylchlorsilany, dialkyldichlorsilany nebo alkyltrichlorsilany.

Rozdělovací chromatografie je obecně nejvhodnější pro látky menších až středních relativních molekulových hmotností. Přítomnost vody není překážkou jako u adsorpční kapalinové chromatografie (Klouda, 2003).

### **3.6.2.3 Iontově-výměnná chromatografie**

Stacionární fází v iontově-výměnné chromatografii (*Ion Exchange Chromatography* – IEC) je měnič iontů. Tím je makromolekulární matrice (polystyren, celulóza, dextran aj.) s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy. Každá funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Ten je vyměňován iontem obsaženým v mobilní fázi. Při tom se uplatňují elektrostatické síly mezi ionty opačného náboje (Coulombovy síly).

Iontově-výměnná chromatografie je hojně využívána jak k separaci slabých organických kyselin a zásad, tak i anorganických iontů. Stala se oblíbenou metodou pro

separaci léčiv, nukleových kyselin, aminokyselin, iontů přechodných kovových prvků, lanthanoidů a aktinoidů (Klouada, 2003).

#### **3.6.2.4 Gelová permeační chromatografie**

V gelové permeační chromatografii (*Gel Permeation Chromatography* – GPC neboli *Size Exclusion Chromatography* – SEC) jsou molekuly separovány podle své velikosti. Dochází k rozdělení složek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu, a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř pórů gelu. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji, a mají tudíž vyšší hodnoty retenčních objemů než větší molekuly.

GPC je vhodná pro analyty relativní molekulové hmotnosti větší než 500, i když jsou separovány molekuly již od  $M_r = 100$ . Metoda je často využívána pro biopolymery, např. proteiny (Klouada, 2003).

#### **3.6.3 Chromatografie na tenké vrstvě**

Při chromatografii na tenké vrstvě dochází k dělení složek při průchodu mobilní fáze tenkou vrstvou jemnozrnného sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze. Tento sorbent je rozprostřen nebo fixován na vhodné podložce, kterou může být skleněná či hliníková deska. Tenké vrstvy se připravují v laboratoři nebo se používá hotových komerčních desek s nanosenou tenkou vrstvou. Nejčastěji používanými materiály pro tenké vrstvy jsou silikagel a oxid hlinitý. Řada preparátů obsahuje také anorganické pojidlo (sádra) (Gasparič a Churáček, 1981).

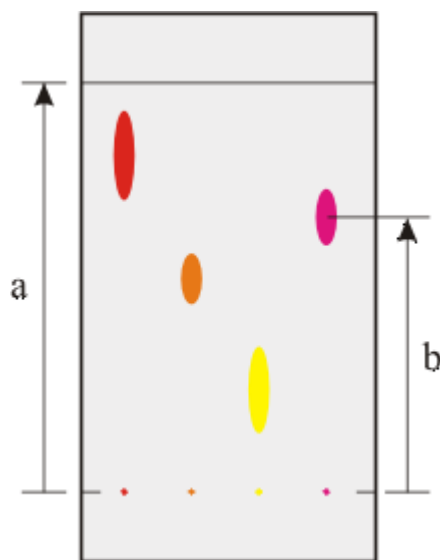
Vzorek se nanáší pomocí kapiláry nebo mikropipety na start, který je blízko jednomu konci plochy. U vysoce účinných tenkých vrstev se nanášení provádí automatickými dávkovači. Tímto koncem se po vyschnutí rozpouštědla ponoří papír nebo podložka s tenkou vrstvou do mobilní fáze. Systém se umístí v prostoru nasyceném parami mobilní fáze.

Mobilní fáze vzlíná papírem nebo tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil, pohybuje se přes start a unáší s sebou složky vzorku tím rychleji, čím méně se poutají na stacionární fázi a čím jsou lépe rozpustné v mobilní fázi. Proto se vzorek rozdělí na zóny obsahující jednotlivé složky.

Pokud složky nejsou tvořeny barevnými látkami, provede se jejich zviditelnění – detekce. Použít můžeme postřik aerosolem činidla, které se složkami reaguje na barevné

sloučeniny nebo pozorováním pod ultrafialovou lampou, kdy fluoreskující látky se nám jeví jako světlé skvrny na tmavém pozadí.

Pro každou látku na chromatogramu je charakteristická její poloha, která se vyjadřuje hodnotou  $R_F$  (retenční nebo-li retardační faktor). Je to poměr vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu (Klouda, 2003).



**Obr. 3.5 TLC chromatogram**

**Zdroj:** <http://www.chem.fsu.edu/chemlab/chm1050lmanual/chromatography/index.html>

**Zkratky:** a – vzdálenost čela rozpouštědla od startu, b – vzdálenost středu skvrny od startu

### 3.6.4 Plynová chromatografie

Nejdůležitější částí chromatografického postupu jsou děje probíhající na koloně. Z tohoto hlediska definujeme plynovou chromatografii jako fyzikálně-chemickou metodu separace látek ze směsi, založenou na distribuci mezi dvě heterogenní fáze. Jedna z těchto fází je vždy nepohyblivá (stacionární), realizovaná sorpčně aktivní látkou, druhá pohyblivá (mobilní) je realizována plynem. Interakce mezi molekulou plynu resp. páry a stacionární fází je dána určitým druhem mezimolekulárních sil (adsorpcí, rozpouštěním) a difúzí.

Podle druhu heterogenní soustavy dělíme plynovou chromatografii na chromatografii systému plyn – tuhá fáze (GSC), kde stacionární fází je povrchově aktivní látka (např. aktivní uhlí, silikagel, molekulová síta, porézní skla) a na chromatografii plyn – kapalina (GLC), kde stacionární fází je kapalinový film zakotvený na inertním nosiči. Z hlediska konstrukce a pracovního postupu při analýze není zásadní rozdíl mezi oběma typy chromatografií.



Podstatný rozdíl tkví ve způsobu separace, neboť v případě GSC je distribuce mezi obě heterogenní fáze založena na adsorpci, zatímco GLC na rozpouštění (Purnell, 1966).

Při vlastním chromatografickém procesu dochází k následujícímu: Ze zdroje plynu, který bývá většinou tlaková nádoba, prochází plyn systémem čistícího a regulačního zařízení, které zbavuje plyn nežádoucích příměsí a zajišťuje jeho konstantní průtok kolonou. Dávkovacím zařízením je vzorek vpraven do proudu nosného plynu a spolu s ním vstupuje do kolony. Za vhodně zvolených podmínek dochází v koloně k rozdělení směsi na jednotlivé složky. Tyto složky jsou proudem nosného plynu převáděny z kolony do detektoru, který bývá spojen přímo se zapisovačem. Součástí přístrojů je i vyhodnocovací zařízení, kterým jsou různé typy integrátorů, resp. počítačů. Dávkovač, kolona a detektor vyžadují termostatování.

Jako analytická metoda umožňuje plynová chromatografie identifikaci a stanovení nejen plynů, ale i všech těch látek, které lze definovaným způsobem převést v páry, ať již jde o kapaliny nebo látky tuhé. Jako preparativní metoda je používána k izolaci čistých látek v gramových množstvích (Smolková a spol., 1983).

## 4 Experimentální část

### 4.1 Popis výběru jedinců do souboru

Výběr byl vytvořen ze vzorků EDTA plazmy diabetiků z Oddělení klinické biochemie Krajské nemocnice Pardubice a.s., které byly odeslány na chromatografickou analýzu do Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Eberhard-Karl-Universität v Tübingenu v rámci Grantu evropské unie s názvem CARE-MAN. Vzorky byly zpracovávány v období od listopadu 2008 do ledna 2009. Do výběru bylo zařazeno 50 anonymních subjektů bez ohledu na věk či pohlaví. Předpokladem zařazení byl informovaný souhlas jedince.

Vybraným jedincům byla odebrána plazma žilní krve do speciálních zkumavek pro diagnostiku diabetu s antiglykolytickým činidlem fluoridem sodným a s EDTA (kyselina ethyldiamintetraoctová). Dále se též pracovalo se sérem pro stanovení koncentrace celkových lipidů.

Vzorky byly zmrazeny na teplotu  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a při této teplotě uchovávány až do zpracování. Po převozu na Katedru biologických a biochemických věd fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice (KBBV) byly zpracovány metodou tenkovrtevné a plynové chromatografie.

Pro přesnější vyhodnocení jednotlivých vzorků byli pacienti rozděleni do tří skupin podle hodnot glukózy a glykovaného hemoglobinu na zdravé jedince, středně nemocné diabetiky a těžce nemocné diabetiky. Glukóza nám ukazuje okamžitý stav pacienta. Nevýhodou je, že hladina glukózy může být z velké části ovlivněna nesprávným stravováním během průběhu onemocnění, nedodržením lačnění před vlastním vyšetřením a podobně. Naproti tomu glykovaný hemoglobin je mnohem dlouhodobějším a přesnějším ukazatelem o průběhu onemocnění.

**Tab. 4.1 Rozdělení pacientů do tří skupin**

	<b>glukóza (mmol/l)</b>	<b>glyk. hemoglobin (%)</b>
<b>zdraví</b>	3,1 - 6,0	2,8 - 4,5
<b>středně nemocní diabetici</b>	6,1 - 10,0	4,6 - 7,0
<b>těžce nemocní diabetici</b>	10,1 a více	7,1 a více

## 4.2 Metoda tenkovrstevné chromatografie

### 4.2.1 Přístrojové vybavení

- Centrifuge type MPW-340  
Výrobce: Mechanika Precyzna, Polsko.  
Distributor: Servis Unimed, Vestec 41, 25242 Vestec u Prahy, ČR.
- Spektrofotometr, Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, DDR.
- Třepačka Vortex typ: REAX top.  
Výrobce: Heidolph instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach, Německo.
- Odpařovací termostat TERMOVAP TV 10.  
Výrobce: ECOM s.r.o, Americká 3, 120 35 Praha 2, ČR.
- Sušárna HS 62 A.  
Výrobce: Chirana, CHIRANA GROUP, a.s. Velká 2984/23, 70200 Ostrava – Moravská Ostrava, ČR.
- Pipety – 100 $\mu$ l, pipety pro organiku 250  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, skleněné pipety 1ml, 5ml, 10ml.

### 4.2.2 Používaný materiál

#### **Extrakční směs: chloroform - methanol.**

- Chloroform p. a., balení 1000 ml, destilační rozmezí 59,5 - 62 °C, hustota 1,470 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.
- Methanol p.a., balení 1000 ml, obsah 99 %, hustota 0,790 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.

#### **Dusík.**

- Dusík 4,6 (99,9 %).  
Výrobce a dodavatel: Linde Technoplyn, U technoplynu 1324, 198 00 Praha 1, ČR.

#### **Standard.**

- Standard Reprochol - lidské nebo koňské sérum se zvýšenou hodnotou cholesterolu.  
Číslo šarže: 201181195, balení 8 x 5 ml.  
Výrobce: IMUNA, š.p., Šarišské Michalany.

### **Chromatografická soustava: hexan - diethylether - kyselina octová**

- Hexan p.a., balení 900 ml, obsah 99 %, hustota 0,660 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.
- Diethylether, balení 1000 ml, bod varu 34 - 35 °C, hustota 0,710 kg/l.  
Výrobce: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Německo.  
Distributor: MERCK s.r.o., Zděbradská 72, 251 01 Říčany - Jazlovce, ČR.
- Kyselina octová p.a., balení 900 ml, obsah 99 %, hustota 1,050 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.

### **Chromatografické desky.**

- TLC plate 20 x 20 cm, No. 1.05721, Silica gel 60.  
Výrobce: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Německo.  
Distributor: MERCK, s.r.o, Zděbradská 72, 251 01 Říčany - Jazlovce, ČR.

### **Detekční činidlo: kyselina fosfomolybdenová (20 % roztok) v ethanolu.**

- Kyselina fosfomolybdenová.  
Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Riedstrasse 2, 89555 Steinheim, Německo.  
Distributor: SIGMA-ALDRICH s.r.o., Pobřežní 46, 186 21 Praha 8, ČR.
- Ethanol pro UV spektroskopii, balení 1000 ml, hustota 0,810 kg/l.  
Výrobce: LACHEMA Brno, Karásek 1, 62133 Brno, ČR.

### **Stanovení jednotlivých frakcí lipidů s kyselinou sírovou a standardem.**

- Kyselina sírová p.a., hustota 1,830 g/l.  
Výrobce: PENTA, ing. Petr Švec, Výroba a prodej čistých, farmaceutických a speciálních chemikálií, Výrobní devize Chrudim, IČ. 10140751, ČR.
- Směsný standard Dade: (kyselina stearová 10 %, kyselina palmitová 10 %, kyselina olejová 80 %) celková koncentrace 8 g/l.  
Souprava LACHEMA - BIO-TEST "Celkové lipidy" (TL 180) Kat. č. 1135801,  
Výrobce Lachema Diagnostica, Karásek 1, 621 33 BRNO, ČR.

### **Fosfovanilinové činidlo: kyselina o-fosforečná - vanilinum.**

- Kyselina o-fosforečná 85 % p.a., balení 1000 ml, obsah 84 - 86 %, hustota 1,710 kg/l.

Výrobce: LACHEMA Brno, Karásek 1, 62133 BRNO, ČR.

- Vanilinum, balení 10 g.

Výrobce: Zdravotnické zásobování, sklad Říčany u Prahy, atest: SUKL 3241/84.

### **4.2.3 Pracovní postup**

#### **4.2.3.1 Extrakce lipidů**

Do centrifugační zkumavky byly válečkem odměřeny 4 ml směsi chloroform-methanol (1:1) a přidáno 0,2 ml séra (standardu). Směs byla protřepána, uzavřena a centrifugována na stolní centrifuze při 3000 rpm po dobu 5 minut. Horní vrstva (3,5 ml) byla opatrně odsána pomocí pipety do jiné zkumavky. Bylo zapnuto odsávání v digestoři a při 60 °C bylo během 15 min. provedeno odpaření pod dusíkem do sucha.

#### **4.2.3.2 Chromatografie a identifikace kyselinou fosfomolybdenovou**

- **Příprava mobilní fáze:**

160 ml hexan, 40 ml diethylether, 6 ml kyselina octová (cca 98 %). Tato směs byla v odměrném válci řádně promíchána a opatrně nalita do chromatografické vany. Vana byla uzavřena a ponechána 30 - 40 minut nasytit.

- **Příprava chromatografické desky:**

Na TLC desky byl obyčejnou tužkou označen rámeček: dolní okraj 2,5 cm, horní okraj a strany 1 cm. Vnitřní plocha byla rozdělena na 5 polí po 3,6 cm a nahoře byly jednotlivé dráhy označeny. Při označování bylo dbáno, aby se zejména startovní čára nepoškrábala.

- **Postup chromatografie:**

Odpařený extrakt byl rozpuštěn v 100 µl směsi chloroform-methanol (2:1). Tento celý objem byl nanesen postupně ve třech dávkách pasteuovou pipetou na chromatografickou desku a po každém nanesení se nechalo rozpouštědlo odpařit. Potom byla chromatografická deska vložena do nasycené vany, rychle uzavřena a asi 60 min. nechána vyvíjet do doby, než čelo mobilní fáze dosáhlo 1 cm od horního okraje desky. Poté byla deska vyjmuta z vany a nechána v digestoři vysušit.

- **Příprava detekčního činidla - kyselina fosfomolybdenová 0,05 mol/l:**

Z 20 % zásobního roztoku firmy Aldrich bylo odměřeno 10 ml a přidáno 10 ml ethanolu. Detekční činidlo bylo nalito do rozprašovače a rovnoměrně jím bylo postříkáno pole se standardem na chromatografické desce. Deska byla vložena na 5 - 10 minut do sušárny vyhřáté na cca 60 °C.

#### **4.2.3.3 Izolace jednotlivých složek lipidů**

Lipidy byly chromatograficky rozděleny na 5 složek seřazených podle vzrůstajícího RF: fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu. Podle standardu byly označeny jednotlivé složky obyčejnou tužkou tak, aby horní okraj místa obsahující označovanou složku byl 0,5 cm nad skvrnou standardu a dolní okraj rovněž 0,5 cm pod skvrnou standardu. Označené složky byly vyškrábány z chromatografické desky a pomocí špachtle přeneseny do předem označených zkumavek s uzávěrem.

#### **4.2.3.4 Extrakce lipidů z jednotlivých vrstev a stanovení jejich koncentrace**

Ke každé složce lipidů byly přidány do zkumavky 4 ml směsi chloroform-methanol (1:1). Uzavřené zkumavky byly 2 min. intenzivně třepány, ponechány 2 min. stát a centrifugovány 5 min. při 3000 rpm. Z každé zkumavky byly odpipetovány 2 ml supernatantu a do čistých zkumavek a při pokojové teplotě byly asi 20 minut odpařovány do sucha pod dusíkem v uzavřené digestoři.

#### **4.2.3.5 Stanovení koncentrace jednotlivých složek sérových lipidů se standardem**

Do všech zkumavek s odparkem bylo přidáno po 1,5 ml kyseliny sírové. Standard byl připraven smícháním 0,02 ml činidla 1 (standard s koncentrací lipidů 8 g/l) s 1,5 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Jako blank bylo použito 1,5 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Všechny zkumavky (blank i standard) byly promíchány a 15 minut zahřívány na vroucí vodní lázni. Po ochlazení zkumavek v proudu studené vody bylo z každé odpipetováno do nových zkumavek 0,1 ml hydrolyzátu a přidáno 1,5 ml činidla 2 (fosfovaniliové činidlo). Vše bylo ponecháno reagovat 50 minut při laboratorní teplotě. Pak byla do 10 minut změřena absorbance vzorků a standardu proti blanku, při vlnové délce 530 nm.

- **Příprava fosfovanilinového činidla:**

Bylo naváženo 1,52 g vanilinu a rozpuštěno ve 225 ml destilované vody. Za stálého míchání bylo přidáno 775 ml 85 % kyseliny o-fosforečné.

- **Výpočet:**

Vyčíslení koncentrace celkových lipidů bylo provedeno podle vzorce:

$$CL = 8 * (AVZ / AST),$$

kde CL jsou celkové lipidy v g/l, AVZ je absorbance vzorků proti blanku a AST absorbance standardu proti blanku.

## **4.3 Metoda plynové chromatografie**

### **4.3.1 Přístrojové vybavení**

- Plynový chromatograf firmy Hewlett - Packard 5890 s autosamplerem
- Kapilární kolona firmy Restek RTx - 2330 (10% cyanopropylphenyl, 90% biscyanopropyl polysiloxane, 60 m, 0,25 mm vnitřní průměr, 0,2 µm tloušťka filmu, Restek, Bellefonte, PA, USA )
- Zkumavky s vloženým mikromíchadlem a silikagelovou vrstvou, vialky
- Třepačka Vortex typ: REAX top.  
Výrobce: Heidolph instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Str. 12, 91126 Schwabach, Německo.
- Odpařovací termostát TERMOVAP TV 10.  
Výrobce: ECOM s.r.o, Americká 3, 120 35 Praha 2, ČR.
- Sušárna HS 62 A.  
Výrobce: Chirana, CHIRANA GROUP, a.s. Velká 2984/23, 70200 Ostrava – Moravská Ostrava, ČR.
- Pipety – 100µl, pipety pro organiku 250 µl, 500 µl, skleněné pipety 1ml, 5ml, 10ml.

### **4.3.2 Používaný materiál**

- deproteinační roztok (2-propanol, heptan, 2M kyselina fosforečná (40:20:1))
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> p.a., obsah 99.0%  
Výrobce: SIGMA-ALDRICH, Německo

#### **Extrakční směs: chloroform - methanol.**

- Chloroform p. a., balení 1000 ml, destilační rozmezí 59,5 - 62 °C, hustota 1,470 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.
- Methanol p.a., balení 1000 ml, obsah 99 %, hustota 0,790 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.

### **Chromatografická soustava: hexan - diethylether - kyselina octová**

- Hexan p.a., balení 900 ml, obsah 99 %, hustota 0,660 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.
- Diethylether, balení 1000 ml, bod varu 34 - 35 °C, hustota 0,710 kg/l.  
Výrobce: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Německo.  
Distributor: MERCK s.r.o., Zděbradská 72, 251 01 Říčany - Jazlovce, ČR.
- Kyselina octová p.a., balení 900 ml, obsah 99 %, hustota 1,050 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.

### **Chromatografické desky.**

- TLC plate 20 x 20 cm, No. 1.05721, Silica gel 60.  
Výrobce: MERCK KGaA, 64271 Darmstadt, Německo.  
Distributor: MERCK, s.r.o, Zděbradská 72, 251 01 Říčany - Jazlovce, ČR.

### **Detekční činidlo: kyselina fosfomolybdenová (20 % roztok) v ethanolu.**

- Kyselina fosfomolybdenová.  
Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Riedstrasse 2, 89555 Steinheim, Německo.  
Distributor: SIGMA-ALDRICH s.r.o., Pobřežní 46, 186 21 Praha 8, ČR.
- Ethanol pro UV spektroskopii, balení 1000 ml, hustota 0,810 kg/l.  
Výrobce: LACHEMA Brno, Karásek 1, 62133 Brno, ČR.

### **Extrakční směs: toluen - methanol.**

- Methanol p.a., balení 1000 ml, obsah 99 %, hustota 0,790 kg/l.  
Výrobce: Lach-Ner, s.r.o, Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR.
- Toluén p.a., 99.8%, hustota 0,865 kg/l.  
Výrobce: : SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Německo

### **Dusík.**

- Dusík 4,6 (99,9 %).  
Výrobce a dodavatel: Linde Technoplyn, U technoplynu 1324, 198 00 Praha 1, ČR.



### **4.3.3 Pracovní postup**

#### **4.3.3.1 Chromatografie na tenké vrstvě**

Do centrifugační zkumavky bylo k 2,5 ml deproteinačního roztoku (2-propanol, heptan, 2M kyselina fosforečná (40:20:1)) přidáno 0,5 ml EDTA plasmy. Směs byla míchána pomocí mixeru vortex po dobu 10 minut. K obsahu ve zkumavce byl přidán 1 ml směsi toluen-methanol (4:1) a 1,5 ml destilované H<sub>2</sub>O. Směs byla centrifugována 5 minut při 4000 rpm. Horní organická vrstva byla odpipetována a odpařena pod N<sub>2</sub> atmosférou do sucha při 40 °C. Odparek byl rozpuštěn v 80 µl směsi CHCl<sub>3</sub> – CH<sub>3</sub>OH (2:1) a vnesen pasteurovou pipetou na start preparativní chromatografické desky o velikosti 20 x 20 cm (Kieselgel 60, Merck KGaA, Darmstadt). Jako mobilní fáze byla použita směs 160 ml n-hexan, 40 ml diethyletheru a 6 ml kyseliny sírové. Pomocí tenkovrstvé chromatografie byla deproteínovaná plasma rozdělena do následujících frakcí: fosfolipidy (PL), diglyceridy (DG), volné mastné kyseliny (VMK), triglyceridy (TG) a estery cholesterolu (ECH). Poloha jednotlivých frakcí byla identifikována postříkáním současně děleného standardu plazmy kyselinou fosfomolybdenovou. Odpovídající frakce byly vyškrabány i se silikagelovou vrstvou a přeneseny do pyrexových zkumavek.

#### **4.3.3.2 Derivatizace - převedení na methylestery**

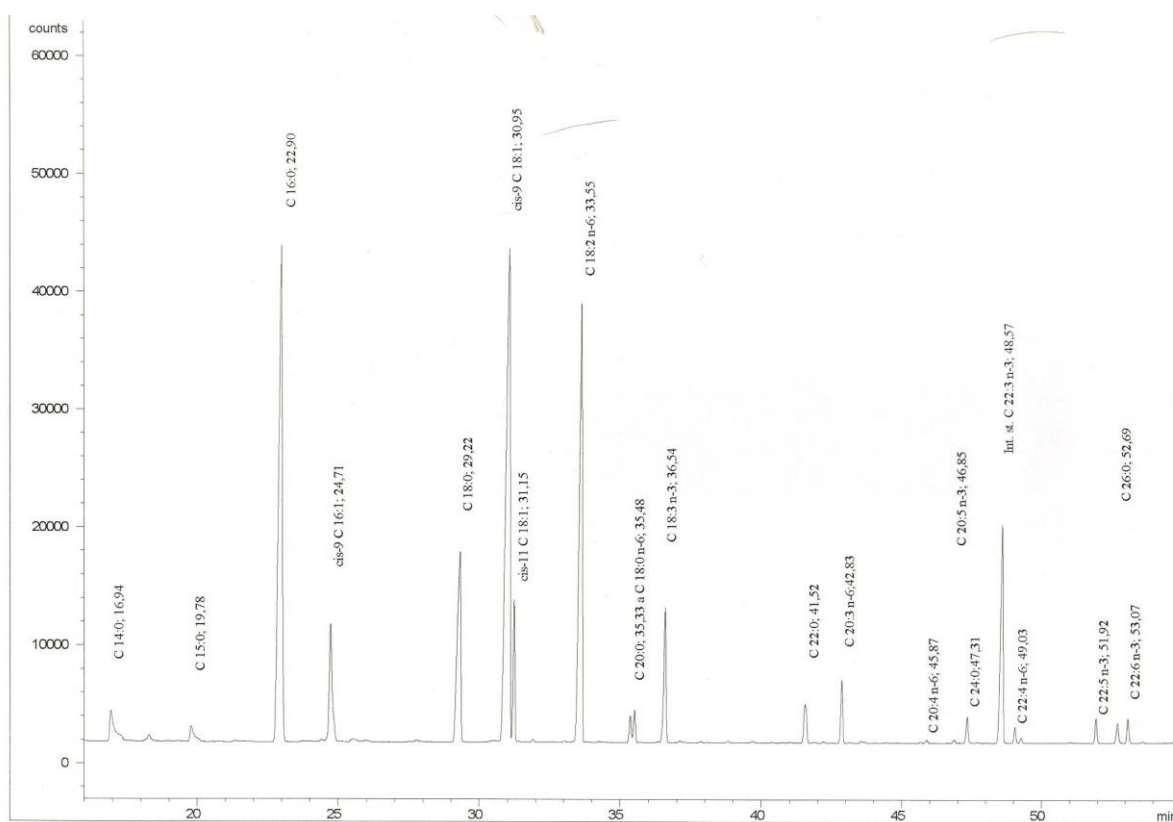
Do pyrexové zkumavky s vloženým mikromíchadlem a silikagelovou vrstvou byl přidán 1 ml roztoku inertního standardu o koncentraci 10 µg/ml (cis-13, 16, 19-docosatrienová kyseliny) a 1 ml směsi toluen – methanol (4:1). Zkumavka byla vložena do termobloku a bylo do ní přidáno 200 µl acetylchloridu jako katalyzátoru esterifikace. Zkumavka byla uzavřena šroubovacím teflonovým uzávěrem a zahřívána 1 hod při 100°C za stálého míchání magnetickým míchadlem. Po uplynutí reakční doby byl obsah zkumavky ochlazen (stáním v digestoři) a neutralizován 5 ml 6 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, vzniklá směs byla 2 min. míchána a pak 10 min centrifugována při 4000 rpm.. Horní fáze byla odpipetována a odpařena pod N<sub>2</sub> atmosférou při pokojové teplotě na 80 µl. Tento roztok byl převeden do vialek a analyzován pomocí plynové chromatografie.

#### **4.3.3.3 Plynová chromatografie**

Analýza byla provedena pomocí plynového chromatografu firmy Hewlett – Packard 5890 s autosamplrem. K analýze byla použita kapilární kolona firmy Restek RTx – 2330 (10% cyanopropylphenyl, 90% biscyanopropyl polysiloxane, 60 m, 0,25 mm vnitřní průměr,

0,2 µm tloušťka filmu, Restek, Bellefonte, PA, USA ). Teplota nástřiku byla 230 °C, teplota detektoru 250 °C. Teplotní program analýzy: počáteční teplota 130 °C (2 min ), dále teplotní gradient 2 °C/min, finální teplota 258 °C (6 min). Doba analýza jednoho vzorku včetně promytí 80 min.

K přiřazení jednotlivých píků mastných kyselin byly použity standardy mastných kyselin v lidském albuminu a poolové EDTA plasmě, všechny analýzy byly prováděny s použitím vnitřního standardu.



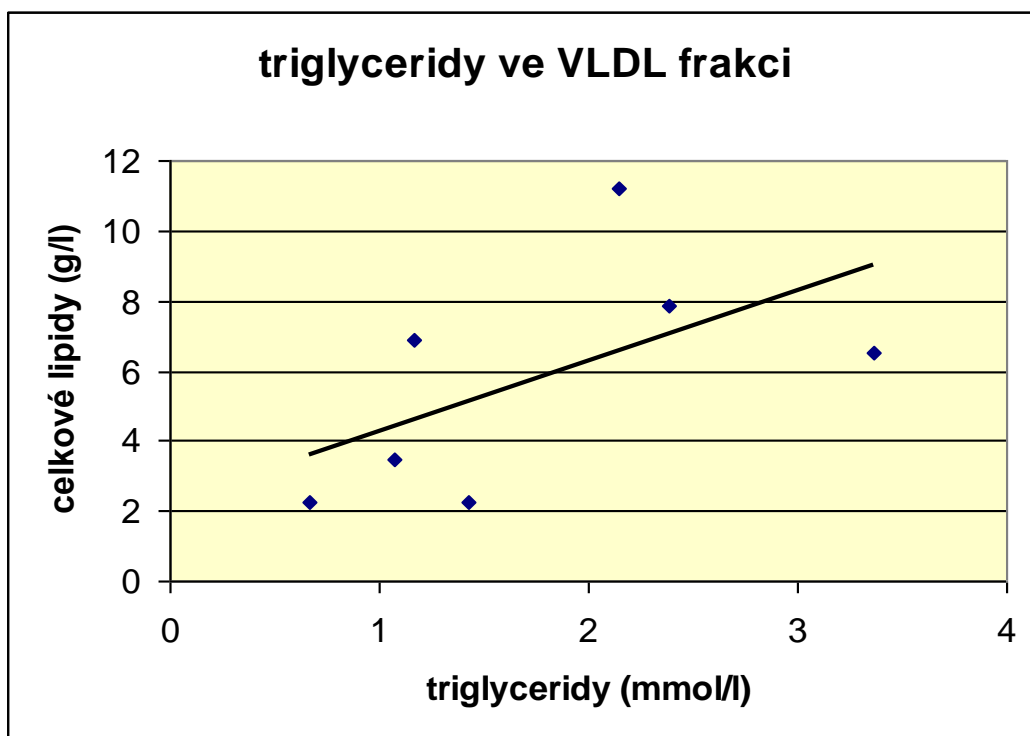
Obr. 4.1 Ukázka chromatogramu plazmatických mastných kyselin

## 5 Výsledková část

### 5.1 Celkové lipidy vs. jednotlivé frakce lipidů

Metoda tenkovrstevné chromatografie byla zvolena jako pomocná metoda, kterou jsme se snažili odhalit vztah mezi celkovými lipidy a jednotlivými frakcemi lipidů (fosfolipidy, diglyceridy, volné mastné kyseliny, triglyceridy a estery cholesterolu), po předchozím rozdělení séra ultracentrifugací na VLDL, LDL, HDL<sub>2</sub> a HDL<sub>3</sub>, ve vztahu k rozvoji onemocnění diabetes mellitus 2. typu. Bylo však zjištěno, že získané výsledné koncentrace lipidů jsou nepoužitelné (obr. 5.1) díky velkým ztrátám, které vznikaly během stanovení.

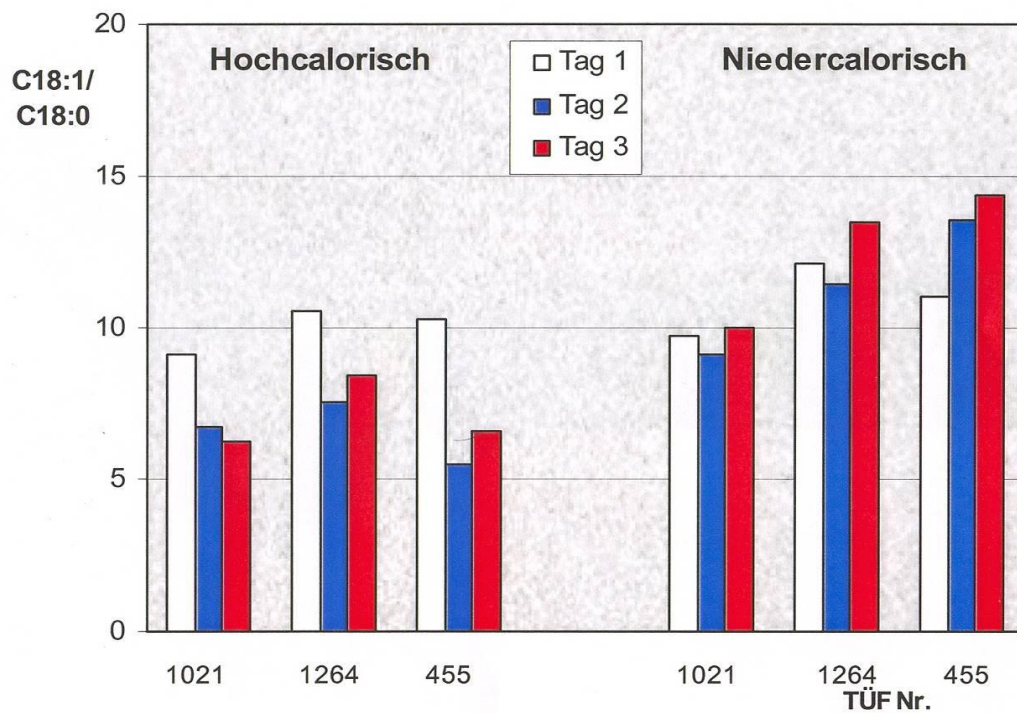
Samotná technika tenkovrstvené chromatografie byla proto označena jako velmi nevhodná pro toto stanovení a dále se už jen využívala pro počáteční přípravu vzorků (rozdělení lipidů na PL, DG, VMK, TG, ECH) pro plynovou chromatografii.



Obr. 5.1 Závislost TG na celkových lipidech ve VLDL frakci

## 5.2 Vliv potravy na aktivitu $\Delta 9$ -desaturázy ve VLDL frakci u zdravých jedinců

Aktivita  $\Delta 9$ -desaturázy u zdravých jedinců se mění v závislosti na podávané stravě. U podávané nízkokalorické stravy je patrný výrazný vzestup této aktivity, která byla měřena po dobu tří dnů. Naproti tomu vysokokalorická strava u zdravých jedinců způsobuje pokles hodnot  $\Delta 9$ -desaturázy.



Obr. 5.2 Vliv vysokokalorické a nízkokalorické stravy na aktivitu  $\Delta 9$ -desaturázy ve VLDL frakci u zdravých jedinců

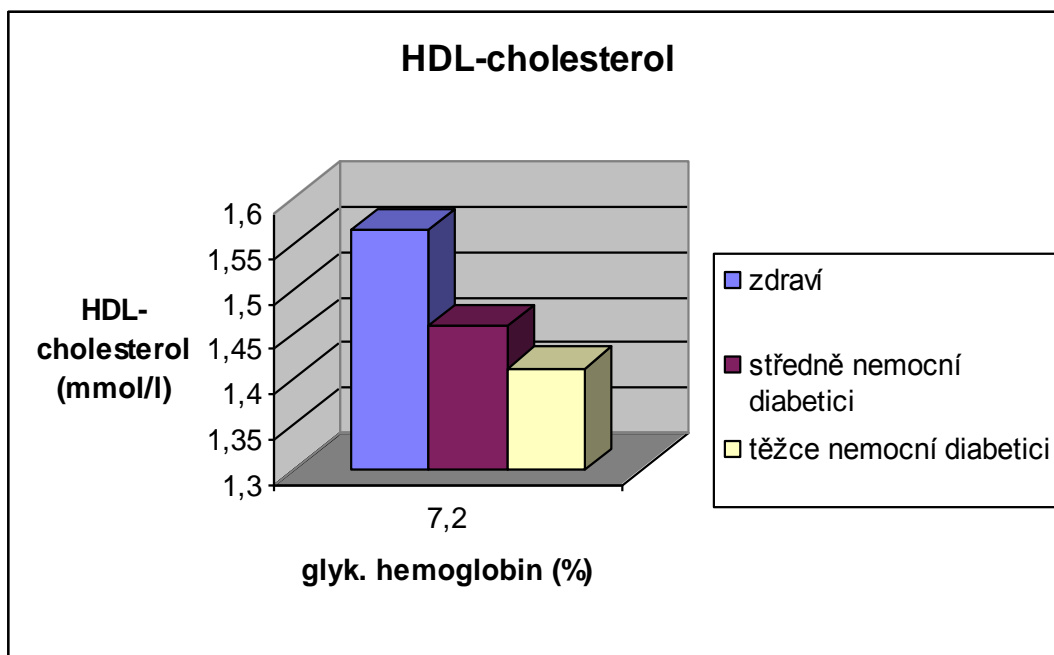
### 5.3 Vyhodnocení HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, triglyceridů ve VLDL frakci

Hladina HDL-cholesterolu v krvi klesá od zdravých jedinců (1,57 mmol/l), s hodnotami glykovaného hemoglobinu v referenčním rozmezí, k těžce nemocným diabetikům (1,41 mmol/l).

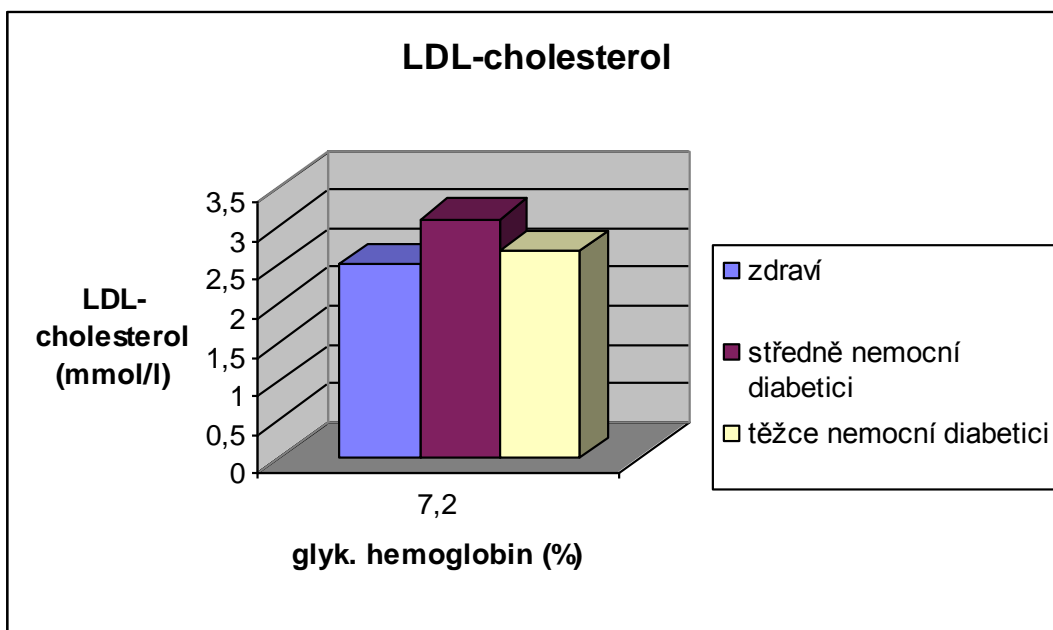
V případě LDL-cholesterolu pozorujeme mírné zvýšení hodnot u diabetiků narozdíl od zdravých jedinců. Hodnota LDL-cholesterolu u zdravých jedinců činí 2,51 mmol/l, u středně nemocných diabetiků 3,09 mmol/l a u těžce nemocných diabetiků dosahuje 2,67 mmol/l.

Hladina triglyceridů má také opačný spád než naměřený HDL-cholesterol v krvi. Roste z hodnoty 1,59 mmol/l až na hodnotu 1,10 mmol/l, která se vyskytuje u zdravých jedinců.

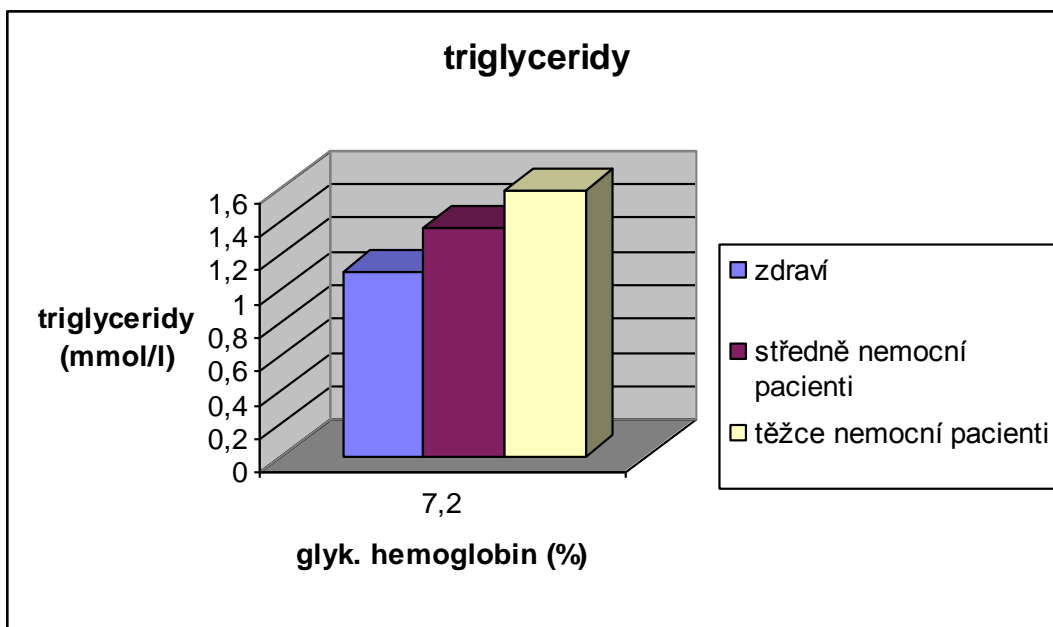
Tyto závislosti na glykovaném hemoglobinu svědčí o tom, že jsme pacienty na počátku prováděných měření dobře rozdělili do skupin na zdravé, středně nemocné a těžce nemocné diabetiky.



**Obr. 5.3 Graf závislosti HDL-cholesterolu ve VLDL frakci na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů**



**Obr. 5.4** Graf závislosti LDL-cholesterolu ve VLDL frakci na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů



**Obr. 5.5** Graf závislosti triglyceridů ve VLDL frakci na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů

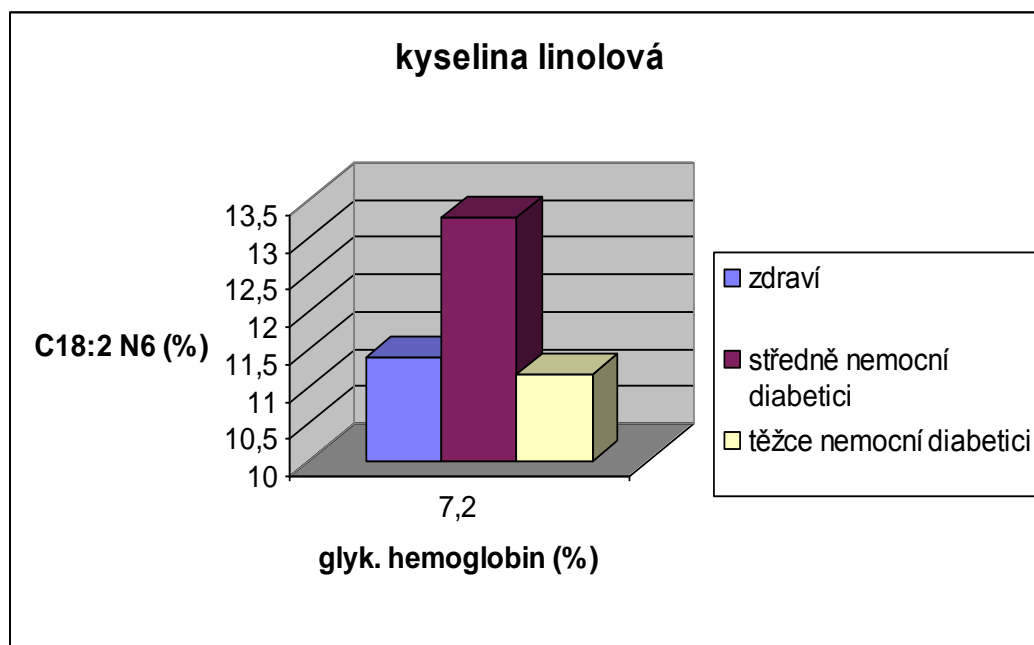
## 5.4 Vyhodnocení nenasycených mastných kyselin ve VLDL frakci a porovnání s LDL frakcí

Kyselina linolová (18:2 N6) podléhá desaturaci  $\Delta 6$ -desaturázou a stává se prekurzorem pro kyselinu  $\gamma$ -linolenovou (18:3 N6). Z jejich závislosti na glykovaném hemoglobinu (obr. 5.4 a obr. 5.5) můžeme pozorovat, zda dochází k porušení desaturace či nedochází.

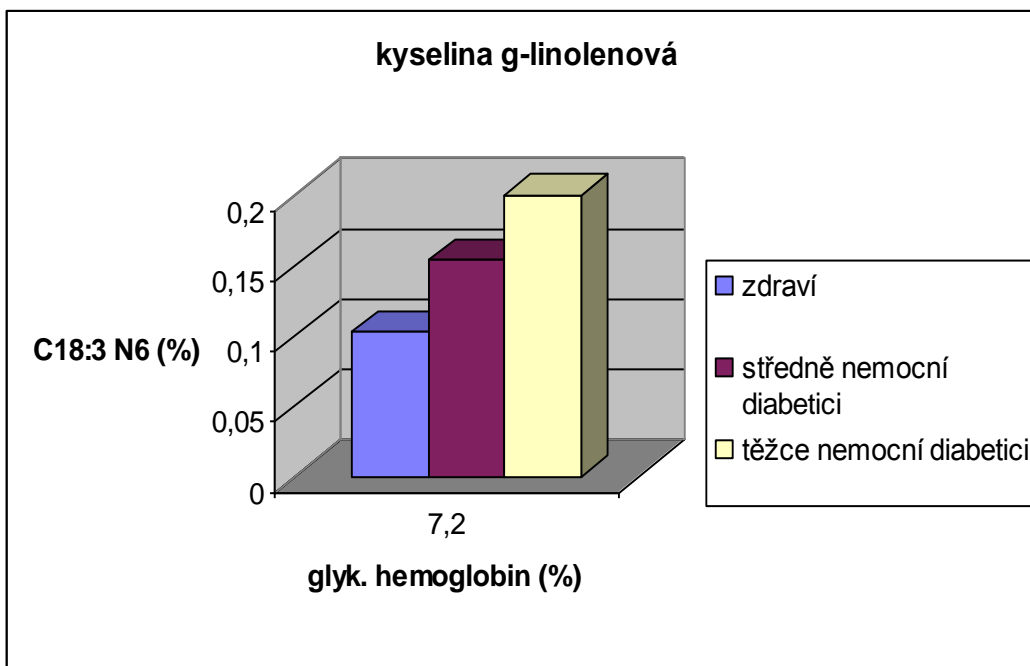
Kyselina linolová dosahuje nejvyšších hodnot u skupiny středně nemocných diabetiků a to 13,16 %. Nejnižší hodnoty nacházíme u těžce nemocných diabetiků, 11,17 %.

U kyseliny  $\gamma$ -linolenové ale nejvyšší hladinu pozorujeme u skupiny těžce nemocných diabetiků, 0,2 %, a nejnižší u zdravých jedinců a to 0,10 %.

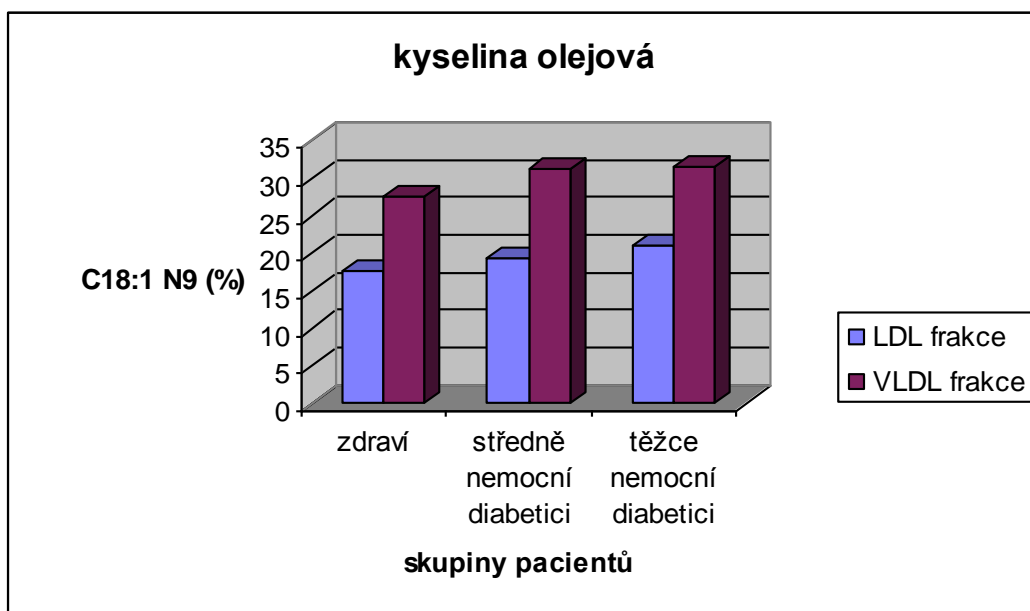
Kyselina olejová (18:1 N9) má vzestupný charakter ve VLDL frakci. U zdravých jedinců je její zastoupení v krvi 27,62 %, u středně nemocných pacientů 31,22 % a u těžce nemocných diabetiků 31,62 %. V LDL frakci je též patrný nárůst hladiny kyseliny olejové. U zdravých jedinců se jedná o hodnotu 17,50 %, u středně nemocných diabetiků 19,46 % a u těžce nemocných diabetiků dosahuje 20,98 %.



**Obr. 5.6** Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny linolové ve VLDL frakci v závislosti na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů



**Obr. 5.7** Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny  $\gamma$ -linolenové ve VLDL frakci v závislosti na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů



**Obr. 5.8** Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny olejové ve VLDL a LDL frakci v závislosti na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů



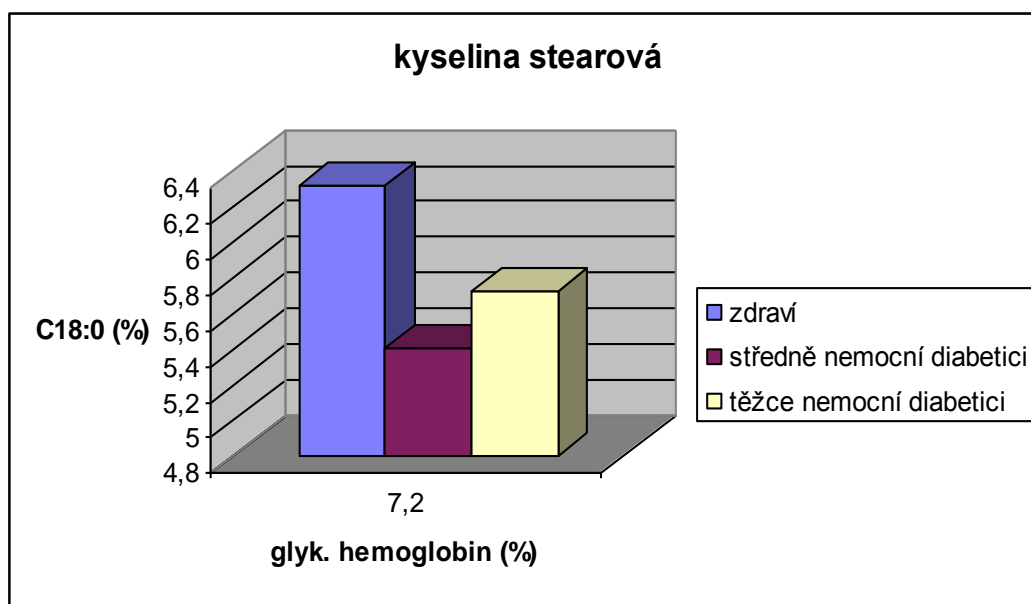
## 5.5 Vyhodnocení nasycených mastných kyselin ve VLDL frakci a porovnání s LDL frakcí

Ze závislosti na glykovaném hemoglobinu u kyselin, jako je kyselina stearová (18:0) a kyselina behenová (22:0), můžeme pozorovat poklesy procentuálního obsahu v EDTA plazmě u diabetiků oproti zdravým jedincům.

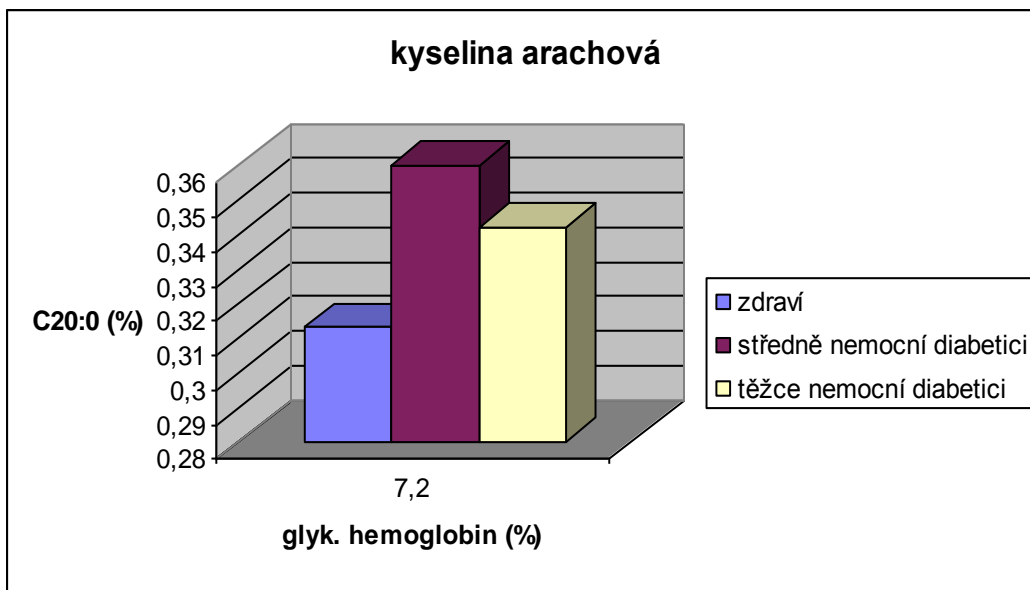
Kyselina stearová klesá ze 6,32 %, přes 5,41 % na 5,73 % (ve směru zdraví jedinci - těžce nemocní diabetici).

Hodnoty kyseliny arachové (20:0) u zdravých jedinců činí 0,31 %, u středně nemocných diabetiků dochází k mírnému zvýšení na 0,36 % a u těžce nemocných diabetiků nastává opět nepatrný pokles na 0,34 %.

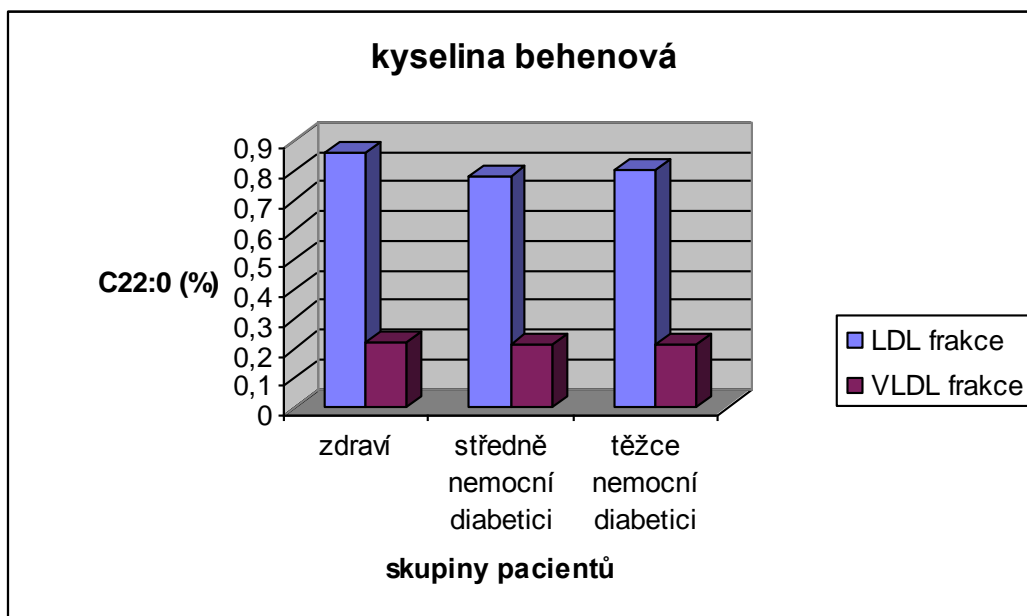
Obr. 5.8 znázorňuje porovnání kyseliny behenové ve VLDL a LDL frakci. V obou případech je rozdíl mezi zdravými jedinci, středně nemocnými diabetici a těžce nemocnými diabetici minimální (VLDL: 0,22 %, 0,21 %, 0,21 %; LDL: 0,86 %, 0,78 %, 0,80 %), pouze pozorujeme to, že LDL frakce nese celkově vyšší zastoupení této kyseliny.



**Obr. 5.9 Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny stearové ve VLDL frakci v závislosti na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů**



**Obr. 5.10** Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny arachové ve VLDL frakci v závislosti na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů



**Obr. 5.11** Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny behenové ve VLDL a LDL frakci v závislosti na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů

## 5.6 Vyhodnocení desaturáz a elongáz ve VLDL frakci a porovnání s LDL frakcí

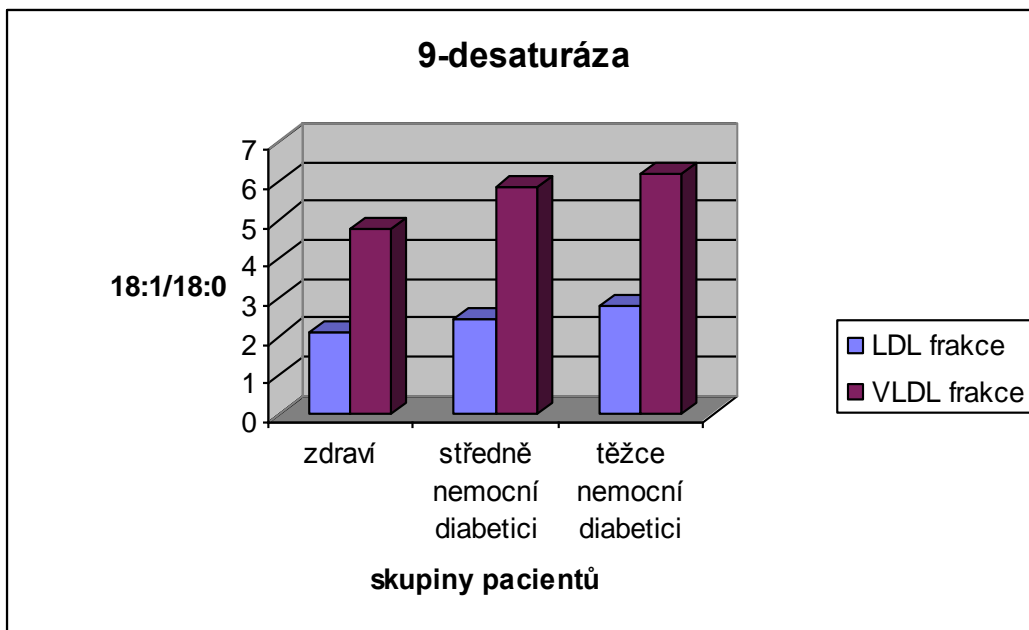
Z jednotlivých níže zobrazených závislostí na glykovaném hemoglobinu u jednotlivých skupin pacientů je patrné, že aktivity desaturáz a elongáz mají podobný charakter stoupání a klesání. Liší se od sebe hodnotou svých aktivit, ať už přímo mezi sebou, nebo mezi jednotlivými frakcemi VLDL a LDL.

Aktivita  $\Delta 9$ -desaturázy (18:1/18:0) se ve VLDL frakci zvyšuje směrem k těžce nemocným diabetikům, kde dosahuje hodnoty 6,19. Ve LDL frakci má  $\Delta 9$ -desaturáza stejný směr stoupání ale v nižších hodnotách.. U zdravých jedinců je aktivita 2,1, u středně nemocných diabetiků 2,45 a u těžce nemocných diabetiků dosahuje hodnoty až 2,78.

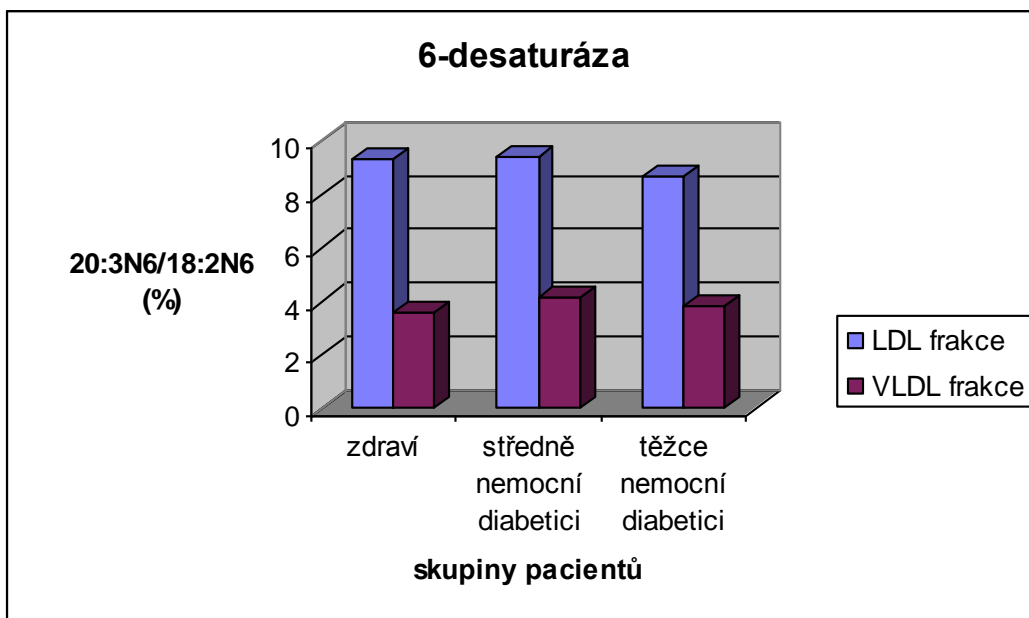
V případě  $\Delta 6$ -desaturázy (20:3N6/18:2N6) je aktivita výrazně vyšší ve LDL frakci. Velmi mírně klesá od zdravých jedinců (9,35) k těžce nemocným diabetikům (8,67). Ve VLDL frakci pozorujeme zhruba o polovinu menší aktivity - u zdravých jedinců je to 3,60, u středně nemocných pacientů 4,13 a u těžce nemocných pacientů 3,84.

$\Delta 5$ -desaturáza (20:4N6/20:3N6) má klesající charakter v obou frakcích. Ve VLDL frakci je její aktivita u zdravých jedinců 9,03 a klesá na hodnoty 4,83 a 6,32 u diabetiků středně a těžce nemocných. Ve LDL frakci jsou potom tyto aktivity 5,25; 2,85 a 2,99.

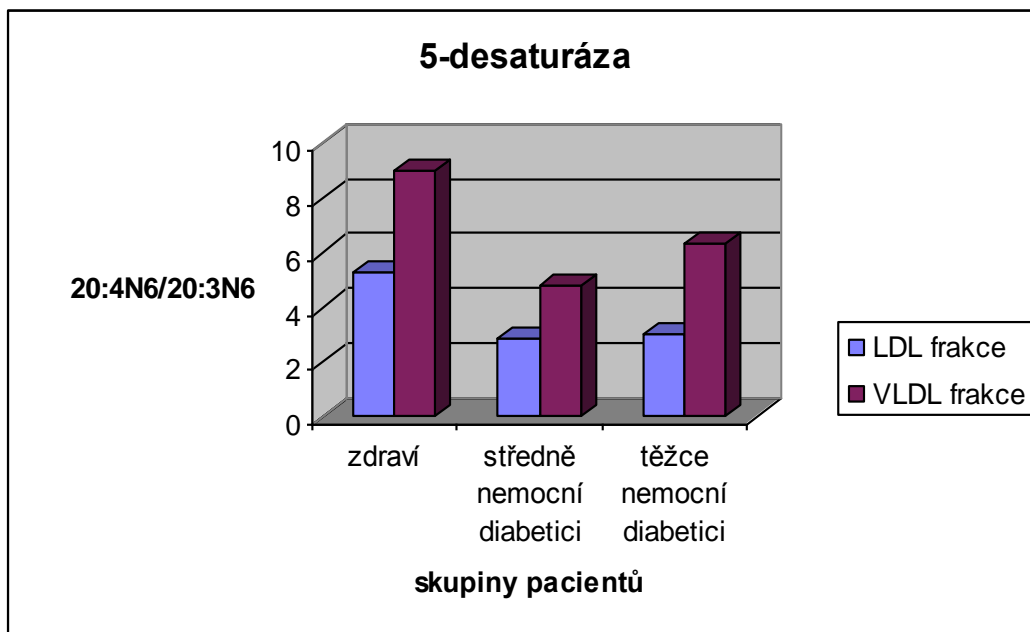
Poslední závislost na glykovaném hemoglobinu popisuje elongázu (18:0/16:0) opět v obou sledovaných frakcích. Stejně jako  $\Delta 5$ -desaturáza a  $\Delta 6$ -desaturáza má i elongáza sestupnou podobu. Ve VLDL frakci je aktivita u zdravých jedinců 18,88, u středně nemocných diabetiků 16,21 a u těžce nemocných diabetiků činí 17,15. Ve LDL frakci aktivita elongázy dosahuje vyšších hodnot (32,18; 30,31 a 27,95).



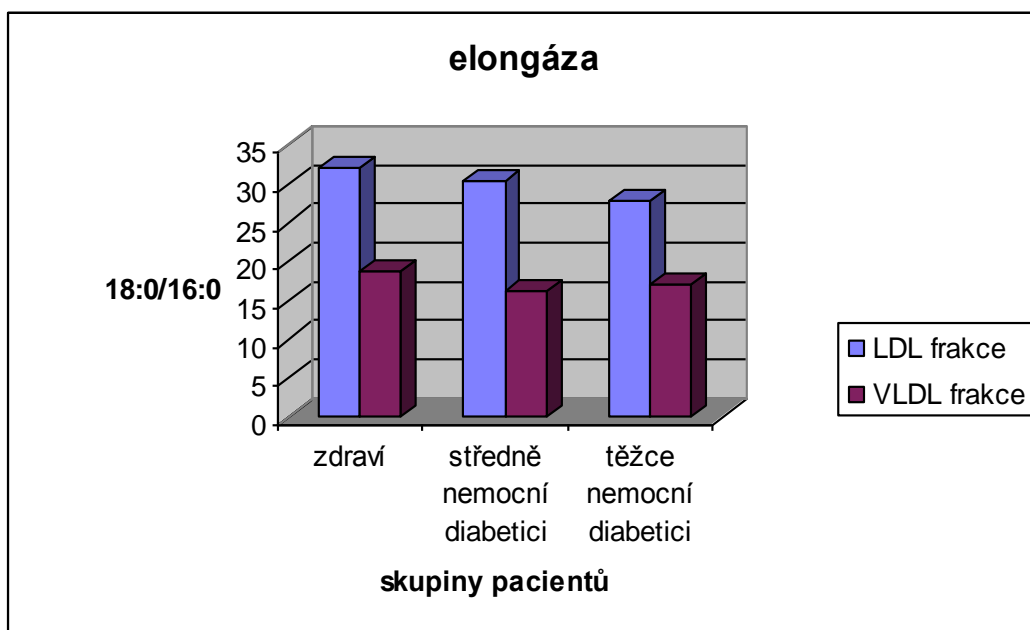
**Obr. 5.12** Grafické znázornění aktivity  $\Delta 9$ -desaturázy ve VLDL a LDL frakci u jednotlivých skupin pacientů v závislosti na glykovaném hemoglobinu



**Obr. 5.13** Grafické znázornění aktivity  $\Delta 6$ -desaturázy ve VLDL a LDL frakci u jednotlivých skupin pacientů v závislosti na glykovaném hemoglobinu



**Obr. 5. 14 Grafické znázornění aktivity  $\Delta$ 5-desaturázy ve VLDL a LDL frakci u jednotlivých skupin pacientů v závislosti na glykovaném hemoglobinu**



**Obr. 5.15 Grafické znázornění aktivity elongázy ve VLDL a LDL frakci u jednotlivých skupin pacientů v závislosti na glykovaném hemoglobinu**

## 6 Diskuze

Cílem této práce bylo na základě vyhodnocení výsledků získaných metodikou plynové chromatografie posoudit, zda jednotlivé enzymy, lipoproteiny a nasycené a nenasycené mastné kyseliny jsou typicky sníženy, či typicky zvýšeny pro diagnostické posouzení metabolického onemocnění diabetes mellitus.

Základním nástrojem diagnostiky diabetu je stanovení plazmatické žilní glukózy. Je to logické, protože zvýšená plazmatická glukóza je základní příčinou diabetických komplikací. Aldehydová skupina glukózy je velmi reaktivní. Dochází k neenzymatické reakci mezi aldehydovou skupinou glukózy a volnými aminoskupinami bílkovin – hlavně argininu a lysinu. Vzniká nejprve aldimin (Schiffova báze), dále Amadoriho produkt (ketoamin) a další chemickou modifikací (oxidace, protein cross-links) nastává přeměna na tzv. AGE-látky (advanced glycation end-products, konečné produkty pokročilé glykace). To je ve stručnosti jedna ze čtyř hlavních patobiochemických drah, jak glukóza poškozují buňky. (Brownlee, 2005, Kaňková, 2005).

Správný odběr má být proveden po minimálně osmihodinovém lačnění s vyloučením fyzické námahy a kouření. Pacient nemá být dehydratovaný. Proto se ráno může napít vody nebo neslazeného čaje. Před odběrem má být nejméně 5 minut v poloze vsedě. Odebírá se plazma žilní krve. To znamená, že pro diagnostiku diabetes mellitus nelze použít krev kapilární, kde je vždy riziko příměsi určitého množství tkáňového moku. Ve speciální zkumavce, která je určena pro diagnostiku diabetu je antiglykolytické činidlo – fluorid sodnýho o koncentraci alespoň 2,5 mg na mililitr krve. Pokud by se dělal test bez antiglykolytického činidla, došlo by k poklesu glukózy až o 5 % za hodinu. Důležitou složkou ve zkumavce bývá také přítomnost EDTA (American diabetes association, 2006, Bartoš a spol., 2005, Franeková, 2005).

Vybraní jedinci pro naši práci byli rozděleni do tří skupin na zdravé, středně a těžce nemocné diabetiky a to nejen podle vzrůstajících hodnot glukózy ale též i podle glykovaného hemoglobinu, který byl nakonec zvolen jako nejměrohodnější.

Glykovaný hemoglobin nebo-li glykohemoglobin vzniká tím, že hemoglobin v erytrocytech podléhá neenzymatické glykaci. Jeho hodnoty se potom vyjadřují v procentech celkového hemoglobinu. Dávají představu o průměrné glykémii za posledních 6 - 8 týdnů (Ráček a spol., 2006, Votey a Peters, 2008).

V prvním kroku jsme sledovali chování HDL-, LDL-cholesterolu a triglyceridů v krvi v závislosti na již zmíněném glykovaném hemoglobinu. Charakter chování těchto

lipoproteinů byl rozepsán už v mnoha studiích. U pacientů trpících diabetem mellitus 2. typu byly pozorovány kvantitativní i kvalitativní abnormality. Jedná se o snížení HDL-cholesterolu, převahu LDL částic o malé hustotě a zvýšení triglyceridových vrstev. Každý z těchto dyslipidemických rysů souvisí se vzrůstajícím rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Například částice LDL mohou pronikat endotelem do intimy tepen. V cévní stěně se vážou prostřednictvím svého ApoB-100 na mezibuněčnou hmotu, hlavně glykosaminoglykany, a začínají podléhat modifikaci, tj. změně struktury, která vede rovněž ke změně jejich vlastností. Dochází tak postupně ke vzniku tzv. pěnové buňky, lipidovým proužkům, vazivového plátu až ke tvorbě komplikovaných lézí. (Krauss, 2004, Hulley 1980, Georg a spol., 2000, Davi a spol., 2005).

Pokud tyto již známá fakta srovnáme s našimi grafickými závislostmi TG, LDL- a HDL-cholesterolu na glykovaném hemoglobinu, zjistíme, že hodnoty sice mírně klesají a vzrůstají, což dokazuje správné rozdělení pacientů do tří skupin, ale zůstávají relativně v referenčním rozmezí. Tyto fyziologické hodnoty mohou souviset s tím, že naši diabetici, kteří byly zařazeni do výběru, jsou léčeni i jiným způsobem, než je podávání inzulínu.

S tímto poznatkem korelují i naše naměřené hladiny nasycených a nenasycených mastných kyselin. Nasycené mastné kyseliny, jako je kyselina behenová a stearová, mají klesající charakter směrem k těžce nemocným diabetikům a nenasycené mastné kyseliny, jako je kyselina olejová, kyselina  $\gamma$ -linolenová i kyselina linolová, naopak vzrůstají.

Podle literatury bychom ale měli u diabetiků pozorovat opačný stav - nárůst nasycených mastných kyselin a pokles nenasycených mastných kyselin. Například podle studie provedené v Bulharsku, kde bylo vyšetřeno 38 pacientů trpících diabetem mellitus 2. typu a 20 zdravých jedinců jako kontrola, bylo zjištěno, že u dekompenzovaného diabetu dochází ke zvýšení hodnot kyseliny palmitové a stearové paralelně s poklesem kyseliny olejové a arachidonové (Dobrev a spol., 1988).

Z těchto výsledků se dá tedy usoudit na to, že na fyziologické hodnoty TG, LDL- a HDL-cholesterolu a na opačné chování nasycených a nenasycených mastných kyselin mají opravdu vliv některé léky, které se podávají k léčbě diabetes. Příkladem těchto léků mohou být hypolipidemika využívaná pro léčbu cévních komplikací diabetu.

Celá řada studií s hypolipidemiky u diabetiků ukázala pokles kardiovaskulární mortality nebo morbidity. Výsledky velké klinické studie CARDS (Collaborative Atorvastatin Diabetes Study), která sledovala efekt atorvastatinu v primární prevenci kardiovaskulárních onemocnění speciálně u diabetiků, vedly k významnému rozšíření léčby statiny u diabetiků a ke snížení cílových hodnot lipidového spektra. Snížení výskytu kardiovaskulárních příhod

dokonce o 37 % při léčbě atorvastatinem je v této studii spojeno se snížením průměrných hodnot LDL-cholesterolu z 3,0 na 2,0 mmol/l. V primární prevenci jsou dnes cílové hodnoty LDL-cholesterolu u diabetiků pod 2,5 mmol/l a v sekundární prevenci po prodělané kardiovaskulární příhodě pod 1,8 mmol/l. Dokonce se diskutuje o podávání statinu všem diabetikům 2. typu (Colhoun a spol., 2004).

Pokud se zaměříme u nenasycených mastných kyselin konkrétně na vztah mezi kyselinou linolovou a kyselinu  $\gamma$ -linolenovou, zjistíme, že dochází k porušení desaturace. Pro plnou využitelnost v organismu, musí být linolová kyselina konvertována na  $\gamma$ -linolenovou reakcí katalyzovanou  $\Delta 6$ -desaturázou (Tvrzická a spol., 2009, Murray a spol., 2002).

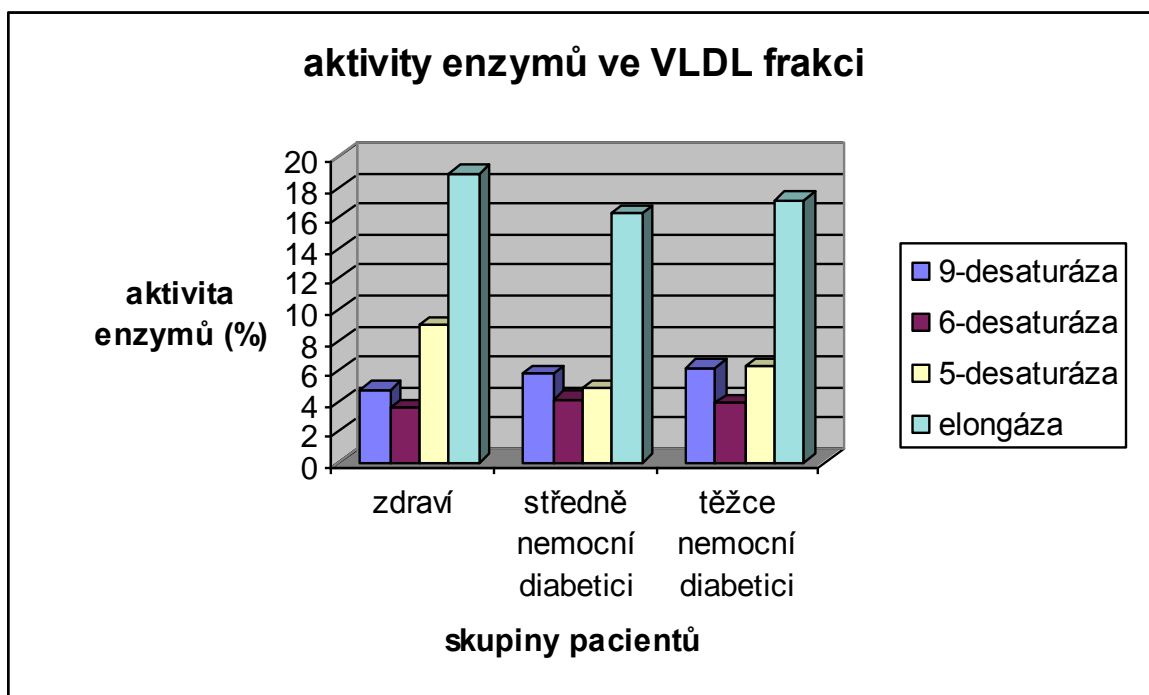
V poslední řadě jsme sledovali vliv glykovaného hemoglobinu na aktivity jednotlivých enzymů u jednotlivých skupin pacientů (obr. 6.1).

$\Delta 9$ -desaturáza je nezbytný enzym, který zajišťuje začlenění první dvojité vazby do kyseliny stearové a kyseliny palmitové (Ntambi, 1999). Podle literatury bylo provedena řada studií, které sledovaly činnost  $\Delta 9$ -desaturázy (SCD) u krys. Snížení její činnosti proběhlo v krysích játrech během hladovění a diabetu. Následně její aktivita opět rapidně stoupla na základě zpětného napájení stravou bohatou na uhlohydráty nebo po podání inzulínu (Grag a spol., 1986, Landau a spol., 1997, Attie a spol., 2002). U neléčených potenciálních diabetiků můžeme tedy sledovat výrazný pokles její aktivity. Z naší závislosti  $\Delta 9$ -desaturázy na glykovaném hemoglobinu pro jednotlivé skupiny pacientů je však viditelný nárůst její aktivity, což jednoznačně připisujeme léčbě.

Ze sledovaných enzymů ve VLDL a LDL frakci má největší význam pro diagnostiku diabetu již zmíněná  $\Delta 9$ -desaturáza. Ostatní typy ( $\Delta 6$ -desaturáza,  $\Delta 5$ -desaturáza, elongáza) v těchto frakcích mají velmi malý význam a nebyly nalezeny žádné studie, které by se zabývaly jejich charakteristickou aktivitou u pacientů s diabetem mellitus.

Pokud se konkrétně zaměříme na tyto méně významné enzymy, zjistíme, že léčba na  $\Delta 5$ -desaturázu nejspíš žádný vliv nemá, protože její aktivita silně klesá.  $\Delta 5$ -desaturáza je pro organismus významná, protože produkuje z kyseliny linolové kyselinu arachidonovou, která je hlavním prekurzorem eikosanoidů (prostaglandinů, tromboxanů, leukotrienů), účinných signálních molekul uvnitř i vně buňky (Tvrzická a spol., 2009). V případě  $\Delta 6$ -desaturázy a elongázy nepozorujeme, že by jejich aktivita byla ovlivněna diabetem. Nedá se ale zcela vyloučit to, že se tu opět vyskytuje pravděpodobný vliv léčby, který byl zjištěn i u ostatních sledovaných enzymů.





**Obr. 6.1 Grafické znázornění aktivit sledovaných enzymů u jednotlivých skupin pacientů na glykovaném hemoglobinu**

## 7 Závěr

V předložené diplomové práci jsme se zabývali sledováním některých parametrů, které mohou přispívat k diagnostice metabolického onemocnění diabetes mellitus. Tyto parametry byly: HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceridy, nasycené a nenasycené mastné kyseliny a enzymy  $\Delta 9$ -desaturáza,  $\Delta 6$ -desaturáza,  $\Delta 5$ -desaturáza a elongáza.

Výběr byl vytvořen ze vzorků EDTA plazmy diabetiků z Oddělení klinické biochemie Krajské nemocnice Pardubice a.s., které byly odeslány na chromatografickou analýzu do Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Eberhard-Karl-Universität v Tübingenu v rámci Grantu evropské unie s názvem CARE-MAN. Vzorky byly zpracovávány v období od listopadu 2008 do ledna 2009.

Anonymní pacienti zařazení do výběru byli rozděleni do tří skupin podle hladiny glykovaného hemoglobinu v krvi na zdravé, středně a těžce nemocné diabetiky.

Podle naměřených výsledků můžeme celkově konstatovat, že mezi anonymními pacienty se nacházejí kompenzovaní diabetici. Řada naměřených koncentrací a charakter aktivit enzymů se nachází v referenčních mezích.

U nasycených a nenasycených kyselin pozorujeme opačně klesající a vzrůstající hodnoty hladin, než jsme původně u diabetiků očekávali. Např. nasycené mastné kyseliny, jako je kyselina behenová a stearová, mají klesající charakter směrem k těžce nemocným diabetikům a nenasycené mastné kyseliny, jako je kyselina olejová, kyselina  $\gamma$ -linolenová i kyselina linolová, naopak vzrůstají.

Koncentrace LDL-cholesterolu, HDL-cholesterolu a triglyceridů jsou také fyziologické, stejně tak aktivita nejdůležitějšího enzymu  $\Delta 9$ -desaturázy pro VLDL a LDL frakci má vzrůstající charakter typický pro zdravé jedince, nikoliv pro pacienty trpící diabetem.

U  $\Delta 6$ -desaturázy,  $\Delta 5$ -desaturázy a elongázy je posouzení aktivit složitější, protože se doposud nevyskytují žádné studie, které by vysvětlily jejich chování u diabetiků. Navíc jejich význam ve VLDL a LDL frakci je minimální. Pravděpodobně na  $\Delta 6$ -desaturázu a elongázu diabetes nemá vliv, nebo se zde také odráží účinky možných podávaných medikamentózních léků. Aktivita  $\Delta 5$ -desaturázy není ale ovlivněna léčbou, protože ze závislosti na glykovaném hemoglobinu je jasně patrné, že silně klesá od zdravých jedinců směrem k těžce nemocným.

Mezi případnou podávanou léčbu mohou patřit tzv. hypolipidemika, konkrétněji atorvastatin, který se u diabetiků podává pro snižování rizika rozvoje arterovaskulárních onemocnění a tedy i ke snížení cílových hodnot lipidového spektra.

Touto studií jsme dokázali kladný vliv léčiv na onemocnění diabetem mellitus. Naše zjištěné výsledky totiž ukazují na to, že včasné zahájení léčby u diabetiků má velký význam. U třetí skupiny těžce nemocných diabetiků dokonce pozorujeme, že se stává plně kompenzovanou po léčbě inzulinem a případnými hypolipidemiky. Jejich krevní hodnoty, aktivity enzymů a hladiny kyselin jsou srovnatelné se zdravou skupinou.

Dále jsme prokázali velké uplatnění plynové chromatografie na monitorování léčby diabetiků, sledování úpravy aktivit enzymů a koncentrací jednotlivých mastných kyselin.

## 8 Literatura

- **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 30 Supl 1: S42-7, 2007.
- **American Diabetes Association.** Clinical practice recommendation. *Diabetes Care* 29 Supl 1: 4-85, 2006.
- **Attie, A. D., Krauss, R. M., Gray-Keller, M. P., et. al.** Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* 2002. 43: 1899-1907.
- **Bartoš, V., Blažej, V., Bořil, P.** Preanalytická fáze. Vydavatelství Česká společnost klinické biochemie, ČLS JEP a SEKK, spol. s.r.o. Praha, 2005.
- **Bartoš, V., Pelikánová, T. a spol.** Praktická diabetologie. Vydavatelství Maxdorf s.r.o, 2000, s. 14-30. ISBN 80-85800-31-4.
- **Bělobrádková, J., Brázdová, L.** Diabetes Mellitus. Vydavatelství Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno 2006, s. 23-128. ISBN 57-863-06.
- **Brownlee, M.** The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes* 54: 1615-1625, 2005.
- **Bush, A. K., Gurisik, E., Cordery, D. V., et. al.** Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic  $\beta$ -cells from lipooptosis. *Diabetes* 54: 2917-2924, 2005.
- **Chandelia, H. B., Ajgaonkar, J., Bagrodia, J., et. al.** Lipid abnormalities in diabetes mellitus. *Int. J. Diab. Dev. Countries.* Vol. 19, 1999.
- **Colhoun, H. M., Betteridge, D. J., Durrington, P. N., et. al.** CARDS investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 364: 685 - 696, 2004.
- **Chu, K., Miyazaki, M., Man, W. Ch., et. al.** Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol.* 26(18): 6786-6798, 2006.
- **Cohen, P., Ntambi, J. M., Friedman, J. M.** Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immun Endocr Metabol Discord.* 3(4): 271-80, 2003.

- **Davi, G., Falco, A., Patrono, C.** Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxidation Redox Signaling*, 7(1-2): 256 - 268, doi: 10.108a/ars.2005.7.256, 2005.
- **Dobrev, D., Terzieva, Ts., Krustev, L., et. al.** Fatty acids in diabetes mellitus. *Vultr Boles* 27(6): 31-5. Bulgarian, 1988.
- **Dobrzym, A., Ntambi, J. M.** Stearoyl-CoA desaturase as a new drug target for obesity treatment. *Obes. Rev.* 2005, 6(2): 169-74.
- **Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus** Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197, 1997.
- **Franeková, J.** Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus. *Klin. Biochem. Metab.* 3: 155-158, 2003.
- **Garg, M. L., Snoswell, A. M., Sabine, J. R.** Influences of dietary cholesterol on desaturase activity in rat liver microsomes. *Prog. Lipid Res.* 1986. 25:639-644.
- **Gasparič, J., Churáček, J.** Papírová a tenkovrstevná chromatografie organických sloučenin. 1. vydání, Praha 1981: SNTL, s. 11, 32, 157-163. ISBN 04-613-81.
- **Georg, P., Ludvik, B.** Lipids and diabetes. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*, 3: 159-162, 2003.
- **Gunstone, F. D.** Fatty acid structure. In *The Lipid Handbook*. London: Chapman and Hall 1994; 1-19.
- **Gutiérrez-Juárez, R., Pocai, A., Mulas, C., et. al.** Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD 1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006, 11(6): 1686-1695. doi: 10.1172 / JCI 26991.
- **Hulley, S., B.** The associations between triglyceride and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1980, 302: 1383 - 9.
- **Kaňková, K.** Molekulární patofyziologie pozdních komplikací diabetes mellitus - genetická predispozice k rozvoji diabetických komplikací. *Vnitř Lék* 4: 438-449, 2005.
- **Klouda, P.** Moderní analytické metody. 2. vydání. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, s. 27-30. ISBN 80-86369-07-2.
- **Krauss, R. M.** Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 1496-1504, 2004.

- **Landau, J. M., Skowski, A., Hamm, M. W.** Dietary cholesterol and activity of stearoyl-CoA desaturase in rats: evidence for an indirect regulatory effect. *Biochem. Biophys. Acta.* 1997. 1345:349-357.
- **Li, J., Ding, S-F., Habbib, N. A., et. al.** Partial characterization of a cDNA for human stearoyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues. *Int. J. Cancres* 57: 348-352, 1994.
- **Machann, J., Thames, C., Schnoedt, B., et. al.** Standardized assessment of whole body adipose tissue topography by MRI. *J Mang Reson Imaging* 21: 455-462, 2005.
- **Marcelo, C. L., Duell, E. A., Rhodes, L. M., et. al.** In vitro model of essential fatty acid deficiency. *J. Invest. Dermatol.* 99: 703-7080, 1992.
- **Matsuda, A., DeFronzo, R.** Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 22: 1462-1470, 1999.
- **Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., et. al.** Harperova biochemie. 4. vydání Jinočany : Nakladatelství a vydavatelství H&H, s. 148-160. ISBN 80-7319-013-3, 2002.
- **Nelson, D. L., Cox, M. M.** Lipid biosynthesis. In: *Principles of Biochemistry.* New York: W.H. Freeman and Comp. 2005; 787-815.
- **Ntambi, J. M.** Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res.* 40: 1549-1558, 1999.
- **Paton Ch. M., Ntambi J. M.** Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *PresS Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, doi: 10.1152/ajpendo.908972008.
- **Perušičová, J., Anděl, M.** Diabetes mellitus a poruchy metabolismu lipidů. Nakladatelství Galén 1999, s. 19-25. ISBN 80-7262-050-9.
- **Purnell, H.** Gas chromatography. Nakladatelství John Willey & Sons, Inc., New York, USA 1966, s. 14-24, 93, DT 543.544.25.
- **Racek, J. a spol.** Klinická biochemie. 2. vydání, Praha 2006 : Nakladatelství Galén, s. 174-175. ISBN 80-7262-324-9.
- **Risérus, U., Tan, G. D., Fielding, B. A., et. al.** Rosiglitazone increases indexes of stearoyl-CoA desaturase activity in humans. *Diabetes* 54: 1379-1384, 2005.
- **Sherlock, S., Dooley, J.** Diseases of the liver and biliary system. Eleventh edition, Blackwell science 2002, s. 26-28, ISBN 80-86703-00-2.

- **Smolková, E., Feltl, L., Pacáková, E.** Plynová chromatografie. Teoretické základy. Vydavatelství Univerzita Karlova, Praha 1983, s.15, 21-22. ISBN 60-151-82.
- **Stefan, N., Peter, A., Cegan, A., et. al.** Low hepatic stearyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans. Diabetologia 2008, doi: 10.1007/s00125-008-0438-7.
- **Stefan, N., Schafer, S., Machicao, F.** Liver fat and insulin resistance are independently associated with the – 514C>T polymorphism of the hepatic lipase gene. J Clin Endocrinol Metab. 90: 4238-4243, 2005.
- **Stefan, N., Wahl, H. G., Fritsche, A., et. al.** Effect of the pattern of elevated free fatty acids on insulin sensitivity and insulin secretion in healthy humans. Horm Metab Res. 33: 432-438, 2001.
- **Svojtka, Vašut** Atlas anatomie. Praha [s.n.], 1996. ISBN 80-7180-092-2.
- **Štern, P.** Obecná a klinická biologie. 1. vydání, Praha 2005: Nakladatelství Karolinum, 216s. ISBN 80-246-1025-6.
- **Trojan, S., Langmeier, M. a kolektiv.** Lékařská fyziologie. 4. přepracované vydání. Grada Publishing, a.s., 2003, s. 414-490, ISBN 80-247-0512-5.
- **Tvrzická, E., Staňková, B., Vecka, M., Žák, A.** Mastné kyseliny. Výskyt a biologický význam. Čas Lék čes; 148: 16 - 24, 2009.
- **Votey, S. R., Peters, A. L.** Diabetes Mellitus, Type 2. Clin. Infect Dis. 39(7): 885-910, 2008.
- **Yao-Borengasser, A., Rassouli, N., Varma, V., et. al.** Stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) gene expression increases following pioglitazone treatment and is associated with PPARγ responsiveness. J Clin Endocrin Metab. as doi: 10.1210 / jc. 2008 – 0782, 2008.

## 9 Přílohy

### 9.1 Statistické zpracování výsledkových dat

Tab. 9.1 Statistické zpracování výsledkových dat pro VLDL frakci

	Zdraví				Středně nemocní diabetici				Těžce nemocní diabetici			
	AVG	SD	Vk	Medián	AVG	SD	Vk	Medián	AVG	SD	Vk	Medián
<b>C14:0</b>	5,81	1,30	22,4	6,11	3,08	1,55	50,3	3,71	5,33	2,92	54,7	4,23
<b>C15:0</b>	0,40	0,23	57,5	0,28	0,36	0,11	30,6	0,30	0,49	0,12	24,5	0,49
<b>C16:0</b>	32,91	4,96	15,1	29,81	33,34	1,06	3,2	33,51	32,33	2,25	7,0	32,44
<b>C16:1N7</b>	4,74	0,58	12,3	4,97	3,79	1,17	30,9	3,32	3,86	1,10	28,5	3,48
<b>C18:0</b>	6,32	2,15	34,0	5,29	5,41	1,24	22,9	5,43	5,73	1,66	29,0	4,55
<b>C18:1N9</b>	27,62	3,14	11,4	27,67	31,22	0,88	2,8	30,91	31,62	2,59	8,2	31,05
<b>C18:1N7</b>	2,87	0,33	11,6	2,99	2,86	0,33	11,6	2,94	2,57	0,51	19,7	2,57
<b>C18:2N6</b>	11,38	4,71	41,4	11,84	13,26	1,41	10,6	12,92	11,17	1,95	17,5	10,76
<b>C20:0</b>	0,31	0,14	45,2	0,24	0,36	0,13	36,1	0,37	0,34	0,17	50,0	0,28
<b>C18:3N6</b>	0,10	0,03	25,0	0,10	0,15	0,11	73,3	0,09	0,20	0,18	90,0	0,10
<b>C18:3N3</b>	2,57	0,95	37,0	2,65	1,82	0,89	48,9	1,83	1,84	0,68	37,0	1,94
<b>C22:0</b>	0,22	0,07	31,8	0,24	0,21	0,06	28,6	0,20	0,21	0,1	47,6	0,17
<b>C20:3N6</b>	0,38	0,08	21,1	0,42	0,55	0,27	49,1	0,47	0,45	0,16	35,6	0,35
<b>C20:4N6</b>	3,35	1,25	37,3	3,06	2,26	0,39	17,3	2,22	2,73	1,22	44,7	2,13
<b>C20:5N3</b>	0,31	0,07	22,9	0,32	0,44	0,25	57,9	0,35	0,38	0,34	88,9	0,27
<b>C24:0</b>	0,02	7,1E-3	35,4	0,02	0,03	0,02	78,2	0,02	0,01	9,3E-3	92,6	0,01
<b>C22:4N6</b>	0,12	0,03	21,2	0,12	0,23	0,18	78,1	0,11	0,16	0,15	93,8	0,11
<b>C22:5N3</b>	0,13	0,05	35,3	0,14	0,19	0,10	51,6	0,13	0,11	0,04	38,1	0,11
<b>C26:0</b>	0,25	0,07	26,7	0,22	0,16	0,07	42,6	0,17	0,18	0,17	93,6	0,11
<b>C22:6N3</b>	0,19	7,1E-3	3,7	0,19	0,28	0,20	71,1	0,13	0,18	0,17	93,8	0,11
<b>18:1/18:0</b>	4,75	1,71	36,0	5,67	5,83	0,69	11,8	5,98	6,19	1,68	27,1	5,90
<b>18:0/16:0</b>	18,88	1,96	10,4	18,23	16,21	1,50	9,3	16,33	17,15	6,27	36,6	13,79
<b>20:4N6/ 20:3N6</b>	9,03	3,28	36,3	10,51	4,83	2,10	43,5	4,18	6,32	2,10	33,2	5,15
<b>20:3N6/ 18:2N6</b>	3,59	0,90	25,1	3,53	4,13	1,82	44,1	4,13	3,84	1,56	40,6	3,25
<b>HDL-ch.</b>	1,57	0,47	29,9	1,40	1,46	0,23	15,8	1,50	1,41	0,45	31,9	1,50
<b>LDL-ch.</b>	2,51	0,22	8,8	2,43	3,09	0,52	16,8	3,29	2,67	2,22	83,1	2,74
<b>TG</b>	1,10	0,30	27,3	1,10	1,36	0,47	34,6	1,2	1,59	1,23	77,4	0,8



## 9.2 Tabulky naměřených dat

Tab. 9.2 Koncentrace lipidů ve VLDL frakci

	jednotky							
Číslo pacienta		10	23	20	16	15	22	19
PL	g/l	0,33	0,81	0,18	1,45	3,51	0,69	0,38
DG	g/l	0,24	0,52	0,07	1,43	1,58	1,26	0,52
VMK	g/l	0,18	0,16	0,15	0,91	1,66	0,42	0,62
TG	g/l	0,67	1,07	1,43	2,39	2,15	1,17	3,36
ECH	g/l	0,85	0,94	0,44	1,69	2,30	3,34	1,65
Glukóza	mmol/l	3,10	4,70	7,50	8,50	9,90	10,2	12,8
Glyk. hemoglobin	%	7,80	4,10	6,90	7,00	7,80	7,20	8,90
ALT	μkat/l	0,31	0,29	0,68	0,32	0,59	0,35	0,35
AST	μkat/l	0,41	0,31	0,52	0,41	0,52	0,36	0,41
GMT	μkat/l	0,33	0,29	0,40	0,37	0,33	0,29	0,82
ALP	μkat/l	1,79	1,30	0,82	1,51	1,20	1,85	3,60
Cholesterol	mmol/l	5,41	4,16	5,74	6,18	5,09	5,10	4,45
HDL cholesterol	mmol/l	1,60	1,20	1,40	1,60	1,20	1,50	0,80
LDL cholesterol	mmol/l	3,20	2,34	3,60	3,29	3,67	3,01	2,09
Triacylglyceroly	mmol/l	0,80	1,40	1,80	1,10	0,40	1,00	3,10
Index atero	arb.j.	2,40	2,50	3,10	2,90	3,20	2,40	4,60

Tab. 9.3 Koncentrace lipidů v LDL frakci

	jednotky							
Číslo pacienta		10	23	20	16	15	22	19
PL	g/l	0,48	0,23	0	1,40	1,92	0,57	0,07
DG	g/l	0,39	0,86	0,66	1,04	2,57	0,75	0,55
VMK	g/l	0,42	0,31	0	0,55	2,72	0,36	0
TG	g/l	0,85	0,99	0,95	1,12	2,60	0,72	0,93
ECH	g/l	2,45	1,79	2,30	3,19	5,55	0,96	1,24
Glukóza	mmol/l	3,10	4,70	7,50	8,50	9,90	10,2	12,8
Glyk. hemoglobin	%	7,80	4,10	6,90	7,00	7,80	7,20	8,90
ALT	μkat/l	0,31	0,29	0,68	0,32	0,59	0,35	0,35
AST	μkat/l	0,41	0,31	0,52	0,41	0,52	0,36	0,41
GMT	μkat/l	0,33	0,29	0,40	0,37	0,33	0,29	0,82
ALT	μkat/l	1,79	1,30	0,82	1,51	1,20	1,85	3,60
Cholesterol	mmol/l	5,41	4,16	5,74	6,18	5,09	5,10	4,45
HDL cholesterol	mmol/l	1,60	1,20	1,40	1,60	1,20	1,50	0,80
LDL cholesterol	mmol/l	3,20	2,34	3,60	3,29	3,67	3,01	2,09
Triacylglyceroly	mmol/l	0,80	1,40	1,80	1,10	0,40	1,00	3,10
Index atero	arb.j.	2,40	2,50	3,10	2,90	3,20	2,40	4,60

**Tab. 9.4 Koncentrace lipidů v HDL<sub>2</sub> frakci**

	<b>jednotky</b>							
<b>Číslo pacienta</b>		<b>10</b>	<b>23</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>19</b>
<b>PL</b>	g/l	0,55	0,18	0	0,39	1,58	0,45	0,27
<b>DG</b>	g/l	0,48	0,44	0,15	0,57	1,66	0,42	0
<b>VMK</b>	g/l	0,33	0,60	0	0,62	1,55	0,30	0,34
<b>TG</b>	g/l	0,48	0,83	0,07	0,55	1,81	0,84	0,52
<b>ECH</b>	g/l	1,18	1,58	0,62	1,12	2,19	0,75	0,76
<b>Glukóza</b>	mmol/l	3,10	4,70	7,50	8,50	9,90	10,2	12,8
<b>Glyk. hemoglobin</b>	%	7,80	4,10	6,90	7,00	7,80	7,20	8,90
<b>ALT</b>	μkat/l	0,31	0,29	0,68	0,32	0,59	0,35	0,35
<b>AST</b>	μkat/l	0,41	0,31	0,52	0,41	0,52	0,36	0,41
<b>GMT</b>	μkat/l	0,33	0,29	0,40	0,37	0,33	0,29	0,82
<b>ALT</b>	μkat/l	1,79	1,30	0,82	1,51	1,20	1,85	3,60
<b>Cholesterol</b>	mmol/l	5,41	4,16	5,74	6,18	5,09	5,10	4,45
<b>HDL cholesterol</b>	mmol/l	1,60	1,20	1,40	1,60	1,20	1,50	0,80
<b>LDL cholesterol</b>	mmol/l	3,20	2,34	3,60	3,29	3,67	3,01	2,09
<b>Triacylglyceroly</b>	mmol/l	0,80	1,40	1,80	1,10	0,40	1,00	3,10
<b>Index atero</b>	arb.j.	2,40	2,50	3,10	2,90	3,20	2,40	4,60

**Tab. 9.5 Koncentrace lipidů v HDL<sub>3</sub> frakci**

	<b>jednotky</b>							
<b>Číslo pacienta</b>		<b>10</b>	<b>23</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>19</b>
<b>PL</b>	g/l	0,39	0,76	0	0,49	2,00	1,05	0,72
<b>DG</b>	g/l	0,58	1,09	0	0,55	1,66	0,69	0,34
<b>VMK</b>	g/l	0,42	0,70	0,26	0,68	1,51	1,08	0,27
<b>TG</b>	g/l	0,58	0,55	0,80	0,62	1,32	0,69	0,65
<b>ECH</b>	g/l	1,58	1,35	1,32	2,52	1,66	1,59	1,48
<b>Glukóza</b>	mmol/l	3,10	4,70	7,50	8,50	9,90	10,2	12,8
<b>Glyk. hemoglobin</b>	%	7,80	4,10	6,90	7,00	7,80	7,20	8,90
<b>ALT</b>	μkat/l	0,31	0,29	0,68	0,32	0,59	0,35	0,35
<b>AST</b>	μkat/l	0,41	0,31	0,52	0,41	0,52	0,36	0,41
<b>GMT</b>	μkat/l	0,33	0,29	0,40	0,37	0,33	0,29	0,82
<b>ALT</b>	μkat/l	1,79	1,30	0,82	1,51	1,20	1,85	3,60
<b>Cholesterol</b>	mmol/l	5,41	4,16	5,74	6,18	5,09	5,10	4,45
<b>HDL cholesterol</b>	mmol/l	1,60	1,20	1,40	1,60	1,20	1,50	0,80
<b>LDL cholesterol</b>	mmol/l	3,20	2,34	3,60	3,29	3,67	3,01	2,09
<b>Triacylglyceroly</b>	mmol/l	0,80	1,40	1,80	1,10	0,40	1,00	3,10
<b>Index atero</b>	arb.j.	2,40	2,50	3,10	2,90	3,20	2,40	4,60

**Tab. 9.6 Tabulka naměřených dat pro VLDL frakci seřazené podle glykovaného hemoglobinu (1. část)**

	Číslo vzorku	6	15	14	17	18	11	8	12
	Pacient	D14	D24	D23	D17	D25	D20	D16	D21
	Datum:	29.5.2008	1.6.2008	1.6.2008	11.6.2008	11.6.2008	1.6.2008	29.5.2008	1.6.2008
	Vzorek	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL
		%	%	%	%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	6,11%	4,39%	6,94%	1,19%	1,79%	3,71%	3,75%	4,96%
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,26%	0,28%	0,67%	0,29%	0,25%	0,44%	0,52%	0,30%
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	39,91%	29,01%	29,81%	34,53%	31,79%	34,02%	33,51%	32,87%
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	5,19%	4,06%	4,97%	4,04%	2,81%	3,32%	5,72%	3,06%
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	8,80%	5,29%	4,88%	6,22%	5,43%	5,56%	4,73%	5,09%
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	24,45%	30,74%	27,67%	30,26%	32,49%	30,73%	31,73%	30,91%
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	2,49%	3,12%	2,99%	2,95%	3,28%	2,37%	2,94%	2,77%
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	6,45%	15,84%	11,84%	12,92%	15,18%	12,99%	11,34%	13,87%
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,23%	0,47%	0,24%	0,37%	0,28%	0,19%	0,48%	0,48%
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,10%	0,08%	0,13%	0,28%	0,26%	0,07%	0,07%	0,09%
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	1,58%	2,65%	3,48%	1,21%	0,77%	3,06%	1,83%	2,23%
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,14%	0,28%	0,24%	0,30%	0,23%	0,16%	0,20%	0,16%
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,29%	0,43%	0,42%	0,75%	0,92%	0,29%	0,47%	0,33%
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	3,06%	2,28%	4,72%	2,90%	2,22%	2,28%	1,96%	1,94%
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,23%	0,37%	0,32%	0,33%	0,89%	0,35%	0,26%	0,37%
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,02%	0,02%	0,01%	0,07%	0,03%	0,02%	0,01%	0,02%
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,09%	0,14%	0,12%	0,45%	0,41%	0,10%	0,10%	0,11%
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,08%	0,14%	0,17%	0,26%	0,32%	0,13%	0,10%	0,12%
<b>Hexacosanová</b>	<b>C26:0</b>	0,33%	0,22%	0,21%	0,18%	0,10%	0,08%	0,17%	0,25%
<b>Dokosaheptaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,19%	0,18%	0,19%	0,49%	0,55%	0,13%	0,13%	0,09%
	Číslo vzorku	6	15	14	17	18	11	8	12
	Pacient	D14	D24	D23	D17	D25	D20	D16	D21
		mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,08191	0,07824	0,12978	0,00544	0,00998	0,12757	0,12071	0,06817
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,00343	0,00507	0,01252	0,00133	0,00137	0,01516	0,01660	0,00419

Palmitová	C16:0	0,53474	0,51669	0,55765	0,15803	0,17683	1,17019	1,07989	0,45220
Palmitolejová	C16:1 N7	0,06958	0,07239	0,09299	0,01850	0,01565	0,11407	0,18440	0,04209
Stearová	C18:0	0,11788	0,09420	0,09132	0,02849	0,03023	0,19112	0,15239	0,06996
Olejová	C18:1 N9	0,32758	0,54758	0,51770	0,13848	0,18073	1,05692	1,02223	0,42519
Oktadecenová	C18:1 N7	0,03330	0,05551	0,05588	0,01350	0,01825	0,08138	0,09478	0,03815
Linolová	C18:2 N6	0,08643	0,28215	0,22151	0,05911	0,08445	0,44680	0,36539	0,19084
Arachová	C20:0	0,00314	0,00843	0,00442	0,00168	0,00154	0,00642	0,01540	0,00656
g-Linolenová	C18:3 N6	0,00139	0,00150	0,00246	0,00130	0,00144	0,00252	0,00225	0,00122
Linolenová	C18:3 N3	0,02113	0,04715	0,06509	0,00555	0,00428	0,10539	0,05890	0,03071
Behenová	C22:0	0,00182	0,00491	0,00445	0,00138	0,00128	0,00534	0,00637	0,00219
Eicosatrienová	C20:3 N6	0,00391	0,00769	0,00782	0,00345	0,00512	0,01009	0,01509	0,00451
Arachidonová	C20:4 N6	0,04105	0,04056	0,08836	0,01328	0,01236	0,07858	0,06308	0,02663
Eikosapentaenová	C20:5 N3	0,00308	0,00653	0,00593	0,00150	0,00494	0,01221	0,00853	0,00510
Lignocerová	C24:0	0,00025	0,00030	0,00019	0,00031	0,00016	0,00060	0,00041	0,00021
Dokosatetraenová	C22:4 N6	0,00125	0,00247	0,00218	0,00207	0,00226	0,00361	0,00318	0,00148
Dokosapentaenová	C22:5 N3	0,00104	0,00247	0,00317	0,00120	0,00178	0,00462	0,00319	0,00171
Hexacosanová	C26:0	0,00449	0,00400	0,00387	0,00082	0,00053	0,00259	0,00532	0,00340
Dokosahexaenová	C22:6 N3	0,00251	0,00329	0,00349	0,00224	0,00305	0,00453	0,00404	0,00127
<b>celkem:</b>	<b>mmol/l</b>	<b>1,340</b>	<b>1,781</b>	<b>1,871</b>	<b>0,458</b>	<b>0,556</b>	<b>3,440</b>	<b>3,222</b>	<b>1,376</b>
Olejová/Stearová	18:1/18:0	2,779	5,813	5,669	4,861	5,979	5,530	6,708	6,077
Palmitolej./ Palmitová	16:1N7/16:0	0,130	0,140	0,167	0,117	0,089	0,097	0,171	0,093
Stearová/Palmitová	18:0/16:0	0,220	0,182	0,164	0,180	0,171	0,163	0,141	0,155
Arachidonová/ Eikosatrienová	20:4N6/20:3N6	10,511	5,272	11,295	3,851	2,415	7,791	4,181	5,909
Eikosatrienová/Linolová	20:3N6/18:2N6	0,045	0,027	0,035	0,058	0,061	0,023	0,041	0,024
9-desaturasa	18:1/18:0	2,78	5,81	5,67	4,86	5,98	5,53	6,71	6,08
9-desaturasa x 100	16:1N7/16:0	13,01	14,01	16,68	11,71	8,85	9,75	17,08	9,31
elongasa x 100	18:0/16:0	22,04	18,23	16,38	18,03	17,09	16,33	14,11	15,47
5-desaturasa	20:4N6/20:3N6	10,51	5,27	11,30	3,85	2,41	7,79	4,18	5,91
6-desaturasa x 100	20:3N6/18:2N6	4,52	2,73	3,53	5,83	6,06	2,26	4,13	2,36
9-desaturasa (výpočet z ploch)	18:1/18:0	4,17	8,73	8,51	6,96	8,56	8,30	10,07	9,12

	Číslo vzorku	6	15	14	17	18	11	8	12
	Pacient	D14	D24	D23	D17	D25	D20	D16	D21
<b>Glukóza [mmol/l]</b>		4,5	6,6	4,7	8,9	5,5	7,5	8,5	8,6
<b>Glyk.hemog.Alc [%]</b>		3,1	3,4	4,1	4,8	5,4	6,9	7	7
<b>ALT [ukat/l]</b>			0,48	0,29	0,33	0,75	0,68	0,32	0,23
<b>AST [ukat/l]</b>			0,38	0,31	0,42	0,67	0,52	0,41	0,35
<b>GMT [ukat/l]</b>			0,3	0,29	0,42	0,42	0,4	0,37	0,3
<b>ALP [ukat/l]</b>			1,02	1,3	1,48	1,12	0,82	1,51	1,62
<b>Cholesterol [mmol/l]</b>		5,3	4,21	4,16	5,62	4,59	5,74	6,18	5,07
<b>HDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		2,1	1,4	1,2	1,1	1,5	1,4	1,6	1,7
<b>LDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		2,76	2,43	2,34	3,65	2,17	3,6	3,29	2,73
<b>Triacylglyc. [mmol/l]</b>		0,8	1,1	1,4	1,9	1,2	1,8	1,1	0,8

**Tab. 9.7 Tabulka naměřených dat pro VLDL frakci seřazené podle glykovaného hemoglobinu (2. část)**

	Číslo vzorku	13	4	2	1	16	10	20	7
	Pacient	D22	D12	D10	D9	D27	D19	D28	D15
	Datum:	1.6.2008	29.5.2008	29.5.2008	29.5.2008	1.6.2008	1.6.2008	11.6.2008	29.5.2008
	Vzorek	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL	VLDL
		%	%	%	%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	7,19%	11,39%	5,85%	2,07%	4,00%	3,03%	4,23%	4,89%
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,49%	0,72%	0,42%	0,35%	0,49%	0,41%	0,52%	0,57%
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	31,98%	31,75%	33,29%	32,44%	32,95%	35,70%	28,17%	34,23%
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	4,78%	3,68%	3,20%	3,48%	6,03%	2,42%	3,39%	3,90%
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	5,16%	5,72%	4,28%	4,44%	4,55%	7,21%	8,72%	3,96%
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	30,46%	28,39%	29,87%	35,89%	31,05%	34,24%	31,43%	33,17%
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	3,16%	2,57%	2,88%	2,19%	2,32%	1,63%	3,01%	2,83%
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	10,92%	8,92%	14,20%	12,81%	9,17%	10,11%	12,03%	10,76%
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,28%	0,53%	0,34%	0,32%	0,59%	0,10%	0,24%	0,19%
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,10%	0,16%	0,12%	0,09%	0,09%	0,11%	0,73%	0,07%
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	1,47%	1,28%	2,39%	2,64%	1,94%	2,38%	0,81%	3,24%
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,20%	0,19%	0,16%	0,25%	0,15%	0,12%	0,42%	0,17%
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,35%	0,35%	0,41%	0,44%	0,57%	0,30%	0,76%	0,18%
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	2,23%	3,27%	1,83%	2,13%	5,14%	1,55%	2,95%	1,39%
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,48%	0,27%	0,17%	0,16%	0,40%	0,34%	1,15%	0,08%
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,02%	0,03%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,00%	0,01%
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,12%	0,11%	0,10%	0,10%	0,11%	0,09%	0,56%	0,08%
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,12%	0,11%	0,10%	0,09%	0,11%	0,07%	0,21%	0,10%
<b>Hexacosanová</b>	<b>C26:0</b>	0,34%	0,47%	0,25%	0,00%	0,17%	0,06%	0,00%	0,11%
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,15%	0,10%	0,14%	0,09%	0,17%	0,11%	0,65%	0,06%
	Číslo vzorku	13	4	2	1	16	10	20	7
	Pacient	D22	D12	D10	D9	D27	D19	D28	D15
		mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,06681	0,07540	0,07331	0,17559	0,11875	0,25668	0,00901	0,12661
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,00452	0,00478	0,00532	0,02995	0,01467	0,03507	0,00111	0,01475

Palmitová	C16:0	0,29727	0,21014	0,41754	2,74796	0,97890	3,02300	0,05997	0,88615
Palmitolejová	C16:1 N7	0,04446	0,02433	0,04010	0,29477	0,17926	0,20520	0,00722	0,10097
Stearová	C18:0	0,04800	0,03784	0,05371	0,37582	0,13504	0,61059	0,01857	0,10239
Olejová	C18:1 N9	0,28316	0,18786	0,37462	3,04029	0,92246	2,89982	0,06691	0,85877
Oktadecenová	C18:1 N7	0,02941	0,01703	0,03617	0,18573	0,06896	0,13825	0,00640	0,07334
Linolová	C18:2 N6	0,10148	0,05902	0,17805	1,08529	0,27242	0,85630	0,02560	0,27857
Arachová	C20:0	0,00264	0,00349	0,00421	0,02686	0,01757	0,00854	0,00052	0,00493
g-Linolenová	C18:3 N6	0,00090	0,00107	0,00145	0,00757	0,00255	0,00916	0,00156	0,00185
Linolenová	C18:3 N3	0,01365	0,00844	0,02992	0,22377	0,05751	0,20156	0,00173	0,08398
Behenová	C22:0	0,00190	0,00129	0,00196	0,02128	0,00458	0,01034	0,00090	0,00441
Eicosatrienová	C20:3 N6	0,00329	0,00230	0,00515	0,03746	0,01699	0,02547	0,00162	0,00477
Arachidonová	C20:4 N6	0,02076	0,02164	0,02299	0,18055	0,15278	0,13120	0,00628	0,03600
Eikosapentaenová	C20:5 N3	0,00444	0,00179	0,00216	0,01375	0,01178	0,02896	0,00244	0,00202
Lignocerová	C24:0	0,00021	0,00018	0,00017	0,00053	0,00025	0,00068	0,00000	0,00032
Dokosatetraenová	C22:4 N6	0,00110	0,00076	0,00123	0,00888	0,00330	0,00739	0,00120	0,00200
Dokosapentaenová	C22:5 N3	0,00111	0,00072	0,00126	0,00737	0,00326	0,00552	0,00045	0,00247
Hexacosanová	C26:0	0,00320	0,00309	0,00310	0,00000	0,00506	0,00482	0,00000	0,00291
Dokosahexaenová	C22:6 N3	0,00135	0,00066	0,00181	0,00797	0,00494	0,00960	0,00138	0,00142
<b>celkem:</b>	<b>mmol/l</b>	<b>0,930</b>	<b>0,662</b>	<b>1,254</b>	<b>8,471</b>	<b>2,971</b>	<b>8,468</b>	<b>0,213</b>	<b>2,589</b>
Olejová/Stearová	18:1/18:0	5,899	4,965	6,975	8,090	6,831	4,749	3,603	8,387
Palmitoolej./ Palmitová	16:1N7/16:0	0,150	0,116	0,096	0,107	0,183	0,068	0,120	0,114
Stearová/Palmitová	18:0/16:0	0,161	0,180	0,129	0,137	0,138	0,202	0,310	0,116
Arachidonová/ Eikosatrienová	20:4N6/20:3N6	6,301	9,421	4,462	4,819	8,991	5,152	3,881	7,553
Eikosatrienová/Linolová	20:3N6/18:2N6	0,032	0,039	0,029	0,035	0,062	0,030	0,063	0,017
9-desaturasa	18:1/18:0	5,90	4,97	6,97	8,09	6,83	4,75	3,60	8,39
9-desaturasa x 100	16:1N7/16:0	14,96	11,58	9,60	10,73	18,31	6,79	12,03	11,39
elongasa x 100	18:0/16:0	16,15	18,01	12,86	13,68	13,79	20,20	30,97	11,55
5-desaturasa	20:4N6/20:3N6	6,30	9,42	4,46	4,82	8,99	5,15	3,88	7,55
6-desaturasa x 100	20:3N6/18:2N6	3,25	3,89	2,89	3,45	6,24	2,97	6,32	1,71
9-desaturasa (výpočet z ploch)	18:1/18:0	8,86	7,45	10,47	12,14	10,26	7,13	5,16	12,59

	Číslo vzorku	13	4	2	1	16	10	20	7
	Pacient	D22	D12	D10	D9	D27	D19	D28	D15
<b>Glukóza [mmol/l]</b>		10,2	6	3,1	7,9		12,8	15,8	9,9
<b>Glyk.hemog.Alc [%]</b>		7,2	7,3	7,8	8,5	8,6	8,9	9,4	7,8
<b>ALT [ukat/l]</b>		0,35	0,38	0,31	0,27	0,33	0,35	0,55	0,59
<b>AST [ukat/l]</b>		0,36	0,42	0,41	0,39	0,33	0,41	0,52	0,52
<b>GMT [ukat/l]</b>		0,29	0,29	0,33	0,28	0,38	0,82	0,45	0,33
<b>ALP [ukat/l]</b>		1,85	1,29	1,79	1,3	2,05	3,6	1,39	1,2
<b>Cholesterol [mmol/l]</b>		5,1	4,84	5,41	5,02	5,37	4,45	4,15	5,09
<b>HDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		1,5	1,7	1,6	0,8	1,6	0,8	2,1	1,2
<b>LDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		3,01	2,35	3,2	2,89	2,74	2,09	1,4	3,67
<b>Triacylglyc. [mmol/l]</b>		1	0,7	0,8	3,4	2,6	3,1	0,7	0,4



**Tab. 9.8 Tabulka naměřených dat pro LDL frakci seřazené podle glykovaného hemoglobinu (1. část)**

	Číslo vzorku	6	15	14	17	18	11	8	12
	Pacient	D14	D24	D23	D17	D25	D20	D16	D21
	Datum:	30.5.2008	2.6.2008	2.6.2008	12.6.2008	12.6.2008	2.6.2008	30.5.2008	2.6.2008
	Vzorek	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL
		%	%	%	%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	1,78%	2,56%	3,21%	1,62%	0,83%	2,43%	1,75%	1,75%
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,14%	0,19%	0,44%	0,23%	0,12%	0,34%	0,13%	0,19%
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	30,80%	23,94%	24,38%	24,85%	25,78%	26,77%	27,86%	26,02%
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	4,37%	2,06%	3,09%	2,88%	1,86%	2,29%	3,27%	1,88%
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	9,07%	8,93%	7,26%	7,27%	8,21%	8,31%	7,77%	8,21%
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	18,14%	16,83%	17,54%	18,82%	20,66%	18,77%	20,26%	18,77%
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,84%	1,43%	1,29%	1,63%	2,22%	1,15%	1,23%	1,19%
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	19,54%	28,66%	23,32%	27,70%	26,56%	26,97%	24,40%	30,38%
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,77%	0,77%	0,41%	0,60%	0,34%	0,43%	0,67%	0,61%
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,25%	0,18%	0,15%	0,19%	0,19%	0,17%	0,29%	0,19%
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	0,79%	0,75%	1,16%	0,73%	0,54%	0,93%	0,52%	0,79%
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,76%	0,89%	0,93%	1,18%	0,69%	0,68%	0,78%	0,59%
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	1,84%	3,11%	1,82%	3,86%	2,11%	2,07%	2,61%	2,04%
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	9,94%	8,53%	13,82%	6,05%	6,52%	7,71%	7,05%	6,46%
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,40%	0,21%	0,33%	0,24%	0,63%	0,24%	0,54%	0,26%
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,12%	0,16%	0,11%	0,44%	0,52%	0,13%	0,19%	0,13%
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,09%	0,13%	0,12%	0,36%	0,29%	0,09%	0,12%	0,10%
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,06%	0,10%	0,16%	0,32%	0,35%	0,11%	0,10%	0,10%
<b>Hexacosanová</b>	<b>C26:0</b>	0,08%	0,18%	0,10%	0,04%	0,10%	0,11%	0,13%	0,10%
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,23%	0,38%	0,36%	0,99%	1,48%	0,30%	0,33%	0,25%
	Číslo vzorku	6	15	14	17	18	11	8	12
	Pacient	D14	D24	D23	D17	D25	D20	D16	D21
		mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,17704	0,14527	0,20652	0,03972	0,01729	0,20436	0,17968	0,14644

<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,01360	0,01073	0,02819	0,00563	0,00259	0,02831	0,01287	0,01593
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	3,06504	1,35850	1,56943	0,60747	0,53881	2,25360	2,85425	2,18040
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	0,43453	0,11710	0,19870	0,07041	0,03897	0,19257	0,33493	0,15716
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	0,90252	0,50683	0,46748	0,17770	0,17150	0,69917	0,79561	0,68820
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	1,80507	0,95526	1,12939	0,46006	0,43164	1,58024	2,07570	1,57309
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	0,08397	0,08141	0,08290	0,03988	0,04649	0,09663	0,12625	0,10002
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	1,94426	1,62652	1,50138	0,67722	0,55493	2,26977	2,50026	2,54616
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,07711	0,04352	0,02634	0,01460	0,00710	0,03620	0,06857	0,05083
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,02459	0,01038	0,00977	0,00457	0,00392	0,01449	0,02957	0,01615
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	0,07827	0,04250	0,07455	0,01777	0,01139	0,07865	0,05319	0,06613
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,07605	0,05067	0,06007	0,02883	0,01441	0,05734	0,07972	0,04911
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	0,18290	0,17646	0,11690	0,09424	0,04409	0,17440	0,26775	0,17076
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	0,98936	0,48391	0,88963	0,14790	0,13618	0,64855	0,72192	0,54172
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,03967	0,01181	0,02137	0,00586	0,01308	0,01996	0,05526	0,02182
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,01194	0,00908	0,00740	0,01078	0,01087	0,01107	0,01974	0,01079
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,00870	0,00736	0,00797	0,00872	0,00599	0,00777	0,01274	0,00801
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,00607	0,00585	0,01021	0,00784	0,00736	0,00958	0,01054	0,00870
<b>Hexacosanová</b>	<b>C26:0</b>	0,00826	0,01013	0,00643	0,00090	0,00211	0,00892	0,01290	0,00831
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,02256	0,02141	0,02305	0,02431	0,03095	0,02549	0,03364	0,02130
<b>celkem:</b>	<b>mmol/l</b>	9,952	5,675	6,438	2,444	2,090	8,417	10,245	8,381
Olejová/Stearová	18:1/18:0	2,000	1,885	2,416	2,589	2,517	2,260	2,609	2,286
Palmitolej./ Palmitová	16:1N7/16:0	0,142	0,086	0,127	0,116	0,072	0,085	0,117	0,072
Stearová/Palmitová	18:0/16:0	0,294	0,373	0,298	0,293	0,318	0,310	0,279	0,316
Arachidonová/ Eikosatrienová	20:4N6/20:3N6	5,409	2,742	7,610	1,569	3,089	3,719	2,696	3,172
Eikosatrienová/Linolová	20:3N6/18:2N6	0,094	0,108	0,078	0,139	0,079	0,077	0,107	0,067
9-desaturasa	18:1/18:0	2,00	1,88	2,42	2,59	2,52	2,26	2,61	2,29
9-desaturasa x 100	16:1N7/16:0	14,18	8,62	12,66	11,59	7,23	8,55	11,73	7,21
elongasa x 100	18:0/16:0	29,45	37,31	29,79	29,25	31,83	31,02	27,87	31,56
5-desaturasa	20:4N6/20:3N6	5,41	2,74	7,61	1,57	3,09	3,72	2,70	3,17
6-desaturasa x 100	20:3N6/18:2N6	9,41	10,85	7,79	13,92	7,94	7,68	10,71	6,71
9-desaturasa (výpočet z ploch)	18:1/18:0	3,00	2,83	3,63	3,71	3,60	3,39	3,92	3,43

	Číslo vzorku	6	15	14	17	18	11	8	12
	Pacient	D14	D24	D23	D17	D25	D20	D16	D21
<b>Glukóza [mmol/l]</b>		4,5	6,6	4,7	8,9	5,5	7,5	8,5	8,6
<b>Glyk.hemog.Alc [%]</b>		3,1	3,4	4,1	4,8	5,4	6,9	7	7
<b>ALT [ukat/l]</b>			0,48	0,29	0,33	0,75	0,68	0,32	0,23
<b>AST [ukat/l]</b>			0,38	0,31	0,42	0,67	0,52	0,41	0,35
<b>GMT [ukat/l]</b>			0,3	0,29	0,42	0,42	0,4	0,37	0,3
<b>ALP [ukat/l]</b>			1,02	1,3	1,48	1,12	0,82	1,51	1,62
<b>Cholesterol [mmol/l]</b>		5,3	4,21	4,16	5,62	4,59	5,74	6,18	5,07
<b>HDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		2,1	1,4	1,2	1,1	1,5	1,4	1,6	1,7
<b>LDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		2,76	2,43	2,34	3,65	2,17	3,6	3,29	2,73
<b>Triacylglyc. [mmol/l]</b>		0,8	1,1	1,4	1,9	1,2	1,8	1,1	0,8

**Tab. 9.9** Tabulka naměřených dat pro LDL frakci seřazené podle glykovaného hemoglobinu (2. část)

	Číslo vzorku	13	4	7	2	1	16	10	20
	Pacient	D22	D12	D15	D10	D9	D27	D19	D28
	Datum:	2.6.2008	30.5.2008	30.5.2008	30.5.2008	30.5.2008	2.6.2008	2.6.2008	12.6.2008
	Vzorek	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL	LDL
		%	%	%	%	%	%	%	%
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	1,98%	2,07%	1,89%	1,54%	1,57%	2,95%	2,57%	1,71%
<b>N-Pentadekanová</b>	<b>C15:0</b>	0,24%	0,36%	0,31%	0,24%	0,14%	0,36%	0,24%	0,22%
<b>Palmitová</b>	<b>C16:0</b>	25,40%	26,07%	27,23%	27,47%	29,25%	27,05%	31,46%	23,93%
<b>Palmitolejová</b>	<b>C16:1 N7</b>	2,90%	2,13%	2,06%	1,89%	2,43%	4,13%	2,04%	1,82%
<b>Stearová</b>	<b>C18:0</b>	8,32%	7,65%	6,93%	6,87%	7,36%	6,91%	8,66%	7,85%
<b>Olejová</b>	<b>C18:1 N9</b>	19,21%	18,76%	18,89%	19,24%	25,61%	21,58%	25,81%	18,73%
<b>Oktadecenová</b>	<b>C18:1 N7</b>	1,42%	1,41%	1,18%	1,40%	1,50%	1,39%	1,51%	1,53%
<b>Linolová</b>	<b>C18:2 N6</b>	26,96%	23,17%	30,00%	30,01%	20,62%	19,90%	19,27%	30,02%
<b>Arachová</b>	<b>C20:0</b>	0,73%	0,60%	0,41%	0,37%	0,54%	0,78%	0,17%	0,35%
<b>g-Linolenová</b>	<b>C18:3 N6</b>	0,18%	0,18%	0,19%	0,24%	0,15%	0,17%	0,14%	0,06%
<b>Linolenová</b>	<b>C18:3 N3</b>	0,73%	0,70%	0,72%	0,70%	0,82%	0,84%	1,08%	0,81%
<b>Behenová</b>	<b>C22:0</b>	0,88%	0,81%	0,98%	0,57%	1,00%	0,68%	0,46%	0,98%
<b>Eicosatrienová</b>	<b>C20:3 N6</b>	2,27%	2,56%	1,79%	2,48%	2,00%	1,66%	1,19%	3,44%
<b>Arachidonová</b>	<b>C20:4 N6</b>	7,64%	12,30%	6,16%	5,84%	6,14%	10,44%	4,31%	5,74%
<b>Eikosapentaenová</b>	<b>C20:5 N3</b>	0,28%	0,42%	0,49%	0,36%	0,30%	0,41%	0,38%	0,65%
<b>Lignocerová</b>	<b>C24:0</b>	0,14%	0,16%	0,17%	0,17%	0,08%	0,12%	0,06%	0,53%
<b>Dokosatetraenová</b>	<b>C22:4 N6</b>	0,11%	0,12%	0,09%	0,10%	0,10%	0,11%	0,10%	0,27%
<b>Dokosapentaenová</b>	<b>C22:5 N3</b>	0,10%	0,12%	0,12%	0,09%	0,09%	0,11%	0,10%	0,16%
<b>Hexacosanová</b>	<b>C26:0</b>	0,17%	0,15%	0,12%	0,14%	0,05%	0,08%	0,07%	0,11%
<b>Dokosahexaenová</b>	<b>C22:6 N3</b>	0,34%	0,27%	0,27%	0,30%	0,23%	0,32%	0,36%	1,07%
	Číslo vzorku	13	4	7	2	1	16	10	20
	Pacient	D22	D12	D15	D10	D9	D27	D19	D28
		mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
<b>Myristová</b>	<b>C14:0</b>	0,14572	0,13399	0,17486	0,12234	0,19297	0,14965	0,18576	0,02038

N-Pentadekanová	C15:0	0,01762	0,02321	0,02912	0,01868	0,01773	0,01831	0,01749	0,00263
Palmitová	C16:0	1,87027	1,68479	2,52336	2,18177	3,58910	1,37077	2,27713	0,28536
Palmitolejová	C16:1 N7	0,21373	0,13765	0,19120	0,15000	0,29825	0,20937	0,14798	0,02166
Stearová	C18:0	0,61238	0,49438	0,64187	0,54586	0,90302	0,35021	0,62710	0,09365
Olejová	C18:1 N9	1,41483	1,21224	1,75032	1,52810	3,14174	1,09347	1,86777	0,22337
Oktadecenová	C18:1 N7	0,10471	0,09084	0,10959	0,11115	0,18441	0,07035	0,10940	0,01818
Linolová	C18:2 N6	1,98581	1,49760	2,78045	2,38339	2,53055	1,00840	1,39447	0,35788
Arachová	C20:0	0,05382	0,03847	0,03787	0,02954	0,06655	0,03969	0,01223	0,00414
g-Linolenová	C18:3 N6	0,01345	0,01168	0,01783	0,01901	0,01876	0,00865	0,01038	0,00075
Linolenová	C18:3 N3	0,05383	0,04551	0,06698	0,05540	0,10073	0,04237	0,07841	0,00968
Behenová	C22:0	0,06448	0,05236	0,09038	0,04546	0,12246	0,03435	0,03352	0,01171
Eicosatrienová	C20:3 N6	0,16700	0,16524	0,16626	0,19662	0,24498	0,08407	0,08598	0,04101
Arachidonová	C20:4 N6	0,56268	0,79513	0,57129	0,46413	0,75380	0,52896	0,31211	0,06848
Eikosapentaenová	C20:5 N3	0,02093	0,02734	0,04530	0,02834	0,03686	0,02062	0,02781	0,00780
Lignocerová	C24:0	0,01054	0,01047	0,01558	0,01345	0,00931	0,00614	0,00460	0,00631
Dokosatetraenová	C22:4 N6	0,00824	0,00756	0,00870	0,00809	0,01238	0,00577	0,00732	0,00328
Dokosapentaenová	C22:5 N3	0,00739	0,00762	0,01123	0,00741	0,01136	0,00552	0,00692	0,00189
Hexacosanová	C26:0	0,01220	0,00939	0,01073	0,01075	0,00631	0,00417	0,00510	0,00130
Dokosahexaenová	C22:6 N3	0,02483	0,01750	0,02513	0,02370	0,02855	0,01609	0,02613	0,01281
<b>celkem:</b>	<b>mmol/l</b>	<b>7,364</b>	<b>6,463</b>	<b>9,268</b>	<b>7,943</b>	<b>12,270</b>	<b>5,067</b>	<b>7,238</b>	<b>1,192</b>
Olejová/Stearová	18:1/18:0	2,310	2,452	2,727	2,799	3,479	3,122	2,978	2,385
Palmitolej./ Palmitová	16:1N7/16:0	0,114	0,082	0,076	0,069	0,083	0,153	0,065	0,076
Stearová/Palmitová	18:0/16:0	0,327	0,293	0,254	0,250	0,252	0,255	0,275	0,328
Arachidonová/ Eikosatrienová	20:4N6/20:3N6	3,369	4,812	3,436	2,361	3,077	6,292	3,630	1,670
Eikosatrienová/Linolová	20:3N6/18:2N6	0,084	0,110	0,060	0,082	0,097	0,083	0,062	0,115
9-desaturasa	18:1/18:0	2,31	2,45	2,73	2,80	3,48	3,12	2,98	2,39
9-desaturasa x 100	16:1N7/16:0	11,43	8,17	7,58	6,88	8,31	15,27	6,50	7,59
elongasa x 100	18:0/16:0	32,74	29,34	25,44	25,02	25,16	25,55	27,54	32,82
5-desaturasa	20:4N6/20:3N6	3,37	4,81	3,44	2,36	3,08	6,29	3,63	1,67
6-desaturasa x 100	20:3N6/18:2N6	8,41	11,03	5,98	8,25	9,68	8,34	6,17	11,46

9-desaturasa (výpočet z ploch)	18:1/18:0	3,47	3,68	4,09	4,20	5,22	4,69	4,47	3,41
	Číslo vzorku	13	4	7	2	1	16	10	20
	Pacient	D22	D12	D15	D10	D9	D27	D19	D28
<b>Glukóza [mmol/l]</b>		10,2	6	9,9	3,1	7,9		12,8	15,8
<b>Glyk.hemog.Alc [%]</b>		7,2	7,3	7,8	7,8	8,5	8,6	8,9	9,4
<b>ALT [ukat/l]</b>		0,35	0,38	0,59	0,31	0,27	0,33	0,35	0,55
<b>AST [ukat/l]</b>		0,36	0,42	0,52	0,41	0,39	0,33	0,41	0,52
<b>GMT [ukat/l]</b>		0,29	0,29	0,33	0,33	0,28	0,38	0,82	0,45
<b>ALP [ukat/l]</b>		1,85	1,29	1,2	1,79	1,3	2,05	3,6	1,39
<b>Cholesterol [mmol/l]</b>		5,1	4,84	5,09	5,41	5,02	5,37	4,45	4,15
<b>HDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		1,5	1,7	1,2	1,6	0,8	1,6	0,8	2,1
<b>LDL-Cholesterol [mmol/l]</b>		3,01	2,35	3,67	3,2	2,89	2,74	2,09	1,4
<b>Triacylglyc. [mmol/l]</b>		1	0,7	0,4	0,8	3,4	2,6	3,1	0,7

## 9.3 Seznam tabulek a obrázků

### 9.3.1 Seznam vyobrazení

- Obr. 3.1 Anatomie ucha
- Obr. 3.2 Krevní lipoprotein
- Obr. 3.3 Metabolismus lipoproteinů
- Obr. 3.4 Struktura inzulínu
- Obr. 3.5 TLC chromatogram
- Obr. 4.1 Ukázka chromatogramu plazmatických mastných kyselin
- Obr. 5.1 Závislost TG na celkových lipidech ve VLDL frakci
- Obr. 5.2 Vliv vysokokalorické a nízkokalorické stravy na aktivitu  $\Delta 9$ -desaturázy ve VLDL frakci u zdravých jedinců
- Obr. 5.3 Graf závislosti HDL-cholesterolu ve VLDL frakci
- Obr. 5.4 Graf závislosti LDL-cholesterolu ve VLDL
- Obr. 5.5 Graf závislosti TG ve VLDL frakci
- Obr. 5.6 Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny linolové ve VLDL frakci
- Obr. 5.7 Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny  $\gamma$ -linolenové ve VLDL frakci
- Obr. 5.8 Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny olejové ve VLDL a LDL frakci
- Obr. 5.9 Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny stearové ve VLDL frakci
- Obr. 5.10 Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny arachové ve VLDL frakci
- Obr. 5.11 Grafické znázornění procentuálního zastoupení kyseliny behenové ve VLDL frakci
- Obr. 5.12 Grafické znázornění aktivity  $\Delta 9$ -desaturázy ve VLDL a LDL frakci
- Obr. 5.13 Grafické znázornění aktivity  $\Delta 6$ -desaturázy ve VLDL a LDL frakci
- Obr. 5.14 Grafické znázornění aktivity  $\Delta 5$ -desaturázy ve VLDL a LDL frakci
- Obr. 5.15 Grafické znázornění aktivity elongázy ve VLDL a LDL frakci
- Obr. 6.1 Grafické znázornění aktivit sledovaných enzymů u jednotlivých skupin pacientů na glykovaném hemoglobinu

### 9.3.2 Seznam tabulek

- Tab. 3.1 Charakteristika lipoproteinů
- Tab. 4.1 Rozdělení pacientů do tří skupin
- Tab. 9.1 Statistické zpracování výsledkových dat pro VLDL frakci
- Tab. 9.2 Koncentrace lipidů ve VLDL frakci
- Tab. 9.3 Koncentrace lipidů v LDL frakci
- Tab. 9.4 Koncentrace lipidů v HDL<sub>2</sub> frakci
- Tab. 9.5 Koncentrace lipidů v HDL<sub>3</sub> frakci
- Tab. 9.6 Tabulka naměřených dat pro VLDL frakci seřazené podle na glykovaného hemoglobinu (1.část)
- Tab. 9.7 Tabulka naměřených dat pro VLDL frakci seřazené podle na glykovaného hemoglobinu (2.část)
- Tab. 9.8 Tabulka naměřených dat pro LDL frakci seřazené podle na glykovaného hemoglobinu (1.část)
- Tab. 9.9 Tabulka naměřených dat pro LDL frakci seřazené podle na glykovaného hemoglobinu (2.část)

### 9.3.3 Seznam zkratk

- AST Absorbance standardu
- AVZ Absorbance vzorku
- BMI Body mass index
- CETP Cholesterylestertransferující protein
- Ch Cholesterol
- CH Chylomikron
- ChE Ester cholesterolu
- CL Celkové lipidy
- CoA Acetyl-koenzym A
- DG Diglyceridy
- DM Diabetes mellitus
- DNA Deoxyribonukleová kyselina
- EDTA Kyselina ethyldiamintetraoctová
- EFA Esenciální mastné kyseliny
- FA Mastné kyseliny



• FFA	Volné mastné kyseliny
• HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě
• HLA	Lidské prezentační/tkáňové/transplantační antigeny
• HMRS	Protonová magnetická rezonanční spektroskopie
• IDDM	Diabetes mellitus závislý na inzulínu
• IDL	Lipoproteiny s přechodnou hustotou
• IEC	Iontově-výměnná chromatografie
• IR	Inzulínová rezistence
• IRS-1	Inzulínový receptorový substrát 1
• KBBV	Katedra biologických a biochemických věd
• LCAT	Lecitin-cholesterolacyltransferáza
• LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
• LLC	Rozdělovací kapalinová chromatografie
• LPL	Lipoproteinová lipáza
• LSC	Adsorpční kapalinová chromatografie
• Mr	Relativní molekulová hmotnost
• MTP	Mikrozomální triglyceridový transportní protein
• NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
• NIDDM	Diabetes mellitus nezávislý na inzulínu
• oGTT	Glukózový toleranční test
• PL	Fosfolipidy
• PP	Pankreatický polypeptid
• PUFA	Vícenenasycené mastné kyseliny
• Rf	Retenční faktor
• SCD	Stearoyl-koenzym A desaturáza
• SEC	Gelová permeační chromatografie
• TG	Triglyceridy
• TLC	Tenkvrstevná chromatografie
• tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
• VLDL	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě
• VMK	Volné mastné kyseliny