

**Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická**

**Analytické parametry stanovení obsahu lipidů v ušním mazu při
použití preparativní chromatografie na tenké vrstvě**

Bc. Markéta Šenkyříková

**Diplomová práce
2009**

Prohlášení autora

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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 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 20.4. 2009

Markéta Šenkyříková

Ráda bych poděkovala vedoucí práce slečně Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., panu prof. RNDr. Milanu Melounovi, DrSc. za poskytnutí užitečných rad a doporučení při statistickém vyhodnocení dat a panu MUDr. Karlu Pokornému , Ph.D. za poskytnutí vzorků k analýze a především za cenné připomínky a velkou pomoc při vypracování diplomové práce.

SOUHRN

Předložená diplomová práce se zabývá problematikou ušního mazu ve vztahu k určení analytických vlastností.

Součástí práce bylo ověřit metodiku stanovení pěti tříd lipidů, která byla již v minulosti k analýze vzorků ušního mazu používána. Modifikace stávajícího pracovního postupu, které nejlépe vypovídaly byly následně použity k vlastní analýze 23 vzorků ušního mazu se zaměřením na závislosti pěti lipidových frakcí cerumina (fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu). Separace byla prováděna metodou preparativní chromatografie na tenké vrstvě.

Získaná experimentální data byla statisticky vyhodnocena, k analýze dat byla použita analýza rozptylu, metoda hlavních komponent, faktorová analýza a analýza shluků.

Analýza rozptylu testovala významnost faktorů pacient a opakovatelnost. Faktor pacient je statisticky významný zatímco opakovatelnost je statisticky nevýznamná. Metoda stanovení ušního mazu pomocí preparativní tenkovrstevné chromatografie je tedy reprodukovatelná a nedochází ke změnám složení v různých částech naakumulovaného vzorku ušního mazu. Rozdíly pozorované mezi jedinci jsou statisticky významné.

Pomocí exploratorní analýzy dat byla prokázána dostatečná proměnlivost v datech pěti vyšetřovaných znaků ušního mazu, která potvrdila možnost užití dalších metod vícerozměrné statistické analýzy. Jelikož řada znaků při vyšetřování metodou exploratorní analýzy naznačovala dostatečnou korelaci, mohla se následně provést metoda hlavních komponent i faktorová analýza. Metodou hlavních komponent za použití zdrojové matice středních hodnot u pěti vyšetřovaných znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH s využitím Hornovy pivotové polosumy malého výběru byl zjištěn optimální počet hlavních komponent dvě a bylo odhaleno, že volné mastné kyseliny a diacylglyceroly silně pozitivně korelují, diacylglyceroly s volnými mastnými kyselinami nekoreluje s fosfolipidy ani s estery cholesterolu, a že fosfolipidy negativně korelují s estery cholesterolu. Užitím metody shluků bylo zjištěno, že triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a diacylglyceroly jsou si vzájemně podobné, avšak silně nepodobné s estery cholesterolu a s fosfolipidy.

Práce odhalila nové informace týkající se problematiky ušního mazu a přispěla tak k rozšíření znalostí o ušním mazu.

Klíčová slova: cerumen, složení, vícerozměrné statistické metody, tenkovrstevná chromatografie

SUMMARY

The thesis considers the topic of the earwax analysis, specifically, the accuracy of the standard used methodology and its analytical properties.

Firstly the established Thin Layer Chromatography methodology of the five lipid fractions separation was verified. Then the currently used techniques were optimized and subsequently utilized for the analysis of the earwax on the sample of 23 subjects with regards to the five earwax lipid fractions (phospholipids, diglycerides, free fatty acids, triglycerides and cholesterol esters) separation. The obtained experimental data were statistically evaluated adopting the Analysis of Variance, Principal Components Analysis, Factor Analysis and Clusters Analysis.

Using the Analysis of Variance the significance of the “patient” and “repeatability (of measurements)” factors was assessed. The factor “patient” was appraised as statistically significant whereas the factor “repeatability (of measurements)” as statistically insignificant. Based on the results it was concluded that the earwax analysis, using the Thin Layer Chromatography methodology, is repeatable and the composition of the diverse parts of the accumulated earwax sample can be regarded as similar. The differences between the tested subjects were assessed as statistical significant.

Adopting the Exploratory Data Analysis the sufficient variability of the five investigated earwax attributes and thus the possibility of using further multidimensional statistic analysis was verified. Since the correlation between most of the attributes was found, the consecutive use of Principal Components Analysis and Factor Analysis was confirmed.

Utilizing the Principal Components Analysis (using the average values source matrix of the five phospholipids investigated attributes - diglycerides, free fatty acids, triglycerides and cholesterol esters – and exploiting Horn’s Estimation of Average Values method) the optimal number of main component (i.e. two) was found. Further the strong positive correlation between diglycerides and free fatty acids, any correlation between diglycerides/ free fatty acids and neither phospholipid nor cholesterol esters, negative correlation between phospholipids and cholesterol esters were revealed.

Adopting the Clusters Analysis the similarity of diglycerides, free fatty acids and triglycerides but also their unlikeness to cholesterol esters and phospholipids was disclosed.

In the thesis new information regarding the currently used earwax analysis methodology were disclosed, that can further improve the earwax examination techniques.

Key words: earwax, composition, multidimensional statistical analysis, Thin Layer Chromatography

OBSAH

1 Úvod	11
2 Teoretická část.....	12
2.1 Chromatografické metody	12
2.1.1 Princip chromatografických technik.....	12
2.1.2 Rozdělení technik chromatografie.....	12
2.1.3 Tenkovrstevná chromatografie	13
2.1.3.1 Experimentální postup tenkovrstevné chromatografie	14
2.1.3.2 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení u tenkovrstvé chromatografie	14
2.2 Lipidy.....	16
2.2.1 Obecné poznatky o lipidech	16
2.2.2 Fyziologicky významné lipidy	17
2.3. Anatomie ucha.....	18
2.3.1. Zevní ucho	18
2.3.2 Střední ucho.....	19
2.3.3 Vnitřní ucho.....	20
2.4 Ušní maz	21
2.4.1 Tvorba ušního mazu	21
2.4.2 Fenotypy ušního mazu.....	21
2.4.3 Složení ušního mazu.....	22
2.4.4 Funkce ušního mazu	23
3 Cíle práce.....	25
4 Experimentální část	26
4.1 Analyzovaný materiál.....	26
4.2 Metodika laboratorního zpracování.....	27
4.2.1 Extrakce lipidů ze vzorku	27
4.2.2 Chromatografie a detekce kyselinou fosfomolybdenovou	27
4.3 Metodika statistického zpracování	32
4.3.1. Charakteristika vícerozměrných dat	32
4.3.2 Exploratorní analýza vícerozměrných dat	32
4.3.3 Analýza hlavních komponent	33
4.3.4 Faktorová analýza.....	34
4.3.5 Analýza shluků	35

4.3.6 Analýza rozptylu	35
5 Výsledky	36
5.1 Ověření metodiky stanovení pěti tříd lipidů	36
5.2 Výsledky laboratorní analýzy	39
5.3 Výsledky statistického zpracování	45
5.3.1 Analýza rozptylu (ANOVA)	45
5.3.2 Exploratorní analýza dat	50
5.3.3 Metoda hlavních komponent	54
5.3.4 Analýza shluků	55
5.3.5 Faktorová analýza	57
6 Diskuze	64
7 Závěry	69
8 Seznam literatury	72
9 Přílohy	76
9.1 Seznam použitých zkratk	76
9.2 Seznam obrázků	77
9.3 Seznam tabulek	78
9.4 Souhrn dat	79

1 ÚVOD

Ušní maz je fyziologický produkt kůže zevního zvukovodu, který je směsí produktů žlázek zevního zvukovodu, oloupaných epitelí, vypadaných chloupků a do zvukovodu zanesených nečistost.

Analýzou ušního mazu bylo zjištěno, že dvě hlavní složky ušního mazu jsou lipidy a proteiny. Bližší analýzou lipidové složky ušního mazu bylo vyzkoumáno, že obsahuje mastné kyseliny, cholesterol, triacylglyceroly, estery cholesterolu a další lipidové látky [1].

Přestože se řada autorů se zabývala složením ušního mazu, stále nejsou rozkryty všechny vlivy působící na jeho složení.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chromatografické metody

2.1.1 Princip chromatografických technik

Chromatografie je jednou z nejpoužívanějších fyzikálně-chemickou separační metodou, která je využívána k dělení velmi složitých směsí, identifikaci, kvantifikaci, analytické kontrole čistoty barviv, léčiv, rozpouštědel a k přečištění chemikálií. Široké uplatnění našla v biochemii, farmakologii a toxikologii. V klinické biochemii má význam při dělení steroidů, lipidů, aminokyselin, sacharidů či hormonů. Pro rutinní kvalitativní a kvantitativní analýzu je v praxi nejpoužívanější chromatografie na tenkých vrstvách, vysokoučinná kapalinová chromatografie nebo chromatografie plynová [2].

Základním principem všech chromatografických technik je dělení složek vzorku mezi dvě navzájem nemísitelné fáze – **stacionární a mobilní**. Dochází k postupnému, mnohonásobně opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi dvěma fázemi [3]. Stacionární fáze je nepohyblivá a mobilní je pohyblivá.

Samotné dělení složek vzorku je založeno na tom, že rychlost pohybu jednotlivých rozpuštěných molekul je závislá na rozdělování těchto molekul mezi stacionární a mobilní fázi[4].

Mobilní fází je kapalina nebo plyn, jimiž je stanovovaná látka z kolony nebo z tenké vrstvy postupně vymývána dle její afinity. Stacionární fázi může tvořit kapalina zakotvená na tuhém nosiči nebo tuhý sorbent. Dělené látky jsou na koloně nebo na tenké vrstvě zachycovány s různou afinitou. Tak dochází k postupnému dělení směsi, nejrychleji migrují složky, které mají nejmenší afinitu k stacionární fázi a nejvíce jsou zadržovány složky s největší afinitou k stacionární fázi.

2.1.2 Rozdělení technik chromatografie

Chromatografické techniky se rozdělují podle několika hledisek:

a) podle skupenství mobilní fáze:

- kapalinová chromatografie – mobilní fází je kapalina
- plynová chromatografie – mobilní fází je plyn

b) podle uspořádání stacionární fáze:

- kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěná v koloně
- plošné techniky
 - papírová chromatografie – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru
 - tenkovrstevná chromatografie – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (na skleněné desce, hliníkové fólii)

c) podle fyzikálního principu, který probíhá:

- podle rozdělovacího koeficientu (rozdělovací chromatografie)
- podle svých různých adsorpčních koeficientů (adsorpční chromatografie)
- podle velikosti disociačních konstant na základě rozdílného elektrického náboje (iontoměničová chromatografie)
- podle velikosti relativních molekulových hmotností (gelová chromatografie)
- podle specifické afinity k určitému ligandu (afinitní chromatografie)

d) podle způsobu provedení:

- na papíře
- v koloně
- na tenkých vrstvách

e) podle způsobu zavádění vzorku na kolonu a podle eluční síly použité mobilní fáze se rozlišují tři techniky vyvíjení:

- frontální vyvíjení – vzorek se přivádí kontinuálně
- vytěšňovací vyvíjení – vzorek se přivádí diskontinuálně
- eluční vyvíjení – vzorek se přivádí diskontinuálně a jeho složky jsou na koloně sorbovány silněji, než složky mobilní fáze [3].

Všechny tyto rozdělení jsou pouze orientační, neboť mnohdy se mohou uplatňovat dva mechanismy zároveň nebo naopak podstata dělicího procesu nemusí být zcela objasněna [2].

2.1.3 Tenkovrstevná chromatografie

Tenkovrstevná chromatografie (TLC – Thin Layer Chromatography) má oproti papírové chromatografii vyšší účinnost, kratší dobu migrace a tedy i kratší celkovou dobu analýzy. K samotnému dělení dochází při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou jemnozrného

sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze, který je buď volně uložen nebo fixován na vhodné podložce. Podložku tvoří buď skleněná deska, hliníková nebo plastová folie [5, 6].

V tenkovrstevné chromatografii se používají adsorbenty, což jsou tuhé látky schopné reverzibilně vázat na svém povrchu v aktivních centrech jiné sloučeniny v kapalně nebo plynné fázi působením fyzikálních nebo chemických sil. Vysoce aktivní sorbent poutá látky tak silně, že zůstanou fixovány na startu. Naopak málo aktivní sorbent poutá látky velmi slabě, takže látky postupují s čelem elučního činidla [6]. Na sobenty jsou kladeny vysoké požadavky týkající se čistoty, zrnění popřípadě dalších vlastností. Mezi nejčastěji používané adsorbenty patří silikagel, oxid hlinitý, křemelina, celit, škrob nebo práškový škrob [5, 7]. Silikagel lze s výhodou používat při chromatografii polárních látek, jelikož u něj lze měnit jeho aktivitu například ho částečně deaktivovat.

2.1.3.1 Experimentální postup tenkovrstevné chromatografie

Vzorek se nejprve musí rozpustit ve vhodném rozpouštědle, které musí být těkavé, nesmí chemicky poškozovat chromatogram a musí být bez nečistot. Na chromatogramu vyznačíme tužkou start a body pro nanesení vzorků. Vzdálenost mezi jednotlivými vzorky by měla být 1,5 až 2,5 cm od sebe. Na označená místa se pomocí mikrokapilár či mikropipet nanese pečlivě vzorek. Po odpaření rozpouštědla je možné nanést vzorek znovu, a tak postupovat, dokud se nespoteřebuje celý objem vzorku. Po nanesení vzorku se chromatogram ponechá vyvíjet v uzavřeném prostoru nasyceném parami rozpouštědla. V chromatografické komoře je na dně vrstva mobilní fáze, do které se chromatografická deska umístí tak, aby start byl asi 1 cm nad hladinou rozpouštědla. Chromatogram se nechá potřebnou dobu vyvíjet a pak se provede jeho detekce. Před detekcí je nutno chromatogram vysušit.

Rozdělené složky putují u TLC v podobě skvrn, které lze detekovat pomocí vhodné fyzikální, chemické či biologické metody

2.1.3.2 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení u tenkovrstvé chromatografie

Kvalitativní hodnocení chromatogramu je založeno na identifikaci rozdělených složek. Porovnáním získaných elučních dat jednotlivých složek vzorku se současně získanými daty standardních látek je možno potvrdit identitu neznámých komponent analyzovaného vzorku [3]. Každá látka má svou charakteristickou polohu, která se vyjadřuje pomocí retenčního faktoru R_F . Retenční faktor je poměr vzdálenosti středu skvrny od startu ku vzdálenosti čela mobilní fáze ku startu.

Specifická detekce rozdělených složek je také součástí kvalitativní analýzy. Je možno použít metody fyzikální, chemické či biologické detekce. Při užití metody fyzikální detekce se využívá záření viditelného, ultrafialového nebo infračerveného, které dopadá na chromatogram. Řada látek absorbuje světlo určité vlnové délky, čehož lze využít při prohlížení chromatogramu. U chemické detekce se používá rozprašovač, kterým se celá deska chromatogramu postříká a chemickou reakcí látky s detekčním činidlem vzniká barevná nebo fluoreskující látka. Jako detekční činidlo slouží kyselina sírová, kyselina dusičná, dichroman sodný, manganistan draselný, koncentrovaný hydroxid a celá řada specifických činidel. Biologický způsob detekce je založen například na tom, že se využije biologických vlastností látky k zastavení růstu mikroorganismů [8].

Ke kvantitativnímu hodnocení lze přistupovat dvěma způsoby – analýzou přímou (in situ) a vyhodnocováním nepřímým (po eluci). Přímá metoda vyhodnocení kvantity je podstatně méně časově náročná. Přímé měření skvrn se provádí nejčastěji optickými metodami denzitometricky, kdy se zjišťuje stupeň ztmavnutí tenké vrstvy v místě skvrny [9]. Nepřímé vyhodnocování je založeno na extrakci látky z tenké vrstvy a následném stanovení jednotlivých sloučenin spektrofotometricky v ultrafialové, infračervené i viditelné oblasti, případně fluorimetricky či jinými metodami. Chromatografie slouží v případě použití nepřímého vyhodnocování kvantity pouze jako preparativní metoda [3].

2.2 Lipidy

2.2.1 Obecné poznatky o lipidech

Lipidy jsou heterogenní skupina sloučenin, která má přímo či nepřímo vztah k mastným kyselinám. Jejich společnou vlastností je relativní nerozpustnost ve vodě a dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech jako ether, chloroform a benzen [10]. Lipidy jsou důležitou složkou potravy nejen pro svou vysokou energetickou hodnotu, ale i pro obsah esenciálních mastných kyselin a vitamínů rozpustných v tucích.

V těle slouží lipidy jako přímý i nepřímý zdroj energie. U některých orgánů a v podkožní tkáni mají funkci tepelného izolátoru. Nepolární lipidy vytvářejí elektrickou izolaci, která umožňuje rychlé šíření depolarizačních vln podél myelinizovaných nervových vláken [10]. Lipidy se spontánně orientují do mono- a dvojvrstev, vytvářejí strukturní jádro biomembrán [11].

Lipidy rozdělujeme na:

- jednoduché
- složené
- prekurzory a odvozené lipidy

Jednoduché lipidy jsou estery mastných kyselin s různými alkoholy. Hlavními a nejčastějšími mastnými kyselinami v lipidech u savců jsou kyseliny palmitová, stearová a olejová [12]. Rozdíly v chemických vlastnostech jednoduchých lipidů jsou způsobeny především jejich alkoholovou složkou. Do skupiny jednoduchých lipidů se řadí tuky a vosky. Tuky jsou estery vyšších mastných kyselin s glycerolem. Tekuté tuky se nazývají oleje a obsahují převážně estery nenasycených mastných kyselin. Vosky jsou estery vyšších mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy.

Složené lipidy jsou estery, které obsahují kromě mastných kyselin a alkoholu navíc další skupiny. Složené lipidy mají amfifilní charakter. Mezi složené lipidy patří fosfolipidy, glykolipidy (glykosfingolipidy) a ostatní složené lipidy.

Fosfolipidy jsou lipidy, které obsahují kromě mastné kyseliny a alkoholu navíc zbytek kyseliny fosforečné popřípadě dusíkaté báze či další substituenty. Fosfolipidy se dále rozdělují na glycerolfosfolipidy a sfingolipidy. U glycerolfosfolipidů je alkohol glycerol, u sfingolipidů sfingosin. Glykolipidy obsahují mastnou kyselinu, sacharidovou složku a

sfingenin. Do skupiny, která zahrnuje ostatní složené lipidy patří sulfolipidy, aminolipidy a mohou sem být zařazeny i lipoproteiny.

Mezi prekurory a odvozené lipidy patří mastné kyseliny, glycerol, steroidy, alkoholy včetně glycerolu a sterolů, mastné aldehydy a ketolátky, uhlovodíky, v tučích rozpustné vitamíny a hormony [10].

2.2.2 Fyziologicky významné lipidy

Mastné kyseliny se vyskytují hlavně v podobě esterů v přírodních tučích a olejích, ale mohou být přítomné i v neesterifikované formě v podobě volných mastných kyselin, které jsou transportní formou přítomnou v krevní plazmě. V přírodních tučích mají mastné kyseliny většinou nevětvený řetězec obsahující sudý počet uhlíkových atomů. Řetězec může být nasycený (neobsahuje žádné dvojně vazby) nebo nenasycený (obsahuje jednu či více dvojných vazeb) [10]. Mastné kyseliny jsou základní stavební složky řady složených lipidů, jsou důležitým zdrojem metabolické energie a zapojují se do biosyntetických a katabolických dějů [13].

Triacylglyceroly jsou hlavní zásobní formou mastných kyselin, tvoří až 95% lipidů v plazmě a zásobních tkáních [13]. Strukturně jsou triacylglyceroly estery alkoholu glycerolu a mastných kyselin. V přírodních lipidech má jen velmi malá část stejnou mastnou kyselinu na všech esterových pozicích, většinou se jedná o smíšené acylglyceroly [10]. Triacylglyceroly slouží jako zásobárna energie.

Glycerofosfolipidy jsou estery 1,2-glycerol-3-fosforečné kyseliny, jejichž fosfátový zbytek tvoří diestery s aminoalkoholy ethanolaminem a cholinem, s hydroxyaminokyselinou serinem a s cyklickým alkoholem inositolem [14] Glycerolfosfolipidy jsou hlavními stavebními jednotkami lipidové dvojvrstvy buněčných biomembrán [13].

Sfingolipidy mají ve své struktuře jako základ nenasycený aminoalkohol sfingosin. V přírodě je nejrozšířenějším typem sfingolipidů sfingomyelin a další významné sfingolipidy jsou ceramid, cerebrosid a gangliosidy. Sfingolipidy jsou velmi rozšířené a mají důležitou úlohu v nervové tkáni a v buněčné membráně.

Cholesterol je nejznámější steroid a je prekurzorem řady důležitých látek, mezi které patří žlučové kyseliny, nadledvinové a pohlavní hormony, vitamín D, srdeční glykosidy a další steroidní látky. Cholesterol je rozšířen ve všech buňkách těla, zvláště v nervové tkáni, plazmatické membráně a v lipoproteinech krevní plazmy.

2.3. Anatomie ucha

Anatomicky se sluchově rovnovážný orgán rozděluje na periferní a centrální část. Periferní část se dělí na zevní, střední a vnitřní ucho. Centrální část obsahuje sluchové dráhy a sluchové centrum.

K zevnímu uchu (*auris externa*) patří ušní boltec a zevní zvukovod, který je zakončen bubínkem. Střední ucho (*auris media*) je tvořeno bubínkovou dutinou, ve které jsou uloženy tři sluchové kůstky, pneumatickým systémem spánkové kosti a Eustachovou trubicí. K vnitřnímu uchu (*auris interna*) náleží vestibulum, polokruhovitě chodbičky a hlemýžď.

2.3.1. Zevní ucho

Nejsnadněji pozorovatelnou částí zevního ucha je boltec (*auricula*), párový orgán plochého tvaru, který je připojen k hlavě v úhlu 20-45°. Boltec je (s výjimkou ušního lalůčku) tvořen elasticou chrupavkou (*cartilago auriculae*), která je z obou stran kryta bohatě cévně zásobenou kůží. Jeho horní okraj je přibližně ve výši kořene nosu, spodní ve výši *spina nasalis anterior* [15]. I přes značnou individualitu boltce na něm lze pozorovat několik charakteristických anatomických útvarů: *helix* – zevní zavínutý okraj boltce, *anthelix* – val v ploše boltce, rovnoběžný s *helixem* a lemující *cavum conchae*, *concha auriculae* – jamka na zevní části boltce kolem otvoru, kterým boltec přechází do zevního zvukovodu, *tragus* – plochý hrbolek ohraničující vstup do zvukovodu zepředu a *antitragus* – malý hrbolek uzavírající *conchu* zezadu [15].

Boltec se nálevkovitě zužuje a přechází do zevního zvukovodu (*meatus acusticus externus*), trubice směřující k středoušní dutině, od které je oddělen bubínkem. Zevní zvukovod se dělí na část chrupavčitou (zevní 2/3) a část kostěnou (vnitřní 1/3). Zvukovod je uvnitř vystlán kůží, která pevně adhezuje k *perichondriu* a *periostu*. V chrupavčitém zvukovodu jsou přítomny chlupy (*tragi*) a početné žlázy mazové (*sebaceózní*) a modifikované apokrinní žlázy (*glandulae ceruminosae*) [15]. Zevní zvukovod plní funkci sluchovou (převod zvukových vln k bubínku) a funkci ochranou [1].

Bubínek (*membrana tympani*) je oválná, tenká vazivová blanka oddělující od sebe zevní zvukovod a středoušní dutinu. Bubínek je posazen šikmo k podélné ose zvukovodu. Bubínek má tři vrstvy odlišné histologické stavby – zevní (kožní) tvoří vrstevnatý dlaždicovitý epitel, vnitřní (slizniční) jednovrstevný plochý epitel, a mezi kožní a slizniční plochou se nachází vrstva vaziva.

2.3.2 Střední ucho

Středoušní dutina (cavum tympani) je malý komůrkovitý prostor ve spánkové kosti. Tato dutina tvaru přesýpacích hodin je vystlána tenkou sliznicí a Eustachovou trubicí je spojena s nosohltanem. Ve středoušní dutině jsou přítomny tři sluchové kůstky (ossicula auditus) a dva drobné svaly - napínač bubínku (musculus tensor tympani) a sval třmínkový (musculus stapedius)

Kladívko (malleus) je kůstka kyjovitého tvaru, jehož hlavice vyčnívá vysoko nad horní okraj bubínku a na zadní straně má zakřivenou plošku pro skloubení s kovadlinkou. Hlavice kladívka pokračuje přes krček kaudálně v rukojeť kladívka, která je srostlá s bubínkem, a ve dva drobné výběžky směřující zevně a vpřed. Kovadlinka (incus) tvoří střední část řetězce sluchových kůstek. Její tělo vpředu nese sedlovitou kloubní plochu pro skloubení s hlavici kladívka, dozadu z něj vystupuje krátké a dlouhé raménko. Třmínek (stapes) tvoří poslední část řetězce sluchových kůstek. Hlavice třmínku se spojuje s dlouhým raménkem kovadlinky. Svou bazí zapadá třmínek do oválného okénka [15]. Sluchové kůstky vytvářejí pohyblivě (kloubně) spojený řetězec mezi bubínkem a oválným okénkem. Hlavním úkolem tohoto řetězce je přenos chvění bubínku, způsobeného dopadajícími zvukovými vlnami do nitroušního labyrintu vyplněného perilymfou [15]. Převodem přes tento systém nerovnoramenných pák dochází k přeměně vibrací (zvuku) s malou intenzitou a velkou amplitudou na bubínku na vibrace o malé amplitudě, ale velké intenzitě, které se dále šíří vnitřním uchem.

Sval napínač bubínku je uložen ve spánkové kosti paralelně a je připojen k rukojeti kladívka. Sval třmínkový se upíná na hlavici třmínku. Sval napínač bubínku a sval třmínkový mají ochrannou funkci bránící poškození sluchového orgánu při nadměrných zvukových podnětech, neboť mohou přizpůsobovat napnutí bubínku a postavení kůstek síle dopadajícího zvuku.

Sluchová trubice, tuba auditiva (Eustachi), je u dospělé osoby dlouhá asi 40 mm, má štěrbinovitý průřez a skládá se z laterální kostěné části a mediální chrupavčité části. Eustachova trubice spojuje středoušní dutinu s nosohltanem. Její funkce spočívá ve vyrovnávání atmosférického tlaku v nosohltanu a tlaku ve středoušní dutině [16].

Pneumatický systém v mastoidálním výběžku spánkové kosti je tvořen souborem dutinek. Z centrální dutinky, která se je vyvinuta již při narození, se postupně vyvíjí ostatní dutinky. Pneumatizace většiny dutinek v kosti spánkové se dokončuje asi mezi 5 – 10 rokem.

2.3.3 Vnitřní ucho

Vnitřní ucho je uloženo v dutině kosti skalní (os petrosum). Vnitřní ucho se skládá z několika dutinek a kanálků označovaných jako kostěný labyrint – kostěný hlemýžď (cochlea), předsíň (vestibulum) a tři polokruhovitě kanálky (canales semicirculares) [17].

Hlemýžď je tvořen dvěma a půl závití postupně se zužujícími, jenž jsou vpravo pravotočivé a vlevo levotočivé. Vestibulum je vstupní částí do vnitřního ucha a tvoří propojení s uchem středním a současně tam ústí jak hlemýžď, tak polokruhovitě chodbičky.

Blanitý labyrint je uložen v kostěném labyrintu a je objemově mnohem menší. K blanitému labyrintu patří dva váčky (utriculus a sacculus) uložené ve vestibulu, hlemýžď a tři polokruhovitě kanálky umístěné ve stejnojmenných částech kostěného labyrintu [17].

Dutiny kostěného labyrintu jsou vyplněny tekutinou perilymfou, která má spojení s mozkomíšním mokem o stejném složení [15]. Blanitý labyrint je naplněn tekutinou nazývanou endolymfa která má podobné složení jako nitrobuněčná tekutina. Mezi prostory vyplněnými perilymfou a endolymfou není spojení [18].

Uvnitř blanitého hlemýždě je uložen Cortiho orgán s vlastními sluchovými receptory, kterými jsou vláskové buňky [17]. Jeho základní funkcí je přeměňovat zvukové kmity na elektrickou energii nervového vzruchu.

Tři polokruhovitě kanálky na obou stranách hlavy jsou na sebe kolmé, takže jsou orientovány do třech prostorových rovin [18]. V ampulách polokruhovitých kanálků je uloženo čidlo pohybu. Tekutina, která vyplňuje kanálky je při rotačních pohybech hlavy uvedena do pohybu a dráždí smyslové buňky.

Váčky blanitého labyrintu – utriculus a sacculus mají na svých stěnách umístěny receptory gravitace označované jako maculae staticae. Uvnitř utricula i saccula jsou na vlásky smyslových buněk přichyceny krystaly uhličitanu vápenatého. Ty se pohybují vlivem gravitace (eventuelně odstředivé síly) vždy směrem jejího působení a v místě kontaktu se smyslovými buňkami dojde k podráždění. Vzniká tak nervový vzruch.

Všechny nervové vzruchy jsou příslušnými částmi VIII. hlavového nervu vedeny do centrální nervové soustavy k jádrům a do dalších struktur mozku (centrální část sluchově rovnovážného ústrojí), jsou zpracovávány a organismus tak získává informaci o poloze, pohybu hlavy a o zvucích v okolí [15].

2.4 Ušní maz

Ušní maz je fyziologickým produktem kůže zevního zvukovodu. Na vzniku ušního mazu se podílejí hlavně žlázy zevního zvukovodu.

2.4.1 Tvorba ušního mazu

Ušní maz je směs odlupovaných šupin keratinocytů, prachových částic a uvolněných chloupků kombinovaná se sekrety mazových a ceruminozních – modifikovaných apokrinálních žláz ve zvukovodu. Mazové žlázy produkují kožní maz (mastné substance) a modifikované apokrinální žlázy produkují sekret podobný potu [19].

Po vzniku je ušní maz pomalu posunován k ústí zevního zvukovodu, kde volně vypadává ven. Posun ušního mazu je důsledkem migrace epitelu a uvolňování je podporováno činností čelisti při žvýkání a mluvení [1].

Během jednoho týdne dochází k produkci asi 1 – 2 mg ušního mazu [1]. Množství vytvořeného ušního mazu ovšem není stálé a kolísá i u jednotlivce. Vyměšovací činnost mazových žláz může být změněna kvantitativně i kvalitativně. Je prokázáno, že při nadměrném žvýkání, mluvení, mechanickém dráždění či škrabání může dojít k nadměrné tvorbě ušního mazu [19]. Produkce ušního mazu může být dále ovlivněna hormony (adrenalin, noradrenalin), pitocinem (stimulans hladkých svalů) nebo některými duševními stavy člověka (bolest, strach) [1]. Častější výskyt nadměrného množství ušního mazu se vyskytuje u starších osob a u osob s mentální retardací [19]. Byl popsán i vliv čištění vatovými smotky, diabetes mellitus, používání ochranných špuntů do uší, vlhkého typu ušního mazu, časté ošetřování pro zvýšenou akumulaci ušního mazu, šířka zvukovodu na větší množství ušního mazu ve zvukovodu [1].

2.4.2 Fenotypy ušního mazu

Jsou známy dva fenotypy lidského ušního mazu – suchý a vlhký typ. Podstatou fenotypu je odlišení obou forem na základě jejich makroskopického vzhledu. Suchý typ ušního mazu je křehký, nelepivý, vločkovitý a má rozsah zbarvení od světle šedé k nahnědlé šedi. Vlhký typ ušního mazu je výrazně lepkavý a světlolzatavě šedý. Avšak postupem času, jak je ušní maz vystaven vzduchu, oxiduje a dehydratuje, a tak v kombinaci s působením bakteriální aktivity mění barvu ušního mazu vlhkého mazu až na černou [19]. Vzhled cerumina je patrný již brzy po narození a nemění se v průběhu života. Nebyl prokázán rozdíl

mezi frekvenci typů mezi pohlavími, ve vazbě na typ krevní skupiny a chuťové schopnosti či rozdíl ve vzhledu ušního mazu mezi vlhkým typem ušního mazu u bělochů a černochů [20].

Rozdíl mezi oběma typy ušního mazu je dědičný a je určený jednoduchým Mendelovým zákonem. Charakter ušního mazu je řízen jedním párem genů, kdy vlhká alela je oproti suché dominantní. Jedná se tedy o autozomálně dominantní dědičnost. Gen, který zajišťuje fenotyp ušního mazu se nachází na 16 chromozomu [21].

Vlastní zastoupení typu mazu v populaci není jednotné, ale kolísá jak mezi rasami, tak i v závislosti na geografické poloze. U mongoloidů a amerických indiánů je charakteristický vyšší výskyt suchého typu (78-87% populace), kdežto u bělochů a černochů převládá vlhký typ ušního mazu (95-98% populace) [1, 22].

Bylo dokázáno, že nejvyšší výskyt suchého typu ušního mazu je v centrální Asii a se vzdáleností všemi směry postupně klesá. Četnost výskytu vlhkého typu ušního mazu je u černochů vyšší než u bělochů [22].

2.4.3 Složení ušního mazu

Zkoumání komponent ušního mazu je předmětem studie vědců již velmi dlouho. Samotná analýza ušního mazu byla ovšem na začátku studií omezena dostupnými laboratorními metodami, které neumožňovaly zpracování vzorků od jednotlivce. K analýze bylo potřebné větší množství ušního mazu v řádu několika gramů, které bylo získáno smícháním ušního mazu od více osob [23]. S vývojem metod instrumentální analýzy jako jsou plynová chromatografie, tenkovrstevná chromatografie nebo plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem bylo umožněno analyzovat vzorky ušního mazu v množství jednotek miligramu.

Použitím metod instrumentální analýzy bylo zjištěno, že ušní maz se skládá v první řadě z lipidové a proteinové frakce. Mezi další látky, které jsou zastoupeny v menším množství patří volné aminokyseliny (glycin, glutamová kyselina, histidin, threonin a serin), cukry (galaktozamin, glukózu, galaktózu, glukozamin, manózu a fruktózu), minerály (vápník, hořčík, fosfor) aromatické látky, imunoglobuliny a lysozym [22, 23, 24, 25, 26].

Bližším zkoumáním lipidové frakce bylo zjištěno, že je složena z dlouhých řetězců nasycených i nenasycených mastných kyselin a alkoholů, prekurzorů cholesterolu, skvalenu a dalších dlouhých řetězců uhlovodíků [27].

Bylo provedeno několik studií, které se zabývaly rozdílem mezi suchým a vlhkým typem ušního. Suchý typ ušního mazu obsahuje asi 20% lipidů zatímco vlhký typ asi 50%.

Podrobnějším zkoumáním bylo zjištěno, že suchý typ ušního mazu obsahuje skvalen (6,4%), estery cholesterolu (9,6%), vosky (9,3%), triacylglyceroly (3%), mastné kyseliny (22,7%), cholesterol (20,9%), ceramidy (18,6%), cholesterol sulfáty (2%) a několik různých neidentifikovatelných polárních komponent (7,5%). Vlhký typ ušního mazu má nedostatek esterů cholesterolu, vosků a navíc obsahuje několik přídavných nepolárních komponent [28]. Bylo prokázáno, že v suchém typu ušního mazu je obsah volných aminokyselin čtyřikrát vyšší než ve vlhkém typu [29].

V další studii, která se zabývala složením ušního mazu, byly nalezeny rozdíly v zastoupení jednotlivých frakcí lipidů i proteinů mezi dětmi a dospělými. Hladina proteinů u dětí byla mírně snižená a hladina lipidů byla naopak mírně zvýšená. U dospělých byly zjištěny nepatrné změny v lipidové a proteinové frakci vzhledem k věku. Změny ovšem nebyly statisticky významné [30, 31].

Byly sledovány vlivy složení lipidové složky cerumina v závislosti na pohlaví, ročním období a na straně odběru cerumina. Nebyly nalezeny rozdíly ve složení lipidové složky mezi pohlavím či v závislosti na straně odběru.

Byl zjištěn pokles frakce triacylglycerolů od zimy do léta. Vědci v této studii navrhli, že sezónní rozdíly hladiny triacylglycerolů mohou být způsobeny například změnou ve stravě či kolísáním patologických stavů ve zvukovodu. [32].

Jiná studie potvrdila vliv období menstruačního cyklu, věku a pohlaví na kvantitativní složení lipidových frakcí cerumina [33].

2.3.4 Funkce ušního mazu

Ochranná funkce ušního mazu spočívá v podílu na čištění zvukovodu, v promašťování kůže zvukovodu a v jeho antibakteriálním, antifungicidním a antiherpetickým působení. V minulosti se uvažovalo o tom, že ušním maz svým zápachem odpuzuje hmyz, což ovšem nebylo dokázáno [34].

Samočisticí mechanismus zvukovodu spočívá v tom, že migrační pohyb epidermis odstraňuje odloupané epitelie a další částice na povrchu kůže zvukovodu a zvláčňuje kůži [1, 35]. Měkká kůže je odolnější vůči lámavosti a mechanickým vlivům. Nalepený cerumen na chloupkách v chrupavčité části zvukovodu brání mechanicky vniknutí prachu či drobných těles do hlubších částí zvukovodu [35].

Ušní maz obsahuje poměrně velké procento tuků, které vytváří ochranný kyselý plášť na kůži zvukovodu a činí kůži zvukovodu vláčnější a mastnější, čímž zabraňuje dermatidám a

rhagádám. Ušní maz je vodě rezistentní a brání, aby povrch vnějšího zvukovodu nasákl vodou [36].

Lipidy obsažené v ušním mazu vytváří hydrofóbní potah bránící adhezenci bakterií, virů a plísní na povrch kůže. Přes relativně teplé, tmavé, vlhké prostředí zvukovodu, které je vhodné pro růst mikroorganismů a přes přítomnost některých živin obsažených v ušním mazu, nedochází tak často k rozvoji zánětů zvukovodu [1].

V ušním mazu byly identifikovány látky, které se podílí na jeho antibakteriálním charakteru. Jedná se o mastné kyseliny, lysozym, imunoglobuliny (IgG a IgA), které jsou baktericidní [22, 24, 37]. Existují ovšem i opačné názory, které popírají antibakteriální působení ušního mazu, jelikož tvrdí, že se jedná o látky, které potřebují ke své správné činnosti další látky imunitního systému, které se ve zvukovodu nenacházejí.

Je známo, že se v lidském vnějším zvukovodu nachází komenzální bakterie. Obvykle jsou identifikovány nepatogenní druhy představované hlavně koaguláza negativní stafylokoky a *Corynebacterium* spp. (diphtheroids). Mezi nejčastěji vykultivované druhy potenciálně patogenních bakterií z ušního mazu patří *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* [38].

Dostupná data efektu ušního mazu na růst bakterií, ale nejsou zatím konečná [39].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce je prohloubit znalosti týkající se lipidů ušního mazu, zejména reprodukovatelnosti používané metody. I když se bližším zkoumáním lipidové frakce ušního mazu zabývala již řada autorů, nejsou ještě prozkoumány všechny vlivy faktorů na složení ušního mazu. K rozšíření informací o uvedeném tématu byly zvoleny tyto konkrétní cíle:

1. Ověřit metodiku stanovení pěti tříd lipidů (fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu) a určit reprodukovatelnost metody pomocí analýzy rozptylu.
2. Pomocí vícerozměrné statistické analýzy vyšetřit strukturu a shluky v matici dat tvořené hladinami jednotlivých tříd lipidů ušního mazu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Analyzovaný materiál

V předložené diplomové práci byly zpracovány vzorky ušního mazu. Vzorky ušního mazu byly získány od pacientů na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku Pardubické krajské nemocnice a.s. v průběhu let 2008-2009. Náhodný výběr byl prováděn u osob s negativní osobní anamnézou onemocnění zevního zvukovodu a středního ucha. Oslovováni byli jedinci s větším množstvím ušního mazu ve zvukovodu, umožňující opakované laboratorní zpracování vzorku (viz kapitola 4.2 Metodika laboratorního zpracování). Předpokladem odběru vzorků byl informovaný souhlas osob.

Jedincům byl odebrán vzorek ušního mazu k následnému laboratornímu zpracování pomocí háčku či štětičkou, bez použití ceruminolytik či výplachu. Celkem bylo získáno 23 vzorků ušního mazu do vlastního souboru (muži:ženy=13:10; věkový průměr 55,6 let / 26-87 let) a od asi 30-40 jedinců vzorek pro vytvoření poolového ušního mazu k provedení testu metodiky laboratorního zpracování.

Vzorky ušního mazu byly uchovávány při teplotě $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do jejich laboratorního zpracování. Vzorky byly zpracovány na Katedře biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice v období od listopadu 2008 do února 2009.

K jejich zpracování byla použita metoda tenkovrstevné chromatografie, která se k dělení složek lipidů běžně používá.

4.2 Metodika laboratorního zpracování

Metodika laboratorního zpracování, kterou byly v předložené diplomové práci analyzovány vzorky ušního mazu byla již v minulosti ušního používána na Katedře biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice při analýze ušního mazu v diplomových prací Peřinové [40] a Hedelové [41].

Při laboratorní analýze byly lipidy ze vzorků tkáňové matrice nejprve extrahovány a jednotlivé složky lipidů byly následně separovány na tenké vrstvě silikagelu F 60. Poté byly složky lipidů extrahovány do směsi chloroform – metanol a izolovány ze supernatantu odpařením pod dusíkem. Kvantitativní stanovení jednotlivých lipidových frakcí bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm.

Jelikož jedním z cílů předložené diplomové práce bylo ověřit metodiku stanovení pěti tříd lipidů (fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu) byla provedena modifikace metodiky původního laboratorního zpracování. Bližší popis modifikace celého postupu je uveden v kapitole 5.1 Ověření metodiky stanovení pěti tříd lipidů.

Změny, které nejlépe vyhovovaly byly následně použity k vlastnímu zpracování 23 vzorků ušního mazu, provedené modifikace jsou v textu zdůrazněny.

4.2.1 Extrakce lipidů ze vzorku

Do centrifugační zkumavky bylo na analytických vahách odváženo 2,5 mg ušního mazu, vždy od jednoho pacienta. Do jedné zkumavky bylo napipetováno 0,2 ml lipidového standardu (Reprochol). Do všech centrifugačních zkumavek byly skleněnou pipetou přidány 4 ml směsi chloroform – methanol (1:1). Směsi vzorků a standardu s organickými rozpouštědly byly *extrahovány protřepáním po dobu tří minut*, uzavřeny a centrifugovány na stolní centrifuze při 3000 otáčkách po dobu 5 minut. Horní vrstva směsi (3,5 ml) byla opatrně odsáta pomocí pipety do jiné zkumavky a v digestoři při 60°C během 20 minut došlo k odpaření v atmosféře dusíku do sucha.

4.2.2 Chromatografie a detekce kyselinou fosfomolybdenovou

Příprava mobilní fáze

Do odměrného válce bylo odměřeno 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml kyseliny octové. Směs byla v odměrném válci řádně promíchána a nalita do chromatografické vany. Vana byla pečlivě uzavřena a ponechána 45 minut nasytit parami rozpouštědel.

Příprava chromatografické desky

Na chromatografické desce o velikosti 20 × 20 cm byl obyčejnou tužkou naznačen rámeček o rozměrech 18 × 16,5 cm tak, že 2,5 cm od dolního okraje byla naznačena startovní čára, horní okraj a strany rámečku byly vzdáleny od konců desky 1 cm. Vnitřní plocha byla rozdělena na 6 sloupců po 3 cm a v horní části desky byly jednotlivé dráhy označeny číslem vzorku. Tužkou bylo zacházeno tak, aby nedošlo k proškrábnutí plochy desky.

Postup chromatografie

Odpařený extrakt vzorků a standardu byl rozpuštěn ve 100 µl směsi chloroform – methanol (2 : 1). Tento objem byl postupně nanesen v několika dávkách pausterovou pipetou na start chromatografické desky a po každém nanesení se ponechalo rozpouštědlo samovolně odpařit. Na jedné chromatografické desce bylo analyzováno 5 vzorků ušního mazu odebraného od jednoho jedince a v šestém sloupci byl umístěn standard. Jednotlivé vzorky od jedince byly získány nakrájením pěti tenkých plátků vždy od jednoho konce naakumulovaného ušního mazu, ze kterých bylo následně odváženo 2,5 mg. Chromatografická deska byla vložena do chromatografické vany, nasycené parami rozpouštědel, rychle uzavřena a ponechána cca 60 minut vyvíjet, až čelo mobilní fáze dosáhlo 1 cm od horního okraje desky. Potom byla deska vyjmuta a ponechána vysušit v digestoři.

Příprava detekčního činidla a detekce lipidových frakcí

Z 20% zásobního roztoku kyseliny fosfomolybdenové bylo odměřeno 10 ml a přidáno k 10 ml ethanolu. Detekční činidlo bylo nalito do rozprašovače a použito k detekci lipidových frakcí standardu na chromatografické desce. Pole standardu bylo rovnoměrně postříkáno detekčním činidlem. Deska pak byla vložena na 10 minut do sušárny vyhřáté na 60 °C.

Izolace jednotlivých složek lipidů

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

Extrakce lipidů z jednotlivých vrstev a stanovení jejich koncentrace

Ke každé složce lipidů ve zkumavce byly přidány 4 ml směsi chloroform - methanol (1 : 1). Uzavřené zkumavky byly 2 minuty intenzivně třepány, ponechány 2 minuty stát a centrifugovány 5 minut při 3000 otáčkách. Z každé zkumavky byly odpipetovány 2 ml supernatantu do čistých zkumavek a při 60°C byly asi 20 minut odpařovány do sucha pod dusíkem v uzavřené digestoři.

Stanovení koncentrace jednotlivých složek lipidů

Do všech zkumavek s odparkem bylo přidáno 1,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Standard byl připraven smícháním 0,02 ml činidla 1 (tj. standard s koncentrací lipidů 8 g/l) s 1,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Jako blank bylo použito 1,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Všechny zkumavky se vzorky, blank i standard byly promíchány a *15 minut zahřívány v olejové lázni při 110° C*. Po ochlazení zkumavek v proudu studené vody bylo z každé odpipetováno do nových zkumavek 0,1 ml hydrolyzátu a přidáno 1,5 ml fosfovanilinového činidla. Vše bylo ponecháno reagovat 50 minut při laboratorní teplotě. Pak byla změřena absorbance vzorků (A_{VZ}) a standardu (A_{ST}) proti blanku při vlnové délce 530 nm.

Výpočet

Výpočet koncentrace celkových lipidů v g/l byl proveden podle vzorce:

$$CL = 8 \cdot \frac{A_{VZ}}{A_{ST}} \cdot F$$

kde CL jsou celkové lipidy v g/l, A_{VZ} je absorbance vzorku, A_{ST} je absorbance standardu měřená proti blanku a F je zředovací faktor, který je pro výpočet koncentrace lipidů ušního mazu $F = 0,4375$, kdy vzorek ušního mazu o zanedbatelném množství byl rozpuštěn ve 4 ml směsi organických látek a odpipetováno pouze 3,5 ml k odpaření, dále rozpuštěno ve 4 ml organické směsi a odebrány pouze 2 ml k odpaření pod dusíkem.

Použité chemikálie a přístrojové vybavení

Analyzované vzorky ušního mazu byly zpracovávány na Katedře biologicko biochemických věd Univerzity Pardubice, kde byly používány chemikálie a přístrojové vybavení uvedené níže:

Při ověřování metodiky:

Zahříváč Termovap typ TV10, ECOM spol.s.r.o., Česká republika.

Při vážení vzorku:

Analytické váhy typ PRL TA13, Zaklady Mechaniki Precyzyjnej, Gdaňsk, Polsko

Pro extrakci lipidů:

Metanol p.a., obsah 99%, hustota 0,790 kg/l, výrobce LACH-NER, s.r.o. Neratovice, ČR

Chloroform p.a., hustota 1,490 kg/l, výrobce LACH-NER, s.r.o. Neratovice, ČR

Reprochol – lyofilizované lidské nebo koňské sérum se zvýšeným obsahem celkového cholesterolu, obsahuje také HDL-cholesterol a triacylglyceroly, výrobce IMUNA š.p., Šarišské Michaľany

Třepačka Mikrowstrzasarka typ ML – 1, výrobce PREMEDI, Polsko

Centrifuga, typ mls-340, výrobce MECHANYKA PRECYZNA, Polsko, distributor Servis Unimed, Vestec u Prahy, ČR

K odpaření pod dusíkem:

Odpařovací termostat TERMOVAP TV 10, výrobce ECOM s.r.o., Praha, ČR

Dusík 4,6(99,9%), výrobce a dodavatel LINDE TTECHNOPLYN, Praha

Pro přípravu mobilní fáze

Hexan p.a., obsah 99%, hustota 0,660kg/l, výrobce LACH-NER, s.r.o., Neratovice, ČR

Diethylether, hustota 0,710 kg/l, výrobce MERCK KGaA, Darmstadt, Německo, distributor MERCK s.r.o., Říčany – Jalovice, ČR

Kyselina octová p.a., obsah 99%, hustota 1,050 kg/l, výrobce LACH-NER, s.r.o., Neratovice, ČR

Při chromatografii:

Chromatografická deska – TLC plate 20*20 cm, No.1.05721, Silica gel 60, výrobce MERCK KGaA, Darmstadt, Německo, distributor MERCK s.r.o., Říčany – Jalovice, ČR

Sušárna HS 62 A, výrobce CHIRANA GROUP, a.s. Ostrava – Moravská Ostrava, ČR

Detekční činidlo – kyselina fosfomolybdenová 20% roztok v etanolu, výrobce SIGMA_ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Německo, distributor SIGMA-ALDRICH s.r.o., Praha, ČR

Etanol, hustota 0,810 kg/l, výrobce LACHEMA Brno, ČR

Pro stanovení koncentrace jednotlivých složek lipidů:

Činidlo 1 – směsný standard Dade (kyselina stearová 10%, kyselina plamitová 10% a kyselina olejová 80%) celková koncentrace 8g/l, výrobce LACHEMA DIAGNOSTICA, Brno, ČR

Kyselina sírová p.a., obsah 96%, hustota 1,83 kg/l, výrobce LACH-NER, s.r.o., Neratovice, ČR

Fosfovanilinové činidlo

- kyselina o-fosforečná 85% p.a., obsah 85%, hustota 1,710 kg/l, výrobce LACHEMA s.p. Brno Závod Neratovice, ČR

- vanilinum, balení 10g, výrobce Zdravotnické zásobování, sklad Říčany u Prahy

Příprava fosfovanilinového činidla: 1, 52 g vanilinu rozpustíme v 225 ml destilované vody a za stálého míchání přidáme 775 ml 85% kyseliny o-fosforečné

Spektrofotometr SPEKOL , výrobce Carl Weiss, Jena, DDR

4.3 Metodika statistického zpracování

4.3.1. Charakteristika vícerozměrných dat

Počáteční data, která jsou určena ke statistickému zpracování se musí na začátku vždy uspořádat do zdrojové matice dat, která obsahuje proměnné neboli znaky v m sloupcích a subjekty čili osoby v n řádcích.

Před samotným provedením některé z metod vícerozměrné statistické analýzy se provede exploratorní (průzkumová) analýza dat, která slouží k určení, zda mezi daty je lineární vazba. K hledání struktury mezi znaky a subjekty slouží metoda analýzy hlavních komponent, metoda faktorové analýzy a shluková analýza.

Množina objektů s podobnými či s společnými znaky se nazývá shluk. Blížkost a podobnost objektů se hodnotí dle míry vzdálenosti objektů v m -rozměrném prostoru znaků. Veličina, podle které se hodnotí podobnost dvou objektů či znaků, se nazývá Pearsonův párový korelační koeficient R . Subjekty jsou podobnější tím více, čím je párový korelační koeficient vyšší a bližší číslu jedna. Pro posouzení míry vzdálenosti dvou objektů se používá Euklidova metrika neboli geometrická vzdálenost. Dva subjekty jsou si tím více blízké, čím jsou si blíže.

Rozptyl je veličina určující rozptýlení objektů a pro její vyjádření se používá směrodatná odchylka s , což je druhá odmocnina z rozptylu.

4.3.2 Exploratorní analýza vícerozměrných dat

Při exploratorní analýze vícerozměrných dat se využívají techniky grafického zobrazení v dvourozměrném, či třírozměrném prostoru. Tyto techniky umožňují identifikovat vybočující složky a nalézt různé struktury v datech. Velmi vhodné jsou grafy symbolové, neboť jednotlivé znaky jsou v nich kodovány s ohledem na jejich konkrétní hodnoty do určitých geometrických tvarů nebo symbolů [42]. V jednom grafu je pak možné rozlišit více znaků. Mezi nepoužívanější symbolové grafy patří profily, polygony, tváře, křivky a stromy.

4.3.3 Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent (PCA) patří mezi nejstarší a nepoužívanější metody vícerozměrné analýzy. Cílem metody PCA je transformace původních znaků $x_i, j = 1, \dots, m.$, do menšího počtu latentních proměnných y_i . [42]. Dojde tak ke zjednodušení popisu lineárně závislých, tj. korelovaných znaků, a to rozkladem matice dat do matice strukturní a do matice šumové. Latentní proměnné jsou hlavní komponenty, které vzniknou jako lineární kombinace původních znaků [43]. Latentní proměnné mají několik výhod, neboť je jich podstatně méně a jsou charakteristické určitými vlastnostmi. Základní charakteristikou každé hlavní komponenty je její míra variability čili rozptyl. Hlavní komponenty jsou seřazeny dle důležitosti, tj. dle klesajícího rozptylu od největšího k nejmenšímu. Přitom většina informace o variabilitě je soustředěna do první hlavní komponenty a nejméně informace je obsaženo v poslední komponentě [44].

K zobrazení výsledku metody hlavních komponent se využívá několik typu různých grafů.

Cattelův indexový graf úpatí vlastních čísel (Scree plot) je vlastně sloupcovým diagramem vlastních čísel $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \lambda_m$ zdrojové matice dat X v závislosti na indexu i [42]. Cattelův indexový graf znázorňuje relativní velikost jednotlivých vlastních čísel. Běžně se využívá k určení počtu hlavních komponent. Zlomové místo mezi kolmou stěnou a vodorovným dnem je úpatí. Hlavní komponenty, které jsou nevýznamné představují vodorovné dno, zatímco komponenty statisticky významné tvoří kolmou stěnu.

Graf komponentních vah, zátěží (Plot Components Weights) zobrazuje komponentní váhy čili zátěže pro první dvě hlavní komponenty. Tento graf zobrazuje vzdálenost mezi znaky, přičemž každému znaku je odpovídá v grafu jeden bod. Silná korelace mezi dvěma znaky je v grafu znázorněna krátkou vzdáleností. V grafu lze nalézt i shluk podobných objektů, mezi kterými je korelace. Tento graf umožňuje znázornit vztah mezi původními znaky a hlavními komponentami, neboť popisuje míru, kterou přispívají jednotlivé původní znaky do hlavních komponent. Je výhodou, pokud se podaří hlavní komponenty pojmenovat a přiřadit jim tak fyzikální, chemický nebo biologický význam [44]. Z grafu komponentních vah tedy můžeme určit důležitost původních znaků, korelaci a kovarianci. Důležitost původních znaků se určuje vzdáleností znaků od počátku a délkou jeho průvodiče. Pokud znak leží blízko počátku a má krátký průvodič, tak přispívá do hlavní komponenty velmi málo. Naopak pokud má dlouhou vzdálenost od počátku přispívá do hlavní komponenty více. V grafu se dá také popsat dle úhlu, který spolu svírají průvodiče dvou znaků jejich vzájemná korelace.

Pokud je úhel průvodičů mezi dvěma roven 0° jsou silně pozitivně korelované, úhel 90° značí nekorelovanost znaků a úhel 180° představuje negativní korelaci dvou znaků. Pokud se nacházejí znaky blízko sebe ve shluku a jejich průvodiče mají malý úhel, jsou silně korelované a mají vysokou kladnou korelaci. Oproti tomu znaky, které jsou daleko od sebe a s velkým úhlem jejich průvodičů jsou negativně korelovány.

Rozptylový diagram komponentního skóre (Scatterplot) znázorňuje komponentní skóre, tedy hodnoty obvykle prvních dvou hlavních komponent. Pokud jsou objekty dokonale rozptýleny, poukazuje to na dokonalé rozlišení objektů. V tomto diagramu lze také poměrně snadno nalézt shluky vzájemně podobných objektů a naopak i objekty silně odlehle a silně odlišné od ostatních [42]. Některé objekty lze i pojmenovat nebo se alespoň pokusit vysvětlit místo konkrétního objektu.

4.3.4 Faktorová analýza

Faktorová analýza dat je metoda, která se používá k vyšetření korelací čili vnitřních vztahů a k odhalení základní struktury zdrojové matice dat. K analýze struktury vnitřních vztahů u velkého počtu původních znaků pomocí souboru menšího počtu latentních proměnných, které se nazývají faktory [42]. Nejdříve se identifikují faktory, a poté se každému faktoru přidělí obsahový význam, pomocí kterého je každý původní znak vysvětlen vybraným faktorem. Faktorová analýza má za cíle sumarizovat a redukovat data. Sumarizace dat je založena na tom, že faktorová analýza s výhodou používá faktory tak, aby vysvětlila a usnadnila jejich pochopení s daleko menším počtem latentních proměnných než je počet původních proměnných. Redukce dat se dosáhne při vyčíslení skóre pro každý faktor a náhradou původních znaků novými latentními proměnnými – faktory [42]. Faktorová analýza nám pomáhá při vysvětlení závislosti znaků a jejich identifikaci, které zestručňují popis původních dat. Identifikace faktorů se provádí pomocí rotace, kterou lze chápat jako určitou transformaci původních znaků, které poté budou snadněji pojmenovatelné [44].

K usnadnění a pochopení vnitřní struktury v datech se používají ve faktorové analýze i grafické pomůcky – graf faktorových zátěží a graf faktorového skóre. Graf faktorových zátěží je 2D- nebo 3D-graf původních znaků, kdy na souřadných osách jsou jednotlivé faktory. Znaky faktorově čisté se nacházejí na konci souřadnicové osy a mají vysokou faktorovou zátěž jen na přiřazené ose. Znaky, které se nenacházejí blízko některé osy a jsou tedy vysvětleny oběma faktory, se nazývají faktorově nečisté. Původní znaky, které jsou blízko počátku mají malé zátěže obou faktorů.

4.3.5 Analýza shluků

Analýza shluků (CLU) je jednou z metod, která se zabývá vyšetřováním podobnosti vícerozměrných objektů a jejich následnou klasifikací, čili tříděním do tříd neboli shluků [42]. Analýza shluků má za cíl popis systematiky, zjednodušení dat a identifikaci vztahu. Podobnost dvou objektů se popisuje dle hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu R . Jako shluk se označuje skupina objektů, jejichž vzdálenost (nepodobnost) je menší než vzdálenost, kterou mají objekty do shluku nepatřící [44]. Dle způsobu shlukování se rozdělují postupy na hierarchické a nehierarchické. Hierarchické postupy můžeme dále rozlišit na aglomerační a divizní shlukování.

Hierarchické postupy shlukování spočívají v tom, že se objekty a shluky postupně spojují do větších shluků. Grafickou pomůckou při zobrazování hierarchických postupů je vývojový strom nebo dendrogram. Analýza shluků umožňuje hodnotit podobnost objektů, analyzovanou pomocí dendrogramu objektů, a také podobnost znaků analyzovanou pomocí dendrogramu znaků [42]. Rozhodující při volbě typu dendrogramu, který nepřesněji odpovídá struktuře objektů a znaků mezi objekty, je kofenetický korelační koeficient CC [42]. Kofenetický korelační koeficient CC je vlastně Pearsonův korelační koeficient mezi skutečnou a predikovanou vzdáleností, založenou na dendrogramu. Čím je vyšší hodnota CC , tím větší je věrohodnost a lepší model shluků [42].

4.3.6 Analýza rozptylu

Analýza rozptylu (ANOVA) je metoda, která se používá k posouzení významnosti zdrojů variability v datech u lineárních statistických modelů. Podstatou analýzy rozptylu je rozklad celkového rozptylu dat na složku objasněnou a neobjasněnou. Do složky objasněné patří známé zdroje variability a do složky neobjasněné zahrnujeme náhodné chyby. Poté se testují hypotézy o významnosti jednotlivých zdrojů variability [42].

Je známo velké množství variant metody rozptylu, které se liší dle konkrétního uspořádání experimentů. Pokud je sledován pouze jeden faktor, jedná se o jednofaktorovou analýzu rozptylu, neboli třídění dle jednoho faktoru. Pokud se sleduje vliv více faktorů, hovoříme o vícefaktorové analýze rozptylu. Když má jeden faktor pevné a druhý faktor náhodné efekty, označuje se tento případ jako model se smíšeným efektem. Při stejném počtu opakování se modely označují jako vyvážené experimenty, zatímco při nestejném počtu opakování se jedná o experimenty nevyvážené.

5 Výsledky

5.1 Ověření metodiky stanovení pěti tříd lipidů

Jedním z cílů předložené diplomové práce bylo ověřit metodiku stanovení pěti tříd lipidů (fosfolipidy, diacylglyceroly, mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu) ve vzorku ušního mazu pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě, která byla již v minulosti při dělení lipidů ušního mazu používána. K ověření metodiky byl použit vzorek ušního mazu od 30-40 jedinců.

Potřeba optimalizace celé metody vyplynula z předcházejících studií [40, 41], kde byla používána, ale rozdíly v jednotlivých lipidových třídách byly až v řádech jednotky. Nabízela se otázka, zda rozdíly koncentrací pěti lipidových tříd mezi jednotlivými pacienty jsou způsobeny vlivem pacienta, či je metoda stanovení lipidových tříd nepřesná a vzorek ušního mazu je nehomogenní.

Optimalizaci zpracování vzorků ušního mazu pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě byla zaměřena na extrakci lipidů a na stanovení koncentrací jednotlivých složek lipidů. Vždy byla použita již stávající metodiku a byla modifikována pouze jednu část experimentu pro lepší vyhodnocení výsledku, který příslušná modifikace postupu přinesla.

Při extrakci lipidů byla vyzkoušena závislost času extrakce na koncentraci jednotlivých složek pěti tříd lipidů. Z poolového vzorku ušního mazu byl vybrán jeden vzorek, ze kterého bylo pětkrát odváženo 2,5 mg ušního mazu do extrakčních zkumavek a válečkem byly přidány 4 ml směsi chloroform – methanol (1:1). Tato směs byla protřepána na třepačce po dobu 1, 2, 3, 5 a 10 minut. Dále bylo postupováno standardním způsobem analýzy bez jakékoliv modifikace. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.1

Tabulka 5.1 Koncentrace (g/ l) pěti tříd lipidů při různé době extrakce 1, 2, 3, 5 a 10 minut

číslo zkumavky	doba extrakce (min)	Volné				
		Fosfolipidy	Diacylglyceroly	mastné kyseliny	Triacylglyceroly	Estery cholesterolu
1	1	0,497	0,459	0,475	0,455	0,464
2	2	0,508	0,55	0,453	0,54	0,583
3	3	0,670	0,696	0,486	0,605	0,582
4	5	0,615	0,648	0,478	0,576	0,55
5	10	0,653	0,675	0,413	0,555	0,531

Z tabulky 5.1 je vidět, že při době extrakce 3 minuty jsou hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů nejvyšší, delší doba třepání již nevedla k růstu koncentrace lipidů.

Při stanovení koncentrací jednotlivých složek pěti tříd lipidů bylo vyzkoušeno několik různých způsobů vaření zkumavek s odparky. Byl ověřován jednak způsob varu a také délka varu. Byly testovány různé postupy varu: na vodní lázni, v olejové lázni a na přístroji Termovap, u kterých byla měněna doba varu. Byl měněn pouze způsob varu, jinak bylo postupováno standardním způsobem

Nejprve byly porovnávány hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů získané zahříváním ve vodní lázni při 100° C po dobu 15 (tabulka 5.2) a 30 minut (tabulka 5.4), s hodnotami, které byly získány na přístroji Termovap typ TV10 při teplotě 100° C po dobu zahřívání 15 (tabulka 5.3) a 30 minut (tabulka 5.4).

Tabulka 5.2 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané při ohřevu na vodní lázni při 100° C po dobu 15 minut

<i>číslo zkumavky</i>	<i>Volné mastné</i>					<i>Estery cholesterolu</i>
	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>		
1	1,987	0,83	0,932	0,24	1,33	
2	1,784	0,898	0,912	0,295	1,659	
3	1,932	0,77	0,977	0,227	1,27	

Tabulka 5.3 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané ohřevem po dobu 15 minut při 110° C na přístroji Termovap typ TV10

<i>číslo zkumavky</i>	<i>Volné mastné</i>					<i>Estery cholesterolu</i>
	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>		
4	2,067	1,057	0,614	0,278	1,171	
5	1,739	0,807	0,695	0,223	1,231	

Tabulka 5.4 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané při ohřevu na vodní lázni při 100° C po dobu 30 minut

<i>číslo zkumavky</i>	<i>Volné mastné</i>					<i>Estery cholesterolu</i>
	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>		
1	1,854	0,432	0,678	0,182	0,871	
2	1,477	0,716	0,532	0,179	0,931	
3	1,967	0,607	0,727	0,164	0,782	

Tabulka 5.5 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané ohřevem po dobu 30 minut při 110° C na přístroji Termovap typ TV10

<i>číslo zkumavky</i>	<i>Volné mastné</i>					<i>Estery cholesterolu</i>
	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>		
4	2,026	0,967	0,537	0,432	0,906	
5	1,136	0,758	0,529	0,241	0,977	

Z tabulek 5.2, 5.3, 5.4 a 5.5 je vidět, že spolu s dobou zahřívání se hodnota koncentrací jednotlivých složek lipidů snižuje u typu zahřívání na vodní lázni i na přístroji Termovap typ TV10.

U stejného vzorku, který byl použit u zahřívání na vodní lázni a na přístroji Termovap typ TV10, byl dále prověřen způsob vaření vzorků s odparkem na olejové lázni při teplotě 110° C a dobou varu 15 a 30 minut (tabulka 5.6, resp. tabulka 5.7).

Tabulka 5.6 Koncentrace (g/ l) pěti tříd lipidů získané při ohřevu na olejové lázni při 110° C po dobu 15 minut

číslo zkumavky			Volné mastné		Estery cholesterolu
	Fosfolipidy	Diacylglyceroly	kyseliny	Triacylglyceroly	
1	2,216	1,165	1,297	0,316	1,449
2	2,167	1,218	1,085	0,371	1,573
3	2,334	1,132	1,234	0,427	1,319
4	2,228	1,318	1,183	0,361	1,624
5	2,331	1,297	1,123	0,312	1,592

Tabulka 5.7 Koncentrace (g/ l) pěti tříd lipidů získané při ohřevu na olejové lázni při 110° C po dobu 30 minut

číslo zkumavky			Volné mastné		Estery cholesterolu
	Fosfolipidy	Diacylglyceroly	kyseliny	Triacylglyceroly	
1	1,932	1,085	0,893	0,207	0,749
2	1,876	1,092	1,174	0,191	0,704
3	1,763	0,983	0,872	0,287	0,859
4	1,375	0,831	0,760	0,252	0,615
5	1,851	0,984	0,851	0,293	0,922

Při srovnání hladiny koncentrací jednotlivých tříd lipidů u tabulek 5.2-5.4 s tabulkami 5.6-5.7 je vidět, že ohřev zkumavek s odparky je účinnější při zahřevu na olejové lázni při 110° C.

Z tabulky 5.6 a 5.7 je zřejmé, že po delším zahřívání na olejové lázni došlo k poklesu koncentrace jednotlivých tříd lipidů. Toto snížení může být způsobeno tím, že při reakci odparku s kyselinou sírovou dochází k hydrolýze a volná mastná kyselina pak reaguje s fosfovanilinovým činidlem na barevnou složku, ale při dlouhém vaření vznikají estery kyseliny sírové, které jsou méně reaktivní a dochází pak ke snížení koncentrace jednotlivých složek lipidových tříd.

Dále bylo vyzkoušeno spojení doby extrakce po dobu 3 minut a vaření na olejové lázni po dobu 15 minut při 110° C opět u stejného vzorku ušního mazu jak v předcházejících modifikacích, jehož výsledky přináší tabulka 5.8.

Tabulka 5.8 Koncentrace (g/l) pěti tříd lipidů získané při ohřevu na olejové lázni při 110° C po dobu 30 minut a při extrakci 3 minuty

číslo zkumavky	<i>Volné</i>				
	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
1	2,328	1,217	1,342	0,428	1,651
2	2,317	1,312	1,265	0,395	1,692
3	2,208	1,241	1,208	0,562	1,491
4	2,412	1,418	1,216	0,489	1,729
5	2,291	1,345	1,327	0,376	1,793

Z tabulky 5.8 je patrné, že při extrakci 3 minuty a záhřevu na olejové lázni při 110°C po dobu 15 minut jsou hodnoty koncentrací jednotlivých tříd lipidů nejvyšší a toto spojení vynáší nejvyšší výtěžnost. Tento upravený postup s modifikacemi doby extrakce 3 minuty a varu na olejové lázni po dobu 15 minut při 110° C byl použit k vlastní analýze 23 vzorků ušního mazu.

V druhé části experimentu (analýze 23 vzorků ušního mazu) byla zvláštní pozornost věnována samotnému odběru vzorku. Strategie odběru byla zvolena tak, aby byl vybrán reprezentativní náhodný výběr. Z naakumulovaného vzorku ušního mazu bylo odebráno pětkrát 2,5 mg, aby mohla být následně určena reprodukovatelnost používané metodiky. Jednotlivé vzorky od jedince byly získány nakrájením pěti tenkých plátků vždy od jednoho konce naakumulovaného ušního mazu, ze kterých bylo následně odváženo 2,5 mg.

5.2 Výsledky laboratorní analýzy

Biochemická analýza ušního mazu 23 pacientů pomocí tenkovrstevné chromatografie byla provedena za účelem analytického stanovení pěti znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH. Každý z 23 vzorků ušního mazu byl analyzován vždy pětkrát, byla tak získána zdrojová matice dat o 115 řádcích a 5 sloupcích. Vlastní výsledky analýzy všech 23 pacientů při pětinašobném opakování přináší tabulka 5.9, ve které jsou hodnoty koncentrací všech pěti lipidových tříd při pětinašobné opakovatelnosti.

Tabulka 5.9 Hodnoty koncentrací lipidových tříd (g/ l) u všech 23 pacientů při pětinasobné opakovatelnosti

		<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
Vzorek 1	1	2,014	0,162	0,087	0,302	1,044
	2	1,863	0,118	0,129	0,215	1,325
	3	1,82	0,172	0,122	0,194	1,012
	4	1,918	0,183	0,108	0,258	1,917
	5	2,217	0,237	0,136	0,215	1,799
Vzorek 2	1	1,767	0,237	0,323	0,14	0,56
	2	1,271	0,198	0,345	0,172	0,442
	3	2,1	0,194	0,398	0,183	0,905
	4	1,185	0,292	0,232	0,162	0,539
	5	1,841	0,258	0,291	0,205	0,862
Vzorek 3	1	2,245	0,898	0,489	0,265	0,748
	2	2,105	0,758	0,325	0,187	0,366
	3	1,895	0,652	0,465	0,245	0,603
	4	2,336	0,843	0,364	0,312	0,725
	5	1,963	0,654	0,429	0,239	0,785
Vzorek 4	1	0,754	0,42	0,125	0,277	1,769
	2	1,054	0,365	0,145	0,325	1,785
	3	1,246	0,512	0,232	0,414	1,698
	4	0,846	0,425	0,185	0,356	1,457
	5	0,813	0,369	0,149	0,278	1,234
Vzorek 5	1	2,038	0,415	0,315	0,286	1,817
	2	1,818	0,364	0,217	0,247	1,657
	3	1,657	0,421	0,279	0,365	1,456
	4	2,234	0,297	0,316	0,347	1,764
	5	2,451	0,317	0,247	0,282	1,478
Vzorek 6	1	1,845	0,714	0,247	0,194	1,852
	2	1,639	0,874	0,271	0,356	1,654
	3	1,479	0,637	0,317	0,273	1,917
	4	1,374	0,528	0,169	0,287	1,215
	5	1,152	0,615	0,264	0,312	1,574
Vzorek 7	1	1,985	0,85	0,638	0,4	0,838
	2	1,738	0,425	0,425	0,438	0,652
	3	1,738	1,075	0,463	0,525	0,813
	4	2,245	0,935	0,525	0,675	0,788
	5	2,175	0,816	0,425	0,563	0,625
Vzorek 8	1	1,088	0,513	0,875	0,438	0,588
	2	1,363	0,75	0,513	0,529	0,647
	3	1,538	0,638	0,863	0,375	0,538
	4	1,325	0,6	0,785	0,413	0,415
	5	1,175	0,625	0,823	0,475	0,576

		<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
Vzorek 9	1	1,458	0,745	0,165	0,754	2,348
	2	1,256	0,658	0,225	0,697	2,583
	3	1,587	0,574	0,196	0,914	2,797
	4	1,352	0,694	0,157	0,754	2,215
	5	1,268	0,484	0,176	0,637	2,282
Vzorek 10	1	1,757	0,912	0,453	0,302	2,298
	2	1,372	0,631	0,367	0,274	1,654
	3	1,384	0,612	0,412	0,316	1,962
	4	1,792	0,697	0,397	0,335	1,674
	5	1,387	0,721	0,671	0,423	2,684
Vzorek 11	1	0,874	0,528	0,247	0,529	3,472
	2	0,687	0,647	0,345	0,634	2,657
	3	0,863	0,567	0,276	0,567	3,314
	4	0,721	0,747	0,331	0,614	3,647
	5	0,697	0,537	0,297	0,776	2,857
Vzorek 12	1	2,348	0,527	0,328	1,514	2,718
	2	1,657	0,634	0,468	1,167	2,147
	3	1,818	0,738	0,289	1,471	2,679
	4	1,729	0,569	0,314	1,164	2,731
	5	1,919	0,721	0,354	1,771	1,978
Vzorek 13	1	1,347	0,475	0,156	0,784	1,974
	2	1,578	0,573	0,178	0,658	1,856
	3	1,657	0,487	0,236	0,712	1,749
	4	1,854	0,713	0,163	0,697	1,516
	5	1,485	0,526	0,187	0,557	1,185
Vzorek 14	1	1,487	0,512	0,256	0,574	2,347
	2	1,297	0,471	0,327	0,637	2,079
	3	1,782	0,529	0,387	0,728	2,857
	4	1,328	0,479	0,356	0,763	2,727
	5	1,678	0,679	0,297	0,568	2,087
Vzorek 15	1	1,567	0,645	0,431	0,425	2,767
	2	1,478	0,497	0,378	0,574	2,314
	3	1,217	0,437	0,425	0,316	2,456
	4	1,774	0,527	0,396	0,374	2,218
	5	1,047	0,718	0,513	0,395	1,927

		<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
Vzorek 16	1	0,818	0,459	0,217	1,678	2,647
	2	0,769	0,513	0,267	1,234	3,397
	3	0,793	0,628	0,218	1,726	2,787
	4	0,645	0,417	0,179	1,214	3,498
	5	0,929	0,423	0,232	1,437	2,434
Vzorek 17	1	1,178	0,168	0,134	0,205	1,947
	2	1,459	0,145	0,156	0,234	1,647
	3	1,616	0,197	0,144	0,215	1,485
	4	1,578	0,159	0,126	0,197	1,717
	5	1,874	0,117	0,112	0,134	1,397
Vzorek 18	1	1,292	0,842	0,743	0,295	1,229
	2	0,887	1,071	0,475	0,231	1,458
	3	0,879	1,221	0,52	0,287	1,679
	4	1,098	0,963	0,623	0,175	1,765
	5	1,356	0,912	0,515	0,162	1,389
Vzorek 19	1	1,378	1,314	0,862	0,344	0,771
	2	1,386	0,977	0,523	0,449	0,38
	3	1,631	1,518	0,713	0,246	0,642
	4	1,728	2,352	0,759	0,472	0,594
	5	1,112	1,892	0,635	0,652	0,352
Vzorek 20	1	1,638	2,062	0,721	0,651	1,314
	2	1,585	1,978	0,612	0,542	0,872
	3	2,132	2,119	0,846	0,712	1,115
	4	1,736	1,759	0,797	0,445	0,775
	5	2,418	1,215	0,894	0,695	1,05
Vzorek 21	1	1,462	0,841	0,912	0,932	1,317
	2	2,157	1,031	0,981	0,591	1,451
	3	1,985	0,918	0,695	0,891	1,682
	4	1,745	0,832	0,818	0,912	2,113
	5	1,618	0,682	0,693	0,841	1,241
Vzorek 22	1	1,482	1,674	0,612	0,618	0,931
	2	1,612	1,512	0,518	1,218	0,793
	3	1,378	0,752	0,387	0,789	0,956
	4	1,983	1,681	0,417	0,751	0,541
	5	1,719	1,749	0,524	0,512	0,981

Vzorek		<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> <i>Fosfolipidy</i> <i>Diacylglyceroly</i> <i>Volné mastné kyseliny</i> <i>Triacylglyceroly</i> <i>Estery cholesterolu</i> </div>				
		23	1	2,198	0,583	0,741
	2	1,636	1,057	1,023	0,691	2,361
	3	1,487	0,716	0,614	0,447	1,821
	4	2,131	0,863	0,581	0,693	1,932
	5	1,716	0,831	0,512	0,492	1,971

Jelikož 5 opakovaných analytických stanovení vede na malý výběr, byla při výpočtu střední hodnoty každého znaku dána přednost věrohodnějšímu odhadu střední hodnoty pro malé výběry, a to Hornově pivotové polosumě. Vznikla tak nová zdrojová matice dat o 23 řádcích a 5 sloupcích (Tabulka 5.10), která byla podstoupena vícerozměrné statistické analýze.

Tabulka 5.10 Zdrojová matice středních hodnot pivotové polosumy 5 biochemických znaků ušního mazu fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu

Pacient	<div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> <i>Fosfolipidy</i> <i>Diacylglyceroly</i> <i>Volné mastné kyseliny</i> <i>Triacylglyceroly</i> <i>Estery cholesterolu</i> </div>				
	1	2,0185	0,1775	0,1115	0,248
2	1,6425	0,243	0,315	0,1725	0,6735
3	2,1155	0,775	0,407	0,2495	0,5755
4	1,00	0,4385	0,1785	0,3455	1,5095
5	2,054	0,359	0,2665	0,306	1,6365
6	1,4985	0,701	0,243	0,275	1,566
7	1,9915	0,75	0,5315	0,5375	0,7315
8	1,313	0,6315	0,694	0,452	0,531
9	1,4215	0,6145	0,191	0,7755	2,506
10	1,582	0,762	0,519	0,3485	2,169
11	0,7805	0,6375	0,296	0,6525	3,152
12	2,0025	0,6325	0,3785	1,4675	2,3545
13	1,6005	0,594	0,196	0,6705	1,5795
14	1,5395	0,575	0,3215	0,6655	2,468
15	1,4105	0,5775	0,4455	0,445	2,347
16	0,7735	0,5225	0,223	1,47	2,766
17	1,526	0,157	0,134	0,184	1,672
18	1,1175	1,0315	0,609	0,2285	1,497
19	1,42	1,6645	0,6925	0,449	0,5615
20	2,0015	1,667	0,753	0,5785	1,0445
21	1,8095	0,8565	0,837	0,7615	1,677
22	1,6805	1,2505	0,4995	0,865	0,761
23	1,8425	0,82	0,7675	0,57	1,911

Další zdrojová matice je znázorněna v tabulce 5.11, ve které jsou hodnoty průměrů jednotlivých lipidových tříd všech 23 pacientů vyjádřeny po Box-Coxově transformaci spolu s hodnotou směrodatné odchylky. Transformace dat se užívá pokud se na základě analýzy dat zjistí, že rozdělení výběru dat se příliš odlišuje od rozdělení normálního, pak vzniká problém jak data vůbec vyhodnotit [42].

Tabulka 5.11 Hodnoty průměrů jednotlivých lipidových tříd (g/ l) a hodnoty směrodatných odchylek vyjádřených po Box-Coxově transformaci

<i>číslo vzorku</i>	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné masné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
1	1,919 (0,097)	0,158 (0,048)	0,107 (0,034)	0,223 (0,028)	1,271 (0,315)
2	1,478 (0,372)	0,221 (0,033)	0,292 (0,081)	0,163 (0,029)	0,590 (0,152)
3	2,039 (0,166)	0,721 (0,090)	0,386 (0,078)	0,231 (0,059)	0,556 (0,425)
4	0,879 (0,127)	0,400 (0,039)	0,154 (0,030)	0,311 (0,041)	1,476 (0,398)
5	1,920 (0,300)	0,341 (0,052)	0,257 (0,052)	0,287 (0,043)	1,571 (0,148)
6	1,394 (0,297)	0,631 (0,101)	0,227 (0,111)	0,257 (0,107)	1,510 (0,530)
7	1,887 (0,203)	0,695 (0,594)	0,469 (0,052)	0,482 (0,089)	0,702 (0,102)
8	1,233 (0,164)	0,593 (0,096)	0,687 (0,507)	0,425 (0,054)	0,510 (0,191)
9	1,339 (0,095)	0,585 (0,148)	0,175 (0,018)	0,718 (0,079)	2,368 (0,157)
10	1,468 (0,132)	0,680 (0,069)	0,429 (0,059)	0,313 (0,036)	1,909 (0,304)
11	0,738 (0,060)	0,577 (0,055)	0,283 (0,045)	0,595 (0,063)	3,016 (0,458)
12	1,818 (0,153)	0,602 (0,088)	0,331 (0,039)	1,324 (0,210)	2,293 (0,430)
13	1,514 (0,188)	0,527 (0,054)	0,175 (0,019)	0,644 (0,142)	1,509 (0,543)
14	1,438 (0,167)	0,512 (0,042)	0,304 (0,062)	0,623 (0,067)	2,292 (0,270)
15	1,301 (0,314)	0,525 (0,091)	0,413 (0,033)	0,388 (0,066)	2,216 (0,354)
16	0,706 (0,101)	0,462 (0,050)	0,210 (0,041)	1,370 (0,195)	2,618 (0,810)
17	1,433 (0,370)	0,145 (0,037)	0,128 (0,020)	0,177 (0,103)	1,563 (0,179)
18	1,020 (0,185)	0,952 (0,111)	0,542 (0,066)	0,207 (0,054)	1,420 (0,221)
19	1,346 (0,315)	1,419 (0,476)	0,645 (0,163)	0,377 (0,146)	0,479 0,161)
20	1,788 (0,224)	1,630 (0,981)	0,724 (0,173)	0,557 (0,172)	0,947 0,194)
21	1,691 (0,250)	0,808 (0,172)	0,773 (0,105)	0,754 (0,472)	1,454 0,217)
22	1,556 (0,183)	1,235 (1,454)	0,457 (0,083)	0,697 (0,174)	0,744 0,457)
23	1,722 (0,247)	0,742 (0,188)	0,636 (0,117)	0,531 (0,090)	1,778 (0,425)

5.3 Výsledky statistického zpracování

Hodnoty získané laboratorním zpracováním vzorků byly vyhodnocovány statisticky za použití statistických programů STATISTICA 8.0, QC-EXPERT a NCSS2000 licencovaných na Univerzitě Pardubice. Data byla vyhodnocována u 23 jedinců, u kterých byla zdrojová matice analyzována vícerozměrnými statistickými metodami za účelem odhalení vnitřních vazeb a struktury, skryté v datech ušního mazu sledovaných pacientů.

Postupně bylo ožito několika statistických metod. Na data byla nejdříve aplikována metoda exploratorní (průzkumové) analýzy, která využívá různé grafické techniky zobrazení dat v dvourozměrném souřadnicovém systému. V rámci exploratorní analýzy byly použity grafické techniky ikonových symbolových grafů a krabicové grafy. Data byla poté zpracována metodou hlavních komponent (PCA) a faktorovou analýzou (FA). Klasifikace dat byla provedena analýzou shluků.

Cílem této práce bylo nalézt analytické parametry stanovení obsahu lipidů v ušním mazu pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě. Pro vyšetření této závislosti byla užitá analýza rozptylu (ANOVA).

5.3.1 Analýza rozptylu (ANOVA)

Analýza rozptylu slouží k analýze zdrojů variability v lineárních statistických modelech [44]. Analýzou ušního mazu u 23 osob s pětinásobným opakováním, byla získána zdrojová matice dat 115×5 pro všech pět vyšetřovaných znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH. Testováním významnosti faktorů pacient a opakovatelnost ve zdrojové matici 115×5 provedené pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu v programu NCSS2000 byl získán výstup uvedený v tabulce číslo 5.12

Tabulka 5.12 Základní výsledky analýzy rozptylu (program NCSS2000)

<i>Statistika</i>	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
<i>F-kritérium - pacient</i>	12,30	23,88	30,66	37,33	32,30
<i>Kritický kvantil</i>	1,66	1,66	1,66	1,66	1,66
<i>p-hodnota</i>	2,219E-18	4,205E-28	3,968E-32	2,105E-35	5,456E-33
<i>Závěr: Faktor je statisticky</i>	Významný	Významný	Významný	Významný	Významný
<i>F-kritérium - opakovatelnost</i>	0,87	0,39	0,79	0,16	2,19
<i>Kritický kvantil</i>	2,48	2,48	2,48	2,48	2,48
<i>p-hodnota</i>	0,485	0,812	0,532	0,960	0,076
<i>Závěr</i>	Nevýznamný	Nevýznamný	Nevýznamný	Nevýznamný	Nevýznamný
<i>F-kritérium – interakce faktorů</i>	1,24	5,26	4,17	8,57	7,50
<i>Kritický kvantil</i>	3,95	3,95	3,95	3,95	3,95
<i>p-hodnota</i>	0,268	0,024	0,044	0,004	0,007
<i>Závěr</i>	Nevýznamný	Významný	Významný	Významný	Významný

V tabulce 5.12 je použito F – kritérium což je poměr průměrných čtverců testovaného faktoru v čitateli ku chybovému faktoru ve jmenovateli. Jedná se o hodnotu Fischer-Snedecorova testačního kritéria F. Vypočtená hladina významnosti α pro F-test představuje vypočtenou pravděpodobnost, že $F_{kritická}$ je větší než $F_{experimentální}$.

Z tabulky vyplývá, že efekty faktorů pacient jsou nulové, neboť hodnota Fisher – Snedecorova testačního kritéria F_{exp} je vyšší než kvantil Fischer-Snedecorova rozdělení $F_{1-0,05}$ a nulová hypotéza H_0 je zamítnuta, efekty faktoru pacientů jsou nulové a faktor pacient je tedy statisticky významný.

U faktoru pacient je spočtená hladina významnosti pro F-kritérium menší než $\alpha=0,05$, a proto je nulová hypotéza zamítnuta a F-kritérium, tedy i faktor pacient jsou statisticky významné.

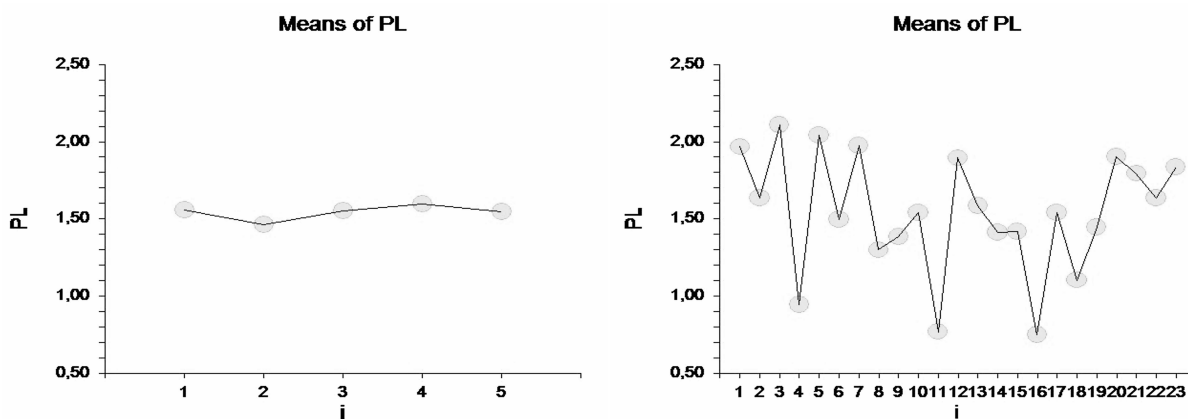
Při testování faktoru opakovatelnost je hodnota Fisher – Snedecorova testačního kritéria F_{exp} nižší než kvantil Fischer-Snedecorova rozdělení $F_{1-0,05}$, a proto je nulová hypotéza H_0 přijata, efekty faktoru opakovatelnosti nejsou nulové a faktor opakovatelnost je tedy statisticky nevýznamný

U faktoru opakovatelnost je spočtená hladina významnosti pro F-kritérium vyšší než $\alpha=0,05$, a proto je nulová hypotéza přijata a F-kritérium, tedy i faktor pacient jsou statisticky nevýznamné.

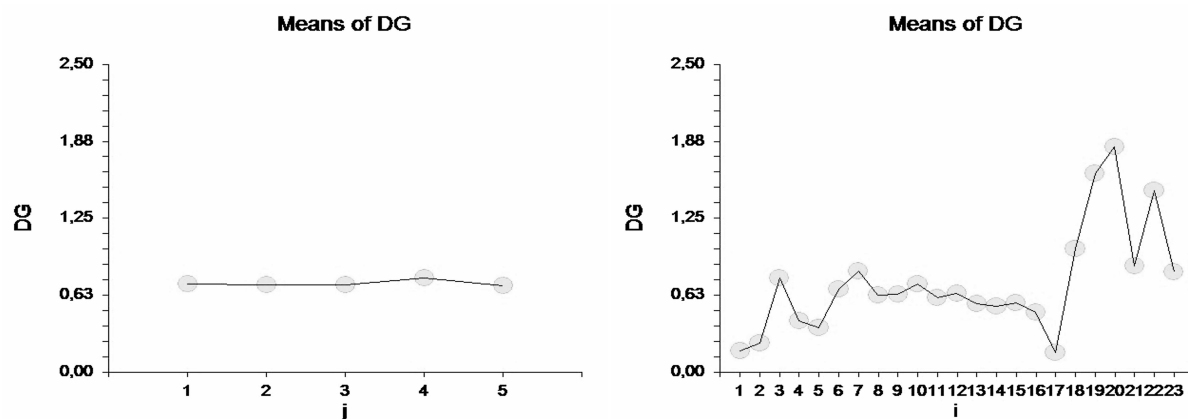
Při testování interakce faktorů pacient a reprodukovatelnost je u sledovaného znaku fosfolipidy hodnota Fisher – Snedecorova testačního kritéria $F_{\text{experimentální}}$ nižší než kvantil $F_{1-0,05}$, nulová hypotéza H_0 o nevýznamnosti interakčního členu pacient - opakovatelnost je přijata, efekty interakce faktorů pacienta a opakovatelnosti nejsou nulové a interakce obou faktorů je tedy statisticky nevýznamná.

U interakce faktorů pacient a reprodukovatelnost jsou u sledovaných znaků diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu hodnoty Fisher – Snedecorova testačního kritéria F_e nižší než kvantily $F_{1-0,05}$, nulové hypotézy H_0 nejsou přijaty, efekty interakce faktorů pacienta a opakovatelnosti jsou nulové a interakce obou faktorů je tedy statisticky významná.

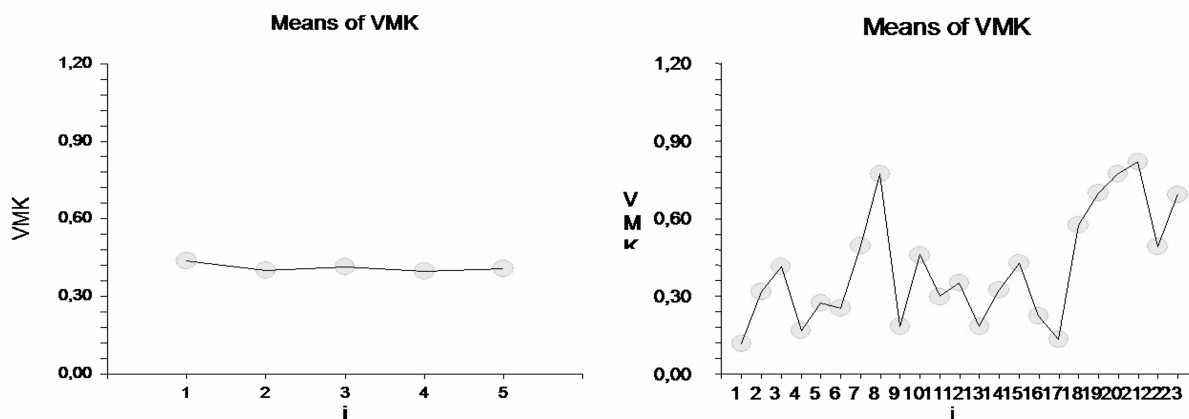
Na obrázku 5.1-5.5 jsou znázorněny graficky průměry hodnot fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu analýzou rozptylu ANOVA. Je vidět splnění proměnlivosti datech u faktoru pacient.



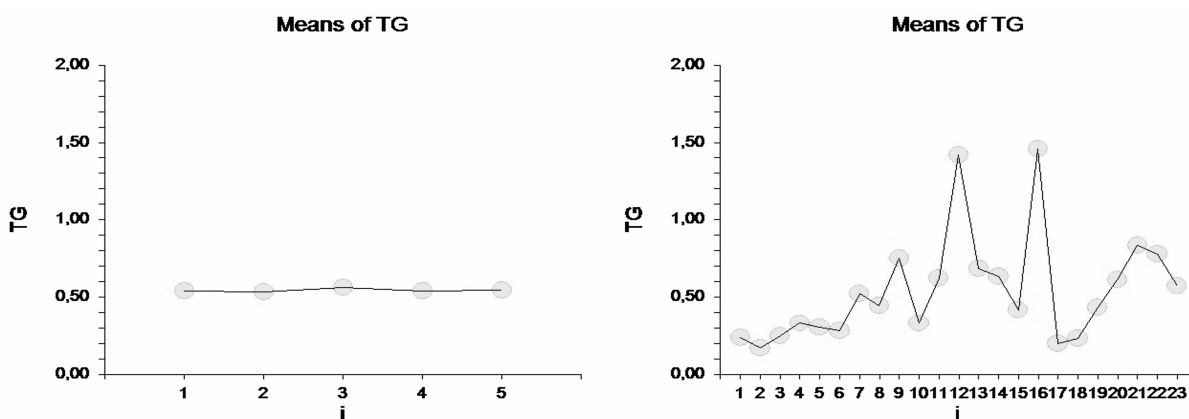
Obrázek 5.1 Grafické znázornění průměrů hodnot fosfolipidů - PL analýzou rozptylu ANOVA: (a) vliv pětinasobné reprodukovatelnosti, (b) vliv pacienta při celkovém počtu 23 pacientů.



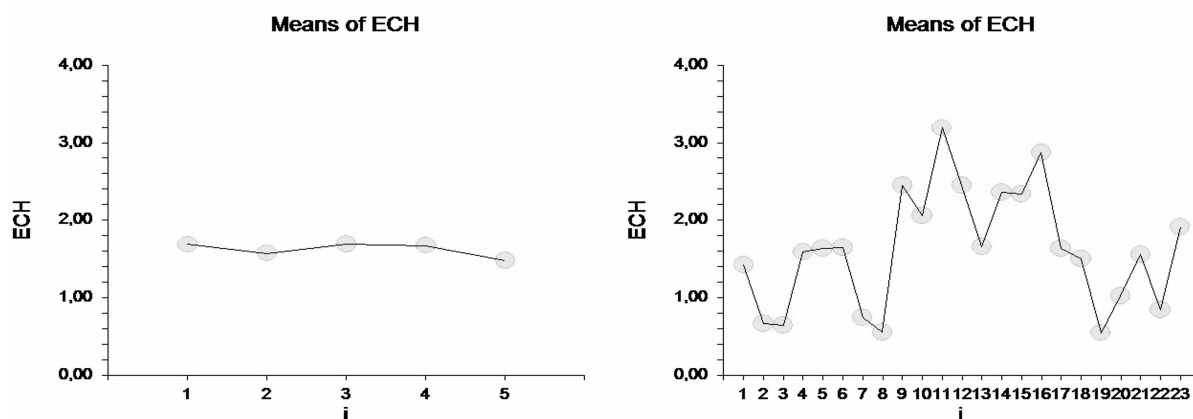
Obrázek 5.2 Grafické znázornění průměrů hodnot diacylglycerolů - DG analýzou rozptylu ANOVA: (a) vliv pětinasobné reprodukovatelnosti, (b) vliv pacienta při celkovém počtu 23 pacientů.



Obrázek 5.3 Grafické znázornění průměrů hodnot volných mastných kyselin - VMK analýzou rozptylu ANOVA: (a) vliv pětinasobné reprodukovatelnosti, (b) vliv pacienta při celkovém počtu 23 pacientů.



Obrázek 5.4 Grafické znázornění průměrů hodnot triacylglycerolů - TG analýzou rozptylu ANOVA: (a) vliv pětinasobné reprodukovatelnosti, (b) vliv pacienta při celkovém počtu 23 pacientů.



Obrázek 5.5 Grafické znázornění průměrů hodnot esterů cholesterolu - ECH analýzou rozptylu ANOVA: (a) vliv pětinasobné reprodukovatelnosti, (b) vliv pacienta při celkovém počtu 23 pacientů.

Z důvodů ověření výsledků pomocí dvou nezávislých byla vytvořena tabulka 5.13 ANOVA (QC-EXPERT) pro ověření výsledků z programu NCSS2000 a obdobně bylo provedeno testování. Tabulka přinesla stejné výsledky testování jako tabulka 5.12. Vzhledem k tomu, že u pacienta není spočtená p -hodnota $> 0,05$, tak není možné přijmout nulovou hypotézu H_0 a F -kriterium, a tedy i faktor pacient se považuje za statisticky významný. Naopak u faktoru opakovatelnost je vypočtená p -hodnota $> 0,05$, tedy je možné přijmout nulovou hypotézu H_0 a F -kriterium, a tedy i faktor opakovatelnost se považuje za statisticky nevýznamný.

Tabulka 5.13 Základní výsledky analýzy rozptylu (program QC-EXPERT)

<i>Statistika</i>	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
<i>F-kritérium - pacient</i>	12,30	23,88	30,66	37,33	32,30
<i>p-hodnota</i>	0	0	0	0	0
<i>Závěr: Faktor je statisticky...</i>	Významný	Významný	Významný	Významný	Významný
<i>F-kritérium - opakovatelnost</i>	0,87	0,39	0,79	0,16	2,19
<i>p-hodnota</i>	0,485	0,812	0,532	0,960	0,076
<i>Závěr</i>	Nevýznamný	Nevýznamný	Nevýznamný	Nevýznamný	Nevýznamný

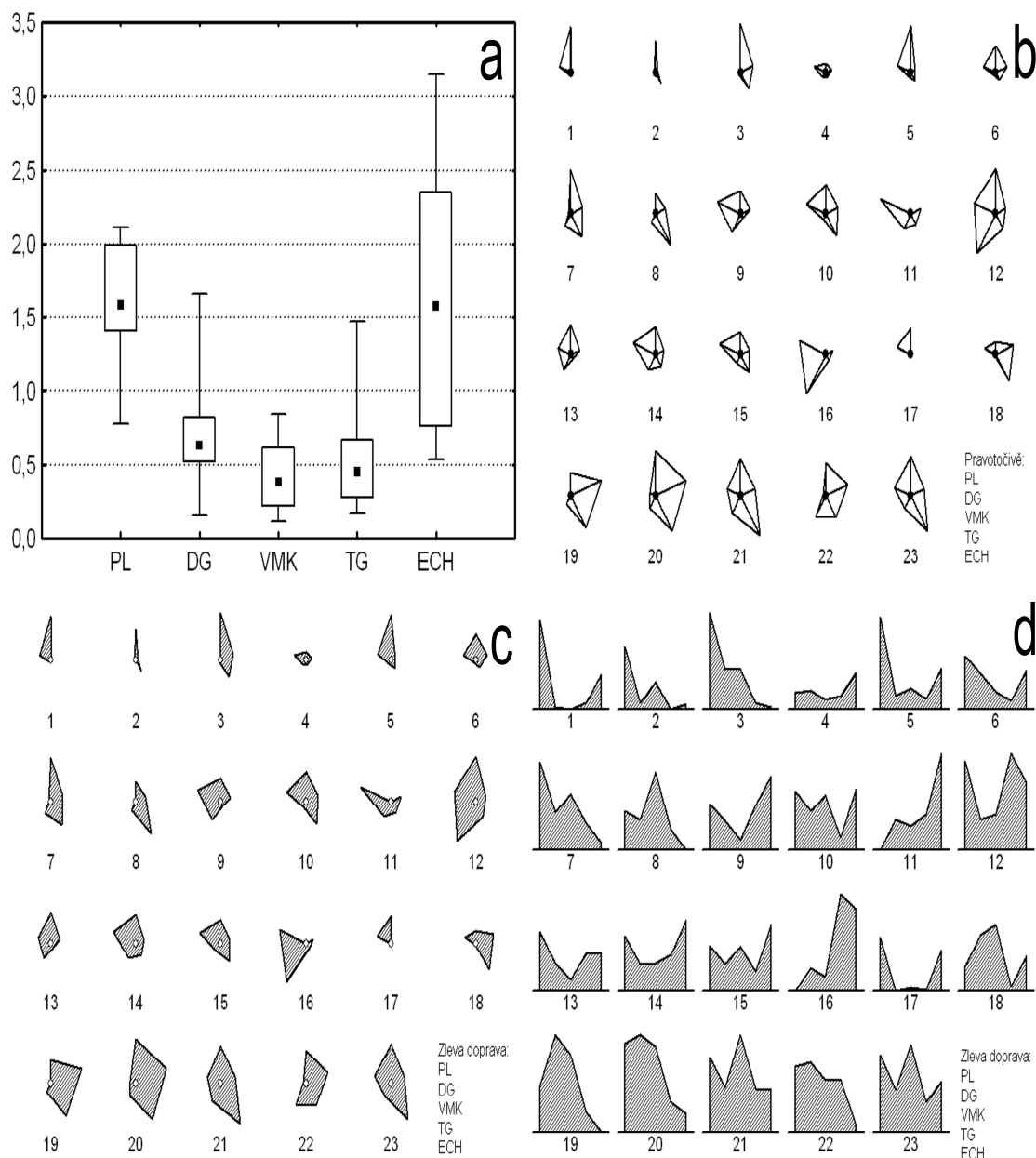
Vzhledem k těmto výsledkům, byl faktor pacient zkoumán a prověřován dalšími metodami vícerozměrné statistiky.

5.3.2 Exploratorní analýza dat

První krokem ve vícerozměrné analýze je vždy exploratorní analýza dat (EDA), kdy jsou v diagnostických grafech odhalovány objekty (zde pacienti) s podobnou či přímo stejnou skladbou znaků, zde pěti ukazatelů ušního mazu. K této analýze se užívají ikonové symbolové grafy. Krabicový graf nejprve ukazuje, zda je v datech dostatečná proměnlivost a zda je možné vůbec aplikovat metody vícerozměrné statistické analýzy. Když by se totiž sledované znaky nedostatečně proměňovaly a představovaly spíše konstanty, byla by vícerozměrná statistická analýza zcela nepoužitelná.

K průzkumové analýze dat EDA bylo použito středních hodnot vždy u pěti opakovaných analytických měření biochemického složení ušního mazu, vyčíslených jako Hornova pivotová polosuma z pěti znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH ve sloupcích a u 23 pacientů v řádcích zdrojové matice

Obrázek 5.6 ukazuje na dostatečnou proměnlivost pěti vyšetřovaných znaků ušního mazu fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH, a potvrzuje tím také jejich správnou volbu k numerické statistické analýze. Hvězdičkový, mnohoúhelníkový a profilový graf umožňují porovnání pacientů v pěti-rozměrném prostoru znaků jeho vhodným promítnutím do roviny. Vzájemně podobné geometrické útvary zde potvrzují i shodnou skladbu ušního mazu, jako je tomu například u pacientů 3 a 5, nebo u 19 a 20, resp. u 21 a 23 či 14 a 15.



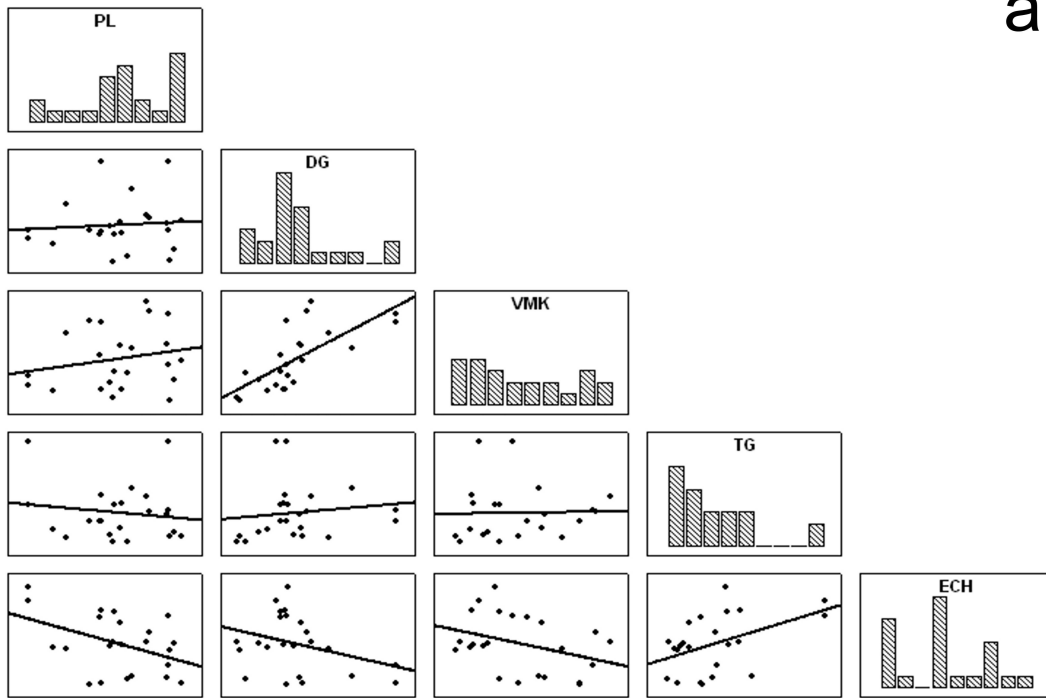
Obrázek 5.6: Grafy průzkumové analýzy dat (a) krabicový graf, (b) hvězdičkového grafu, (c) mnohoúhelníkového grafu, (d) grafu profilů (STATISTICA 8.0)

Součástí průzkumové analýzy dat EDA středních hodnot znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu - ECH u 23 pacientů zdrojové matice Hornovy pivotové polosumy je také korelační matice pěti vyšetřovaných znaků. Když by nebyla korelace u všech dvojic statisticky významná, nešlo by aplikovat metody hlavních komponent (PCA) a faktorové analýzy (FA). Hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu vyjadřují velikost korelace vždy mezi dvěma znaky.

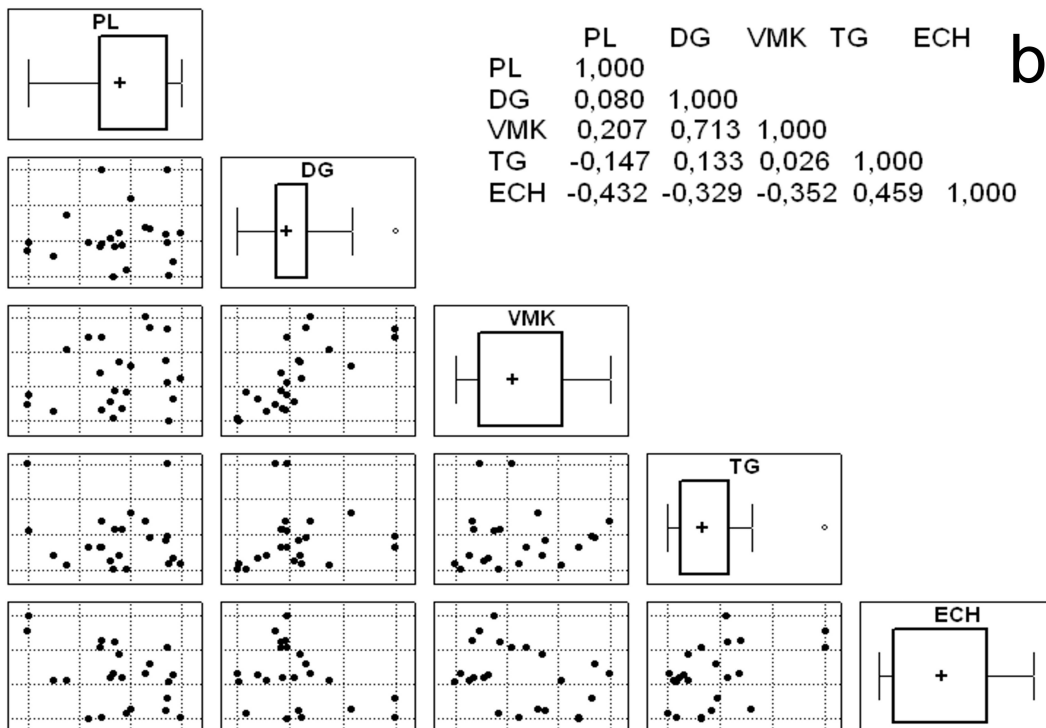
Obrázek 5.7 (a) diagram korelační matice s histogramy jednotlivých znaků odhaluje jejich korelaci, která zaručuje skrytou vnitřní závislost mezi znaky. Je-li proto prokládaná přímka téměř rovnoběžná s x -vou osou, není ve dvojici znaků korelace, a tím i mezi nimi není skrytá závislost. Obrázek 5.7 (b) diagram korelační matice s krabicovým grafem ukazuje ještě navíc na dostatečnou proměnlivost všech pěti znaků. Ukazuje se, že řada dvojic znaků vykazuje dostatečnou korelaci, a proto lze aplikovat následně metody PCA a FA.

Korelace (Matice s Hornovou polosumou 5s*23ř)

a



b

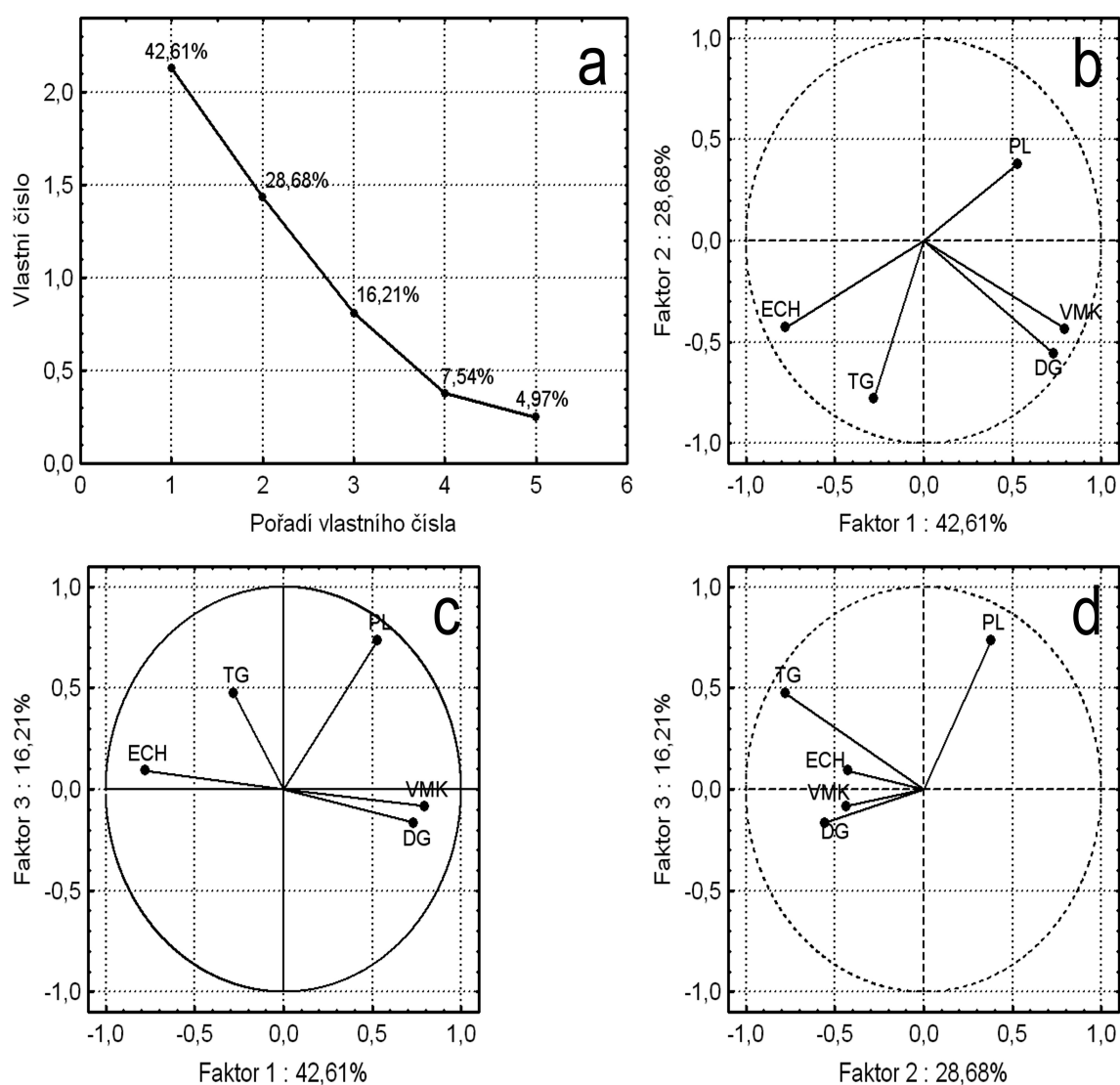


Obrázek 5.7 Korelační tabulka a diagram korelace (a) s histogramy jednotlivých znaků, (b) s krabicovým grafem

5.3.3 Metoda hlavních komponent

Cílem metody hlavních komponent (PCA) je zjednodušení popisu skupiny vzájemně lineárně závislých neboli korelovaných znaků čili rozklad zdrojové matice dat do matice strukturní a matice šumové [42]. Metoda hlavních komponent je vhodná k určení vzájemné vazby a struktury mezi znaky a také mezi subjekty.

Grafy získané metodou hlavní komponent jsou získány za použití zdrojové matice středních hodnot pěti vyšetřovaných znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH s využitím Hornovy pivotové polosumy malého výběru pěti opakovaných měření u 23 pacientů.



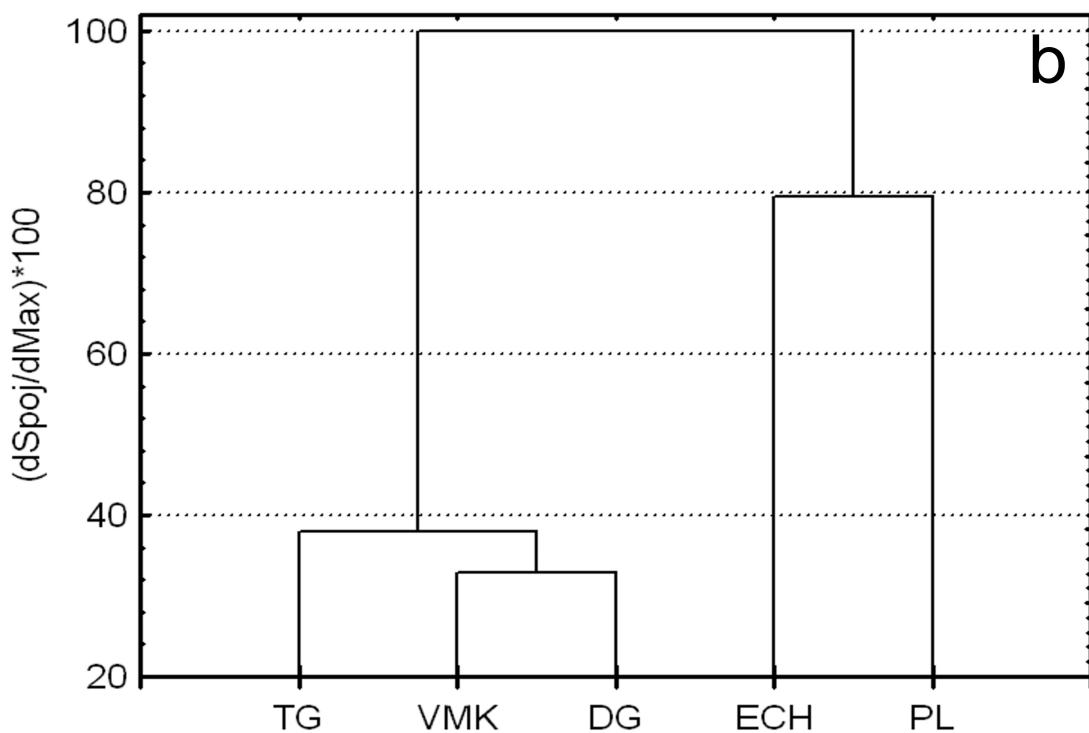
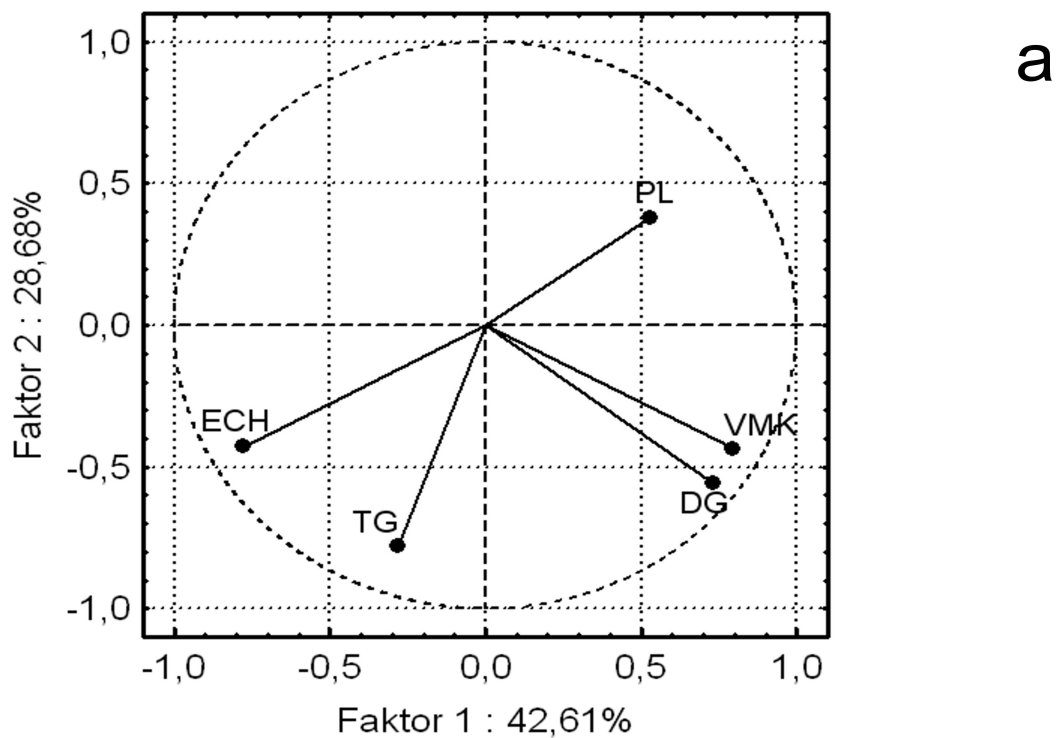
Obrázek 5.8 Grafy metody hlavních komponent (a) Cattelův indexový graf vlastních čísel, a grafy komponentních vah u (b) 1. a 2. hlavní komponenty, (c) 1. a 3. hlavní komponenty (d) 2. a 3. hlavní komponenty

Na obrázku 5.8 (a) se pomocí Cattelova indexového grafu vlastních čísel stanovuje nejprve optimální počet hlavních komponent. Dle Kaiserova kritéria je komponenty s vlastním číslem menším než 1 třeba chápat spíše jako komponenty šumu. Z toho plyne, že optimální počet hlavních komponent je zde roven 2.

Obrázek 5.8 (b) - (d) představují grafy komponentních vah, které informují o vzájemném vztahu mezi původními proměnnými a hlavními komponentami a ukazují jakou měrou přispívají původní znaky do nově vytvořených hlavních komponent. Tři průměty z prostorového 3D grafu všech pěti znaků do tří rovin (tj. 1-2, 1-3, 2-3 průmětů) ukazují, že volné mastné kyseliny a diacylglyceroly silně pozitivně korelují, diacylglyceroly s volnými mastnými kyselinami nekorelují s fosfolipidy ale ani s estery cholesterolu, protože svírají pravý úhel. Fosfolipidy negativně korelují s estery cholesterolu, protože oba svírají úhel 180° v grafu 1. a 2. hlavní komponenty (1-2 průmět). Tento 1-2 průmět je nejdůležitější, protože zobrazuje $42,61\% + 28,68\% = 71,29\%$ veškeré proměnlivosti v datech. Zbývající dva průměty 1-3 a 2-3 vystihují daleko méně proměnlivosti a vedou k obdobným závěrům jako 1-2 průmět.

5.3.4 Analýza shluků

Analýza shluků (CLU) patří mezi metody, které se zabývají vyšetřováním podobnosti vícerozměrných objektů a jejich klasifikací do tříd čili shluků [42].



Obrázek 5.9 Graf komponentního skóre pro 1. a 2. hlavní komponentu (a) a dendrogram analýzy shluků (b)

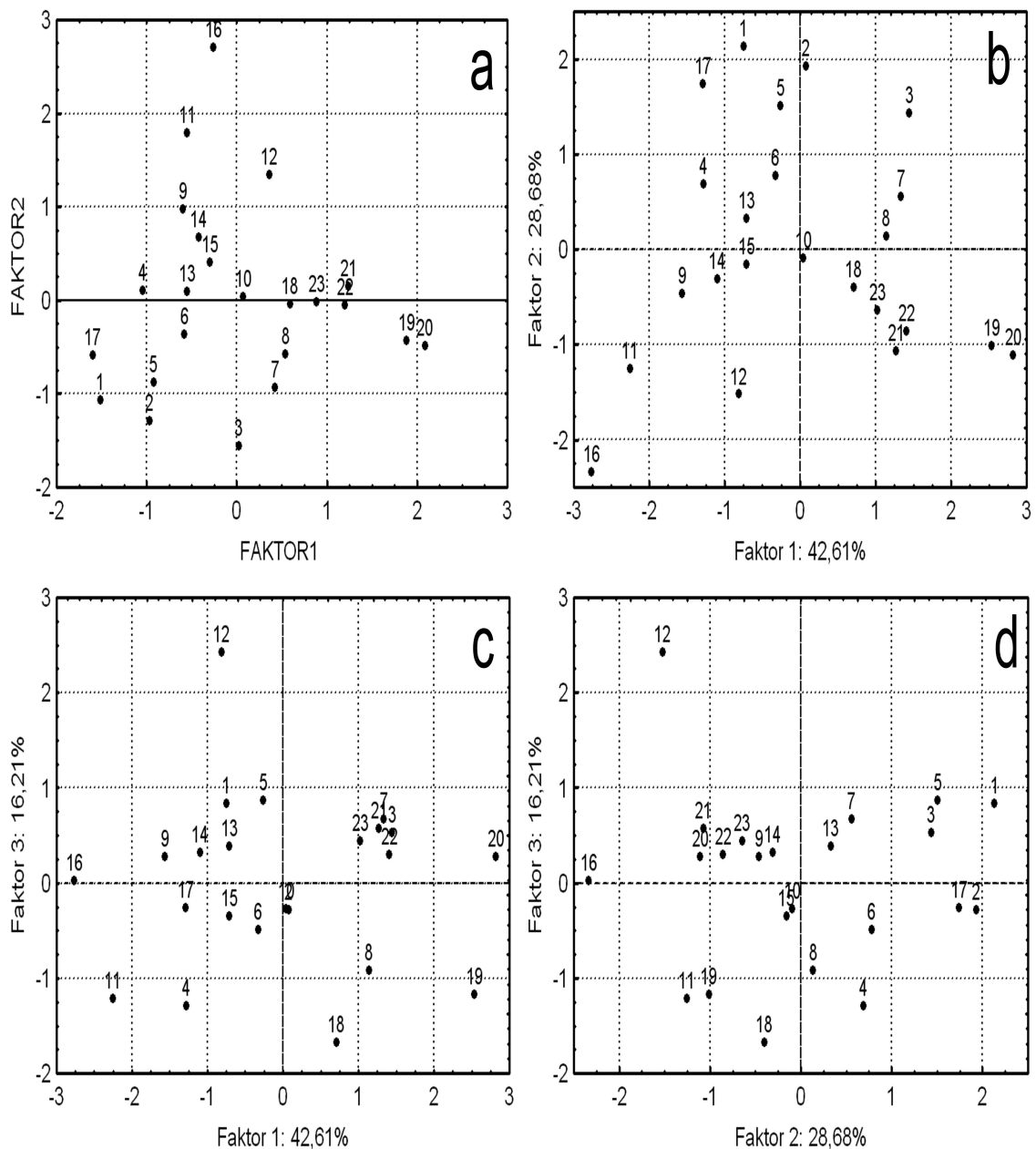
Na obrázku 5.9 je znázorněno porovnání dosažených závěrů klasifikace znaků dvěma nezávislými statistickými metodami, a to metodou hlavních komponent PCA (na základě korelace) a analýzou shluků CLU na základě podobnosti čili normované Mahalanobisovy

vzdálenosti (v %) v 5ti-rozměrném prostoru. Zatímco graf 1. a 2. hlavní komponenty byl co do korelace mezi znaky již vysvětlen na obrázku 5.8 (b), z obrázku 5.9 (b) dendrogramu plyne, že tři znaky triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a diacylglyceroly jsou si vzájemně podobné, protože mají kratší normovanou Mahalanobisovu vzdálenost 30% a 35% avšak silně nepodobné s estery cholesterolu a fosfolipidy, protože s nimi mají vzdálenost 100%. Dvojice estery cholesterolu a fosfolipidy si je vzájemně také nepodobná, protože vykazuje vzdálenost 80%.

5.3.5 Faktorová analýza

Faktorová analýza (FA) je technika vícerozměrné statistiky, která slouží k vyšetření vnitřích souvislostí a vztahů čili korelací a odhalení základní struktury zdrojové matice dat [42]. Cílem faktorové analýzy je odvodit z dat snadno vysvětlitelné a pojmenovatelné společné faktory, které zestručňují původní data.

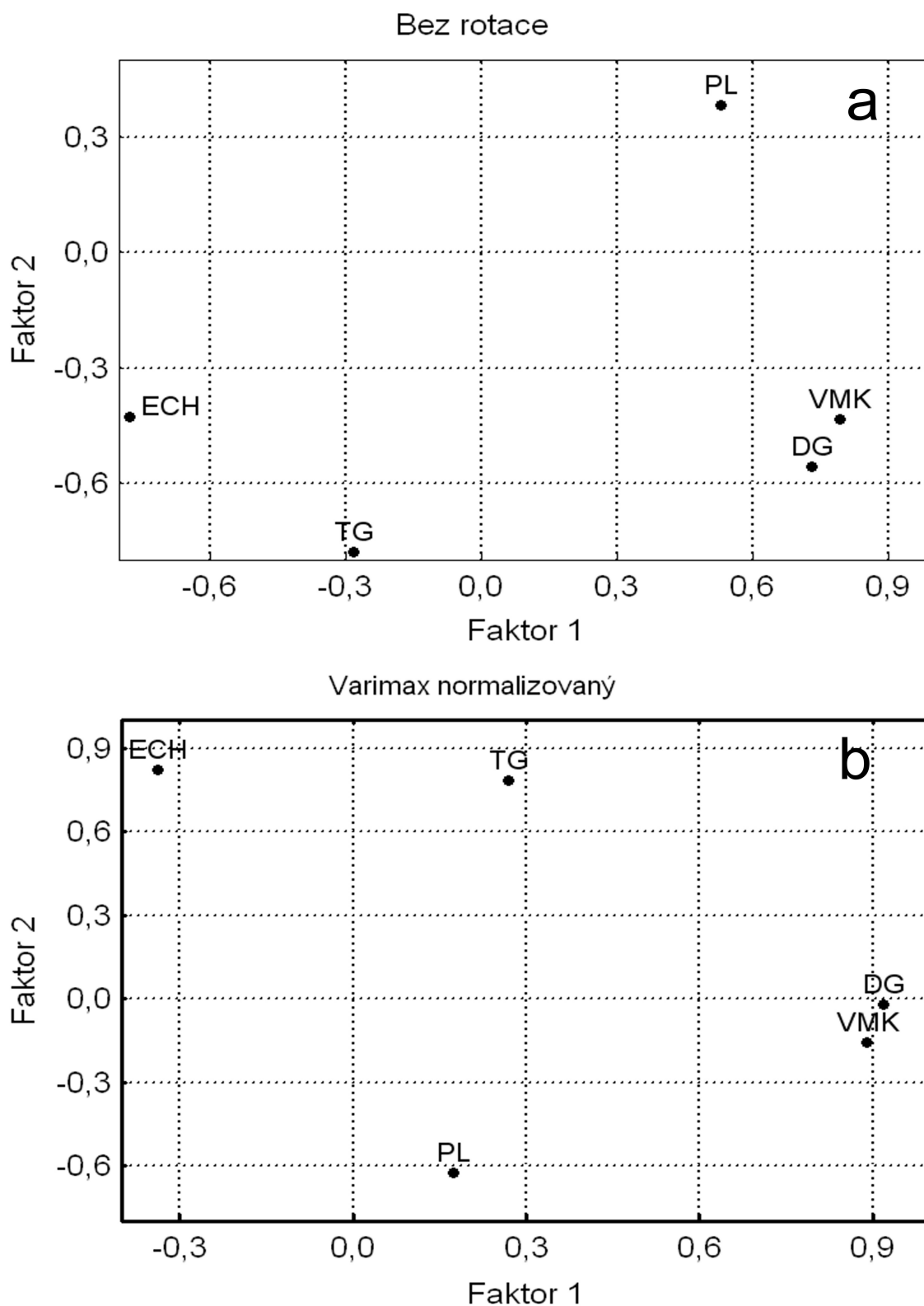
Vlastní klasifikaci ušního mazu 23 pacientů metodami hlavních komponent PCA a faktorové analýzy FA po rotaci Varimax normalizovaný přináší obrázek 5.10. Vysoce věrohodný je obrázek 5.10 (a) graf faktorového skóre po rotaci, který přináší faktorová skóre pacientů, kteří jsou zde faktorově čistí, například 18, 23, 20, 22, 19, 20, 13, 6, 4 vždy s vysokou hodnotou prvního faktoru a velmi nízkou či přímo nulovou hodnotou druhého faktoru. Jsou zde také zobrazení jako faktorově čistí pacienti s vysokou hodnotou druhého faktoru a nízkou hodnotou prvního faktoru, například, 16, 11, 12, 10, 14, 15, 3, 7, 8.



Obrázek 5.10 Grafy analýzy hlavních komponent a faktorové analýzy (a) graf faktorového skóre metody FA po rotaci Varimax normalizovaný, (b) graf komponentního skóre metody PCA 1. a 2. hlavní komponenty, (c) 1. a 3.hlavní komponenty a (d) 2. a 3.hlavní komponenty.

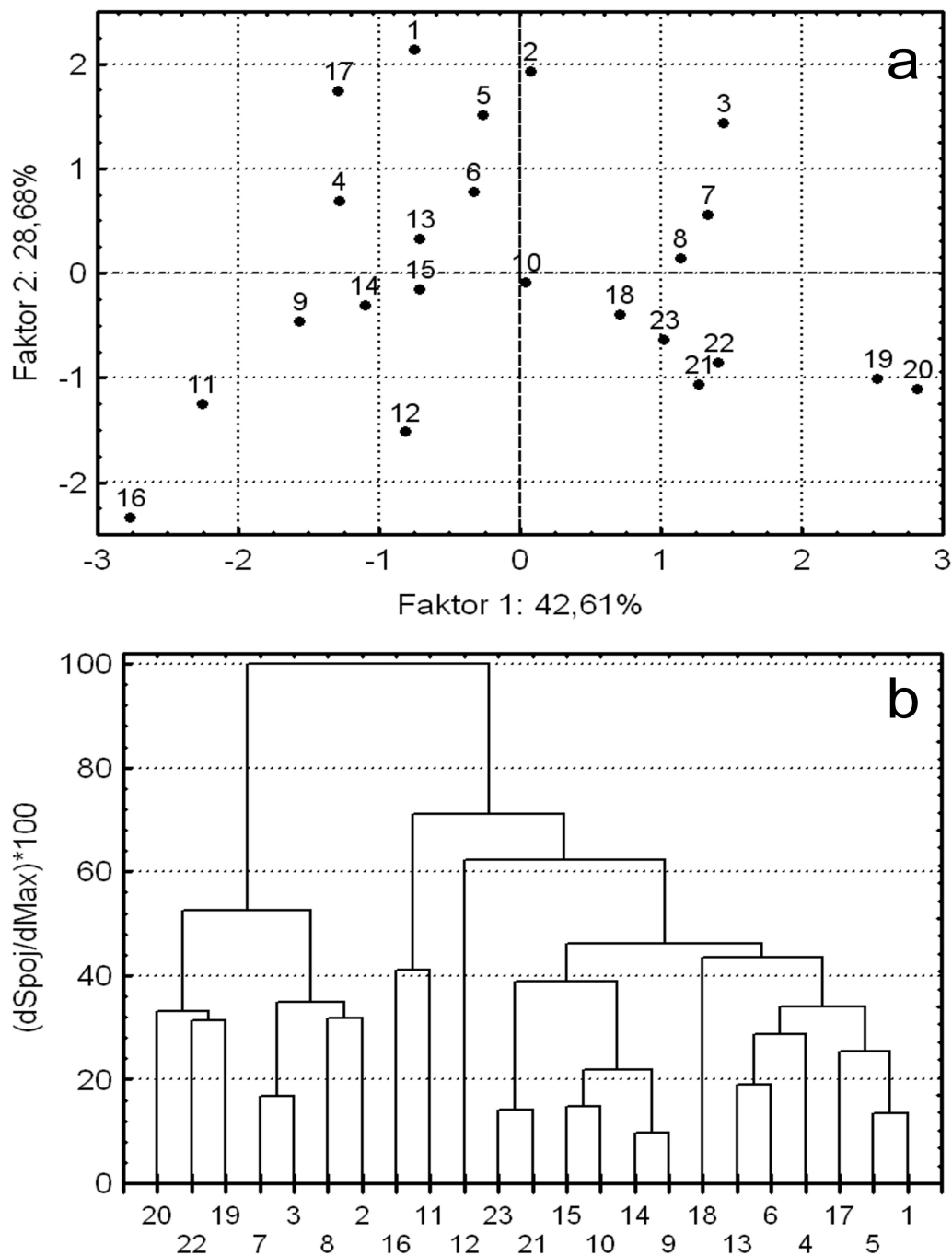
Na základě faktorových vah po rotaci Varimax normalizovaný na obrázku 5.11 (b) lze usoudit, že 1. faktor je silně ovlivněn především znaky volné mastné kyseliny a diacylglyceroly (vahou 0,9 a 2. faktor vahou 0), zatímco 2. faktor znaky triacylglyceroly (vahou 0,9 a 1. faktor vahou 0,3) a fosfolipidy (vahou -0,6 a 1. faktor vahou 0,1) a znak estery cholesterolu je méně faktorově čistý, protože sice ovlivňuje 2. faktor vahou 0,9 ale také 1. faktor vahou -0,3. Z toho také plyne důsledek k analýze, které znaky nejvíce ovlivňují ušní

maz dotyčných pacientů, u 1. faktoru jsou to znaky volné mastné kyseliny, diacylglyceroly a u 2. faktoru především znaky triacylglyceroly, fosfolipidy a estery cholesterolu.



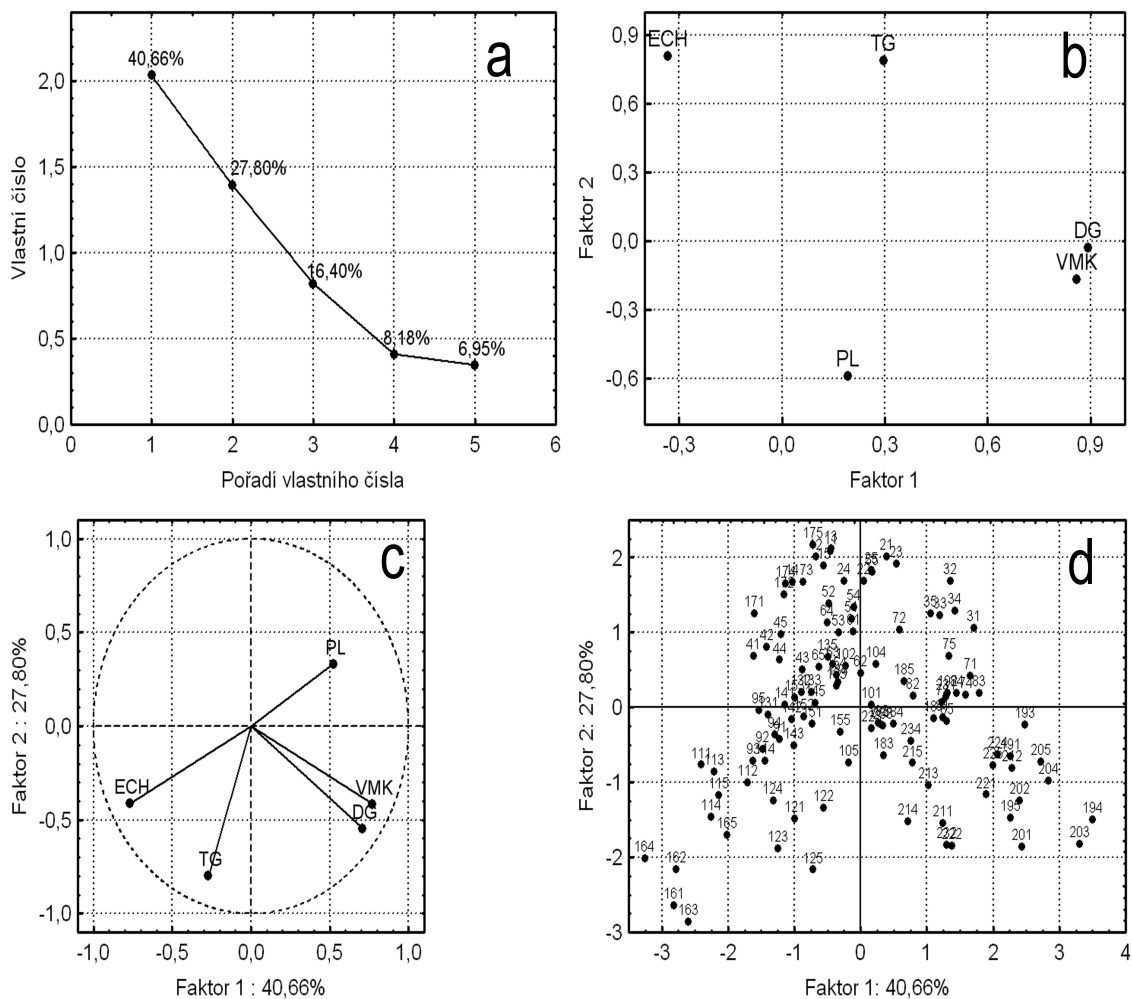
Obrázek 5.11 Grafy faktorové analýzy 1. a 2. faktoru (a) bez rotace a (b) po rotaci Varimax normalizovaný

Zajímavé porovnání závěrů o podobnosti skladby ušního mazu přináší obrázek 5.12 posuzovaný dvěma nezávislými statistickými metodami – metodou hlavních komponent PCA (na základě korelace) a analýzou shluků CLU (na základě podobnosti čili normované Mahalanobisovy vzdálenosti v %) v 5ti-rozměrném prostoru fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH. Na obrázku 5.7 (a) obsahuje graf faktorového skóre pacientů 1. a 2. faktoru a obrázek 5.7 (b) dendrogram pacientů, sestrojený technikou váženého průměru. Shluky na obrázku 5.7 (a) jsou převážně stejné jako indikované shluky v dendrogramu na obrázku 5.7 (b), které byly vytvořeny zcela odlišnou a na první předešlé metodě nezávislou matematickou metodou.



Obrázek 5.12 Grafy metody hlavních komponent PCA a analýzy shluků CLU (a) graf komponentního skóre PCA, (b) dendrogram pacientů sestrojený technikou váženého průměru

Na obrázku 5.13 je znázorněna analýza ušního mazu původní zdrojové matice 115×5 u všech 23 pacientů s pětinasobným opakováním tj. 115 pacientů v řádcích pro pět vyšetřovaných znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH ve sloupcích metodou hlavních komponent PCA a faktorové analýzy FA po rotaci Varimax.



Obrázek 5.13 Grafy metody hlavních komponent a faktorové analýzy (a) Cattellově indexovém grafu vlastních čísel, (b) graf faktorových vah po Varimax normalizované rotaci, (c) graf komponentních vah u 1. a 2. hlavní komponenty a (d) graf komponentního skóre pro 1. a 2. hlavní komponentu.

Z obrázku 5.13 (a) na Cattellově indexovém grafu vlastních čísel vyplývá, že dle Kaiserova kritéria je optimální počet hlavních komponent roven 2, komponenty pod vlastním číslem 1 patří do oblasti šumu. Obr. 5.13 (b) graf faktorových vah po Varimax normalizované rotaci ukazuje, že po rotaci jsou znaky diacylglyceroly a volné mastné kyseliny faktorově čisté s maximální hodnotou prvního 1-2 faktoru, zatímco znaky estery cholesterolu, triacylglyceroly a fosfolipidy jsou rovněž faktorově čisté ale ovlivní maximální hodnotou druhého faktoru. Jedná se o obdobu obrázku 5.11 (b). Obdobně jako na obrázku 5.8 (b) je i na obrázku 5.13 (c) grafu komponentních vah u 1. a 2. hlavní komponenty patrné, že volné mastné kyseliny a diacylglyceroly silně pozitivně korelují, diacylglyceroly s volnými mastnými kyselinami nekoreluje s fosfolipidy ale ani s estery cholesterolu, protože svírají pravý úhel. Fosfolipidy negativně korelují s estery cholesterolu, protože oba svírají úhel 180°

v grafu 1. a 2. hlavní komponenty. Tento 1-2 průmět je nejdůležitější, protože zobrazuje $40,66\% + 27,80\% = 68,46\%$ veškeré proměnlivosti v datech. Graf komponentního skóre na obrázku 5.8 (d) pro 1-2 komponentu ukazuje na shluky pacientů podobných či stejných hodnot pěti znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu - ECH. Vyznačené shluky zde vznikly v pětirozměrném prostoru na základě pouhé korelace.

Lze uzavřít, že zdrojová matice 23×5 je přehlednější a přináší naprosto stejné výsledky jako původní zdrojová matice 115×5 . Z toho důvodu byla dána přednost v analýze dat matici

23×5 .

6 DISKUZE

Složení ušního mazu bylo předmětem studií řady autorů. Rozbory byly na zpočátku omezeny vybavením laboratoří a metodami, které dovolovaly zpracovat pouze velké množství vzorku, řádově v gramech, jenž bylo k analýze získáváno smícháním vzorků odebraných až od desítek osob [23]. Postupně s rozvojem metod instrumentální analýzy jako tenkovrstevná chromatografie, plynová chromatografie prosta či ve spojení s hmotnostní spektrometrií bylo umožněno analyzovat vzorky ušního mazu od jednotlivce, řádově v miligramech.

Analýzou ušního mazu bylo zjištěno, že se skládá především z lipidové a proteinové složky. Mezi další látky, které jsou zastoupeny v menším množství patří volné aminokyseliny (glycin, glutamová kyselina, histidin, threonin a serin), cukry (galaktozamin, glukózu, galaktózu, glukozamin, mannózu a fruktózu), minerály (vápník, hořčík, fosfor a další), aromatické látky, imunoglobuliny a lyozym [22, 23, 24, 25, 26]. Množství vytvořeného ušního mazu je individuální a kolísá jak interindividuálně, tak i u jednotlivce v průběhu času [1].

Látky nalezené v lipidové frakci byly identifikovány jako dlouhé řetězce nasycených i nenasycených mastných kyselin a alkoholů, prekurzory cholesterolu, skvalen a další dlouhé řetězce uhlovodíků [27]. Ve studiích, které se zabývaly rozbořením lipidové frakce bylo zjištěno, že suchý typ ušního mazu obsahuje asi 20% lipidů, zatímco vlhký typ ušního mazu obsahuje asi 50% lipidů [25, 28]. V podrobnějších studiích, které se zabývaly rozdílem ve mezi suchým a vlhkým typem ušního mazu byly zjištěny další rozdíly v jejich složení [29].

Jedna z novějších studií se zabývala lipidovou frakcí ušního mazu v závislosti na věku, pohlaví a období menstruačního cyklu [33]. Bylo zjištěno, že ve věkové kategorii 40 let byla u mužů vyšší hladina volných mastných kyselin, kdežto u žen této věkové kategorie vyšší hodnota triacylglycerolů, cholesterolu, esterů cholesterolu a vosků. Ve věkové skupině žen 19 – 40 let byla stanovena nižší hodnota skvalenu, esterů cholesterolu a vosků a naopak vyšší hladina triacylglycerolů a cholesterolu než u mužů, ve věku 11 – 18 let byla u mužů zjištěna nižší hladina triacylglycerolů, esterů cholesterolu, vosků a vyšší množství volných mastných kyselin a cholesterolu.

Klinické studie se zabývaly i rozdílem mezi zastoupením jednotlivých komponent cerumina mezi dětmi a dospělými. [30, 31]. U dětí byla zjištěná hladina proteinů mírně snížená a hladina lipidů byla naopak mírně zvýšená oproti dospělým. U dospělých byly

nalezeny nepatrné změny v lipidové a proteinové frakci vzhledem k věku. Změny ovšem nebyly statisticky významné [30, 31].

Byl sledován i vliv času, po kterou ušní maz zůstával ve zvukovodu, na jeho složení. [31]. Obsah proteinů v ušním mazu se navyšoval s dobou, po kterou se akumuloval ve zvukovodu. Naproti tomu obsah lipidů byl v čerstvém ušním mazu vyšší než u mazu, který zůstával ve zvukovodu po delší čas – dny, týdny. Rozdíly ve složení lipidů a proteinů nebyly ovšem statisticky významné [31].

K dělení lipidových složek bylo v mnohých publikacích, stejně jak v této diplomové práci použito tenkovrstevné chromatografie [28, 45]. Velká část klinických studií se zabývá kvalitativním složením ušního mazu, ale ve srovnání s tím je známo podstatně méně informací o kvantitě jednotlivých látek. Bortz a kolektiv [28] ve své publikaci předložil detailnější kvantitativní složení lipidové frakce ušního mazu, jejíž celkové množství tvořilo $52\% \pm 3\%$ váhového procenta. Zjistil, že suchý typ ušního mazu obsahuje skvalen (6,4%), estery cholesterolu (9,6%), vosky (9,3%), triacylglyceroly (3%), mastné kyseliny (22,7%), cholesterol (20,9%), ceramidy (18,6%), cholesterol sulfáty (2%) a několik různých neidentifikovatelných polárních komponent (7,5%) [28]. Vlhký typ ušního mazu má naopak nedostatek esterů cholesterolu, vosků a navíc obsahuje několik přídatných nepolárních komponent [28].

V předkládané diplomové práci byly měřeny hodnoty jednotlivých lipidových frakcí v ušním mazu u 23 osob s pětinasobnou opakovatelností. Cílem bylo posoudit reprodukovatelnost metody stanovením jednotlivých lipidových tříd ušního mazu pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě. K testování statistické významnosti rozdílů byla použita analýza rozptylu (ANOVA), pomocí které bylo zjištěno, že faktor pacient je statisticky významný zatímco faktor reprodukovatelnosti vyšel statisticky nevýznamný (výsledky základní analýzy rozptylu jsou uvedeny v tabulce 5. 12 a v tabulce 5. 13). Z tohoto testování je patrné, že metoda stanovení jednotlivých složek lipidových tříd pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě je dobře reprodukovatelná a že nedochází ke změnám složení v naakumulovaném vzorku ušního mazu.

Jelikož faktor pacient vyšel statisticky významný bylo vhodné posoudit vnitřní vazbu a strukturu zdrojové matice pomocí vícerozměrných statistických metod. K tomuto zjištění byla provedena metoda hlavních komponent, shluková analýza a faktorová analýza.

Při laboratorním zpracování byly získány průměrné hodnoty koncentrací jednotlivých lipidových složek uvedené v tabulce 6.1

Tabulka 6.1 Průměrné hodnoty koncentrací lipidových složek (g/l) v ušním mazu po Box-Coxově transformaci a hodnoty Hornovy pivotové polosumy

	<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
<i>Průměr po Box-Coxově transformaci</i>	1,564	0,738	0,421	0,560	1,656
<i>Minimum</i>	0,706	0,145	0,107	0,163	0,479
<i>Maximum</i>	2,039	1,630	0,773	1,370	3,016
<i>Směrodatná odchylka</i>	0,041	0,045	0,022	0,036	0,076
<i>Hornova pivotová polosuma</i>	1,518	1,104	0,512	0,920	1,926

Při srovnání výsledků publikovaných Inabou a kolektivem [45], Bortzem a kolektivem [28] a s výsledky [46], které byly získány postupem podobným tomu, jaký je použit v této práci, je zřetelné obdobné rozložení lipidových složek na chromatografických deskách, avšak jsou jiné obsahy jednotlivých komponent. Pozorované rozdíly byly autory vysvětlovány použitím jiného druhu standardu a modifikací pracovního postupu vedoucího ke stanovování odlišného počtu lipidových složek.

Při srovnání našich naměřených průměrných hodnot koncentrací jednotlivých lipidových složek s výsledky uvedenými v diplomové práci Peřinové [40], která se zabývala vztahem lipidů ušního mazu a krevního séra, najdeme určitou podobnost mezi výsledky. Hodnoty u fosfolipidů (Peřinová [40] průměr $2,361 \pm 1,33$ g/l), volných mastných kyselin (Peřinová [40] průměr $0,736 \pm 0,6$ g/l) a triacylglycerolů (Peřinová [40] průměr $0,304 \pm 0,326$ g/l) jsou sice odlišné od našich, ale naproti tomu hodnoty diacylglycerolů (Peřinová [40] průměr $0,723 \pm 0,348$ g/l) a esterů cholesterolu (Peřinová [40] průměr $1,692 \pm 1,433$ g/l) jsou skoro identické s těmi našimi [40].

Průměrná hodnota celkových lipidů v ušním mazu po Box-Coxově transformaci byla 4,833 g/l. Srovnání obsahu jednotlivých lipidových frakcí ve vztahu k celkovým lipidům je uvedeno v tabulce 6.2. Tyto hodnoty jsou velmi odlišné od hodnot jaké publikoval Bortz a kolektiv [28], ale opět velice podobné s výsledky uvedené v práci Peřinové [40]. Odlišnosti oproti výsledkům publikovaným Bortzem a kolektivem [28], mohou být způsobeny použitím jiného typu standardu, neboť v našem případě je používán triglyceridový standard, pomocí kterého pak námi vypočítané koncentrace jednotlivých lipidových tříd mohou být zatíženy větší chybou. Je i možná příčina ve velké variabilitě mezi jednotlivci a případně i mezi rasami. V našem souboru byly všichni běloši, Bortz a kolektiv [28], ve své publikaci rasu nezmínil. Pro tuto skutečnost svědčí i statistická významnost faktoru pacient při relativně

velkém rozptylu naměřených hodnot (viz tabulka 6.1) a nevýznamnost faktoru reprodukovatelnosti.

Rozdíl od výsledků Peřinové [40] může být způsoben též zařazením obou pohlaví do studie a věková nesourodost souboru. Hedelová [41] ve své práci hodnotí vliv pohlaví a věku na složení ušního mazu sice neprokázala významný vliv pohlaví na složení mazu, avšak stejně jako Peřinová [40] pozorovala statisticky významné změny v závislosti na věku jedince. Naopak Kocer [33] významné změny v závislosti na pohlaví zjistil (viz výše).

Tabulka 6.2 Hladiny lipidových složek (v %) ve vztahu k celkovým lipidům

<u>Lipidová složka</u>	
<i>Fosfolipidy</i>	32,36
<i>Diacylglyceroly</i>	15,27
<i>Volné mastné kyseliny</i>	6,52
<i>Triacylglyceroly</i>	11,59
<i>Estery cholesterolu</i>	34,26

Ušní maz je variantou kožního mazu, proto lze očekávat podobnost ve složení mezi těmito produkty kůže. Prací, které se zabývaly problematikou kožního mazu je více, než studií o ušním mazu. Odběry kožního mazu byly prováděny hlavně na čele, ale i na dalších částech těla.

Kožní maz je tvořen mazovými žlázami a epidermis [47, 48]. Složení kožního mazu je ovlivněno věkem a pohlavím. Olejovitá látka, která je sekretována mazovými žlázami na povrch kůže, obsahuje hlavně skvalen, triacylglyceroly, estery a estery cholesterolu. Sterol a estery sterolu vznikají v epidermis. Triacylglyceroly vznikají z mazových žláz i z epidermis [48].

Güldür [49] ve své studii zkoumal exkreční poměr kožního mazu odebraného z čela dospělých mužů s hypolipoproteinemií typu IV. Výsledky naznačily, že se složení kožních lipidů mění v závislosti na patologii krevních lipidů [49].

Klinické studie se zabývaly i vlivem věku na aktivitu mazových žláz. Tyto studie ukázaly zřetelnou odlišnost mastných kyselin a esterů od dětství, přes dospělost po stárnutí [50]. Dle některých výsledků je složení kožního mazu starých lidí velmi podobné jak u dětí před pubertou [51].

Další studie kožního mazu se zabývaly vznikem mastných kyselin. Mastné kyseliny dle těchto studií vznikají při hydrolýze triacylglycerolů, esterů a esterů cholesterolu. Nicolaidis [51] ve své studii naznačil, že volné mastné kyseliny jsou odvozeny hlavně

z hydrolyzy triacylglycerolů, na které se podílí výrazně mikroorganismy, což potvrzuje důkaz, že při snížení hladiny triacylglycerolů se hladina volných mastných kyselin zvýší [52]. Dále byly identifikovány produkty hydrolyzy monoglyceroly a diacylglyceroly a ukázalo se, že poměr volných mastných kyselin k esterifikovaným se zvyšuje s časem.

V našem případě z analýzy shluků vyplynulo, že tři znaky triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a diacylglyceroly jsou si vzájemně podobné, avšak silně nepodobné s estery cholesterolu. Dvojice estery cholesterolu a fosfolipidy si je vzájemně také nepodobná. Naše výsledky analýzy shluků jsou ve shodě s uvedenou publikací Nicolaidese [52].

Výsledky naší laboratorní analýzy na základě metody hlavních komponent ukázaly, že volné mastné kyseliny a diacylglyceroly spolu silně pozitivně korelují, diacylglyceroly s volnými mastnými kyselinami nekorelují s fosfolipidy ale ani s estery cholesterolu. Fosfolipidy negativně korelují s estery cholesterolu.

Analýza hlavních komponent naznačila u našich výsledků silnou pozitivní korelaci mezi diacylglyceroly a volnými mastnými kyselinami, tedy při zvýšení diacylglycerolů se zvýší i hladina volných mastných kyselin. Naše výsledky analýzy hlavních komponent jsou tedy částečně v neshodě s informacemi uvedenými publikací Nicolaidese [52].

Ovšem příčinou určitých neshod může být i to, že složení ušního mazu může být ovlivněno i jinými činiteli než kožní maz. Dále na rozdíl od kožního mazu, který je z čela omýván při hygieně a otírání rukama, ušní maz se akumuluje řádově až měsíce. U kožního mazu je popsán rozklad triacylglycerolů, takže v ušním mazu bychom podle této teorie neměly po měsících akumulace najít téměř žádné triacylglyceroly, ale byly zde opakovaně prokázány..

Při porovnání našich výsledků hlavních komponent s výsledky uvedenými v diplomové práci Peřinové [40] je patrná pouze částečná shoda, v její práci vyšla pouze mírná korelace mezi diacylglyceroly a triacylglyceroly, zatímco estery cholesterolu, fosfolipidy a triacylglyceroly spolu nekorelují [40].

7 Závěry

1. cíl: Ověření metodiky stanovení pěti tříd lipidů (fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu)

Ušní maz je směs organických a anorganických látek a nachází se v různém množství téměř u všech jedinců. Složením ušního mazu se zabývali autoři řady publikací, ale jelikož není toto téma ještě beze zbytku zdaleka prozkoumáno, bylo zvoleno k této diplomové práci.

V předložené diplomové práci byla ověřena metodika stanovení pěti tříd lipidů. K této optimalizaci byl použit vzorek, který byl získán asi od 30-40 jedinců.

Zpracování vzorků ušního mazu pomocí preparativní chromatografie na tenké vrstvě bylo zaměřeno na extrakci lipidů a na stanovení jejich koncentrace. Extrakce lipidů byla nejvyšší při třiminutovém třepání s narůstající dobou extrakce se výtěžnost lipidů nezvyšovala. Doba extrakce 3 minuty vedla k lepšímu rozmělnění pevného vzorku mazu.

Při stanovení koncentrací jednotlivých složek pěti tříd lipidů byly testovány různé způsoby vaření zkumavek s odparkem. Byla ověřena doba a způsob varu. Bylo zjištěno, že nejlepší výtěžnost lipidů ušního mazu byla při vaření zkumavek s odparkem na olejové lázni při teplotě 110° C po dobu 15 minut.

Při delší době vaření zkumavek s odparkem již docházelo ke snížení koncentrací jednotlivých lipidových tříd ušního mazu. Toto snížení může být nejspíše způsobeno tím, že při reakci odparku s kyselinou sírovou dochází k hydrolýze a volná mastná kyselina pak reaguje s fosfovanilinovým činidlem na barevnou složku, ale při dlouhém vaření vznikají estery kyseliny sírové, které jsou méně reaktivní a dochází ke snížení koncentrace jednotlivých složek lipidových tříd

Analýzou ušního mazu u 23 osob při pětinasobném opakování byla získána zdrojová matice dat 115 × 5 pro všech pět vyšetřovaných znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH. Tato zdrojová matice dat byla dále zpracována metodou analýzy rozptylu (ANOVA), ze které vyplynulo, že faktor pacient je statisticky významný, a proto byl dále vyšetřován statistickými metodami. Faktor opakovatelnost vyšel naopak statisticky nevýznamný, a tedy metoda stanovení jednotlivých tříd lipidů má dobrou reprodukovatelnost a naakumulovaný ušní maz lze považovat za homogenní a výsledky nesvědčí pro změny složení ušního mazu v čase.

2. cíl: Vyšetření struktury a klasifikace dat dle hladin tříd lipidů ušního mazu

K vyšetření struktury a shluků pomocí vícerozměrných statistických metod bylo použito středních hodnot vždy u pěti opakovaných analytických měření biochemického složení ušního mazu, vyčíslených jako Hornova pivotová polosuma z pěti znaků fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu – ECH ve sloupcích a u 23 pacientů v řádcích zdrojové matice.

Prvním krokem exploratorní analýzy dat bylo pomocí grafických metod zjištěno, že mezi pěti vyšetřovanými znaky ušního mazu je dostatečná proměnlivost, což umožňuje další statistického zpracování. Z hvězdičkového, mnohoúhelníkového a profilového grafu, které usnadňují porovnání pacientů v pěti-rozměrném prostoru znaků jeho vhodným promítnutím do roviny, je vidět, že vzájemně podobné geometrické útvary zde potvrzují shodnou skladbu ušního mazu, jako je tomu například u pacientů 3 a 5, nebo u 19 a 20, resp. u 21 a 23 či 14 a 15.

Metodou hlavních komponent bylo odhaleno, že volné mastné kyseliny a diacylglyceroly silně pozitivně korelují, diacylglyceroly s volnými mastnými kyselinami nekorelují s fosfolipidy ale ani s estery cholesterolu, protože svírají pravý úhel. Fosfolipidy negativně korelují s estery cholesterolu, protože oba svírají úhel 180° v grafu 1. a 2. hlavní komponenty (1-2 průmět). Tento 1-2 průmět je nejdůležitější, protože zobrazuje $42,61\% + 28,68\% = 71,29\%$ veškeré proměnlivosti v datech. Zbývající dva průměty 1-3 a 2-3 vystihují daleko méně proměnlivosti a vedou k obdobným závěrům jako 1-2 průmět.

Pomocí analýzy shluků na základě podobnosti čili normované Mahalanobisovy vyplynulo, že tři znaky triacylglyceroly, volné mastné kyseliny a diacylglyceroly jsou si vzájemně podobné, protože mají kratší normovanou Mahalanobisovu vzdálenost, avšak silně nepodobné s estery cholesterolu a fosfolipidy. Dvojice estery cholesterolu a fosfolipidy si je vzájemně také nepodobná.

Na základě faktorových vah po rotaci Varimax normalizovaný lze usoudit, že 1. faktor je silně ovlivněn především znaky volné mastné kyseliny a diacylglyceroly (vahou 0,9 a 2. faktor vahou 0), zatímco 2. faktor znaky triacylglyceroly (vahou 0,9 a 1. faktor vahou 0,3) a fosfolipidy (vahou -0,6 a 1. faktor vahou 0,1) a znak estery cholesterolu je méně faktorově čistý, protože sice ovlivňuje 2. faktor vahou 0,9 ale také 1. faktor vahou -0,3. Z toho také plyne důsledek k analýze, které znaky nejvíce ovlivňují ušní maz dotyčných pacientů, u 1.

faktoru jsou to znaky volné mastné kyseliny, diacylglyceroly a u 2. faktoru především znaky triacylglyceroly, fosfolipidy a estery cholesterolu.

8 SEZNAM LITERATURY

1. Mejzlík, J., Pokorný, K., Chrobok, V. *Zevní zvukovod*. 1. vyd. Havlíčkův Brod: Tobiáš, 2007. s 16-26., 98-104. ISBN 978-80-731-092-8
2. Doleželová, V. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4., přeprac. vyd. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. s. 89-127.
3. Holzbecher, Z., Churáček, J. a kolektiv. *Analytická chemie*. Praha: SNTL – Státní nakladatelství chemické literatury, 1987. s. 413-480.
4. Dean, J. A., *Chemické dělicí metody*. Praha: SNTL – Státní nakladatelství chemické literatury, 1974. s.73-294.
5. Churáček, J. a kolektiv. *Plynová a kapalinová chromatografie*. Pardubice: Vysoká škola chemicko – technologická v Pardubicích, 1991. s.16-28., 83-230.
6. Gasparič, J., Churáček, J. *Papírová a tenkovrstevná chromatografie organických sloučenin*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1981. s.157-163. ISBN 04-613-81
7. Kolář, K. *Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie*. Hradec Králové: Gaudeamus, 1996. s. 5-20.
8. Churáček, J. a kolektiv. *Plynová a kapalinová chromatografie*. Pardubice: Vysoká škola chemicko – technologická v Pardubicích, 1991. s.16-28., 83-230.
9. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. s. 10-25.
10. Murray, R.K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. 4. vydání *Harperova biochemie*. Jinočany: Nakladatelství H+H, 2002. s.148-291.
11. Vodrážka, Z. *Biochemie*. Praha: Academia nakladatelství Československé akademie věd, 1992. s.63-83.
12. Schneiderka, P. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. Praha : Karolinum, 1998. s. 80-82.
13. Novák, F. *Úvod do klinické biochemie*. Praha: Karolinum, 2002. s. 181-196.
14. Šípal, Z. , *Biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství 1992. s.117-130.
15. Čihák, R., *Anatomie 3.*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 1998. s.605-623.
16. Hybášek, I. *Ušní, nosní a krční lékařství*. Praha: Galén, 1999. s. 31-35.
17. Dylevský, I. *Základy anatomie a fyziologie člověka*. Olomouc: EPAVA, 1998. s. 376-379.
18. Gannong, W .F. *Přehled lékařské fyziologie*, Jinočany : H & H, 1995. s.139-150.

19. Roeser, J. R., Ballachanda, B.B. (1997) Physiology, pathophysiology and antropology/epidemiology of human earcanal secretions. *J. Am. Acad. Audio.* 8(6): 391-400.
20. Meyer zum Gottesberge, A., Meyer zum Gottesberge, A.M. (1995) Der dimorphism des cerumens, fakten und teorie. *Lyryngo-Rhino-Otol.* 74(10): 606-610.
21. Tomita, H., Yamada, K., Ghadami, M. Ogura, T., Yanai, Y., Nakatomi, K., Yamamoto, A., Serizawa, S., Iti, M., Sato, Y. (1987) Effects of agin on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters. *J Incest Dermatol.* 89(5): 507.
22. Petrakis, N.L., Pingle, U., Petrakis, S.J., Petrakis, S.L. (1971) Evidence for a genetic cline in ear wax types in the modele East and Southeast Asia. *Am. J. Phys. Anthropol.* 35(1): 141-4
23. Matsunaga, E. (1962) The dimorphism in normal cerumen. *Ann Hum Genet.* 25:273-86.
24. Driscoll, P. V., Ramachandrula, A., Drezner, D. A., Nicka, T.A., Schaffer, S.R. (1993) Charakteristice of cerumen in diabetic patiens: key to understanding malignant external otitis? *Otolaryngol Head Beck Surg.* 109(4): 676.
25. Burkhart, C. N., Burkhart, C.G., Wiliams, S., Andrews, P.C., Adappa, V., Arbogast J. (2000) In pursuit of Ceruminolytic Agents: A study of Earwax Composition. *Am J Otol.* 21(2):157-60.
26. Burkhart, C. N., Kruge, M.A., Burkhart C.G., Blaf, C. (2001) Cerumen composition by flash pyrolysis gas chromatography/mass spektrometry. *Otol neurotik.* 22(6): 715-22
27. Okuda, I., Brian, B.m Stoney, P., Hawke, M. (1991) The organic composition of ear wax. *J Otolaryngol.* 20: 212-215.
28. Bortz, J.T., Hertz, P.W., Downing, D.T. (1990) Composition of cerumen lipids. *Am Acad Dermatol.* 23(5 Pt 1): 845-9.
29. Katura, A., Katura, K. (1967) The comparison on free and bound amino acids between dry and wet types of cerumen. *Tohoku J Exp Med.* 91(3): 215-25.
30. Chiang, S. P., Lowry, O.H., Senturia, B.H. (1955) Microchemical studies on normal cerumen. I. The lipid and protein kontent of normal cerumen as affected by age and sex. *Laryngoskope.* 65: 927-934.
31. Chiang, S. P., Lowry, O.H., Senturia, B.H. (1957) Micro-chemical studies on normal cerumen. II. The percentage of lipid and protein in casnal and fresh cerumen. *J Incest Dermatol.* 28(1): 63-8.

32. Ciprianni, C., Taborelli, G., Gaudia, G., Melagrana, A., Šebora, A. (1990) Production rate and composition of cerumen: influence of sex and season. *Laryngoskope*. 100(3): 275-6.
33. Kocer, M., Güldür, T., Akarçay, M., Miman, M. C., Beker, G. (2007) Investigation of age, sex and menstrual stage variation in human cerumen lipid composition by high performance thin layer chromatography. *Laryngol Otol*. DOI 10.1017/S0022215107000783:1-6.
34. Přecechtěl, A. *Otolaryngologie*. 1.vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1953. s. 258
35. Lejska, V. *Kompendium ORL dětského věku*. Praha: GRADA, 1995. s.13-18, 43-44.
36. Megarry, S., Pett, A., Scarlett, A., Tčeh, W., Zeigler, E., Canter, R.J. (1988) The activity against trast of human cerumen. *J Laryngál Otol*. 102(8): 671-2.
37. Stone, M., Fulghum, R.S.(1984) Bactericidal aktivty of wet cerumen. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 93(2 Pt 1): 183-6.
38. Stenfors, L. E., Räisänen, S.: Quantity of aerobic bacteria in the bony portion of extrenal auditory canal of children. *Int J Pediatr otorhinolaryngol* 2002, 66: 167-73.
39. Campos, A., Arias, A., Betancor, L., Rodríguez, C., Hernández, A.M., López Aguado, D., Sierra, A. (1998) Study of common aerobic flora of human cerumen. *J Laryngol otolog*. 112(7): 613-6.
40. Peřinová, H. Vztah ušního mazu a krevního séra. Pardubice 2008, 91 s. Diplomová práce na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Alexander Čekan. Konzultanti prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc., MUDr. Karel Pokorný, Ph.D.
41. Hedelová, M. Vliv pohlaví na složení ušního mazu. Pardubice 2008, Diplomová práce na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Alexander Čekan. Konzultanti prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc., MUDr. Karel Pokorný, Ph.D.
42. Meloun, M., Militký, J. *Kompendium statistického zpracování dat : metody a řešené úlohy analýza experimentálních dat*. 2. vyd. Praha: Academia, 2006. s. 140-166, 255-275, 479-519. ISBN 80-200-1396-2
43. Meloun, M., Militký, J., Hill, M. 1. vyd. *Počítačová analýzy vícerozměrných dat v příkladech*. Praha: Academia, 2005.s.137-170, 268-294.
44. Meloun, M., Militký, J. *Statistická analýza experimentálních dat*. 2. vyd. Praha: Academia, 2004. s. 85-92, 230-251, 277-326.

45. Inaba M, Chung TH, Kim JC, Choi YC, Kim JH. (1987). Lipid composition of ear wax in hircismus. *Yonsei Med J* 28:49–51.
46. Pokorný, K., Čegan, A., Skalický, J., Meloun, M. (2007) Lipidová složka ušního mazu: metodika kvalitativní a kvantitativní anlyzy. *Otorinolaryngol. Chir. Krku.* 1: 37-42.
47. Nicolaides, N. : Thein biochemical uniqueness. *Science* 186 19-26, 1974.
48. Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y.: Effect of aging on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters. *J Invest Dermatol.* 1987 Nov;89(5):507-12.
49. Thody, AJ., Shuster, S.: Kontrol and function of sebaceous flanda. *Physiological Reviews* 1989 , 69: 383-416
50. Güldür T, Bayraktar N, Kaynar O, Beker G, Koçer M, Ozcan H.: Excretion rate and composition of skin surface lipids on the foreheads of adult males with type IV hyperlipoproteinemia. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2007;18(1):21-35.
51. Nazzaro-Porro, M., Passi, S., Boniforti, L., Beltisito, F.: Effects of Aging on Fatty Acids in Skin Surfaře Lipids. *The Journal of Investigative Dermatology*, 73: 112-117, 1979.
52. Nicolaides, N., Wells, G.C.(1957):On the biogenesi of the free fatty acids in human skin surface fat. *J. Incest. Dermatol.*, 29: 423-433.

9 PŘÍLOHY

9.1 Seznam použitých zkratk

AST	absorbance standardu
AVZ	absorbance vzorku
CC	kofenetický korelační koeficient
CL	celkové lipidy
CLU	analýza shluků
DG	diacylglyceroly
ECH	estery cholesterolu
F – test	Fischer-Snedecorův test
F	zřed'ovací faktor
FA	faktorová analýza
i	index vlastního čísla
Ig	imunoglobulin
ORL	otorinolaryngologie
p	vypočtená hladina významnosti
PCA	metoda hlavních komponent
PL	fosfolipidy
R	Pearsonův párový korelační koeficient
R _F	retenční faktor
s	směrodatná odchylka
ST	standard
TG	triaclylyceroly
TLC	thin layer chromatography
VMK	volné mastné kyseliny mastné kyseliny
α	hladina statistické významnosti
λ ₁	vlastní číslo

9.2 Seznam obrázků

Obrázek 5.1 Grafické znázornění průměrů hodnot fosfolipidů - PL analýzou rozptylu	47
Obrázek 5.2 Grafické znázornění průměrů hodnot diacylglycerolů - DG analýzou rozptylu..	48
Obrázek 5.3 Grafické znázornění průměrů hodnot volných mastných kyselin - VMK analýzou rozptylu.....	48
Obrázek 5.4 Grafické znázornění průměrů hodnot triacylglycerolů - TG analýzou rozptylu..	48
Obrázek 5.5 Grafické znázornění průměrů hodnot esterů cholesterolu - ECH analýzou rozptylu.....	49
Obrázek 5.6: Grafy průzkumové analýzy dat).....	51
Obrázek 5.7 Korelační tabulka a diagram korelace.....	53
Obrázek 5.8 Grafy metody hlavních komponent.....	54
Obrázek 5.9 Graf komponentního skóre a dendrogram analýzy shluků	56
Obrázek 5.10 Grafy analýzy hlavních komponent a faktorové analýzy	58
Obrázek 5.11 Grafy faktorové analýzy.....	59
Obrázek 5.12 Grafy metody hlavních komponent PCA a analýzy shluků CLU.....	61
Obrázek 5.13 Grafy metody hlavních komponent a faktorové analýzy.....	62

9.3 Seznam tabulek

Tabulka 5.1 Koncentrace (g/ l) pěti tříd lipidů při různé době extrakce 1, 2, 3, 5 a 10 minut .	36
Tabulka 5.2 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané při ohřevu na vodní lázni při 100° C po dobu 15 minut	37
Tabulka 5.3 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané ohřevem po dobu 15 minut při 110° C na přístroji Termovap typ TV10	37
Tabulka 5.4 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané při ohřevu na vodní lázni při 100° C po dobu 30 minut	37
Tabulka 5.5 Hodnoty koncentrací pěti tříd lipidů (g/ l) získané ohřevem po dobu 30 minut při 110° C na přístroji Termovap typ TV10	37
Tabulka 5.6 Koncentrace (g/ l) pěti tříd lipidů získané při ohřevu na olejové láni při 110° C po dobu 15 minut.....	38
Tabulka 5.7 Koncentrace (g/ l) pěti tříd lipidů získané při ohřevu na olejové láni při 110° C po dobu 30 minut.....	38
Tabulka 5.8 Koncentrace (g/ l) pěti tříd lipidů získané při ohřevu na olejové láni při 110° C po dobu 30 minut a při extrakci 3 minuty	39
Tabulka 5.9 Hodnoty koncentrací lipidových tříd (g/ l) u všech 23 pacientů při pětinasobné opakovatelnosti.....	40
Tabulka 5.10 Zdrojová matice středních hodnot pivotové polosumy 5 biochemických znaků ušního mazu fosfolipidy - PL, diacylglyceroly - DG, volné mastné kyseliny - VMK, triacylglyceroly - TG a estery cholesterolu	43
Tabulka 5.11 Hodnoty průměrů jednotlivých lipidových tříd (g/ l) a hodnoty směrodatných odchylek vyjádřených po Box-Coxově transformaci	44
Tabulka 5.12 Základní výsledky analýzy rozptylu (program NCSS2000)	46
Tabulka 5.13 Základní výsledky analýzy rozptylu (program QC-EXPERT)	49
Tabulka 6.1 Průměrné hodnoty koncentrací lipidových složek (g/ l) v ušním mazu po Box-Coxově transformaci a hodnoty Hornovy pivotové polosumy.....	66
Tabulka 6.2 Hladiny lipidových složek (v %) ve vztahu k celkovým lipidům	67
Tabulka 9.1 Koncentrace jednotlivých lipidových tříd (g/ l) u všech 23 pacientů při pětinasobné opakovatelnosti.....	79

9.4 Souhrn dat

Tabulka 9.1 Koncentrace jednotlivých lipidových tříd (g/ l) u všech 23 pacientů při pětinasobné opakovatelnosti

		<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
Vzorek 1	1	2,014	0,162	0,087	0,302	1,044
	2	1,863	0,118	0,129	0,215	1,325
	3	1,82	0,172	0,122	0,194	1,012
	4	1,918	0,183	0,108	0,258	1,917
	5	2,217	0,237	0,136	0,215	1,799
Vzorek 2	1	1,767	0,237	0,323	0,14	0,56
	2	1,271	0,198	0,345	0,172	0,442
	3	2,1	0,194	0,398	0,183	0,905
	4	1,185	0,292	0,232	0,162	0,539
	5	1,841	0,258	0,291	0,205	0,862
Vzorek 3	1	2,245	0,898	0,489	0,265	0,748
	2	2,105	0,758	0,325	0,187	0,366
	3	1,895	0,652	0,465	0,245	0,603
	4	2,336	0,843	0,364	0,312	0,725
	5	1,963	0,654	0,429	0,239	0,785
Vzorek 4	1	0,754	0,42	0,125	0,277	1,769
	2	1,054	0,365	0,145	0,325	1,785
	3	1,246	0,512	0,232	0,414	1,698
	4	0,846	0,425	0,185	0,356	1,457
	5	0,813	0,369	0,149	0,278	1,234
Vzorek 5	1	2,038	0,415	0,315	0,286	1,817
	2	1,818	0,364	0,217	0,247	1,657
	3	1,657	0,421	0,279	0,365	1,456
	4	2,234	0,297	0,316	0,347	1,764
	5	2,451	0,317	0,247	0,282	1,478
Vzorek 6	1	1,845	0,714	0,247	0,194	1,852
	2	1,639	0,874	0,271	0,356	1,654
	3	1,479	0,637	0,317	0,273	1,917
	4	1,374	0,528	0,169	0,287	1,215
	5	1,152	0,615	0,264	0,312	1,574
Vzorek 7	1	1,985	0,85	0,638	0,4	0,838
	2	1,738	0,425	0,425	0,438	0,652
	3	1,738	1,075	0,463	0,525	0,813
	4	2,245	0,935	0,525	0,675	0,788
	5	2,175	0,816	0,425	0,563	0,625
Vzorek 8	1	1,088	0,513	0,875	0,438	0,588
	2	1,363	0,75	0,513	0,529	0,647
	3	1,538	0,638	0,863	0,375	0,538
	4	1,325	0,6	0,785	0,413	0,415
	5	1,175	0,625	0,823	0,475	0,576

		<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
Vzorek 9	1	1,458	0,745	0,165	0,754	2,348
	2	1,256	0,658	0,225	0,697	2,583
	3	1,587	0,574	0,196	0,914	2,797
	4	1,352	0,694	0,157	0,754	2,215
	5	1,268	0,484	0,176	0,637	2,282
Vzorek 10	1	1,757	0,912	0,453	0,302	2,298
	2	1,372	0,631	0,367	0,274	1,654
	3	1,384	0,612	0,412	0,316	1,962
	4	1,792	0,697	0,397	0,335	1,674
	5	1,387	0,721	0,671	0,423	2,684
Vzorek 11	1	0,874	0,528	0,247	0,529	3,472
	2	0,687	0,647	0,345	0,634	2,657
	3	0,863	0,567	0,276	0,567	3,314
	4	0,721	0,747	0,331	0,614	3,647
	5	0,697	0,537	0,297	0,776	2,857
Vzorek 12	1	2,348	0,527	0,328	1,514	2,718
	2	1,657	0,634	0,468	1,167	2,147
	3	1,818	0,738	0,289	1,471	2,679
	4	1,729	0,569	0,314	1,164	2,731
	5	1,919	0,721	0,354	1,771	1,978
Vzorek 13	1	1,347	0,475	0,156	0,784	1,974
	2	1,578	0,573	0,178	0,658	1,856
	3	1,657	0,487	0,236	0,712	1,749
	4	1,854	0,713	0,163	0,697	1,516
	5	1,485	0,526	0,187	0,557	1,185
Vzorek 14	1	1,487	0,512	0,256	0,574	2,347
	2	1,297	0,471	0,327	0,637	2,079
	3	1,782	0,529	0,387	0,728	2,857
	4	1,328	0,479	0,356	0,763	2,727
	5	1,678	0,679	0,297	0,568	2,087
Vzorek 15	1	1,567	0,645	0,431	0,425	2,767
	2	1,478	0,497	0,378	0,574	2,314
	3	1,217	0,437	0,425	0,316	2,456
	4	1,774	0,527	0,396	0,374	2,218
	5	1,047	0,718	0,513	0,395	1,927

		<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
Vzorek 16	1	0,818	0,459	0,217	1,678	2,647
	2	0,769	0,513	0,267	1,234	3,397
	3	0,793	0,628	0,218	1,726	2,787
	4	0,645	0,417	0,179	1,214	3,498
	5	0,929	0,423	0,232	1,437	2,434
Vzorek 17	1	1,178	0,168	0,134	0,205	1,947
	2	1,459	0,145	0,156	0,234	1,647
	3	1,616	0,197	0,144	0,215	1,485
	4	1,578	0,159	0,126	0,197	1,717
	5	1,874	0,117	0,112	0,134	1,397
Vzorek 18	1	1,292	0,842	0,743	0,295	1,229
	2	0,887	1,071	0,475	0,231	1,458
	3	0,879	1,221	0,52	0,287	1,679
	4	1,098	0,963	0,623	0,175	1,765
	5	1,356	0,912	0,515	0,162	1,389
Vzorek 19	1	1,378	1,314	0,862	0,344	0,771
	2	1,386	0,977	0,523	0,449	0,38
	3	1,631	1,518	0,713	0,246	0,642
	4	1,728	2,352	0,759	0,472	0,594
	5	1,112	1,892	0,635	0,652	0,352
Vzorek 20	1	1,638	2,062	0,721	0,651	1,314
	2	1,585	1,978	0,612	0,542	0,872
	3	2,132	2,119	0,846	0,712	1,115
	4	1,736	1,759	0,797	0,445	0,775
	5	2,418	1,215	0,894	0,695	1,05
Vzorek 21	1	1,462	0,841	0,912	0,932	1,317
	2	2,157	1,031	0,981	0,591	1,451
	3	1,985	0,918	0,695	0,891	1,682
	4	1,745	0,832	0,818	0,912	2,113
	5	1,618	0,682	0,693	0,841	1,241
Vzorek 22	1	1,482	1,674	0,612	0,618	0,931
	2	1,612	1,512	0,518	1,218	0,793
	3	1,378	0,752	0,387	0,789	0,956
	4	1,983	1,681	0,417	0,751	0,541
	5	1,719	1,749	0,524	0,512	0,981

		<i>Fosfolipidy</i>	<i>Diacylglyceroly</i>	<i>Volné mastné kyseliny</i>	<i>Triacylglyceroly</i>	<i>Estery cholesterolu</i>
Vzorek						
23	1	2,198	0,583	0,741	0,537	1,461
	2	1,636	1,057	1,023	0,691	2,361
	3	1,487	0,716	0,614	0,447	1,821
	4	2,131	0,863	0,581	0,693	1,932
	5	1,716	0,831	0,512	0,492	1,971