

# STUDIUM VLIVU PLAZMATICKÝCH MASTNÝCH KYSELIN NA PROGRESI DIABETU TYPU 2

**FIALOVÁ PAVLA, JANEČEK RADIM A ČEGAN ALEXANDER\***

*Katedra biologických a biochemický věd*

*\* Garant*

## ÚVOD

Diabetes mellitus je metabolické onemocnění projevující se hyperglykemií spojenou s abnormálním metabolismem sacharidů, bílkovin a lipidů. Nečastější formou onemocnění je diabetes mellitus 2. typu (dříve známý jako non-inzulín dependentní), který je charakterizován inzulínovou rezistencí, klesající produkcí inzulínu vedoucí až k eventuálnímu selhání  $\beta$ -buněk pankreatu. Diabetes mellitus 2. typu je výsledkem interakce genetických faktorů s faktory životního prostředí. Lidé žijící s tímto onemocněním jsou více náchylnější k různým komplikacím. Počet osob s diabetes mellitus 2. typu celosvětově rapidně stoupá.<sup>1</sup>

Většina jedinců trpících diabetes mellitus 2. typu je obezních s centrální viscerální tukovou tkání. Přebytek tělesného tuku je primárním rizikovým faktorem pro vznik diabetu 2. typu. Dlouhodobé účinky určitých typů mastných kyselin na inzulínovou rezistenci a riziko vzniku diabetes mellitus 2. typu nejsou však stále úplně jasné. V nedávných studiích však byly zaznamenány potenciálně ochranné účinky mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin. Naproti tomu příjem nasycených a trans-nenasycených mastných kyselin je spojován se zvýšením rizika onemocnění.<sup>2,3</sup>

Cílem práce tedy bylo zjistit, jak se změní složení mastných kyselin v jednotlivých frakcích při onemocnění diabetes mellitus 2. typu a jaký vliv má tato změna na progresi onemocnění. A jestli lze tyto změny využít jako potencionální biomarkery pro odlišení osob s diabetes mellitus 2. typu od zdravých jedinců.

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K analýze bylo použito 21 vzorků plazmy pacientů s onemocněním diabetes mellitus typu 2 a 17 vzorků plazmy od zdravých jedinců. Jednotlivé vzorky séra (500  $\mu$ l) byly deproteinovány přidáním 2,5 ml roztoku o složení: 2-propanol, n-heptan a 2M  $H_3PO_4$  (v poměru 40:20:1). Vzniklá směs byla promíchána a 10 minut kondicionována při pokojové teplotě. Následně byl přidán 1 ml roztoku směsi toluen-methanol (4:1) a 1,5 ml destilované

vody. Po následné centrifugaci (10 minut při 3000 otáčkách) byla přepipetována horní organická vrstva do zkumavky a odpařena pod dusíkem do sucha.

Odparky 5 vzorků a standardu pro tenkovrstvou chromatografií byly rozpuštěny v 75  $\mu\text{l}$  směsi chloroform:metanol (v poměru 2:1), promíchány a kvantitativně pomocí Pasteurových pipet převedeny na startovací linii TLC desky. Následně bylo do zkumavek přidáno dalších 25  $\mu\text{l}$  směsi chloroform:metanol. Vzniklá směs byla promíchána a rovněž kvantitativně převedena na TLC desku. Po odpaření rozpouštědla byla deska se vzorky vložena do chromatografické vany obsahující 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml 99% kyseliny octové. TLC deska zde byla ponechána ke vzlínání po dobu přibližně jedné hodiny. Jakmile mobilní fáze dosáhla vyznačeného čela, deska byla z vany vyňata a vysušena v digestoři.

Pouze na sloupek se standardem bylo aplikováno detekční činidlo 2',7'-dichlorfluorescein. Po zaschnutí činidla byly UV lampou detekovány a tužkou označeny jednotlivé frakce (fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu). Pomocí špachtle byla z TLC desky vyškrábána frakce triacylglycerolů, volných mastných kyselin a esterů cholesterolu. Tyto frakce byly převedeny do čistých pyrexových zkumavek.

Do zkumavek s jednotlivými frakcemi byl přidán 1 ml interního standardu o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$ . Následně byla vložena mikromíchadla a bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  acetylchloridu, který slouží jako katalyzátor esterifikace. Poté byly zkumavky uzavřeny víčkem a umístěny do termobloku vyhřátého na 100°C se zapnutým magnetických mícháním. Při této teplotě probíhala esterifikační reakce po dobu 1 hodiny.

Po ochlazení na pokojovou teplotu byla provedena neutralizace přidáním 5 ml 6% roztoku  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Po přidavku byla směs intenzivně 2 minuty třepána a následně centrifugována po dobu 10 minut při 3000 otáčkách. Horní organická fáze byla odpipetována do zkumavky, následně odpařena pod dusíkem dosucha. Poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  směsi toluen-methanol (4:1) a vzniklý roztok byl převeden do chromatografických vialek a uzavřen víčkem.

Vlastní analýza připravených vzorků byla provedena plynovým chromatografem Agilent Technologies 7890A s kolonou HP 88 pro dělení methylesterů. Teplotní program byl optimalizován s celkovým časem analýzy 92 minut pro frakce volných mastných kyselin a triacylglycerolů a 120 minut pro analýzu esterů cholesterolu. Celé měření probíhalo v módu split v poměru 10:1. Z chromatografického záznamu byly zjišťovány plochy píků pro dané mastné kyseliny.

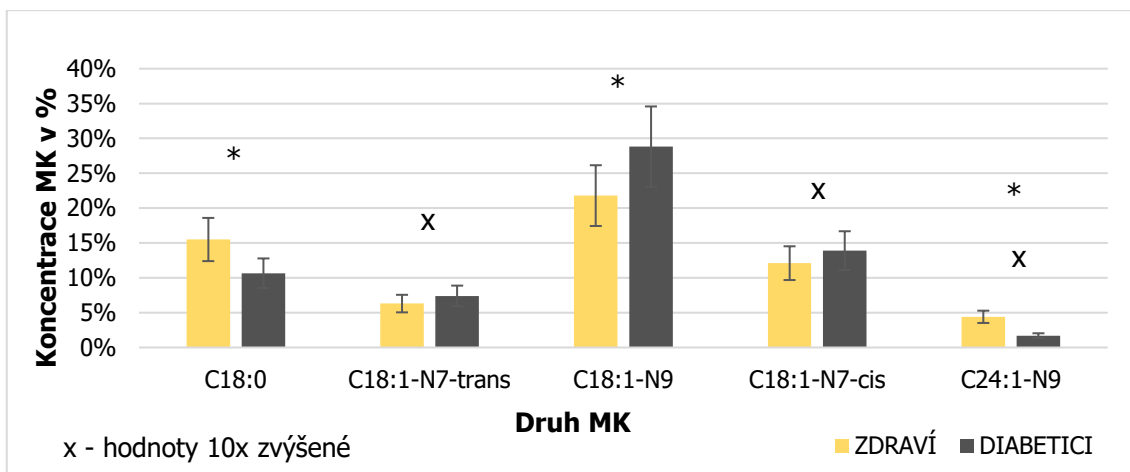
## VÝSLEDKY A DISKUZE

Měřené vzorky byly podle hodnot glykovaného hemoglobinu rozděleny do dvou skupin na zdravé dárce a diabetiky (viz Tabulka 1).

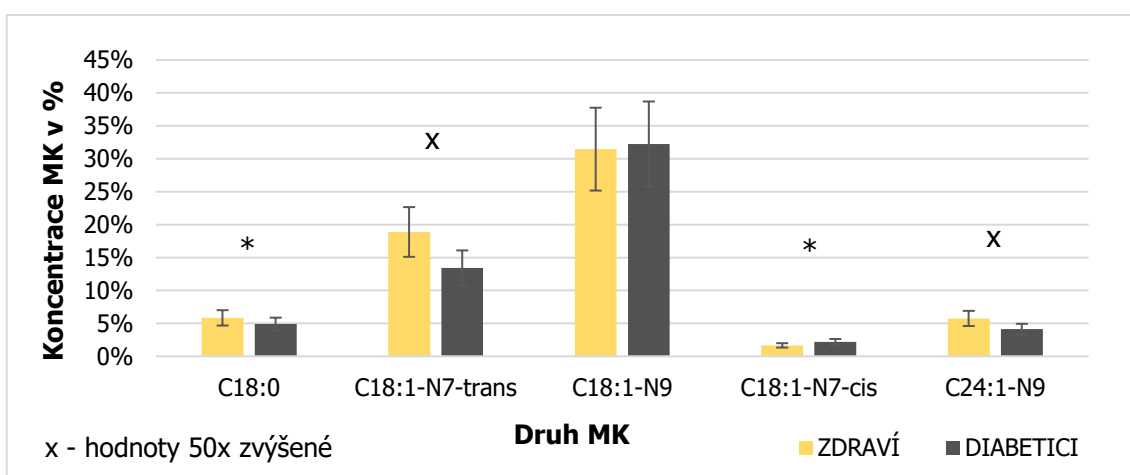
**Tabulka 1** Rozdělení vzorků podle koncentrace glykovaného hemoglobinu

Skupina	Glykovaný hemoglobin (%)
Zdraví dárce	4,5 – 5,8
Diabetici	6,1 a více

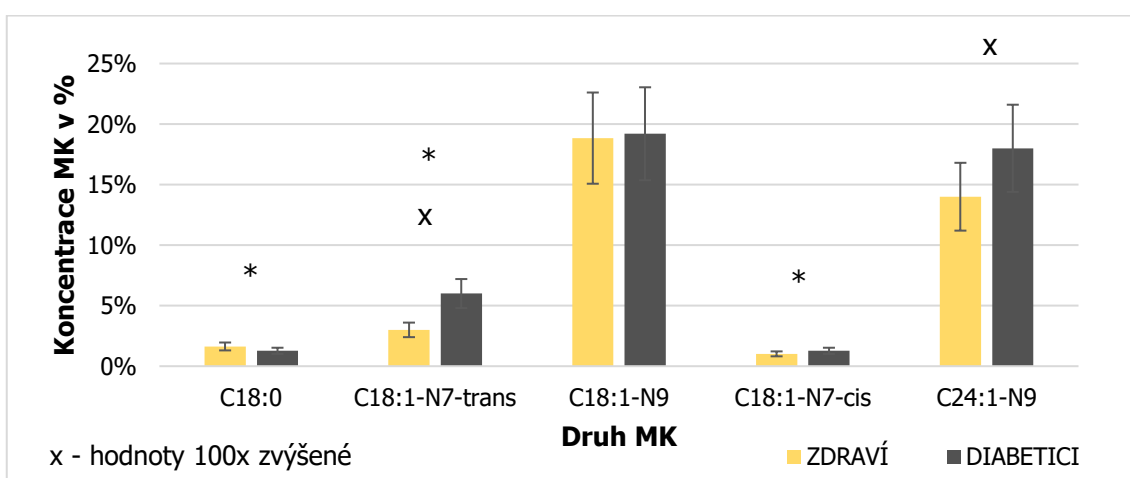
Pomocí t-testu v programu Statistica 12 bylo zkoumáno procentuální zastoupení vybraných čtrnácti mastných kyselin ve frakci triacylglycerolů, volných mastných kyselin a esterů cholesterolu. Pro každou mastnou kyselinu byly sledovány rozdíly jejího obsahu mezi zdravými dárce a diabetiky. Statická významnost je vyjádřena hodnotou  $p$ , která byla počítána na hladině významnosti  $\alpha \leq 0,050$ . Porovnání obsahu statisticky významných mastných kyselin je pro jednotlivé frakce graficky vyjádřeno na obrázku 1, 2 a 3. Po provedení statistické analýzy získaných dat jsme zjistili statisticky významný pokles kyseliny stearové (C18:0) u diabetiků ve všech sledovaných frakcích (viz Tabulka 2). Snížená koncentrace je způsobena zvýšenou aktivitou enzymu  $\Delta^9$ -stearoylkoenzymA-desaturasy (viz obrázek 5), což je v souladu s dřívějšími nálezy.<sup>4</sup> Byla potvrzena zvýšená hladina kyseliny olejové (C18:1-N9) a kyseliny vakcenové (C18:1-N7-cis). Z obrázku 4 je patrné, že vyšší hodnota kyseliny olejové je spojena se stoupající hodnotou glykovaného hemoglobinu. Tato závislost ukazuje, že diabetici mají vyšší aktivitu enzymu  $\Delta^9$ -stearoylkoenzymA-desaturasy. Tento enzym chrání organismus před vysokými hladinami nasycených mastných kyselin, které způsobující inzulínovou rezistenci, a tím zhoršují průběh diabetes mellitus. Dále můžeme zmínit kyselinu trans-vakcenovou (C18:1-N7-trans), jejíž zvýšení u diabetiků je statistické významné ve frakci esterů cholesterolu. Zvýšení trans-mastných kyselin pozitivně koreluje s progresem diabetes mellitus. Zajímavé znaky byly nalezeny u kyseliny nervonové. Tyto znaky nebyly doposud v literatuře popsány. Tato kyselina by mohla být dalším nezávislým markerem průběhu onemocnění diabetes mellitus.<sup>5,6</sup>



**Obrázek 1:** Grafické porovnání koncentrace statisticky významných mastných kyselin ve frakci volných mastných kyselin



**Obrázek 2:** Grafické porovnání koncentrace statisticky významných mastných kyselin ve frakci triacylglycerolů

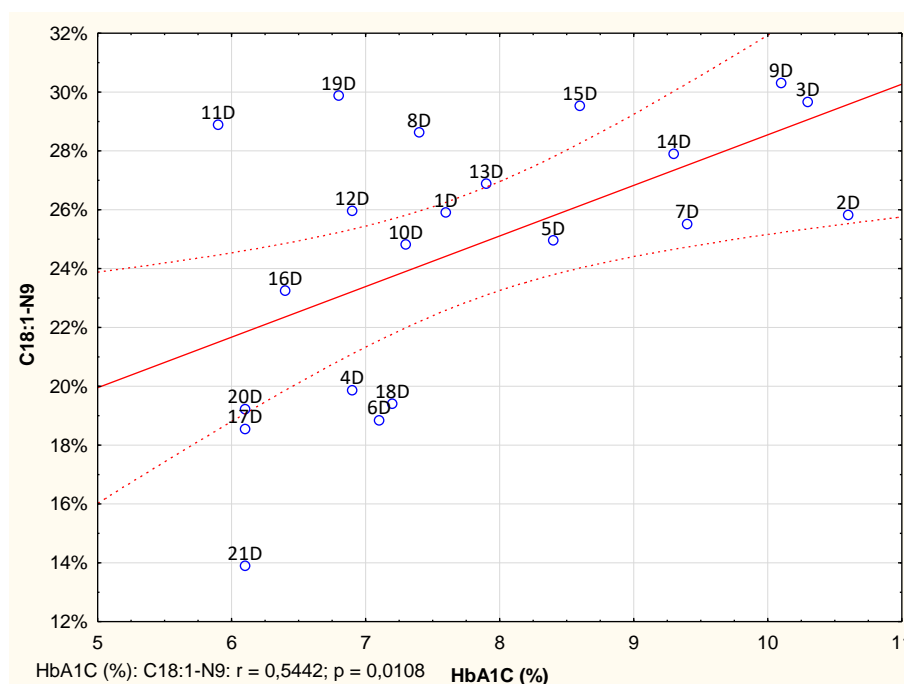


**Obrázek 3:** Grafické porovnání koncentrace statisticky významných mastných kyselin ve frakci esterů cholesterolu

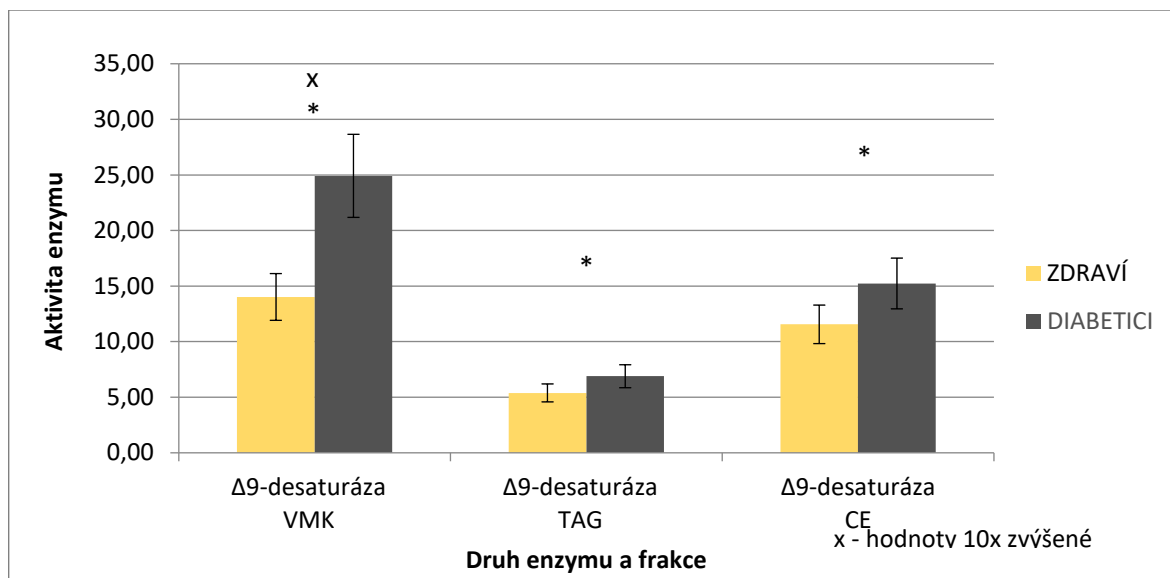
**Tabulka 2:** Přehled zastoupení statisticky významných mastných kyselin s výsledky t-testu

Kyselina	Frakce	Zdraví		Diabetici		P	Závěr
		M (%)	STD	M (%)	STD		
<b>C18:0</b>	TAG	5,84	0,012	4,89	0,009	<b>0,012</b>	<b>Významný</b>
	FFA	15,49	0,036	10,65	0,016	<b>0,000</b>	<b>Významný</b>
	CE	1,63	0,004	1,27	0,003	<b>0,005</b>	<b>Významný</b>
<b>C18:1-N7-trans</b>	TAG	0,38	0,002	0,27	0,001	0,138	-
	FFA	0,63	0,002	0,74	0,002	0,075	-
	CE	0,03	0,000	0,06	0,000	<b>0,002</b>	<b>Významný</b>
<b>C18:1-N9</b>	TAG	31,46	0,027	32,25	0,027	0,122	-
	FFA	21,79	0,049	25,82	0,045	<b>0,041</b>	<b>Významný</b>
	CE	18,84	0,030	19,20	0,017	0,405	-
<b>C18:1-N7-cis</b>	TAG	1,66	0,006	2,19	0,005	<b>0,018</b>	<b>Významný</b>
	FFA	1,21	0,006	1,39	0,006	0,776	-
	CE	1,02	0,003	1,27	0,003	<b>0,008</b>	<b>Významný</b>
<b>C24:1-N9</b>	TAG	0,12	0,001	0,08	0,001	0,201	-
	FFA	0,44	0,002	0,17	0,003	<b>0,044</b>	<b>Významný</b>
	CE	0,14	0,000	0,18	0,001	0,958	-

TAG – triacylglyceroly, FFA – volné mastné kyseliny, CE – estery cholesterolu, M – medián, STD – směrodatná odchylka, p – koeficient významnosti



**Obrázek 4:** Bodový graf kyseliny olejové v závislosti na glykovaném hemoglobinu ve frakci volných mastných kyselin u diabetiků



**Obrázek 5:** Grafické porovnání aktivity enzymu  $\Delta^9$ -desaturázy ve vybraných frakcích

## ZÁVĚR

Analýze bylo podrobena celkem 38 vzorků, které byly podle hodnot glykovaného hemoglobinu rozděleny do dvou skupin na zdravé dárce (17) a diabetiky (21). Pomocí tenkovrstvé chromatografie byla plazma rozdělena do pěti lipidových frakcí. Frakce triacylglycerolů, volných mastných kyselin a esterů cholesterolu byly derivatizovány a ve formě methylesterů analyzovány plynovou chromatografií. Získaná data o množství mastných kyselin v jednotlivých frakcích byla následně zpracována v programech Microsoft Office Excel 2013 a Statistica 12.

Nalezli jsme u diabetiků zvýšenou aktivitu enzymu  $\Delta^9$ -stearoylkoenzymA-desaturasy, která transformuje nasycené mastné kyseliny na nenasycené. Tento mechanismus chrání organismus před vysokými hladinami nasycených mastných kyselin, které způsobují inzulinovou rezistenci a zhoršují průběhu diabetes mellitus. Nalezené významné změny v koncentracích kyseliny nervonové by mohly být využity jako marker průběhu onemocnění diabetes mellitus.

## LITERATURA

1. Obateru A. O., Olokoba B. A., Olokoba B. L.: Oman Medical Journal, 27, 4 (2012).
2. Van Dam M. R., Hu B. F., Liu S.: Diabetologia, 44, 7 (2001).
3. Hu B. F., Manson E. J., Salmerón J. et al.: Am. J. Clin. Nut., 73, 6 (2001).
4. Pinnamaneni S. K., Southgate R. J. et al.: Diabetologia, 49, 12 (2007).
5. Guo S.: Journal of Endocrinology, 220, 2 (2014).
6. Glass C. K., Olefsky J. M.: Cell Metabolism, 15, 5 (2012).