Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

STANOVENÍ AKTIVIT DESATURÁZ A ELONGÁZ V EDTA PLAZMĚ DIABETIKŮ

Mgr. Petr Laštovička

Školitel: prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

Disertační práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Department of Analytical Chemistry

DETERMINATION OF DESATURASE AND ELONGASE ACTIVITY IN PLASMA OF DIABETICS

Mgr. Petr Laštovička

Supervisor: prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

Thesis

2018

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 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 Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2.5.2018 Petr Laštovička

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé disertační práce panu prof. Ing. Alexandru Čeganovi, CSc. za vedení, vstřícnost, korekturu a poskytnuté materiály.

Dále bych chtěl poděkovat rodině a vůbec všem okolo mne za podporu a důvěru v průběhu studia.

SOUHRN

Předložená disertační práce se zabývá vztahy mezi enzymy lipidového metabolismu, mastnými kyselinami a progresí onemocnění diabetes mellitus 2. typu. Progrese diabetu byla určována úrovní hladiny glykovaného hemoglobinu, jakožto markeru dlouhodobé kompenzace glukózy v krvi.

Pro zjištění koncentrací mastných kyselin v plazmě byla použita kombinace ultracentrifugace a dvou chromatografických metod. První byla tenkovrstevná chromatografie, pomocí které byly lipidy rozděleny do jednotlivých tříd. Následně byl podíl jednotlivých mastných kyselin v těchto třídách po derivatizaci zjišťován na plynovém chromatografu Agilent Technologies 7890A GC System s plamenově ionizačním detektorem. Aktivita lipidických enzymů byla stanovena výpočtem jako indexy.

Po statistickém vyhodnocení výsledků bylo přistoupeno k vyhodnocení výsledků ve vztahu ke kompenzaci diabetu. Se změněným lipidovým metabolismem u tohoto onemocnění byly pozorovány i diference v profilu mastných kyselin v jednotlivých frakcích. Podrobnějšímu popisu těchto změn se věnuje následující práce.

Význam této práce podtrhuje fakt, že jen v České republice máme okolo jednoho milionu diabetiků, z nichž 90 % trpí právě diabetem 2. typu. Přínos ve zkoumání vlivu jednotlivých mastných kyselin a enzymů lipidového metabolismu dle mého názoru leží hlavně v efektivnějších dietetických doporučeních a udržení kompenzace diabetu u léčených pacientů.

Klíčová slova: diabetes mellitus, lipidy, desaturázy, elongáza, plynová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie

SUMMARY

This thesis deals with the relationship between enzymes of lipid metabolism, fatty acids and progression of type 2 diabetes mellitus. Progression of diabetes was determined by the level of glycosidic hemoglobin as a marker of long-term blood glucose level compensation.

The combination of ultracentrifugation and two chromatographic methods was used to determine plasma concentrations of fatty acids. The first thin layer chromatography, whose task was to divide the total lipids in each class, which were derivatized to processing gas chromatography using gas chromatograph from Agilent Technologies 7890 GC System with a flame ionisation detector. Lipid enzyme activity was determined by calculation as indices.

After a statistical evaluation of the results, the results were evaluated in relation to diabetes compensation. With altered lipid metabolism in this disease, the differences in the fatty acid profile in the individual fractions were also observed. A more detailed description of these changes is given below.

The importance of this work is underlined by the fact that only in the Czech Republic we have about one million diabetics, 90% of whom suffer from type 2 diabetes. The benefit in examining the effects of individual fatty acids and enzymes of lipid metabolism, in my opinion, lies mainly in more effective dietary recommendations and maintenance of diabetes compensation in treated patients.

Keywords: diabetesmellitus, lipids, desaturase, elongase, gaschromatography, thin layerchromatography

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5D	5 desaturáza
6D	6 desaturáza
9D	9 desaturáza
α	Hladina významnosti
ACC	Acetyl-CoA karboxyláza
ACP	Acyl carrier protein
AMK	Aminokyselina
ANOVA	Analýza rozptylu
ATP	Adenosintrifosfát
BCFA	Branched chain fatty acids
BMI	Body mass index
CoA	Koenzym A
CE	Cholesterolestery
CN	Carbon number
CV	Variační koeficient
D5D	Delta 5 desaturáza
D6D	Delta 6 desaturáza
DG	Diacylglyceroly
DHA	Docosahexaenoic acid
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus typu 2
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELOVL	Elongation of very-long-chain fatty acids
EPA	Eicosapentaenoic acid
FAD	Flavin adenin dinukleotid

FADS	Fatty acid desaturases
FATP	Fatty acid translocase
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas chromatography
GCI	Glykemický index
GHb	Glykovaný hemoglobin
Hb	Hemoglobin
HDL	High-density lipoproteins
IDL	Intermediate-density lipoproteins
IGTT	Intravenózní glukózový toleranční test
IR	Inzulínová rezistence
LCAT	Lecitin-cholesterolacyltransferáza
LDL	Low-density lipoproteins
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LPL	Lipoproteinová lipáza
MF	Mobilní fáze
MK	Mastné kyseliny
Mr	Molekulová hmotnost
MS	Mass Spectrometry
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
MUFA	Monounsaturated fatty acids
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NIDDM	Non-inzulíndependentní diabetes mellitus
OGTT	Orální glukózový toleranční test

PL	Fosfolipidy
PPAR	Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
R	Mez reprodukovatelnosti
r	Mez opakovatelnosti
R_F	Retenční faktor
SCD	Stearoyl-CoA desaturáza
SD	Směrodatná odchylka
SF	Stacionární fáze
SFA	Saturated fatty acids
TG	Triacylglyceroly
TLC	Thin layer chromatography
VLDL	Very low-density lipoproteins
VMK	Volné mastné kyseliny

OBSAH

1 ÚVOD 13

2 TEORETICKÁ ČÁST 14

2.1 Játra 14

2.1.1 Funkce jater 15

2.2 Lipidy 17

2.2.1 Rozdělení lipidů 17

2.2.2 Lipoproteiny 18

2.2.2.1 Metabolismus lipoproteinů 19

2.2.3 Mastné kyseliny 21

2.2.3.1 Názvosloví mastných kyselin 21

2.2.3.2 Nasycené mastné kyseliny 22

2.2.3.3 Nenasycené mastné kyseliny 23

2.2.3.4 Rozvětvené mastné kyseliny 23

2.2.3.5 Syntéza mastných kyselin 25

2.2.3.6 Metabolismus mastných kyselin 26

2.3 Inzulín 27

2.3.1 Metabolické účinky inzulínu 27

2.3.2 Biosyntéza inzulínu 27

2.3.3 Sekrece inzulínu 27

2.4 Desaturázy a elongázy 29

2.4.1 Stearoyl-CoA desaturáza 1 30

2.4.2 Stearoyl-CoA desaturáza 5 33

2.4.3 Ostatní desaturázy 33

2.4.4 Elongázy 35

2.4.5 Vyjadřování aktivity lipidických enzymů indexy 35

2.5 Diabetes mellitus typu 2 36

2.5.1 Inzulínová rezistence 37

2.5.2 Diabetes mellitus a poruchy v metabolismu lipidů 37
2.5.3 Vyšetření při diabetu 38
2.5.3.1 Orální glukózový toleranční test 38
2.5.3.2 Euglykemický hyperinzulinemický clamp 38
2.5.4 Krátkodobá kompenzace diabetu 39
2.5.5 Dlouhodobá kompenzace diabetu 39
2.6 Stanovení mastných kyselin 40
2.6.1 Chromatografie na tenké vrstvě 40
2.6.2 Plynová chromatografie 41
2.6.2.1 Detektory v plynové chromatografii 42
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 43
3.1 Popis vzorků a jejich rozdělení do skupin 43
3.1.1 Kritéria pro přijetí vzorků 43
3.2 Přístrojové vybavení a pomůcky 44
3.3 Chemikálie a další používaný materiál 45
3.4 Postup práce 47
3.4.1 Ultracentrifugace 47
3.4.2 Denaturace bílkovin a extrakce lipidů 47
3.4.3 Metoda tenkovrstevné chromatografie 48
3.4.4 Metoda plynové chromatografie 49
3.4.4.1 Izolace jednotlivých složek lipidů 49
3.4.4.2 Derivatizace: převedení na methylestery 49
3.4.4.3 Vlastní plynová chromatografie 50
3.4.4.5 Výpočet aktivitních indexů enzymů 53
3.4.4.6 Vyhodnocení výsledků 53
3.5 Analytické parametry metody 54
4 VÝSLEDKY A DISKUSE 61
4.1 Vztahy mezi glykovaným hemoglobinem a profilem mastných kyselin 61
4.2 Stanovení rozvětvených mastných kyselin 82

4.3 Stanovení mastných kyselin v HDL lipoproteinech 87
5 ZÁVĚR 94
6 PUBLIKAČNÍ ČINNOST 96
7 LITERÁRNÍ ZDROJE 98
8 PŘÍLOHY 109
8.1 Data pro stanovení analytických parametrů metody 109
8.2 Seznam vyobrazení 119
8.3 Seznam tabulek 120

1 ÚVOD

Diabetes mellitus je jedním z problémů vyspělého světa, který se s rozvojem civilizace a zdejšího způsobu života stupňuje. Ať chceme nebo ne, diabetes zasahuje do mnoha sfér našeho bytí, ať už do oblasti medicínské, ekonomické nebo sociální. Díky dnešnímu hektickému způsobu života, zahrnujícímu přemíru energeticky bohatého a těžko stravitelného jídla, stres, nedostatek kvalitního spánku a redukci mnohdy jakékoli pohybové aktivity, stoupá v populaci rapidně počet obézních jedinců. Tito pak mají vyšší riziko vzniku diabetu či kardiovaskulárních onemocnění.

Přestože první zmínky o této chorobě se objevují již ve Starověkém Egyptě před více než tři a půl tisíci lety, řadíme diabetes mezi civilizační choroby. Termín diabetes přitom poprvé použil Aretaus Kapadocijský v období kolem počátku našeho letopočtu.

Hlavním problémem je neuspokojivě kompenzovaný diabetes. Jako takový je v České republice nejčastější příčinou selhání ledvin, slepoty a vedle aterosklerózy také nejčastější příčinou amputací dolních končetin. Diabetes je také silným rizikovým faktorem pro vznik aterosklerózy, pokud tato nebyla již dříve. Včasné určení diagnózy a disciplinovanost pacientů může přispět k eliminaci, nebo alespoň významnému zmírnění těchto veskrze nepříznivých následků.

U diabetiků nedochází jen ke zvyšování hladin glukózy, potažmo glykovaného hemoglobinu, ale k celé řadě změn koncentrací různých látek od lipidů, přes aminokyseliny až po enzymy. Právě koncentrace mastných kyselin a s nimi spojená aktivita enzymů, konkrétně desaturáz a elongáz, jsou předmětem zájmu této práce. Jejich koncentrace hraje klíčovou roli při biosyntéze nenasycených vyšších mastných kyselin.

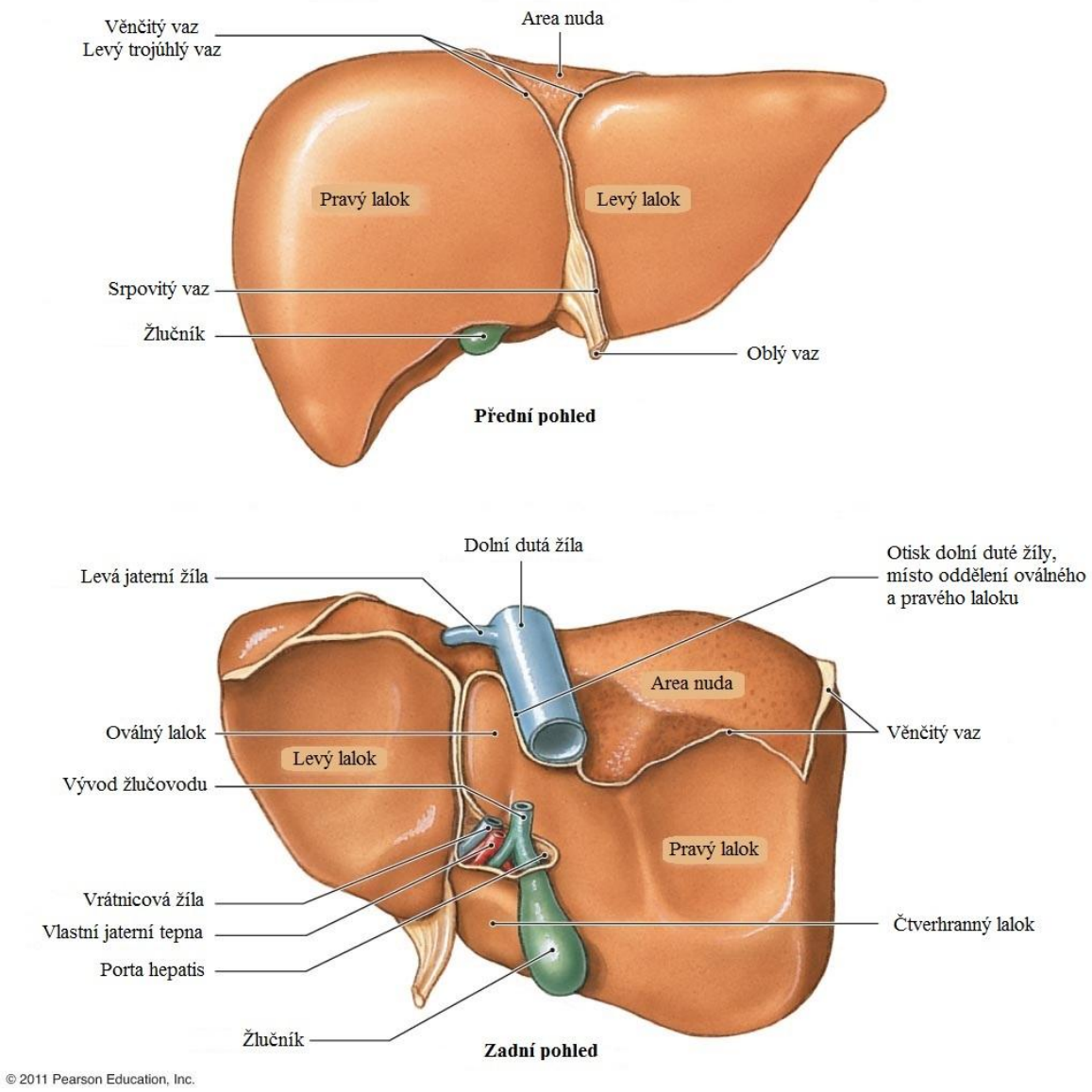
Provázanost vztahů mezi mastnými kyselinami, glykovaným hemoglobinem a aktivitami enzymů bude předmětem zkoumání.

Jelikož nepředpokládám v dohledné době zlepšení životního stylu obyvatelstva, ba právě naopak, bude na prevenci, diagnostiku a léčbu civilizačních chorob, diabetu nevyjímaje, brán stále větší zřetel.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Játra

Játra představují metabolické centrum organismu a tím i orgán, který je naprosto nezbytný pro život. Protéká jimi za jednu minutu asi 1500 ml krve a mají jak oběh funkční (portální), tak oběh nutritivní (*a. hepatica*) (Trojan a spol., 2003).



Obr. 2.1: Anatomie jater

Zdroj: http://www.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/faculty/harnden/2122/images/liver.jpg, upraveno, cit. 5. 5. 2015

Játra jsou svou stavbou exokrinní žláza produkující žluč. Žluč je žlutohnědá kapalina, která na vzduchu zelená. Na výstupu z jater je tvořena asi 97 % vody, zbytek představují žlučové soli a pigmenty, cholesterol a mastné kyseliny. Dále je žluč předávána vývodnými cestami do duodena, kde se spojuje s tuky z potravy a dává vznik ve vodě rozpustným komplexům, z nichž mohou být lipidy snáze vstřebány (tzv. hydrotropní účinek žluče) (Čihák a Grim, 2002; Šmídková a spol., 2003).

Játra jsou umístěna těsně pod bránicí, z větší části pod pravou klenbou, přesahují až pod mediální část levé klenby brániční. Jsou největší a nejtěžší žlázou lidského těla. Průměrná váha činí 1500 g, což u dospělého člověka představuje asi 1/40 hmotnosti těla. Jaterní buňky zaujímají 60 % jaterního objemu a nazýváme je hepatocyty (Čihák a Grim, 2002; Klener, 2011).

Z průtoku krve játry vyplývá, že na rozdíl od lalůčku *vena centralis*, který je jednotkou morfologickou, má ale více přívodů krve, lze za jakousi funkční jednotku, stanovenou podle přívodu krve, považovat tzv. lalůček portální (*lobulus venae interlobularis*), což je část jaterního parenchymu zásobená jednou interlobulární žílou a z ní ve třech směrech vystupujícími cirkumlobulárními žilami; má tvar nepravidelného ovoidu, v jehož středu probíhá *vena interlobularis*. Ze stejného okrsku se také do interlobulárního žlučovodu sbírá produkovaná žluč (Čihák a Grim, 2002).

2.1.1 Funkce jater

- **Produkce žluči:** asi 600 ml denně. Obsahuje žlučová barviva a žlučové kyseliny. Žluč má zásadní význam pro vstřebávání tuků a vitaminů rozpustných v tucích.
- **Detoxikační funkce:** toxické látky jsou v játrech konjugovány např. s kyselinou sírovou nebo kyselinou glukuronovou. Sem patří rovněž schopnost jater inaktivovat některé hormony (např. inzulín).
- **Termogeneze:** díky vysoké metabolické aktivitě. Krev vytékající z jater má nejvyšší teplotu krve v lidském těle (39 °C).
- **Zásobní funkce:** slouží jako rezervoár pro železo (ferritin) a glukózu (glykogen). V případě cirkulační hypovolémie může být z jater vypuzována krev.
- **Tvorba močoviny:** ornitinový cyklus.
- **Glukostatická funkce:** udržují glykémii na stálých hodnotách. V játrech je indukována glukoneogeneze, je zde zásoba glykogenu.

- **Produkce proteinů:** tvoří se zde všechny plazmatické proteiny s výjimkou imunoglobulinů a von Willebrandova faktoru
- **Produkce lipoproteinů typu VLDL a HDL**: probíhá zde desaturace a elongace mastných kyselin a játra se nezastupitelným podílem účastní metabolismu cholesterolu (Ehrman a spol., 2014; Trojan a spol., 2003).

2.2 Lipidy

Lipidy představují širokou heterogenní skupinu sloučenin, jenž má přímo či nepřímo vztah k mastným kyselinám. Jejich charakteristickou vlastností je relativní nerozpustnost ve vodě; a naopak dobrá rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech. Nerozpustnost ve vodě je dána nedostatkem polarizujících atomů, jako je kyslík, dusík, síra či fosfor (Koolman a Röhm, 2012; Murray a spol., 2002).

Lipidy jsou důležitou složkou potravy nejen pro svou vysokou energetickou hodnotu, ale i pro obsah esenciálních mastných kyselin, vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K a provitaminů A – karotenů), sterolů a antioxidantů rozpustných v tucích (Dostálová, 2011).

V těle slouží tuk jako vydatný zdroj energie, ať přímý, nebo potenciální, uložený do zásoby v tukové tkáni. Má též význam jako tepelný izolátor v podkožní tkáni a v okolí některých orgánů. Nepolární lipidy vytvářejí také elektrickou izolaci, která umožňuje rychlé šíření depolarizačních vln podél myelinizovaných nervových vláken.

Lipidy jsou důležité součásti buněčných a mitochondriálních membrán, a také umožňují transport lipidů krví (Murray a spol., 2002).

2.2.1Rozdělení lipidů

1. **Jednoduché lipidy**

   Za jednoduché lipidy považujeme estery mastných kyselin s různými alkoholy.

   a) **Tuky:** Estery mastných kyselin s glycerolem. Tekuté tuky nazýváme oleje.

   b) **Vosky:** Estery mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy.

2. **Složené lipidy**

   Takto nazýváme estery obsahující mimo mastné kyseliny a alkohol ještě další skupiny.

   a) **Fosfolipidy:** Lipidy, které obsahují vyjma mastných kyselin a alkoholu i zbytek kyseliny fosforečné. Často obsahují i dusíkaté báze a další substituenty. Dále se dělí na:

      - Glycerolfosfolipidy: Alkoholem u těchto fosfolipidů je glycerol.
      - Sfingofosfolipidy: Alkoholem v tomto případě je sfingosin (sfingenin).

   b) **Glykolipidy (glykosfingolipidy):** Lipidy obsahující mastnou kyselinu, sfingenin a sacharidovou složku.

   c) **Ostatní složené lipidy**: Sulfolipidy a aminolipidy. Mohou sem být přiřazeny i lipoproteiny.

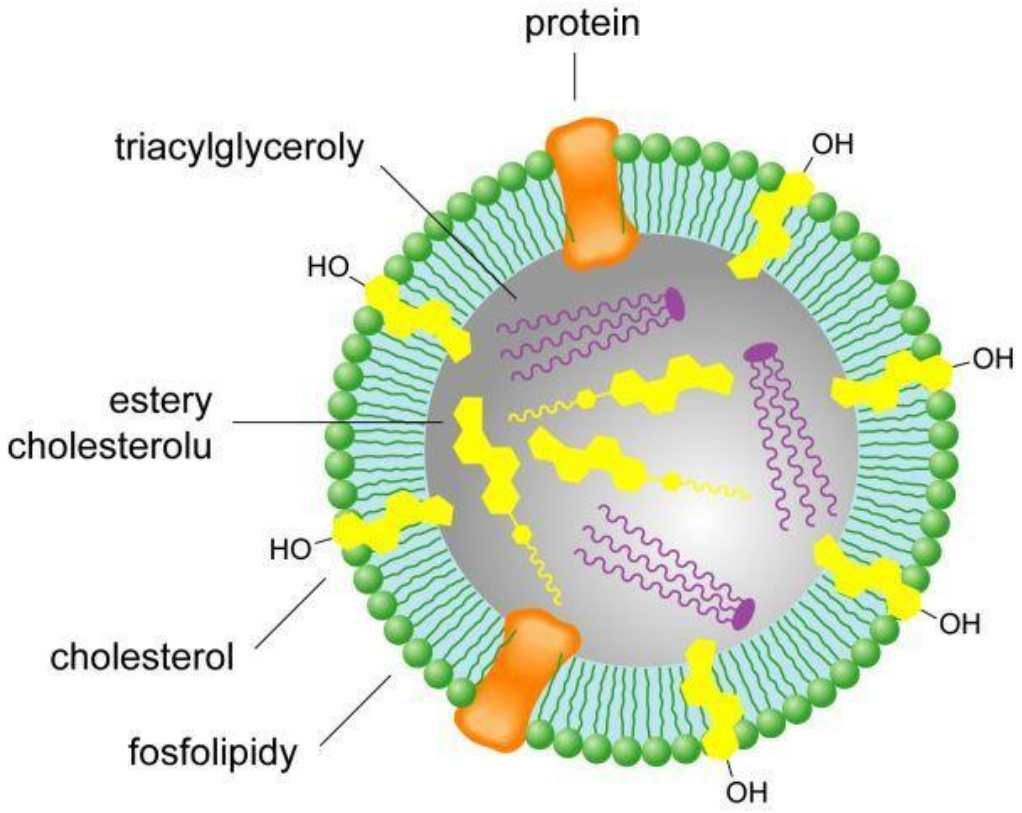
3. **Prekurzory a odvozené lipidy**

Do této skupiny patří mastné kyseliny, glycerol, steroidy, alkoholy (včetně sterolů), mastné aldehydy a ketolátky, uhlovodíky, v tucích rozpustné vitamíny a hormony.

Acylglyceroly, cholesterol a jeho estery, které nenesou žádný náboj, se též nazývají neutrální tuky (Murray a spol., 2002).

2.2.2 Lipoproteiny

Lipidy jsou v plazmě transportovány ve formě lipoproteinů. Ty představují kulovité částice, které se skládají z esterifikovaného cholesterolu (60–70 % celkového cholesterolu) a triacylglycerolů v nepolárním jádru a z proteinů, fosfatidylcholinu, sfingomyelinu a volného cholesterolu, jež tvoří amfifilní obal. Jednotlivé třídy lipoproteinů se liší poměrným zastoupením triacylglycerolů, cholesterolua jednotlivých apoproteinů. Apoproteiny plní nezastupitelnou úlohu, kdy tvoří základní strukturu obalu lipoproteinových částic, uplatňují se při vazbě na příslušné receptory a také při regulaci aktivity enzymů lipoproteinového metabolismu (Holeček, 2003; Voet a Voetová, 1995; Tvrzická a spol., 2009a).



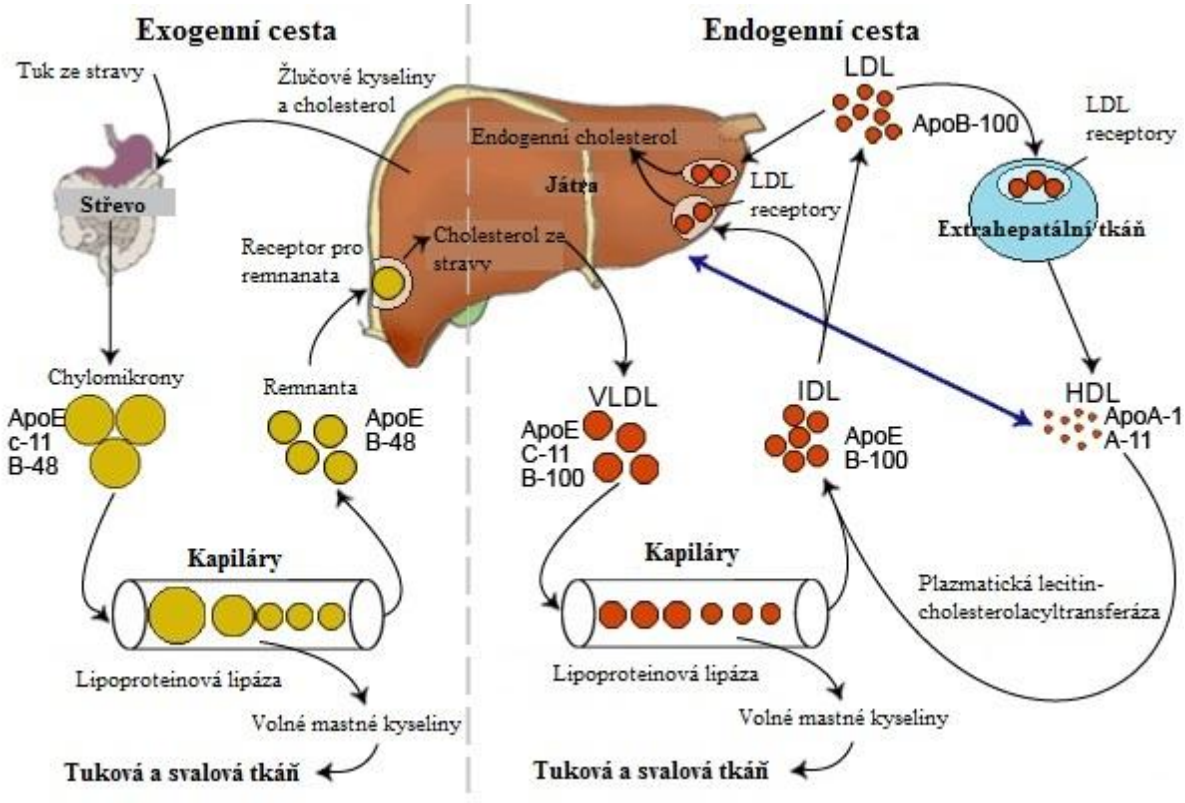
Obr. 2.2: Krevní lipoprotein

Zdroj: http://eluc.cz/uploads/images/14720/content_lipoprotein.jpg, cit 21. 4. 2015

2.2.2.1 Metabolismus lipoproteinů

Chylomikrony se tvoří na sliznici tenkého střeva, obsahují exogenní triacylglyceroly a cholesterol, ale i cholesterol endogenního původu, který se do střeva dostává se žlučí. Tyto lipoproteiny jsou největší a obsahují také nejvíce lipidů, pročež mají i nejmenší hustotu. Přestupují do lymfy a cestou *ductus thoracicus* se dostávají do krevního oběhu. Hlavním apoproteinem je apoB-48, obsahují ovšem i apoproteiny skupiny A a v plazmě přijímají apoE a C, které jsou nezbytné pro jejich katabolismus (Murray a spol., 2002; Vokurka a spol., 2012).

Triacylglyceroly jsou pomocí lipoproteinové lipázy (LPL) štěpeny na jednotlivé mastné kyseliny a monoacylglyceroly. Uvolněné MK slouží jako zdroj energie pro svaly a další tkáně, například zásobní triacylglyceroly v tukové tkáni, nebo jsou vychytány játry a využity k resyntéze triacylglycerolů. Takto ochuzené zbytky chylomikronů nazýváme remnanta a z cirkulace jsou vychytávány játry.



Obr. 2.3: Schéma lipoproteinového metabolismu

Zdroj: http://www.remedia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20070522104014.jpg, upraveno, cit. 4. 5. 2015

V játrech se tvoří v největší míře lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL – very low-density lipoproteins). Jejich charakteristickou komponentou je apoB-100. Dále

obsahují apoE, apoC-11, endogenní triacylglyceroly a estery cholesterolu. V plazmě dochází k přesunu esterů cholesterolu a apoC z lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL – high-density lipoproteins) do VLDL. Dále ztrácí triacylglyceroly působením LPL a předávají fosfolipidy, většinu apoC a část apoE částicím HDL. Tak z VLDL vznikají částice VLDL remnants, zvané též lipoproteiny o střední hustotě (IDL – intermediate-density lipoproteins).

IDL obsahují velké množství cholesterolu a na svém povrchu nesou apoB-100 a apoE. 60 až 70 % IDL je vychytáno játry a metabolizováno. Zbytek je pomocí enzymu jaterní lipázy přeměněn na lipoproteiny o nízké hustotě (LDL – low-density lipoproteins) (Holeček, 2003; Racek a spol., 2006).

LDL jsou hlavním typem lipoproteinů, jenž přenáší cholesterol do tkání. Jádro LDL obsahuje téměř výlučně estery cholesterolu, povrch pak tvoří fosfolipidy, volný cholesterol a apoB-100. LDL jsou ze tří čtvrtin vychytány játry. LDL se vážou na membránové receptory prostřednictvím apoB-100, dochází k internalizaci částice, která se spolu s receptorem dostává do lysozomu. Receptor je uvolněn a putuje znovu k buněčné membráně, aby byl užit k vazbě další částice LDL. V případě vysokých hladin LDL či poruchy vychytávání LDL játry dochází k ukládání cholesterolu a postupnému rozvoji ateroskleróz (Devlin, 2010; Racek a spol., 2006).

Posledním typem jsou lipoproteiny o velmi vysoké hustotě (HDL – high-density lipoproteins). Jsou ze všech lipoproteinů nejmenší. Vznikají jako nascentní HDL v játrech a tenkém střevě. Mají diskoidní tvar a jsou tvořeny dvojvrstvou fosfolipidů a apolipoproteiny A-I, A-II a E. Přijímají z buněčných membrán i z jiných typů lipoproteinů volný cholesterol, který je v částici esterifikován a hromadí se v jádře HDL. Děj katalyzuje enzym lecitin-cholesterolacyltransferáza (LCAT). Nejmenší sférické HDL se značí HDL_3, obohacením o další cholesterol se mění na HDL_{2a}. Z těchto částic výměnou cholesterolu za triacylglyceroly z VLDL vznikají HDL_{2b}, které se po hydrolýze triacylglycerolů jaterní lipázou mění zpět na HDL_3. Přenos cholesterolu z HDL_{2a} na VLDL zajišťuje bílkovina zvaná cholesteryl-ester transfer protein. Touto cestou se přebytečný cholesterol z buněčných membrán přes HDL dostává do VLDL a vrací se do jater vychytáváním IDL či LDL. Výše popsaný mechanismus je znám jako reverzní transport cholesterolu, tedy z periferních tkání do jater (Racek a spol., 2006).

2.2.3 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) se vyskytují hlavně jako estery v přírodních tucích a olejích, ale mohou být přítomné i v neesterifikované podobě jako volné mastné kyseliny, jenž jsou transportní formou přítomnou v krevní plazmě. MK v přírodních tucích mají zpravidla nevětvený řetězec obsahující sudý počet uhlíkových atomů. Řetězec může být buď nasycený (neobsahující žádné dvojné vazby) nebo nenasycený (obsahující jednu či více dvojných vazeb) (Murray a spol., 2002).

Nasycené mastné kyseliny jsou vysoce ohebné molekuly s velkým počtem konformací díky relativně volné rotaci kolem každé vazby C-C. Nicméně energeticky nejvýhodnější je plně linearizovaná konformace, neboť při ní dochází k nejmenšímu počtu stérických interferencí mezi sousedními methylenovými skupinami.

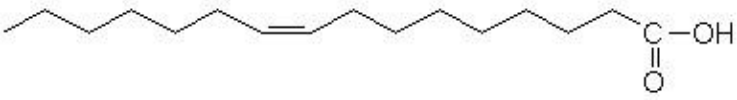
Dvojné vazby mastných kyselin mají téměř vždy cis-konfiguraci. Toto způsobuje rigidní ohyb o 30° v uhlovodíkovém řetězci nenasycených MK a brání tak jejich účinnému využití prostoru. Tím způsobené snížení van der Waalsových interakcí vede ke snižování bodu tání MK se stupněm jejich nenasycenosti. Stejně tak tekutost lipidů se zvyšuje se stupněm nenasycenosti MK v nich obsažených. Tato vlastnost výrazně ovlivňuje vlastnosti membrán (Voet a Voetová, 1995).

2.2.3.1 Názvosloví mastných kyselin

Názvy MK tvoříme podle platné chemické nomenklatury, častěji se však setkáme s triviálními názvy. V odborné literatuře pak dominuje vyjádření pomocí schematického vzorce:

$$CN{:}\,p(n-x)$$

CN představuje počet uhlíků (carbon number), p je počet dvojných vazeb a n-x je poloha první dvojné vazby od metylového konce, zde je rozdíl od klasického názvosloví, kde se poloha dvojné vazby počítá od karboxylové skupiny. Pro větší přehlednost si uvedeme názorný příklad:



Dle nomenklatury se jedná se o cis-9-hexadecenovou karboxylovou kyselinu, triviální název je kyselina palmitoolejová a schematický vzorec je 16:1(n-7).

2.2.3.2 Nasycené mastné kyseliny

Strukturně nejjednodušší skupinou mastných kyselin jsou nasycené mastné kyseliny (SFA – saturated fatty acids). Tyto MK neobsahují žádnou dvojnou vazbu ani substituenty. Obvykle čítají sudý počet atomů uhlíku v rozmezí od 4 až po 38 atomů uspořádaných v lineárním řetězci. Můžeme je rozdělit podle počtu obsažených uhlíků na SFA s krátkým řetězcem (4 – 6 uhlíků), se středně dlouhým řetězcem (8 – 12 uhlíků), s dlouhým řetězcem (14 – 18 uhlíků), s velmi dlouhým řetězcem (20 – 26 uhlíků) a s ultra dlouhým řetězcem (28 – 38 uhlíků). V praxi jsou nejvýznamnější a nejvíce zastoupené SFA s dlouhým řetězcem (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Kyselina myristová je běžnou součástí všech živočišných i rostlinných tuků a olejů. Obsahuje 14 uhlíkových atomů. Její zvýšená koncentrace se dává do souvislosti s rizikem vzniku ischemické choroby srdeční. Její hypercholesterolemický efekt způsobuje zvyšování hladiny LDL i HDL cholesterolu (Bradbury a spol., 2010).

Nejrozšířenější SFA prakticky ve všech organismech je kyselina palmitová. Velice dobře se vstřebává z potravy. Skládá se z 16 atomů uhlíku. Podobně jako u kyseliny myristové, i kyselina palmitová zvyšuje koncentraci cholesterolu; urychluje vznik LDL lipoproteinových částic a zároveň snižuje aktivitu receptorů pro LDL (Fernandez a West, 2005). Palmitová kyselina je důležitou součástí biologických membrán, kde zajišťuje jejich strukturální stabilitu a katalytickou aktivitu. Na proteiny membrán se váže palmitoylací. Tato je realizována posttranslační reverzibilní thioesterifikací cysteinu (Tvrzická a spol., 2009b). Kyselina palmitová je označována jako přední představitel cytotoxických MK pro β-buňky pankreatu i pro hepatocyty. Její cytotoxický efekt je spojený s aktivací kaspázy a následnou indukcí apoptózy. Zvýšená hladina této kyseliny se tedy přímo podílí na vzniku inzulínové rezistence a diabetu. Cytotoxické působení palmitátu se silněji projevuje při snížené funkci enzymu stearoyl-CoA desaturázy, která hraje klíčovou roli v desaturaci kyseliny palmitové na palmitoolejovou (Cnop a spol., 2001; Ricchi a spol., 2009; Welters a spol., 2006). Kyselina palmitová také inhibuje expresi a aktivitu inzulínových receptorů (Dey a spol., 2005)

Další významnou SFA je kyselina stearová. Její uhlíková kostra čítá 16 uhlíkových atomů. Oproti ostatním SFA má pozitivní vliv na koncentraci HDL cholesterolu. Dále podporuje uvolňování inzulínu z β-buněk pankreatu, ovšem při dlouhodobém působení jeho uvolňování naopak inhibuje (Montecucco a spol., 2008; Tvrzická a spol., 2009a; Tvrzická a spol., 2009b).

2.2.3.3 Nenasycené mastné kyseliny

Nenasycené MK obsahují jednu nebo více dvojných vazeb. Přijímáme je potravou a organismus je schopen je vytvářet za pomoci desaturačních enzymů. Více o tvorbě nenasycených MK je obsaženo v kapitole 2.4 Desaturázy a elongázy.

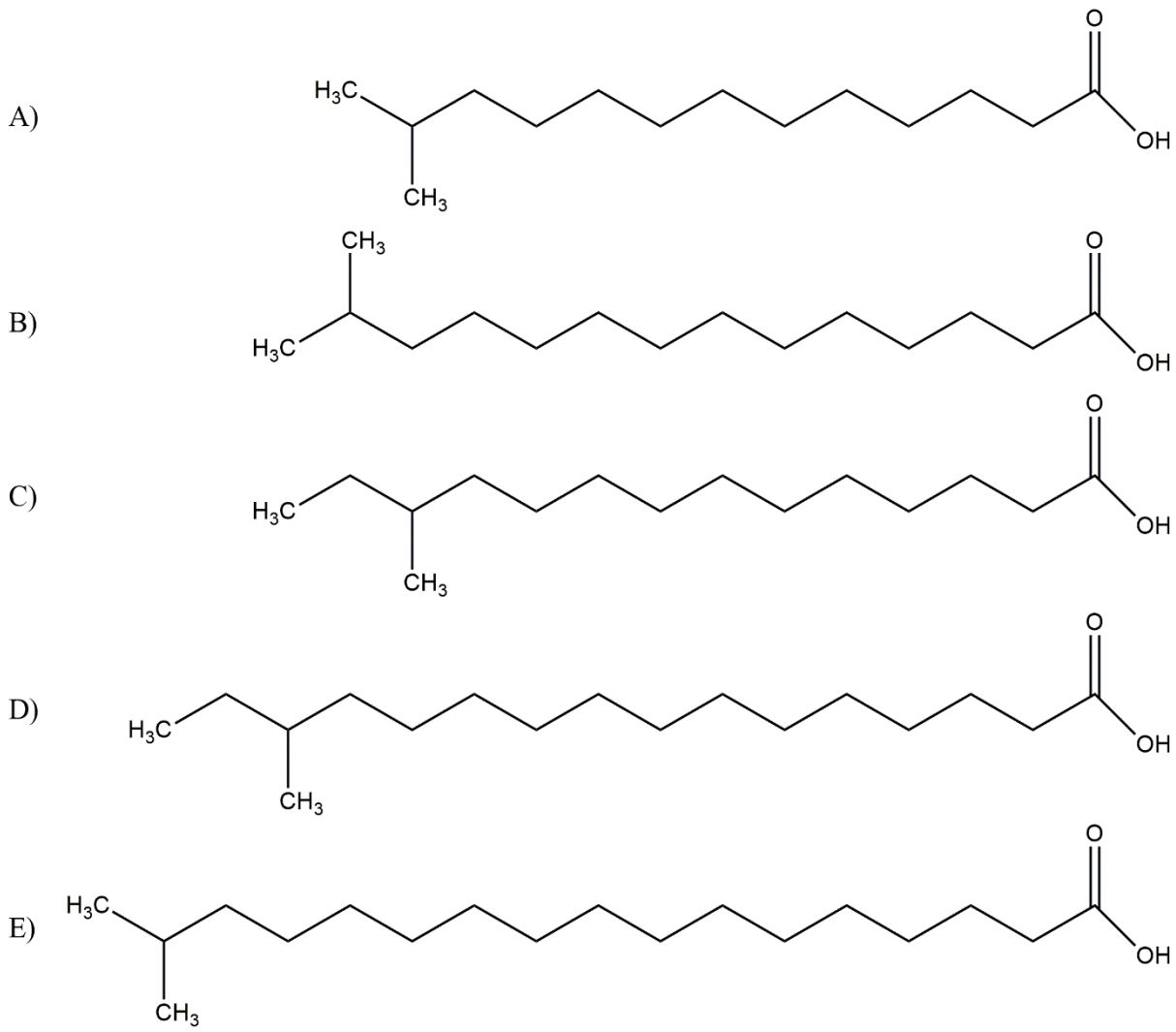
S přítomností dvojné vazby přichází logicky v potaz i izomerie, konkrétně *cis* a *trans*. Přirozeně se vyskytující nenasycené mastné kyseliny mají u savců konfiguraci *cis*. *Trans* mastné kyseliny jsou pro organismus škodlivé, jejich vliv je srovnatelný s SFA, dále působí prozánětlivě, zvyšují riziko vzniku metabolického syndromu a ischemické choroby srdeční (Dostálová, 2011; Murray a spol., 2002).

Mezi nejdůležitější mononenasycené mastné kyseliny (MUFA – monounsaturated fatty acids), to znamená MK s jednou dvojnou vazbou, patří kyseliny olejová a palmitoolejová. Významné je protektivní působení těchto kyselin na β-buňky pankreatu proti cytotoxickému efektu SFA. Kyselina olejová snižuje koncentraci LDL cholesterolu a působí i proti vzniku trombů (Maedler a spol., 2003).

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA – polyunsaturated fatty acids) obsahují dvě a více dvojných vazeb. Rozlišujeme dvě rodiny těchto kyselin, jejichž původ je odvozen od dvou esenciálních mastných kyselin, které si tělo nedokáže samo syntetizovat. Rodina n-3 je odvozena od kyseliny α-linolenové a rodina n-6 od kyseliny linolové. Odvození dalších polynenasycených mastných kyselin je podrobněji popsán v kapitole 2.4.3 Ostatní desaturázy a znázorněno na obrázku 7. N-3 PUFA mají antiarytmický, antitrombotický a protizánětlivý vliv. N-6 PUFA mají účinek protrombotický, prozánětlivý a zvyšují citlivost k inzulínu. Proto je důležitý i vzájemný poměr n-6/n-3 PUFA. Obecně jsou PUFA prekurzorem pro vznik celé škály eikosanoidů a prostaglandinů a mají pozitivní dopad v podobě snižování celkového cholesterolu v krvi (Araya a spol., 2010; Dostálová, 2011; Lattka a pol., 2010; Tvrzická a spol., 2009a; Tvrzická a spol., 2009b).

2.2.3.4 Rozvětvené mastné kyseliny

Mezi rozvětvené mastné kyseliny (BCFA – branched chain fatty acids) řadíme nasycené mastné kyseliny, které mají na uhlíkatém řetězci navázanou metylovou skupinu. Tato metylová skupina se vyskytuje nejčastěji na druhém či třetím uhlíku na C konci řetězce. Na obrázku 4 je uveden přehled BCFA stanovovaných v rámci této práce.



Obr. 2.4: Přehled stanovovaných rozvětvených mastných kyselin

A) 12-metyltridekanová k., B) 13-metyltetradekanová k., C) 12-metyltetradekanová k., D) 14-metylhexadekanová k., E) 16-metylheptadekanová k.

Jedná se o méně prozkoumanou skupinu mastných kyselin, proto víme málo o jejich vlivu na organismus, metabolismu i fyziologickém efektu (Ran-Ressler a spol., 2008). Jedna z mála studií ukazuje, že zvýšená koncentrace BCFA v gastrointestinálním traktu nenarozených krysích mláďat pozitivně koreluje se sníženou incidencí nekrotizující enterokolitidy (nemoc postihující předčasně narozené děti) (Ran-Ressler a spol., 2011a).

Se snahou zlepšovat stravovací návyky stoupá i spotřeba mléka a mléčných výrobků. Tyto obsahují relativně vysoký podíl BCFA, bylo popsáno, že mléko ve Spojených státech obsahuje až dvouprocentní podíl BCFA z celkových MK (Ran-Ressler a spol., 2011b).

MK s rovným řetězcem jsou odbourávány pouze v mitochondriálním matrixu. BCFA a MK s velmi dlouhým řetězcem jsou primárně oxidovány v peroxizomech a až poté

transportovány jako acyl-CoA do mitochondrií (Mukherji a spol., 2003). Tento proces je řízen PPAR (Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor) receptory, které představují jaderné faktory regulující produkci lipogenních enzymů, jenž jsou nezbytné pro provádění výše zmíněné peroxizomální a mitochondriální oxidace MK. Existuje více druhů PPAR receptorů. PPARα jsou u člověka exprimovány převážně v játrech, kosterním svalstvu, ledvinách a cévním endotelu, kde regulují expresi mnoha genů kódujících enzymy podílejících se na proliferaci peroxizomů a na oxidaci MK probíhající v peroxizomech a v mitochondriích (Memon a spol., 2001).

PPARβ a δ se nachází v rozličných tkáních, mohou zřejmě také zasahovat do lipidového metabolizmu, tyto PPAR snižují množství sérových triacylglycerolů cestou stimulace vychytávání VLDL lipoproteinů (Michalík a spol., 2003).

PPARɣ je zatím nejlépe prostudovaná skupina PPAR receptorů. Nejvíce jsou zastoupeny v tukové tkáni, kde se vyskytují ve dvou izoformách - PPARɣ1 a PPARɣ2. V menší míře jsou zastoupeny i ve slezině, v buňkách hematopoetického systému a kosterního svalstva (jedná se převážně o PPARɣ1) (Kawaguchi a spol., 2003; Spiegelman, 2008).

2.2.3.5 Syntéza mastných kyselin

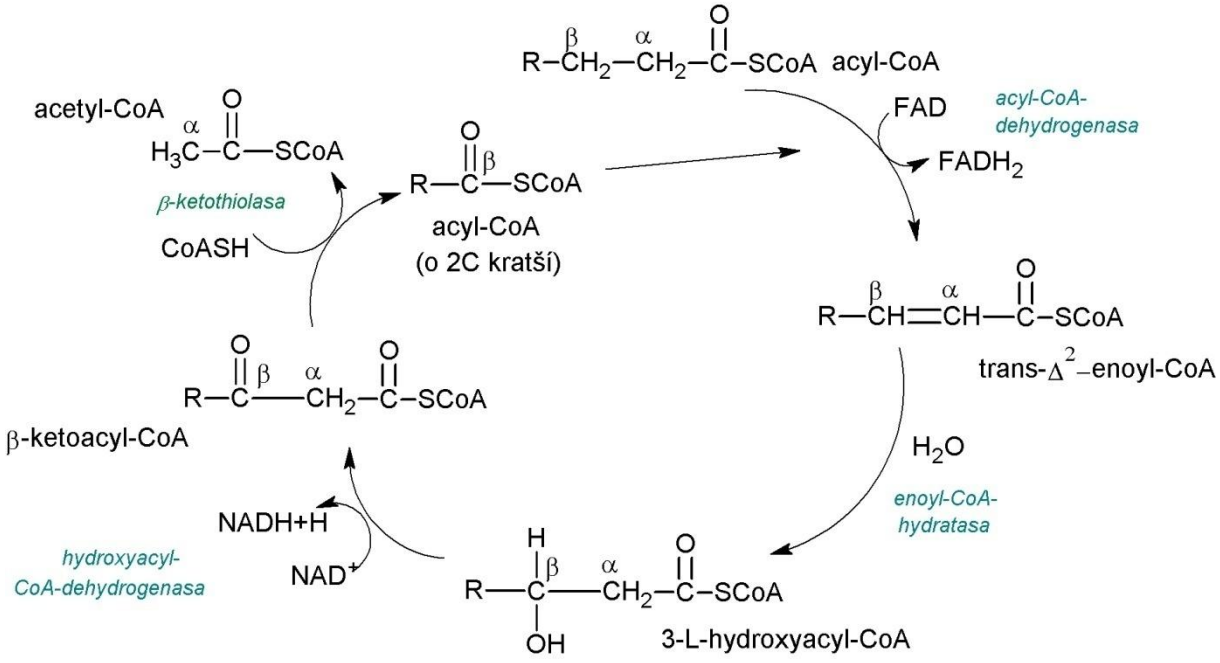
Lidský organismus si mastné kyseliny umí vytvořit sám. Syntéza MK probíhá v cytoplazmě z dvou či tříuhlíkatých prekurzorů. Jedinými nezbytnými kyselinami, které organismus potřebuje, ale nedokáže si je syntetizovat, jsou kyseliny linolová a linolenová (tzv. esenciální mastné kyseliny), tyto jsou potom prekurzory pro n-3 a n-6 řadu polynenasycených mastných kyselin. Základem syntézy MK je acetyl-CoA, který vzniká ze sacharidů, aminokyselin (AMK) i odbouráváním jiných MK (Štern a spol., 2005; Tvrzická a spol., 2009a).

Prvním krokem je karboxylace acetyl-CoA na malonyl-CoA. Tuto reakci umožňuje enzym acetyl-CoA-karboxyláza a potřebuje energii ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Malonyl-CoA se váže na protein přenášející acyl (ACP – acyl carrier protein). MK jsou dále syntetizovány v opakujícím se sledu hydrogenačních a dehydratačních reakcí katalyzovaných syntázou mastných kyselin. Tu představuje komplex enzymů podílejících se na výstavbě řetězce nově vznikající MK. Kofaktory nutné pro správnou funkci syntázy MK jsou: biotin, nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), ATP, Mn^{2+} a kyselina pantotenová. Pro přenášení meziproduktů mezi jednotlivými kroky syntézy MK slouží ACP. Při biosyntéze MK se výstavba řetězce zastavuje na počtu šestnácti uhlíkových

atomů. V první řadě tedy vzniká kyselina palmitová, kterou řadíme do skupiny nasycených mastných kyselin (Holeček, 2006; Murray a spol., 2002).

2.2.3.6 Metabolismus mastných kyselin

Hlavní a také energeticky nejvýhodnější, cestou odbourávání mastných kyselin je β-oxidace (cyklus tří oxidací). β-oxidace je cyklický pochod, který postupně zkracuje řetězec mastné kyseliny vždy o dva atomy uhlíku. Odbourávání se tedy děje po spirále, jak je naznačeno na obr. 2.5. β-oxidaci se také říká podle jejího objevitele Lynenova spirála (Čegan a Korecká, 2008).



Obr. 2.5: β-oxidace mastných kyselin

CoA (koenzym A), FAD (flavinadenindinukleotid), NAD (nikotinamidadenindinukleotid)

Zdroj: http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241143/mod_page/content/31/beta-oxidace%20final%20oprava.jpg, cit 11. 5. 2015

2.3 Inzulín

lnzulín je hlavním hormonem podílejícím se na regulaci glykémie. Jedná se o peptidový hormon produkovaný v β-buňkách pankreatu.

2.3.1 Metabolické účinky inzulínu

Inzulín facilituje vstup glukózy do buněk a tím snižuje glykémii. Zvyšuje počet glukózových transportérů (facilitovaná difúze), což je podstatou první (rychlé, nastávající v sekundách) fáze účinku inzulínu. Kromě glukózy se zvyšuje i vstup aminokyselin a draslíku do buněk. V druhé fázi (střední, nastávající v minutách) inzulín stimuluje proteosyntézu a inhibuje rozpad proteinů (anabolický účinek) a aktivací enzymu glykogensyntázy zesiluje tvorbu glykogenu v játrech a tím utilizaci glukózy. V poslední (pozdní fázi, nastávající v hodinách) inzulín stimuluje tvorbu tuku – aktivuje lipogenetické enzymy (Klouda, 2013; Trojan a spol., 2003).

2.3.2 Biosyntéza inzulínu

Prekurzorová molekula, preproinzulín, peptid o molekulové hmotnosti (M_r) 11 500, je tvořen syntézou směrovanou z DNA/RNA v hrubém endoplasmatickém retikulu pankreatických β-buněk. Mikrozomální enzymy jej štěpí na proinzulín (M_r asi 9000) téměř ihned po syntéze. Proinzulín je transportován do Golgiho komplexu, kde je umístěn v sekrečních granulech potažených klathrinem. Dozrávání sekrečních granul je spojeno s rozrušením klathrinového obalu a s přeměnou proinzulínu na inzulín s 51 aminokysleinami (AMK) a menší spojující peptid neboli C peptid s 31 AMK, proteolytickým štěpením na dvou místech polypeptidového řetězce. Normální zralá (nepotažená) sekreční granula obsahují inzulín a C peptid v ekvimolárním množství a jen malý podíl proinzulínu (Greenspan a Baxter, 2003; Kittnar a spol., 2011).

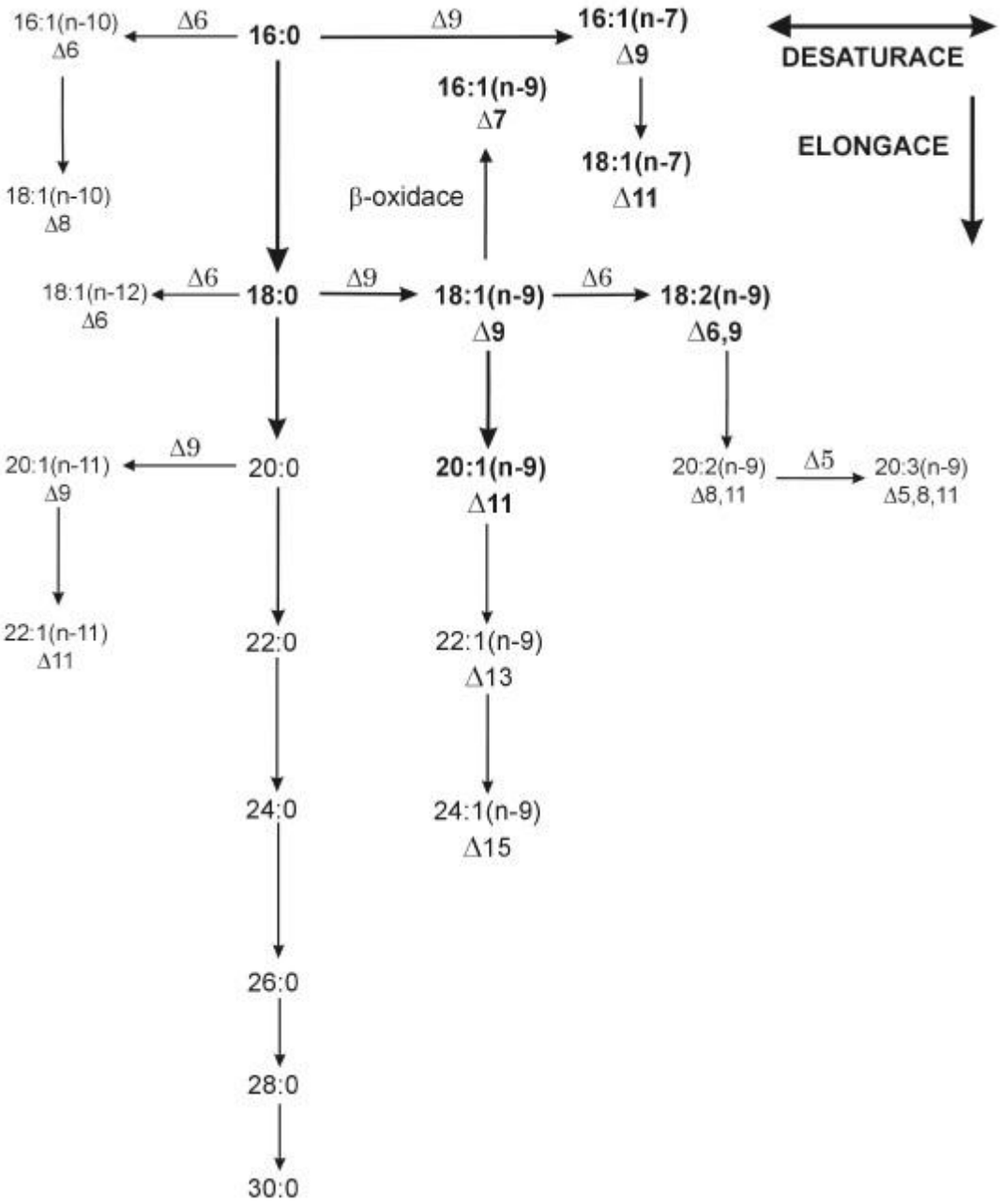
2.3.3 Sekrece inzulínu

Lidský pankreas secernuje u zdravého dospělého jedince asi 40 – 50 jednotek inzulínu denně. Bazální koncentrace inzulínu v krvi nalačno je v průměru 10 μU/ml (0,4 ng/ml nebo 69 pmol/l). U zdravých kontrolních osob zřídka vystupuje inzulín nad 100 μU/ml po standardním jídle. Vzestup periferní koncentrace inzulínu začíná po 8 – 10 minutách po příjmu jídla a dosahuje vrcholu v periferní krvi za 30 až 45 minut. Je následován rychlým poklesem postprandiální koncentrace glukózy v plazmě, která se vrací k bazálním hodnotám za 90 – 120 minut (Greenspan a Baxter, 2003; Trojan a spol., 2003).

Stimulovaná sekrece inzulínu je ta, která nastává jako odpověď na exogenní podněty. *In vivo* je to odpověď β-buňky na požití jídla. Glukóza je nejúčinnější stimulátor uvolnění inzulínu. Když koncentrace glukózy v systému náhle vzroste, dojde k počátečnímu krátkodobému uvolnění inzulínu („časná fáze“), pokud je koncentrace glukózy udržována na této hladině, uvolňování inzulínu postupně klesá a pak začne opět narůstat až ke stálé hladině („pozdní fáze“) (Greenspan a Baxter, 2003; Kittnar a spol., 2011).

2.4 Desaturázy a elongázy

Endogenní MK v lidském organismu by po biosyntéze představovala prakticky jen kyselina palmitová. Ta je cytotoxická a tělo navíc k životu potřebuje rozličné variace mastných kyselin. Proto máme systém enzymů, které dokáží z MK vytvářet pomocí desaturace a elongace další produkty (Cnop a spol., 2001; Holeček, 2006).



Obr. 2.6: Úloha desaturáz a elongáz v přeměně mastných kyselin

Zdroj: Tvrzická a spol., 2009a

Syntéza mastných kyselin s jednou dvojnou vazbou probíhá v játrech a příslušné enzymy jsou uložené v endoplazmatickém retikulu, částečně i v peroxizomech. Nazývají se desaturázy a jedná se o nehemové enzymy obsahující železo. Jejich význam spočívá především v přeměně cytotoxických nasycených MK na mononenasycené MK, které cytotoxicitu nevykazují, navíc snižují hladinu celkového i LDL cholesterolu v krvi (Dostálová, 2011; Lagarde a spol., 2013; Ledvina a spol., 2004; Oh a spol., 2012).

Desaturázy jsou enzymy patřící do skupiny oxidoreduktáz, které katalyzují odštěpení dvou vodíků z nasycené vazby na mastné kyselině za vzniku dvojné vazby v konfiguraci cis. Metabolickou formou účastnící se desaturací i elongací jsou acyl-CoA příslušných MK. U živočichů jsou dodatečné dvojné vazby zaváděny mezi karboxylovou skupinu a již existující dvojnou vazbu (Lagarde a spol., 2013; Murray a spol., 2002).

U většiny zvířat mohou být dvojné vazby zavedeny v polohách Δ^4, Δ^5, Δ^6 a Δ^9. Ovšem není možné zavést dvojnou vazbu za pozici Δ^9. Z tohoto důvodu se kyseliny linolová a α-linolenová stávají jedinými esenciálními mastnými kyselinami. Savčí buňky vykazují Δ^5, Δ^6 a Δ^9 desaturázovou aktivitu (Guillou a spol., 2010; Lagarde a spol., 2013; Murray a spol., 2002).

Monoenové mastné kyseliny mohou být vytvořeny z nasycených MK v mnoha tkáních, včetně jater. První dvojná vazba zavedená do mastné kyseliny je téměř vždy v poloze Δ^9. Desaturační a elongační systémy jsou eliminovány při hladovění, podáváním glukagonu a adrenalinu a při nedostatku inzulínu při diabetes mellitus typu 1 (Murray a spol., 2002).

Aktivity desaturačních i elongačních enzymů jsou regulovány primárně na transkripční úrovni. Přítomnost a hladiny příslušných transkripčních faktorů, ligandů a kofaktorů v dané tkáni a čase přispívají k jejich regulaci. Ve stejnou dobu je celková homeostáza lipidů regulována na vyšší úrovni hormony, cirkadiánními rytmy a příjmem potravy (Guillou a spol., 2010).

2.4.1 Stearoyl-CoA desaturáza 1

Zavedení první cis dvojné vazby mezi uhlíky 9 a 10 zprostředkuje enzym stearoyl-CoA desaturáza 1 (SCD1). Reakce dále zahrnuje cytochrom b_5, NADH (P)-cytochrom b_5 reduktázu a molekulární kyslík. Preferovanými substráty jsou palmitoyl- a stearoyl-CoA, které se přeměňují na palmitooleoyl- a oleoyl-CoA. Například konverzi stearoyl-CoA na

oleoyl-CoA katalyzuje v endoplazmatickém retikulu se nacházející Δ^9-desaturáza. Mikrozomální Δ^9-desaturázový systém je znázorněn níže:

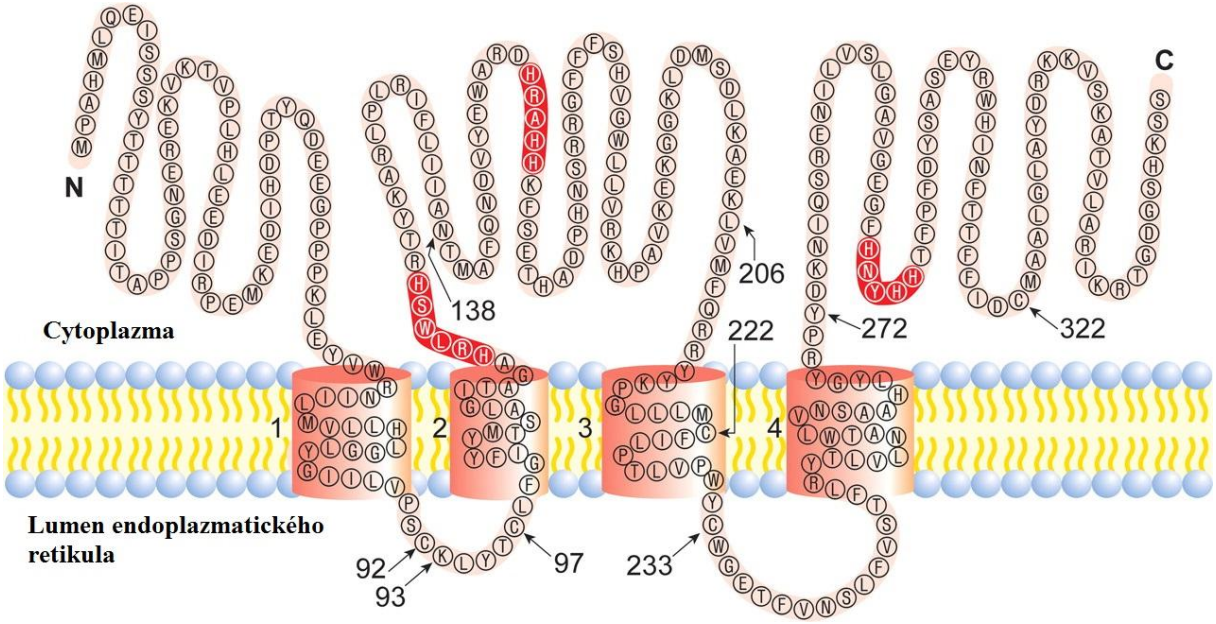
$$Stearoyl - CoA + NAD(P)H + H^+ + O_2 \xrightarrow{\Delta^9-\text{desaturázový systém}} Oleoyl - CoA + NAD(P)^+ + 2H_2O$$

Jde o typický monooxygenázový systém obsahující cytochrom b_5. Gen pro SCD1 je umístěn na 10. chromozomu, 17. chromozom obsahuje ještě inaktivní SCD1 pseudogen (Murray a spol., 2002; Ntambi, 1999; Paton a Ntambi, 2009; Voet a Voetová, 1995).

Endogenně desaturázoutvořené mononenasycené mastné kyseliny jsou hlavním substrátem pro syntézu jaterních triacylglycerolů a esterů cholesterolu. Možným fyziologickým vysvětlením potřeby exprese SCD pro jejich syntézu je produkce snáze přístupných MUFA v bezprostřední blízkosti acyl-CoA-cholesterolacyltransferázy, diacylglycerol-acyltransferázy a mikrozomální glycerolfosfát-acyltransferázy (Man a spol., 2006).

Celkově lze říci, že Δ^9 desaturázy ovlivňují složení mastných kyselin, fosfolipidů a triacylglycerolů. Vliv na složení fosfolipidů je důležitý při udržování fluidity membrán a jeho změny jsou součástí u mnoha různých chorobných stavů (Ntambi, 1999).

SCD1 obsahuje čtyři transmembránové domény s oběma N- a C-konci orientovanými do cytosolu. Jednotná cytoplazmatická smyčka a C-konec obsahují osm histidinových zbytků, známých jako histidinové boxy, které vážou železo v katalytickém centru desaturázy. Dvě smyčky nacházející se v lumenu endoplazmatického retikula jsou relativně malé ve srovnání s cytosolovou smyčkou (Paton a Ntambi, 2009).



Obr. 2.7: Model membránové topologie myší SCD1

Zdroj: http://ajpendo.physiology.org/content/297/1/E28/F2.large.jpg, upraveno, cit. 12. 5. 2015

SCD1 je nejvíce exprimována v tukové a jaterní tkáni. Vykazuje 85 % podobnost s myšími izoformami SCD1 až SCD4 (Flowers a Ntambi, 2008).

Pokusy na myších ukázaly, že SCD-deficientní myši jsou chráněny před obezitou, zatímco obézní myši mají vysoké hladiny SCD. SCD1 je u člověka úzce spjata s expresí PPARγ. PPARγ up-regulace SCD1 vede ke zvýšené lipogenezi (Yao-Borengasser a spol., 2008).

Studie dokázaly, že jaterní SCD1 je klíčovým enzymem v rozdělení tuku v játrech. Nutriční a hormonální regulace SCD1 je v souladu se syntézou lipidů za podmínek zvýšené potřeby lipogeneze. Přímým účinkem deficitu SCD1 v játrech je snížení množství tuků zvýšením oxidace a blokováním lipogeneze (Dobrzyn a Ntambi, 2005).

Další studie prokázaly pozitivní korelaci mezi aktivitou SCD1 a indexem BMI (body mass index), diastolickým tlakem, hodnotou celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolů (TG). Naopak negativní korelaci vykazuje SCD1 oproti HDL částicím ($P \leq 0{,}019$) (Murakamia a spol., 2008).

Pokud je SCD1 blokována, buňky již nemohou tvořit normální množství mononenasycených mastných kyselin, které jsou potřebné pro syntézu VLDL a TG. Pokud se tak stane, mohou značně vzrůst hladiny nasycených mastných kyselin. Vědci v roce 1970 oznámili, že mastné kyseliny inhibují acetyl-CoA karboxylázu 1 a 2 (ACC1 a

ACC2), které produkují malonyl-CoA. Takové hromadění nasycených mastných kyselin může tedy působit snížení úrovně malonyl-CoA a stimulovat vstup MK do mitochondrií a obrátit spalování tuků (Paton a Ntambi, 2009).

Na základě orálního glukózového tolerančního testu (OGTT) a inzulinového clampu bylo zjištěno, že cirkulující palmitooleát určuje citlivost na inzulín. U osob, které zpočátku měly vysoké hladiny palmitooleátu, bylo častěji pozorováno zvýšení citlivosti na inzulín, nehledě na index BMI, ve srovnání s pacienty s nízkými hladinami. Z toho se dá usuzovat, že palmitooleát by mohl být zapojen do regulace citlivosti na inzulín u lidí. Hladina palmitooleátu s největší pravděpodobností není ovlivněna skladbou přijímané stravy, nýbrž *de novo* lipogenezí v tukové tkáni. A právě SCD1 je klíčový enzym pro přeměnu palmitátu na palmitooleát (Stefan a spol., 2010).

Jaterní enzym SCD1, stanovený z mastných kyselin v sérových VLDL-TG, negativně koreluje s obsahem tuku v játrech. Protože vztah jaterní SCD1 a obsahu tuku v játrech, a skutečnost, že tuk v játrech je úzce spjat s jaterní inzulínovou rezistencí napovídá, že SCD1 může ovlivňovat regulaci citlivosti na inzulín cestou regulace akumulace tuku v játrech (Stefan a spol., 2008).

2.4.2 Stearoyl-CoA desaturáza 5

U myší nalézáme 4 izoformy SCD1 až SCD4, oproti tomu u lidí se vyskytují izoformy jen dvě, kromě výše zmíněné SCD1 je to i SCD5. SCD5 je nejhojněji exprimována v mozku a pankreatu. Zvýšená exprese SCD5 mRNA byla zjištěna u osob trpících Alzheimerovou chorobou. Podobně jako SCD1 i SCD5 provádí desaturaci nasycených mastných kyselin. Podporuje také proliferaci a potlačuje diferenciaci neuronů (Flowers a Ntambi, 2008; Sinner a spol., 2012).

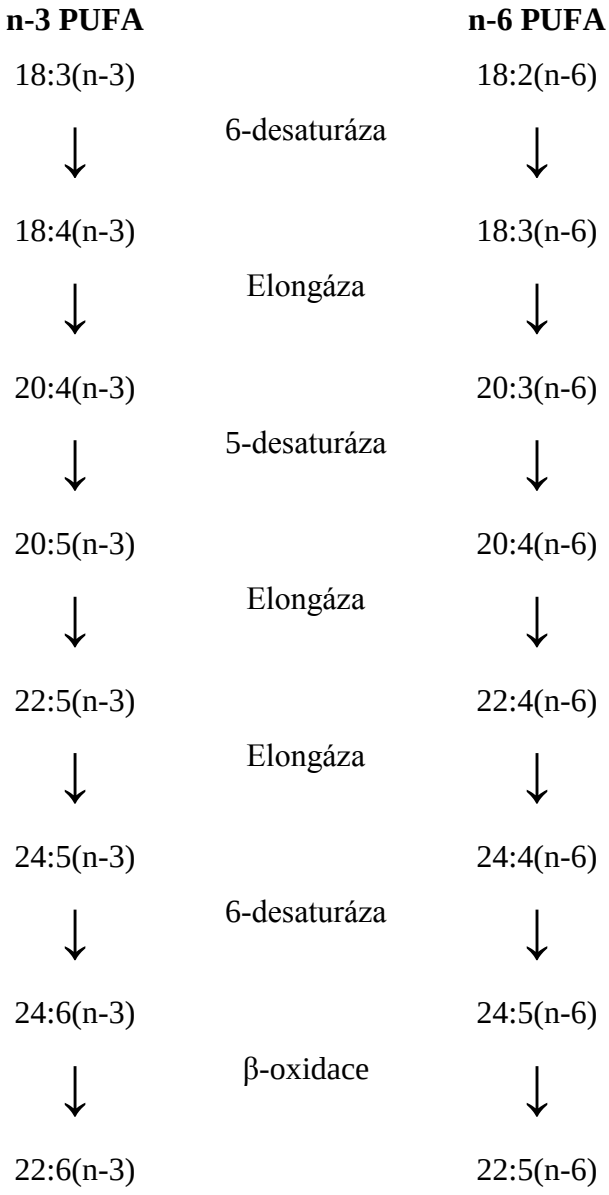
2.4.3 Ostatní desaturázy

Dalšími desaturázami mastných kyselin jsou Δ^5desaturáza (D5D) a Δ^6 desaturáza (D6D). Obě jsou membránově vázané proteiny, jsou složeny celkem ze 444 aminokyselin, obsahují tři histidinové boxy, N- a C-konec a na N-konci se váže cytochrom b_5. Tyto desaturázy jsou kódovány geny FADS (fatty acid desaturase) – FADS1 pro D5D a FADS2 pro D6D. FADS1 i 2 jsou lokalizovány na jedenáctém chromozomu v oblasti 11q12-13.1 (Abdelmagid a spol., 2015; Bokor a spol., 2010; Lattka a spol., 2010).

Výzkumy ukázaly, že jaterní indexy D5D ani D6D nesouvisí s množstvím tuku v játrech ani s citlivostí na inzulín. Studie s mladými dívkami v Japonsku ukázala, že aktivita D6D vykazuje pozitivní asociaci s BMI, systolickým tlakem krve a koncentrací

triacylglycerolů ($P \leq 0{,}045$). U D5D byla nalezena nezávislá negativní asociace s BMI indexem, systolickým tlakem krve, koncentrací triacylglycerolů a inzulínem ($P \leq 0{,}007$) (Murakamia a spol., 2008; Stefan a spol., 2008).

Jelikož přísun PUFA potravou není dostatečný, ukazuje se význam D5D i D6D, které se spolu s elongázou zapojují do syntézy PUFA z esenciálních řady n-3 a n-6. Prekurzorem pro řadu n-3 PUFA je kyselina α-linolenová a pro řadu n-6 PUFA je to kyselina linolová. PUFA mají antiaterogenní a antitrombotický účinek, jsou navíc prekurzorem pro vznik eikosanoidů a prostaglandinů (Araya a spol., 2010; Lattka a pol., 2010; Tvrzická a spol., 2009a; Tvrzická a spol., 2009b).



Obr. 2.8: Desaturace a elongace esenciálních mastných kyselin

Mastné kyseliny spolu soutěží o stejné desaturační enzymy. Afinita D5D a D6D není ke všem substrátům stejná a klesá v řadě n-3 > n-6 > n-9 (Cormier a spol., 2014).

2.4.4 Elongázy

Elongázy jsou membránově vázané enzymy lokalizované v endoplazmatickém retikulu, jenž prodlužují acyl mastné kyseliny vázaný na CoA na acyl-CoA o 2 uhlíky delší za pomoci malonyl-CoA jako donoru acetylu a NADPH jako reduktantu. V podstatě se jedná o obrácenou β-oxidaci (Murray a spol., 2002; Xue a spol., 2014).

Elongace je dosaženo čtyřmi samostatnými enzymatickými reakcemi: kondenzací mezi acyl-CoA a malonyl-CoA za vzniku 3-ketoacyl-CoA, redukcí tohoto produktu vzniká 3-hydroxyacyl-CoA, který se dehydratuje ve prospěch trans-2-enoyl-CoA, který se nakonec redukuje za vzniku prodlouženého acyl-CoA (Guillou a spol., 2010).

Počáteční a rychlost kontrolující kondenzační reakce je katalyzována elongačními enzymy známými jako ELOVLs (Elongation of very-long-chain fatty acids). Do této doby bylo identifikováno 7 ELOVL proteinů. ELOVL1, 3, 6 a 7 preferují jako substrát nasycené a mononenasycené mastné kyseliny, ELOVL4 se účastní biosyntézy MK s velmi dlouhým řetězcem od 26 uhlíků, zatímco ELOVL2, a 5 jsou selektivní pro PUFA (Cormier a spol., 2014; Logan a spol., 2014; Xue a spol., 2014).

Na studii s mladými Japonkami (ve věku od 18 do 22 let) bylo prokázáno, že elongázová aktivita negativně koreluje s indexem BMI, krevním tlakem a koncentrací triacylglycerolů. Naopak byla objevena pozitivní asociace s částicemi HDL ($P \leq .026$) (Murakamia a spol., 2008).

2.4.5 Vyjadřování aktivity lipidických enzymů indexy

Aktivitní index SCD1 je vyjadřován jako poměr 18:1(n-9)/18:0 – D9D aktivita. Bylo také prokázáno, že poměr 16:1(n-9)/16:0 ve VLDL-TG frakci nalačno pozitivně koreluje s expresí jaterní SCD1 mRNA. Dále, 20:4(n-6)/20:3(n-6) a 18:3(n-6)/18:2(n-6) představují indexy jaterní D5D a D6D aktivity. (Peter a spol., 2009; Stefan a spol., 2008).

Jako aktivitní index pro elongázu se používá 18:0/16:0 (Szabó a spol., 2004; Yamagishi a spol., 2008).

2.5 Diabetes mellitus typu 2

Diabetes mellitus (DM), často označován jako cukrovka, v historii znám pod pojmem úplavice cukrová, je klinický syndrom porušeného metabolismu s nepřiměřenou hyperglykémií v důsledku buď absolutního deficitu inzulínu, snížení jeho biologické účinnosti, nebo kombinací obou těchto principů. Podle toho diabetes dále dělíme (Greenspan a Baxter, 2003; Perušičová a Anděl, 2000; Rybka, 2007).

Manifestuje se v kterémkoli věku, nejčastěji po dosažení čtyřiceti let. Příznaky při diagnóze DM druhého typu nejsou obvykle zvlášť typické, záchyt je často náhodný, a to je důvodem pro to, že jej často diagnostikujeme již s klinickými projevy specifických mikroangiopatických komplikací. Část nemocných má již v době záchytu onemocnění i jiné klinické projevy metabolického syndromu (Rybka, 2007).

Do této skupiny spadá 90 % diabetiků. Označujeme ho NIDDM (non-inzulíndependentní diabetes mellitus), i když nezávislost na exogenní dodávce inzulínu není pravidlem. V krvi je inzulínu dostatek, nebo dokonce nadbytek, ovšem inzulinová rezistence (IR) ve tkáních klade na jeho produkci pro udržení glykémie stále větší nároky a β-buňky časem atrofují. Zvýšená hladina glukózy v krvi dává vzniku produktům neenzymatické glykace, z nichž nejznámější je glykovaný hemoglobin, který se používá v diagnostice diabetu. (Racek a spol., 2006; Trojan a spol., 2003).

V období několika až dvaceti let před vznikem diabetes mellitus typu 2 (DM2) se vyskytuje metabolický syndrom, který je charakteristický abdominální obezitou, inzulinovou rezistencí, dyslipidémií a hypertenzí. Metabolický syndrom není rizikovým faktorem jen pro vznik DM2, ale také aterosklerózy. Vznik metabolického syndromu není dosud plně pochopen, podílí se na něm řada faktorů souvisejících s životním stylem, ale i genetická predispozice (de Souza a spol., 2012; Pelikánová a spol., 2010; Perušičová a spol., 2012; van Dijk a spol., 2009).

Potíže u diabetiků plynou z nedostatku inzulínových receptorů na kompetentních buňkách. Zvýšená tvorba inzulínu je snad důsledkem přejídání (obezita je téměř vždy následkem přejídání) a ve svých důsledcích vede k potlačení syntézy inzulinových receptorů (na plazmatickou membránu vázaných glykoproteinů). Tato hypotéza je v souladu s poznatkem, že dieta sama o sobě je často dostatečně účinným prostředkem regulace tohoto typu diabetu (Voet a Voetová, 1995).

Jeden z nejvíce alarmujících faktů je výskyt DM2 u adolescentů. Dříve byl DM2 považován za onemocnění středního věku a starších. Ačkoli je stále pravda, že tato věková

skupina vykazuje vyšší relativní rizika (oproti mladším ročníkům) i incidenci, hromadí se znepokojující důkazy, že nástup mezi 20. a 30. rokem života nebude žádnou raritou. Nyní bývá DM2 diagnostikován dokonce i u dětí (Feinglos a Bethelová, 2008).

2.5.1 Inzulínová rezistence

IR je nedostatečná biologická odpověď na dané množství inzulínu. Chyba v odpovědi může být na prereceptorové, receptorové nebo postreceptorové úrovni. Geneticky podmíněné (primární) poruchy vznikající v dětství na úrovni cílových buněk a jsou sdruženy s celou řadou dalších poruch (Pelikánová, 2002).

Klinicky velmi významné jsou sekundární inzulínové rezistence receptorového typu, ale především postreceptorového typu. Projevují se ve středním a vyšším věku a k jejich uplatnění přispívají zevní faktory (obezita, přejídání, tučná strava, nízká fyzická aktivita a kouření).

Inzulínovou rezistenci lze navodit i nadměrnými dávkami inzulínu. Opakované stavy s hypoglykémií vedou k nárůstu hmotnosti a k zanoření inzulínových receptorů do buněk a tím k progresi inzulínové rezistence (Rušavý a Kreuzbergová, 2003).

Za základní odchylku se považuje IR v metabolismu glukózy, jenž vede ke kompenzatornímu hyperinzulínizmu. Vlivem hyperinzulínémie se zvyšují některé účinky inzulínu v metabolismu lipidů, proteinů, nukleových kyselin a minerálů, které se dále projeví různými patologickými odchylkami (Pelikánová a spol., 2010).

2.5.2 Diabetes mellitus a poruchy v metabolismu lipidů

V důsledku aktivace hormon-senzitivní lipázy a inhibice lipogeneze je v tukové tkáni aktivována lipolýza, což v důsledku uvolňuje do oběhu větší množství MK. Jejich utilizace inhibuje v řadě tkání utilizaci glukózy a přispívá k rozvoji hyperglykémie a IR.Část MK je v cytoplazmě hepatocytů reesterifikována za vzniku triacylglycerolů a secernována do krve ve formě VLDL. Jejich zpracování v tkáních však v důsledku snížené aktivity lipoproteinové lipázy vázne a vzniká hypertriacylglycerolémie. Protože vysoká koncentrace MK v mitochondriích inhibuje některé enzymy citrátového cyklu, je část vytvářeného acetyl-CoA využita pro syntézu ketolátek a cholesterolu. Všechny ketolátky se vylučují močí, část acetonu (zejména u diabetického kómatu) se eliminuje plícemi. Zvýšená produkce NADH při β-oxidaci podporuje syntézu glycerol-3-fosfátu, jenž je využit pro syntézu triacylglycerolů (Holeček, 2006).

Mezi významné aspekty, které jsou pro patogenezi hyperlipoproteinémií u diabetiků typické, patří schopnost inzulínu regulovat syntézu VLDL v játrech. Inzulín zvyšuje degradaci apoB v cytosolu, a proto stavy, kdy je inzulínu málo, nebo kdy není funkční, vedou k vyšším koncentracím tohoto apoproteinu. Inzulín dále snižuje syntézu proteinu MTP (microsomal triglyceride transfer protein), jehož úkolem je mikrozomální transfer TG. Dále v důsledku poruchy reverzního transportu cholesterolu při hypertriacylglycerolémii vznikají malé denzní LDL částice, které se považují za jedny z nejvíce aterogenních vůbec (Perušičová a Anděl, 2000).

2.5.3 Vyšetření při diabetu

Jelikož cukrovkou trpí velké množství lidí, diabetici jsou velmi nesourodou skupinou pacientů s celou škálou komplikací a přidružených onemocnění. Proto u každého diabetika stanovujeme individuální cíle léčby a léčebný postup s ohledem na věk, celkový zdravotní stav a fyzickou aktivitu nemocného. Musí se brát v úvahu i schopnost spolupráce pacienta a typ jeho zaměstnání (Špitálníková, 2010).

2.5.3.1 Orální glukózový toleranční test

Je-li hodnota glykémie v plazmě (séru) venózní krve v intervalu 6,1 až 6,9 mmol/l, pro konfirmaci diagnózy diabetu se užívá orální glukózový toleranční test. Pacient před testem jí 3 dny stravu bohatou na sacharidy. Test se provádí nalačno. Pacient vypije během 5 až 10 minut 300 ml tekutiny s obsahem 75 g sacharidů. První odběr se provádí před podáním cukerného roztoku, další po jedné a druhé hodině. Podle zjištěných hladin glukózy a průběhu křivky se následně usuzuje na diagnózu. V případě nálezu hladiny po dvou hodinách nad 11,1 mmol/l, je diagnóza diabetes mellitus jednoznačně stanovena. V případě hodnoty glukózy do 11,1 mmol/l se jedná o porušenou glukózovou toleranci (Gunderson a spol., 2012; Racek a spol., 2006).

V případě porušené absorpce glukózy ze střeva se provádí intravenózní glukózový toleranční test (IGTT). U tohoto provedení však chybí stimulace sekrece inzulínu enterohormony (Racek a spol., 2006).

2.5.3.2 Euglykemický hyperinzulinemický clamp

Toto vyšetření je zlatým standardem měření inzulinové rezistence. Koncentrace inzulínu je udržována na určité hladině (50 – 5000 mU/l) podáním exogenního inzulínu. Množství exogenní glukózy, které musí být podáno, aby se udržela absolutní euglykémie,

vyjadřuje citlivost na inzulín. Čím nižší je potřeba exogenní glukózy, tím vyšší je inzulínová rezistence pacienta (Pisprasert a spol., 2013; Racek a spol., 2006).

2.5.4 Krátkodobá kompenzace diabetu

Okamžitou hladinu glukózy vyjadřuje jednorázová glykémie, vyšetření je spíš orientační a diabetici si jej provádějí sami. Referenční hodnoty glykémie nalačno jsou v celé krvi 3,3 – 5,6 mmol/l, v séru pak 3,6 – 6,1 mmol/l (Racek a spol., 2006).

Při určování inzulínové terapie se využívá malý a velký glykemický profil. Malý glykemický profil je tvořen obvykle 3–5 měřeními, před hlavními jídly a eventuálně před spaním a v noci. Velký glykemický profil (6–8 měření) je kontrola glykémie prováděná před každým hlavním jídlem a dvě hodiny po něm, před spaním a ve 2 hodiny ráno (Špitálníková, 2010).

Dalším vyšetřením, které ukazuje kompenzaci hladiny glukózy u diabetika, je glykemický index (GCI). Provádí se celkem 9 odběrů a glykemický index se vypočítá dle vzorce:

$$GCI = M + (Glu_{max} - Glu_{min})/2$$

Kde M je průměrná hodnota z devíti odběrů a $Glu_{max\ a\ min}$ jsou nejvyšší a nejnižší hodnota glykémie. Hodnoty GCI do 10 ukazují na velmi dobrou kompenzaci diabetika, nad 20 pak kompenzaci neuspokojivou. Doplňkovým vyšetřením může být stanovení glykosurie, jenž má význam pro určení denních ztrát glukózy močí (Racek a spol., 2006).

2.5.5 Dlouhodobá kompenzace diabetu

Glykovaný protein vzniká neenzymatickou glykacína ε-aminoskupinu lyzinu plazmatických bílkovin, převážně albuminu. Takto modifikované bílkoviny zůstávají v krevní plazmě až do svého odbourání. Glykovaný protein poskytuje představu o stavu glykémie za posledních 14 až 21 dní (Racek a spol., 2006).

Neenzymatickou glykací hemoglobinu (Hb) vzniká glykovaný hemoglobin (GHb), konkrétně tedy nejstabilnější frakce HbA1c, ukazuje vývoj hladiny cukru v krvi 2 až 3 měsíce zpět. Pokud se v krvi objeví glukóza v nadbytku, váže se na hemoglobin přítomný v červených krvinkách. Podle množství takto změněného hemoglobinu v krvi můžeme usuzovat, v jakém rozmezí se množství glukózy v krvi pohybovalo v uplynulých dnech života erytrocytů. Je-li cukrovka dobře léčena, měly by se hodnoty glykovaného hemoglobinu pohybovat v rozmezí 43 až 53 mmol/mol (Hanas a John, 2010; Špitálníková, 2010).

2.6 Stanovení mastných kyselin

Ke stanovení mastných kyselin se používají chromatografické techniky. Ať už samostatně, či v kombinaci více přístupů. Příkladem může být předrozdělení plazmatických lipidů tenkovrstevnou chromatografií (TLC – thin layer chromatography) a následná analýza methylesterů příslušných MK pomocí plynové chromatografie (GC – gas chromatography).

Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují (separují) složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Může být ovšem použita i k účelům preparativním.

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze (SF) je nepohyblivá, mobilní fáze (MF) je pohyblivá. Analytje umístěn na začátek stacionární fáze. Pohybem MF přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být SF zachycovány, a proto při pohybu dochází k jejich retenci. Více se zdrží složky, které SF poutá silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec SF se dostávají dříve složky s menší retardací (Klouda, 2003).

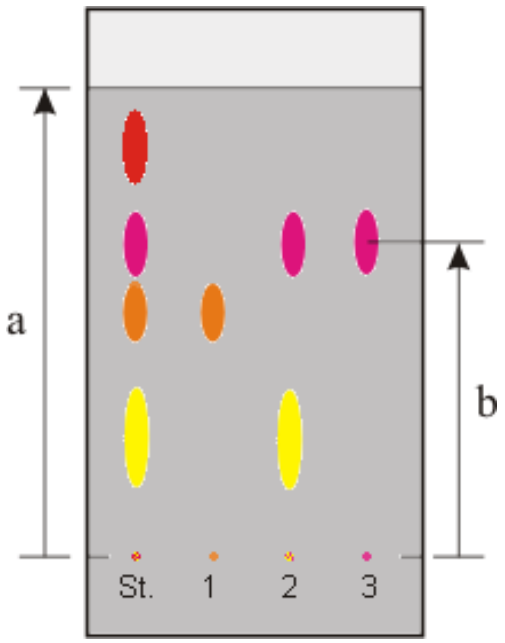
2.6.1 Chromatografie na tenké vrstvě

V této chromatografické technice je SF umístěna v ploše. V případě užití pro dělení plazmatických lipidů jde o metodu preparativní a jako SF se používá silikagel nanesený na skleněné desce. Na povrch desky se vzorek ve vhodném těkavém rozpouštědle nanáší pomocí kapiláry na startovní linii. Po odpaření rozpouštědla se deska ponoří do MF. Systém se umístí v prostoru nasyceném parami MF.MF vzlíná tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil, pohybuje se přes start a unáší s sebou složky vzorku tím rychleji, čím méně se poutají na SF a čím lépe jsou rozpustné v MF. Vzorek se rozdělí na zóny obsahující jednotlivé složky. Vyvíjení se ukončí před dosažením konce plochy a označí se čelo (Klouda, 2003).

Po zviditelnění pomocí vhodných detekčních činidel (kyselina fosfomolybdenová, 2,7-dichlorfluorescein) se v případě lipidů přistupuje k seškrabání vrstvy a následné extrakci (Peter a spol., 2009, Smolková a Feltl, 1991).

Kvalitativním parametrem je podíl vzdálenosti středu skvrny od startu a čela od startu. Nazývá se retenční (retardační) faktor R_F:

$$R_F = \frac{vzdálenost\ středu\ skvrnyodstartu}{vzdálenostčelaodstartu}$$



Obr. 2.9: Znázornění retenčního faktoru

Popisky: a – vzdálenost čela od startu, b – vzdálenost skvrny od startu

V daném systému a za daných podmínek je retenční faktor pro určitou látku konstantou (Klouda, 2003).

2.6.2 Plynová chromatografie

Vzorek se dávkuje do proudu plynu, který jej dále unáší kolonou. Proto se MF nazývá nosný plyn. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na SF. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek.

Pro nutnost přeměny analytů v plyny můžeme separovat takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovaných kapalin a pevných organických molekul a mnoha organokovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí. Častým postupem je chemická změna (derivatizace) analytů nevyhovujících vlastností na deriváty, které mohou být v analýze plynovou chromatografií použitelné.

Plynový chromatograf se tedy skládá ze zdroje nosného plynu, čistícího zařízení, regulačního systému, dávkovače (nástřik do kolony, pomocí děliče toku, bez děliče toku,

koncentrátor na počátku kolony), dále z vlastní kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Dávkovač, kolona a detektor jsou umístěny v termostatu. Teplota kolony se může programově měnit, když zpravidla po určitém izotermickém úseku se zvyšuje na další hodnotu rychlostí 30 – 40 °C/min. Běžně pracujeme při teplotách 50 – 300 °C (Klouda, 2003; Smolková a Feltl, 1991)

2.6.2.1 Detektory v plynové chromatografii

Funkcí detektoru je převádění analytických vlastností analyzované látky na hodnoty, které lze registrovat. Analytickou vlastností je jakákoli vlastnost látky, která je v přesně definovaném vztahu ke kvalitě a množství látky. Působením vlastnosti na čidlo schopné registrovat tuto vlastnost vzniká signál (Smolková a Feltl, 1991).

Nejčastěji uplatňovanými detektory v GC pro MK jsou plamenový ionizační detektor (FID – Flame Ionization Detector) a hmotnostní spektrometr (MS – Mass Spectrometry) FID je nejrozšířenějším detektorem v plynové chromatografii. Princip spočívá v ionizaci molekul eluovaných látek v difúzním kyslíko-vodíkovém plameni. Přítomnost složky zvýší ionizaci a tím i elektrický proud mezi elektrodami. V případě MS je nejběžnější spojení GC/MS s konvenční elektronovou ionizací. Nepostradatelné je spojení GC/MS tam, kde se provádějí identifikace neznámých složek směsí. Pro každou složku lze získat její hmotnostní spektrum a identifikovat ji porovnáním jejího spektra s knihovnou spekter sloučenin uloženou v počítači (Klouda, 2003).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Popis vzorků a jejich rozdělení do skupin

V této práci byly zpracovávány vzorky EDTA plazmy pacientů s diagnózou Diabetes mellitus 2. typu. Tyto vzorky biologického materiálu byly též použity pro verifikaci analtických parametrů metod na Oddělení klinické biochemie Krajské nemocnice Pardubice, a.s. Dále byly použity vzorky zdravých dárců, jakožto kontrol.

Žilní krev byla odebrána do speciálních zkumavek pro diagnostiku diabetu s antiglykolytickým činidlem fluoridem sodným a s kyselinou ethylendiaminotetraoctovou (EDTA) za standardních podmínek, to je mezi 7 a 8 hodinou ranní po nočním lačnění. Krev byla následně centrifugována (15000 g po dobu 20 min) a vzorky plazmy byly uchovávány ve zmraženém stavu při teplotě -80 °C v polypropylenových zkumavkách. Následně byly zpracovávány metodou tenkovrstevné chromatografie s navazující chromatografií plynovou s možným předrozdělením lipoproteinů preparativní ultracentrifugací.

Tyto vzorky byly za účelem zpracování v disertační práci rozděleny do třech skupin podle úrovně glykovaného hemoglobinu (viz. Tabulka 3.1). Tento ukazatel se jeví jako nejspolehlivější, jelikož není ovlivněn špatnými podmínkami (například nedodržení lačnění) před odběrem; a osvětluje vývoj glykémie v posledních 4 až 6 týdnech.

Tab. 3.1: Rozdělení vzorků dle úrovně glykovaného hemoglobinu

Skupina	Glykovaný Hb [mmol/mol]
Zdraví dárci	20 – 42
Kompenzovaní diabetici	43 – 53
Nekompenzovaní diabetici	54 a více

3.1.1 Kritéria pro přijetí vzorků

Bylo nutno eliminovat rušivé vlivy na profil mastných kyselin v plazmě. Výběr vzorků pacientů i dárců se proto pro potřeby disertační práce řídil množinou pečlivě zvolených vstupních kritérií.

Pacienti byli starší třiceti let, obojího pohlaví s diagnostikovaným diabetem 2. typu po dobu minimálně tří let (popřípadě do jednoho roku od diagnostikování v případě prvozáchytu onemocnění). Pacienti dále dodržovali nízkokalorickou dietu a byly léčeni pouze perorálními antidiabetiky.

Ze studie byli vyloučeni pacienti i dárci s diagnostikovaným diabetem 1. typu, selháním ledvin, jater, štítné žlázy nebo s onkologickým onemocněním. Dále byly vyloučeny osoby pravidelně požívající alkohol a osoby léčené inzulínem.

Žádný z účastníků netrpěl zjevným kardiovaskulárním onemocněním, diabetickou nefropatií či retinopatií. Žádný ze zdravých dárců si nebyl vědom metabolické poruchy, jako je diabetes nebo hyperlipidémie. Nedrželi žádnou specifickou dietu a dlouhodobě neužívali léky. Od všech účastníků byl dále obdržen písemný informovaný souhlas. Studie byly schváleny příslušnými etickými komisemi.

3.2 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Centrifuga Beckman GPR Refrigerated Centrifuge
  Výrobce: Beckman Instruments, Inc., California, USA
- Vakuová ultracentrifuga Optima™ L-90 K Preparative ultracentrifuge
  Výrobce: Beckman Instruments, Inc., California, USA
- Termoblok PIERCE REACTI-THERM HEATING/STIRRING MODULE, www.biotech.cz
- Odpařovací zařízení PIERCE model 18780, REACTIVE-VAP EVAPORATING UNIT
- Pyrexové zkumavky
  Výrobce: Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Staffs, Spojené království, Značka 1636/26MP, 761152 Culture Tube 16x100 SVL SCRE s teflonovým těsněním
- Třepačka Vortex typ: REAX top
  Výrobce: Heidolph instruments GmbH & Co. KG, Walpersdorfer Str. 12, 911 26 Schwabach, Německo
- Plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A GC System
  Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Kolona HP-88, 100 m x 0,250 mm x 0,20 μm, teplotní limit od 50 °C do 250 °C, pro dělení methylesterů mastných kyselin

Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA

- Chromatografické vialky s pryžovým septem, 5188-6599
  Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Inserty do chromatografických vialek, 8010-0132
  Výrobce: Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, Kalifornie 95051, USA
- Rozprašovací sprej, Desaga spray gun
  Dünnschicht-chromatographie, Thin-layer
  Výrobce: Desaga Gmbh D-690 Heidelberg 1, Německo
- Automatické pipety – 100, 200, 500 a 1000 µl
- Chromatografická vana
- Magnetická míchadla
- Mikrozkumavky Eppendorf
- Odměrné válce – 50, 100 ml
- Skleněná kapátka
- Skleněné pipety - 5 a 10 ml
- Špachtle

3.3 Chemikálie a další používaný materiál

1. **Detekční činidlo: 2,7-dichlorfluorescein v 2-propanolu**
   - Isopropylalkohol, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8%, Mr = 60,1, hustota 785 kg/m^3
     Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
   - 2,7-dichlorfluorescein, ≈ 90%, balení 5 g
     Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie Gmbh, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo
2. **Mobilní fáze (hexan:diethylether:kyselina octová)**
   - n-hexan, p.a., balení 1000ml, obsah 99%, Mr = 86,18, hustota 659 kg/m^3
     Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
   - Diethylether, p.a., nestabilizovaný, balení 1000 ml, obsah 99,7%, Mr = 74,12, hustota 714 kg/m^3
     Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

- Kyselina octová, čistá, balení 1000 ml, obsah 99%, Mr = 60,05, hustota 1050 kg/m^3
  Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR

3. Deproteinační roztok (2-propanol:n-heptan:kyselina fosforečná)

- Isopropylalkohol, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8%, Mr = 60,1, hustota 785 kg/m^3
  Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
- n-heptan, pro UV spektroskopii, balení 900ml, hustota 680kg/m^3
  Výrobce: LACHEMA Brno, Karásek 1, 621 33 Brno, ČR
- Kyselina fosforečná, p.a., balení 1000 ml, obsah 85%, Mr = 98, hustota 1710 kg/m^3
  Výrobce: CHEMAPOL Praha, ČR

4. Interní standard

- Kyselina cis-13,16,19 dokosatrienová
  Výrobce: Larodan Fine Chemicals AB, Limhamnsgårdens allé 9, SE 216 16 Malmö, Švédsko

5. Ostatní chemikálie

- Acetylchlorid, Reagent Plus > 99%, balení 50 g
  Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie Gmbh, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo
- Bromid draselný, p.a., balení 500 g, Mr = 119,01
  Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- EDTA ≥ 98%, balení 50 g, Mr = 292,24
  Výrobce: SIGMA-ALDRICH Chemie Gmbh, Reidstrasse 2, 895 55 Steinheim, Německo
- Chlorid sodný, p.a., balení 500 g, Mr = 58,44
  Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR
- Chloroform, p.a., stabilizovaný, balení 1000 ml, obsah 99,8%, Mr = 119,38
  Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
- Methylalkohol, p.a., balení 1000 ml, obsah 99,8%, Mr = 32,04, hustota 791 kg/m^3
  Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
- Toluen, p.a., balení 1000 ml, obsah 99%, Mr = 92,14, hustota 867 kg/m^3
  Výrobce: PENTA, Ing. Petr Švec, Wuchterlova 16, 160 41 Praha 6, ČR
- Uhličitan draselný, bezvodý, p.a., balení 1000 g, Mr = 138,21
  Výrobce: Lach-Ner, s.r.o., Tovární 157, 277 11 Neratovice, ČR

6. Tlakové láhve

- Dusík: N_2 4.0, UN 1066
  Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
- Helium: He 5.0, UN 1046
  Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
- Vodík: H_2 5.0, UN 1049
  Výrobce: Linde Gas a.s., U Technoplynu 1324, 198 00 Praha 9, ČR
- Vzduch syntetický: 80% N_2, 20% O_2
  Výrobce: Linde Gas Hungary Co.Cltd., H-9653 Répcelak, Maďarsko

7. Chromatografické desky

- TLC Silica gel 60, 25 Glass plates 20x20 cm, balení 25 kusů, číslo produktu 1057210001
  Výrobce: MERCK, 642 71 Darmstadt, Germany

3.4 Postup práce

3.4.1 Ultracentrifugace

Pro rozdělení krevních lipoproteinů byla zvolena ultracentrifugace. Do ultracentrifugačních zkumavek bylo napipetováno 1,5 ml roztoku NaCl o hustotě 1,006 g/ml (11,2 g NaCl, 0,1 g EDTA a 1 ml 1M NaOH doplněno v odměrné baňce na objem 1 l) a následně opatrně podvrstveno 1,5 ml plazmy. Zkumavky byly poté dováženy na jednotnou hmotnost (možná změna na čtvrtém desetinném místě), pro korekci hmotnosti byl přidáván již dříve použitý roztok NaCl. Ultracentrifugace byla prováděna na preparativní vakuové ultracentrifuze s rotorem MLA-80 (fixní úhel 26°) při 40 000 otáčkách za minutu po dobu 18 hodin za teploty 10 °C. Horní vrstva obsahující VLDL lipoproteiny byla odsáta do čisté zkumavky.

Ke zbytku ve zkumavce obsahujícím LDL a HDL bylo přidáno 1,5 ml roztoku KBr (27,6 g KBr a 0,1 g EDTA doplněno v odměrné baňce na objem 200 ml) o hustotě 1,117 g/ml a zkumavky opět dováženy. Ultracentrifugace byla provedena za stejných podmínek, jako při oddělení VLDL. Po jejím ukončení byla odebrána horní vrstva LDL a ve zkumavce zbyla HDL frakce.

3.4.2 Denaturace bílkovin a extrakce lipidů

Do pyrexové zkumavky s víčkem bylo pipetováno 500 µl plazmy (popřípadě VLDL, LDL nebo HDL frakce plazmy). Dále bylo přidáno 2,5 ml deproteinačního roztoku ve

složení: 2-propanol, n-heptan a 2M H_3PO_4 v poměru 40:20:1. Vzniklá směs byla promíchána na mixeru vortexového typu a po dobu deseti minut ponechána kondicionovat při pokojové teplotě. K obsahu ve zkumavce byl přidán 1 ml směsi toluen-methanol (4:1) a 1,5 ml destilované vody. Vzniklá směs byla deset minut centrifugována při 3000 otáčkách za minutu. Horní organická vrstva byla přepipetována do čisté zkumavky a v digestoři pod dusíkem odpařena při pokojové teplotě do sucha.

3.4.3 Metoda tenkovrstevné chromatografie

- **Příprava chromatografické desky**

  Na TLC desky byly měkkou tužkou vyznačeny jednotlivé dráhy, start a čelo. Linie startu byla umístěna 2,5 cm od spodního okraje desky, čelo ve vzdálenosti 1 cm od jejího horního okraje. Plocha byla následně rozčleněna do šestice drah o šířce 3 cm, přičemž po obou okrajích desky byly vyznačeny okraje šířky 1 cm.

- **Příprava mobilní fáze**

  Mobilní fáze byla vytvořena smíšením 160 ml hexanu, 40 ml diethyletheru a 6 ml kyseliny octové, 98%. Tato směs byla nalita do chromatografické vany, která byla uzavřena a ponechána nasytit parami po dobu 30 až 40 minut před vložením chromatografické desky.

- **Vlastní chromatografie**

  Odparek byl rozpuštěn v 75 µl směsi chloroform-methanol (2:1) a pomocí skleněných kapátek postupně nanesen celý objem pěti vzorků a standardu (byla použita pool plazma) na startovní čáru chromatografické desky. Mezi jednotlivými nanášecími kroky byl dostatečný časový prostoj, který umožnil odpaření rozpouštědla. Bylo dbáno, aby nedošlo k mechanickému porušení silikagelového povrchu. Pro kvantitativní převedení byly zkumavky ještě propláchnuty 25 µl směsi chloroform-methanol a naneseno stejným způsobem na desku. Takto připravená deska byla vložena do chromatografické vany a ponechána vyvíjet cca jednu hodinu, než vzlínající mobilní fáze dosáhla označeného čela. Poté byla deska vyjmuta z vany a nechána v digestoři vysušit. Tímto bylo dosaženo rozdělení přítomných lipidů do následujících vrstev: fosfolipidy (PL), diglyceridy (DG), volné mastné kyseliny (VMK), triacylglyceroly (TG) a estery cholesterolu (CE).

- **Příprava detekčního činidla, 2,7-dichlorfluoresceinu**

Detekční činidlo bylo připraveno rozpuštěním 0,2 g 2,7-dichlorfluoresceinu ve 100 ml 2-propanolu.

- **Detekce**

  Detekční činidlo bylo za pomoci rozprašovače rovnoměrně rozptýleno po povrchu pole standardudesky. Vizualizace skvrn lipidů se prováděla po zaschnutí pod UV světlem (240 nm).

3.4.4 Metoda plynové chromatografie

3.4.4.1 Izolace jednotlivých složek lipidů

Po denaturaci a chromatografickém rozdělení popsaných v kapitolách 4.4.1 a 4.4.2 byly sérové lipidy rozděleny na 5 složek seřazených podle klesající polarity: fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu. Podle standardu byly označeny jednotlivé složky měkkou tužkou tak, že nad horním i pod dolním okrajem skvrny zbývalo asi 0,5 cm. Takto získaná jednotlivá pole byla vyškrábána z chromatografické desky do předem označených pyrexových zkumavek s uzávěrem s teflonovým těsněním.

3.4.4.2 Derivatizace: převedení na methylestery

Do pyrexových zkumavek obsahujících vyškrábané jednotlivé frakce lipidů byl přidán 1 ml roztoku interního standardu pro plynovou chromatografii o koncentraci 10 µg/ml (rozpuštěn ve směsi toluen-methanol 4:1) a 1 ml směsi toluen-methanol (4:1). Do zkumavek bylo vloženo teflonové mikromíchadlo a následně byly umístěny do termobloku s magnetickým mícháním. Do takto připravených zkumavek bylo pipetováno 200 µl acetylchloridu, který sloužil jako katalyzátor esterifikace. Zkumavky byly uzavřeny uzávěrem s teflonovým těsněním, bylo zapnuto míchání a vyhřívání termobloku na teplotu 100 °C. Při této teplotě probíhala esterifikační reakce po dobu jedné hodiny.

Po uplynutí reakční doby byly zkumavky ochlazeny na pokojovou teplotu stáním v digestoři. Byla provedena neutralizace obsahu za pomoci 5 ml roztoku K_2CO_3, 6%. Po přídavku roztoku uhličitanu byla směs dvě minuty intenzivně míchána a posléze deset minut centrifugována při 3000 otáčkách za minutu. Horní organická fáze byla odpipetována do předem připravené a označené zkumavky. Tato organická fáze byla odpařována v digestoři pod dusíkem na objem cca 100 µl. Vzniklý roztok, obsahující

zakoncentrované lipidické frakce, byl převeden do chromatografických vialek se separačním nástavcem, které byly pečlivě uzavřeny víčkem s pryžovým septem.

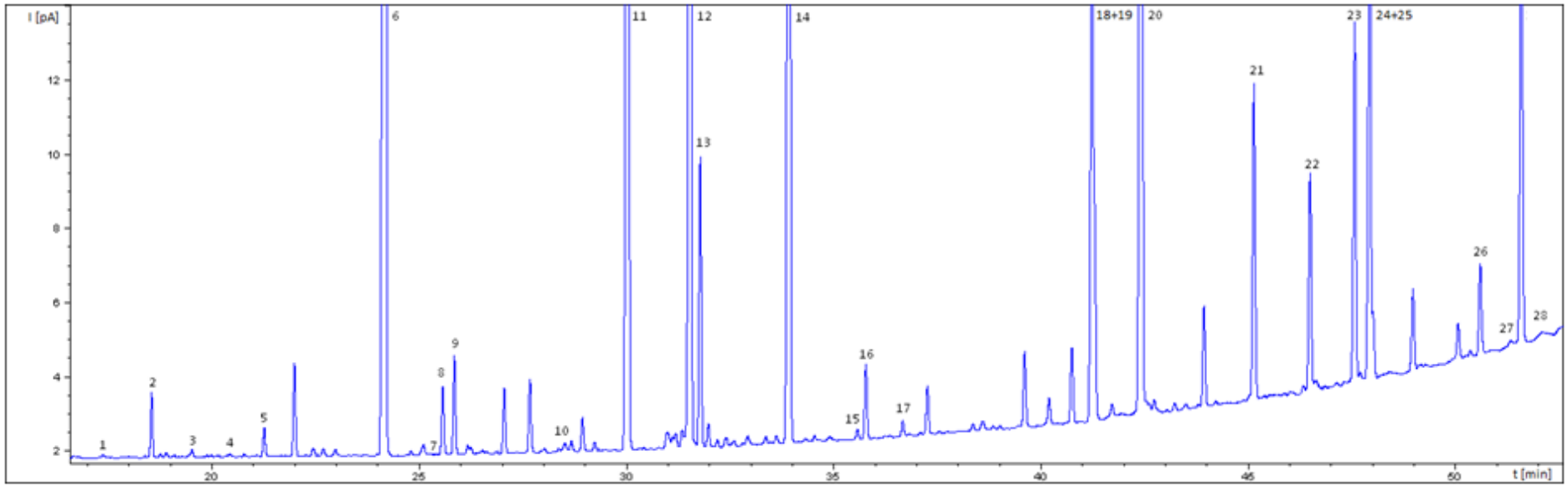
3.4.4.3 Vlastní plynová chromatografie

Vzorky umístěné v dobře uzavřených vialkách byly naskládány do karuselu. Po naprogramování dané sady vzorků byl plynový chromatograf Agilent Technologies 7890AGC System uveden do chodu.

Během mého působení docházelo k úpravám teplotního programu metody a k identifikaci více mastných kyselin. Pro srovnání uvedu původní metodu, se kterou se zde začínalo a nynější používanou metodu.

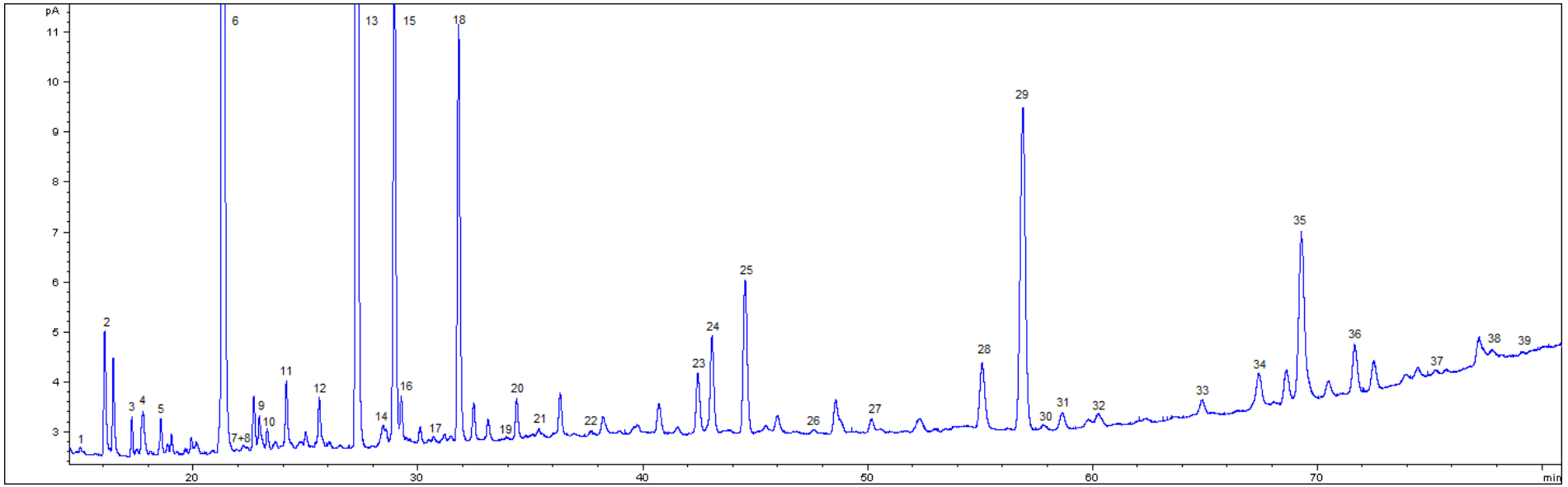
U původní metody bylo možné stanovení 27 mastných kyselin. Teplota nástřiku byla 230 °C a teplota FID detektoru 250 °C při následujícím teplotním programu:130 °C po 1 min → gradient 2 °C/min do 250 °C po 25 min. Výsledný chromatogram znázorňuje obrázek 3.1.

Nynější metoda dovoluje rozdělení 38 mastných kyselin. Teplota nástřiku byla 250 °C a teplota FID detektoru 280 °C při následujícím teplotním programu: 130 °C po 1 min → gradient 2 °C/min do 176 °C po 2 min → gradient 1 °C/min do 186 °C po 1 min → gradient 0,1 °C/min do 190 °C po 1 min → gradient 1 °C/min do 220 °C po 4 min. Celková doba analýzy tak činila 92 minut. Chromatogram z této metody můžeme vidět na obrázku 3.2.



Obr. 3.1: Chromatogram původní používané metody (frakce PL)

Popisky: 1. 12-metyltridekanová kyselina, 2. kyselina myristová, 3. kyselina 13-metylmyristová, 4. kyselina 12-metyltetradekanová, 5. kyselina pentadekanová, 6. kyselina palmitová, 7. kyselina palmitoolejová trans, 8. kyselina palmitoolejová cis, 9. kyselina 14-metylhexadekanová, 10. kyselina isostearová, 11. kyselina stearová12. kyselina olejová, 13. kyselina vakcenová, 14. kyselina linolová, 15. kyselina arachová, 16. kyselina ɣ-linolenová, 17. kyselina α-linolenová, 18. kyselina eikosatrienová, 19. kyselina behenová, 20. kyselina arachidonová, 21. kyselina eikosapentaenová, 22. kyselina cis-13,16,19 dokosatrienová (interní standard), 23. kyselina lignocerová, 24. kyselina dokosatetraenová, 25. kyselina dokosapentaenová, 26. kyselina cerotová, 27. kyselina dokosahexaenová, 28. kyselina nervonová



Obr. 3.2: Chromatogram nynější používané metody (frakce PL)

Popisky: 1. kyselina 12-metyltridekanová, 2. kyselina myristová, 3. kyselina 13-metylmyristová, 4. kyselina 12-metyltertadekanová, 5. kyselina pentadekanová, 6. kyselina palmitová, 7. kyselina palmitoolejová trans, 8. kyselina sapienová, 9. kyselina palmitoolejová cis, 10. kyselina 14-metylhexadekanová, 11. kyselina heptadekanová. 12. kyselina 16-metylheptadekanová, 13. kyselina stearová, 14. kyselina vacénová trans, 15. kyselina olejová, 16. kyselina vakcenová cis, 17. kyselina nonadekanová, 18. kyselina linolová, 19. kyselina ɣ-linolenová, 20. kyselina arachová, 21. kyselina α-linolenová, 22. kyselina stearidonová, 23. kyselina eikosatrienová, 24. kyselina behenová, 25. kyselina arachidonová, 26. kyselina eikosatetraenová, 27. kyselina eikosapentaenová, 28. kyselina lignocerová, 29. kyselina cis-13,16,19 dokosatrienová (interní standard), 30. kyselina dokosatetraenová, 31. kyselina nervonová, 32. kyselina dokosapentaenová N6, 33. kyselina dokosapentaenová N3, 34. kyselina dokoshexaenová, 35. kyselina cerotová, 36. kyselina tetrakosatetraenová, 37. kyselina tetrakosapentaenová N6, 38. kyselina tetrakosapentaenová N3, 39. kyselina tetrakosahexaenová

3.4.4.5 Výpočet aktivitních indexů enzymů

Aktivitní index pro SCD1 byl vyjadřován jako poměr 16:1(n-7)/16:0. Dále, poměry 20:4(n-6)/20:3(n-6) a 20:3(n-6)/18:2(n-6) byly brány jako indexy jaterní D5D a D6D aktivity. Jako aktivitní index pro elongázu byl použit poměr 18:0/16:0.

3.4.4.6 Vyhodnocení výsledků

Získané chromatogramy byly následně integrovány v programu GC ChemStation B04.03 a takto získaná data statisticky zpracována za pomoci softwaru MS Excel 2007, SigmaStat 3.5 a Statistica 12.0.

Tab. 3.2: Přehled názvosloví stanovovaných mastných kyselin

Název dle nomenklatury	Schematický vzorec	Triviální název
12-metyltridekanová k.	12-Me C13:0	isomyristová k.
tetradekanová k.	C14:0	myristová k.
13-metyltetradekanová k.	13-Me C14:0	13-metylmyristová k.
12-metyltetradekanová k.	12-Me C14:0	12-metylmyristová k.
pentadekanová k.	C15:0	pentadecylová k.
hexadekanová k.	C16:0	palmitová k.
trans-9-hexadecenová k.	C16:1(n-7)*trans*	palmitoolejová trans
cis-6-hexadecenová k.	C16:1(n-10)	sapienová k.
cis-9-hexadecenová k.	C16:1(n-7) *cis*	palmitoolejová k. cis
14-metylhexadekanová k.	14-Me C16:0	14-metylpalmitová k.
heptadekanová k.	C17:0	margarová k.
16-metylheptadekanová k.	16-Me C17:0	isostearová k.
oktadekanová k.	C18:0	stearová k.
trans-11-oktadecenová	C18:1(n-7) *trans*	vakcenová k. trans
cis-9-oktadecenová k.	C18:1(n-9)	olejová k.
cis-11-oktadecenová k.	C18:1(n-7) *cis*	vakcenová k. cis
nonadekanová k.	C19:0	nonadecylová k.
all-cis-9,12-oktadekadienová k.	C18:2(n-6)	linolová k.
all-cis-6,9,12-oktadekatrienová k.	C18:3(n-6)	ɣ-linolenová k.
eikosanová k.	C20:0	arachová k.
all-cis-9,12,15-oktadekatrienová k.	C18:3(n-3)	α-linolenová k.

Název dle nomenklatury	Schematický vzorec	Triviální název
all-cis-6,9,12,15-oktadekatetraenová k.	C18:4(n-3)	stearidonová k.
all-cis-8,11,14-eikosatrienová k.	C20:3(n-6)	eikosatrienová k.
dokosanová k.	C22:0	behenová k.
all-cis-5,8,11,14-eikosatetraenová k.	C20:4(n-6)	arachidonová k.
all-cis-8,11,14,17-eikosatetraenová k.	C20:4(n-3)	eikosatetraenová k.
all-cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenová k.	C20:5(n-3)	eikosapentaenová k.
tetrakosanová k.	C24:0	lignocerová k.
all-cis-7,10,13,16-dokosatetraenová k.	C22:4(n-6)	dokosatetraenová k.
cis-15-tetrakosenová k.	C24:1(n-9)	nervonová k.
all-cis-4,7,10,13,16-dokosapentaenová k.	C22:5(n-6)	dokosapentaenová k.
all-cis-7,10,13,16,19-dokosapentaenová k.	C22:5(n-3)	dokosapentaenová k.
all-cis-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová k.	C22:6(n-3)	dokosahexaenová k.
hexakosanová k.	C26:0	cerotová k.
all-cis-9,12,15,18-tetrakosatetraenová k.	C24:4(n-6)	tetrakosatetraenová k.
all-cis-6,9,12,15,18-tetrakosapentaenová k.	C24:5(n-6)	tetrakosapentaenová k.
all-cis-9,12,15,18,21-tetrakosapentaenová k.	C24:5(n-3)	tetrakosapentaenová k.
all-cis-6,9,12,15,18,21-tetrakosahexaenová k.	C24:6(n-3)	tetrakosahexaenová k.

3.5 Analytické parametry metody

Opakovatelnost vyjadřuje preciznost za stejných pracovních podmínek v krátkém časovém období. Podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení v krátkém časovém rozmezí. Ukazatelem opakovatelnosti je mez opakovatelnost, pro kterou se se specifikovanou pravděpodobností předpokládá, že pod ní leží absolutní rozdíl výsledků dvou nezávislých zkoušek získaných za podmínek opakovatelnosti. Mez opakovatelnosti r se vypočte jako 2,8mi násobek směrodatné odchylky výsledků za podmínek opakovatelnosti. Mez opakovatelnosti je spojována vždy s pravděpodobností 95 %, což představuje hladinu významnosti $\alpha = 0,05$.

Opakovatelnost metody byla určována na dvou koncentračních hladinách odpovídajících přídavku 150 µl, respektive 450 µl roztoku mastných kyselin ke zředěnému roztoku pool plazmy. Na každé koncentrační hladině bylo analyzováno 10 vzorků. Následně byla určena směrodatná odchylka měření, variační koeficient a mez opakovatelnosti.

Výsledky opakovatelnosti pro obě koncentrační hladiny jsou obsaženy ve dvou následujících tabulkách 3.3 a 3.4.

Tab. 3.3: Charakteristika opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	r [µmol/l]
isomyristová k.	4,70	4,72	0,48	10,17	1,34
myristová k.	8,56	8,77	0,95	11,04	2,65
13-metylmyristová k.	6,32	6,50	0,73	11,52	2,04
12-metylmyristová k.	7,52	7,54	0,47	6,25	1,32
pentadecylová k.	7,46	7,35	0,72	9,58	2,00
palmitová k.	156,67	155,98	9,29	5,93	26,02
sapienová k.	2,56	2,51	0,42	16,23	1,16
palmitoolejová k. cis	10,05	10,17	0,83	8,26	2,32
14-metylpalmitová k.	2,26	2,22	0,21	9,37	0,59
margarová k.	4,13	4,10	0,16	3,96	0,46
isostearová k.	2,08	2,08	0,15	7,30	0,42
stearová k.	49,78	49,13	4,73	9,50	13,25
vakcenová k. trans	2,52	2,48	0,50	19,72	1,39
olejová k.	94,29	94,50	4,49	4,76	12,58
vakcenová k. cis	8,94	8,96	0,65	7,27	1,82
nonadecylová k.	2,68	2,74	0,20	7,61	0,57
linolová k.	56,25	55,74	5,08	9,02	14,21
ɣ-linolenová k.	2,35	2,23	0,36	15,37	1,01
arachová k.	2,65	2,57	0,23	8,87	0,66
α-linolenová k.	10,90	11,07	0,89	8,12	2,48
stearidonová k.	1,52	1,49	0,20	13,39	0,57
eikosatrienová k.	0,87	0,84	0,09	10,15	0,25
behenová k.	0,18	0,19	0,03	17,76	0,09
arachidonová k.	4,02	3,99	0,28	6,94	0,78
eikosatetraenová k.	0,05	0,05	0,01	26,80	0,04
eikosapentaenová k.	23,57	23,50	2,52	10,68	7,05
lignocerová k.	0,44	0,46	0,10	23,67	0,29

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	r [µmol/l]
dokosatetraenová k.	6,00	6,12	1,58	26,35	4,43
nervonová k.	150,80	153,64	7,78	5,16	21,79
dokosapentaenová k.	1,74	1,77	0,30	17,26	0,84
dokosapentaenová k.	1,02	1,02	0,09	8,40	0,24
dokosahexaenová k.	2,72	2,73	0,40	14,69	1,12
cerotová k.	0,70	0,68	0,19	27,06	0,53
tetrakosatetraenová k.	1,63	1,62	0,29	18,10	0,82
tetrakosapentaenová k.	1,48	1,47	0,21	13,90	0,58
tetrakosapentaenová k.	1,15	1,21	0,20	17,76	0,57
tetrakosahexaenová k.	1,54	1,45	0,37	24,00	1,04

Tab. 3.4: Charakteristika opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	r [µmol/l]
isomyristová k.	11,19	10,92	1,26	11,24	3,52
myristová k.	14,99	15,61	1,74	11,63	4,88
13-metylmyristová k.	13,18	13,29	0,86	6,52	2,41
12-metylmyristová k.	19,64	20,24	2,31	11,75	6,46
pentadecylová k.	10,28	10,37	0,31	3,00	0,86
palmitová k.	382,44	379,64	14,88	3,89	41,66
sapienová k.	5,05	5,10	0,22	4,30	0,61
palmitoolejová k. cis	24,35	24,61	0,90	3,71	2,53
14-metylpalmitová k.	6,23	6,19	0,15	2,47	0,43
margarová k.	11,55	11,56	0,14	1,20	0,39
isostearová k.	5,73	5,73	0,11	1,97	0,32
stearová k.	126,97	126,65	7,19	5,66	20,14
vakcenová k. trans	7,54	7,52	0,12	1,60	0,34
olejová k.	251,12	248,58	8,62	3,43	24,13
vakcenová k. cis	24,66	24,61	0,44	1,79	1,23
nonadecylová k.	8,88	8,89	0,14	1,57	0,39
linolová k.	129,23	129,43	1,57	1,21	4,38

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	r [µmol/l]
ɣ-linolenová k.	6,11	6,10	0,12	2,04	0,35
arachová k.	6,94	6,82	0,26	3,72	0,72
α-linolenová k.	32,02	32,06	0,75	2,33	2,09
stearidonová k.	3,34	3,33	0,15	4,48	0,42
eikosatrienová k.	2,11	2,11	0,06	2,61	0,15
behenová k.	0,17	0,17	0,02	9,11	0,04
arachidonová k.	9,16	9,14	0,18	1,99	0,51
eikosatetraenová k.	0,20	0,19	0,02	10,29	0,06
eikosapentaenová k.	66,52	66,52	1,62	2,44	4,55
lignocerová k.	0,34	0,35	0,04	11,04	0,11
dokosatetraenová k.	6,55	6,54	0,15	2,25	0,41
nervonová k.	485,17	484,78	6,92	1,43	19,37
dokosapentaenová k.	4,70	4,71	0,28	5,95	0,78
dokosapentaenová k.	3,17	3,15	0,09	2,73	0,24
dokosahexaenová k.	5,54	5,51	0,23	4,15	0,64
cerotová k.	4,76	4,89	0,56	11,86	1,58
tetrakosatetraenová k.	5,52	5,50	0,24	4,32	0,67
tetrakosapentaenová k.	4,98	4,98	0,28	5,63	0,78
tetrakosapentaenová k.	3,52	3,54	0,19	5,41	0,53
tetrakosahexaenová k.	3,82	3,76	0,30	7,96	0,85

Reprodukovatelnost (v našem případě intralaboratorní) vyjadřuje preciznost za podmínek reprodukovatelnosti. Těsnost shody výsledků měření stejné veličiny, kde jsou jednotlivá měření provedenápo časovém intervalu dostatečně dlouhém ve srovnání s délkou trvání jednotlivého měření, za různých obvyklých podmínek provozu užívaných přístrojů. Mez reprodukovatelnosti R je hodnota, pro kterou se s definovanou pravděpodobností předpokládá, že pod ní leží absolutní rozdíl výsledků dvou jednotlivých zkoušek získaných za podmínek reprodukovatelnosti. Mez reprodukovatelnosti R se standardně vypočte jako 2,8mi násobek směrodatné odchylky výsledků za podmínek reprodukovatelnosti. I v tomto případě se budeme pohybovat na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Reprodukovatelnost metody byla opět stanovována na dvou koncentračních hladinách odpovídajících přídavku 150 µl, respektive 450 µl roztoku mastných kyselin ke

zředěnému roztoku pool plazmy. Na každé koncentrační hladině byl analyzován 1 vzorek v deseti po sobě následujících pracovních dnech, celkem tedy 10 měření na každé koncentrační hladině. Následně byla určena směrodatná odchylka měření, variační koeficient a mez reprodukovatelnosti.

Z dat byla vypočítána i mez detekce (limit of detection – LOD) a mez stanovitelnosti (limit of quantification – LOQ). Mez detekce jednotlivé analytické metody je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být detekováno, ale nemusí být nutně stanoveno jako přesná hodnota. V našem případě vyjádřeno jako trojnásobek směrodatné odchylky. Mez stanovitelnosti jednotlivé analytické metody je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s přijatelnou přesností. V našem případě stanoveno jako šestinásobek směrodatné odchylky, respektive dvojnásobek meze detekce.

Tab. 3.5: Charakteristika reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	R [µmol/l]
isomyristová k.	4,81	4,76	0,15	3,06	0,41
myristová k.	9,04	9,02	0,21	2,31	0,58
13-metylmyristová k.	5,95	5,93	0,15	2,48	0,41
12-metylmyristová k.	7,67	7,67	0,22	2,86	0,61
pentadecylová k.	7,67	7,72	0,15	1,90	0,41
palmitová k.	155,91	155,62	2,02	1,29	5,64
sapienová k.	2,61	2,60	0,04	1,62	0,12
palmitoolejová k. cis	10,44	10,41	0,13	1,23	0,36
14-metylpalmitová k.	2,17	2,19	0,09	4,24	0,26
margarová k.	4,22	4,24	0,10	2,26	0,27
isostearová k.	2,22	2,25	0,13	5,87	0,36
stearová k.	48,09	48,30	0,63	1,31	1,77
vakcenová k. trans	2,16	2,21	0,17	8,08	0,49
olejová k.	93,38	93,56	0,67	0,71	1,86
vakcenová k. cis	9,08	9,05	0,19	2,09	0,53
nonadecylová k.	2,54	2,55	0,10	3,85	0,27

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	R [µmol/l]
linolová k.	55,24	55,39	0,71	1,29	2,00
ɣ-linolenová k.	2,26	2,27	0,17	7,31	0,46
arachová k.	2,43	2,41	0,08	3,27	0,22
α-linolenová k.	10,75	10,79	0,18	1,63	0,49
stearidonová k.	1,53	1,47	0,21	13,65	0,58
eikosatrienová k.	0,95	0,96	0,06	6,18	0,17
behenová k.	0,17	0,17	0,01	8,38	0,04
arachidonová k.	3,89	3,90	0,08	1,96	0,21
eikosatetraenová k.	0,05	0,05	0,00	7,13	0,01
eikosapentaenová k.	22,25	22,30	1,25	5,63	3,51
lignocerová k.	0,50	0,50	0,07	13,27	0,19
dokosatetraenová k.	6,33	6,31	0,12	1,91	0,34
nervonová k.	149,99	149,94	2,02	1,35	5,67
dokosapentaenová k.	1,81	1,78	0,08	4,37	0,22
dokosapentaenová k.	1,01	1,02	0,03	3,24	0,09
dokosahexaenová k.	2,87	2,88	0,11	3,89	0,31
cerotová k.	0,88	0,87	0,06	7,03	0,17
tetrakosatetraenová k.	1,65	1,65	0,08	5,08	0,23
tetrakosapentaenová k.	1,62	1,61	0,09	5,51	0,25
tetrakosapentaenová k.	1,14	1,15	0,06	4,92	0,16
tetrakosahexaenová k.	1,48	1,50	0,10	6,87	0,28

Tab. 3.6: Charakteristika reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	R [µmol/l]
isomyristová k.	10,19	10,18	0,14	1,36	0,39
myristová k.	14,41	14,38	0,14	0,98	0,39
13-metylmyristová k.	11,60	11,56	0,08	0,66	0,21
12-metylmyristová k.	20,28	20,23	0,15	0,75	0,43
pentadecylová k.	10,10	10,09	0,12	1,22	0,34
palmitová k.	374,19	375,33	3,41	0,91	9,55

Triviální název	Průměr [µmol/l]	Medián [µmol/l]	SD [µmol/l]	CV [%]	R [µmol/l]
sapienová k.	4,94	4,95	0,05	0,95	0,13
palmitoolejová k. cis	24,24	24,28	0,13	0,55	0,37
14-metylpalmitová k.	6,00	6,00	0,11	1,89	0,32
margarová k.	11,46	11,46	0,09	0,80	0,26
isostearová k.	5,61	5,60	0,11	1,90	0,30
stearová k.	118,07	118,32	1,47	1,24	4,12
vakcenová k. trans	7,62	7,61	0,11	1,42	0,30
olejová k.	247,16	247,81	2,11	0,85	5,90
vakcenová k. cis	24,12	24,08	0,25	1,04	0,70
nonadecylová k.	8,91	8,89	0,09	1,02	0,25
linolová k.	128,33	128,13	1,62	1,26	4,53
ɣ-linolenová k.	6,13	6,13	0,04	0,68	0,12
arachová k.	6,86	6,86	0,07	1,03	0,20
α-linolenová k.	33,07	33,05	0,28	0,84	0,78
stearidonová k.	3,59	3,64	0,19	5,16	0,52
eikosatrienová k.	2,07	2,06	0,03	1,65	0,10
behenová k.	0,16	0,16	0,01	5,80	0,03
arachidonová k.	9,55	9,54	0,07	0,75	0,20
eikosatetraenová k.	0,20	0,20	0,01	5,99	0,03
eikosapentaenová k.	68,95	68,91	0,85	1,23	2,37
lignocerová k.	0,37	0,38	0,01	3,12	0,03
dokosatetraenová k.	6,74	6,77	0,13	1,88	0,35
nervonová k.	475,70	476,28	3,45	0,72	9,65
dokosapentaenová k.	5,09	5,11	0,06	1,10	0,16
dokosapentaenová k.	3,18	3,18	0,02	0,75	0,07
dokosahexaenová k.	5,79	5,81	0,09	1,49	0,24
cerotová k.	3,99	4,00	0,21	5,38	0,60
tetrakosatetraenová k.	5,09	5,10	0,04	0,79	0,11
tetrakosapentaenová k.	4,55	4,56	0,05	1,03	0,13
tetrakosapentaenová k.	3,73	3,72	0,03	0,90	0,09
tetrakosahexaenová k.	3,48	3,47	0,07	1,96	0,19

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V následující kapitole jsou výsledky rozčleněny a diskutovány chronologicky dle jednotlivých prováděných studií.

4.1 Vztahy mezi glykovaným hemoglobinem a profilem mastných kyselin

V rámci této případové studie bylo zpracováno celkem 26 diabetiků 2. typu a 26 zdravých dárců.

Nejdříve byla data s použitím dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) ověřena, zda se v rámci skupin statisticky významně mění zastoupení jednotlivých mastných kyselin, jejich jednotlivých skupin a aktivitních indexů enzymů lipidového metabolismu s ohledem na faktory věku a pohlaví. Bylo hodnoceno procentické zastoupení mastných kyselin, sum jednotlivých skupin. F test zprostředkoval porovnání v rámci faktoru a mezi faktory navzájem. Hladina významnosti p určovala jako statisticky významné rozdíly, pokud $p < 0,05$. Síla $(1-\beta)$ určovala citlivost testu. Z tabulek 4.1 a 4.2 je patrné, že ve frakci PL není složení mastných kyselin ovlivněno věkem ani pohlavím u žádného ze souborů. Jinak je tomu u frakce TG u skupiny diabetiků, kde věk ovlivňuje hladiny kyseliny olejové a linolové, potažmo I MUFA a PUFA jako celku; ani zde však není patrný vliv pohlaví na skladbu MK.

Tab. 4.1: Porovnání rozdílů mezi skupinou zdravých dárců a diabetiky druhého typu pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu. Rozdíly hledány u faktoru věku a pohlaví ve frakci PL

		Zdraví dárci				Diabetici			
	Faktor	F	p	Síla (1-β)	Závěr	F	p	Síla (1-β)	Závěr
Palmitová k. C16:0	Pohlaví	0,000	0,998	0,050	-	0,103	0,753	0,050	-
	Věk	0,813	0,535	0,050	-	0,757	0,595	0,050	-
	Pohlaví*Věk	2,743	0,065	0,410	-	0,340	0,880	0,050	-
Stearová k. C18:0	Pohlaví	0,335	0,571	0,050	-	0,673	0,426	0,050	-
	Věk	1,142	0,372	0,072	-	1,064	0,421	0,060	-
	Pohlaví*Věk	0,830	0,526	0,050	-	0,404	0,838	0,050	-
Olejová k. C18:1(n-9)	Pohlaví	0,149	0,705	0,050	-	2,337	0,149	0,180	-
	Věk	1,258	0,327	0,092	-	2,723	0,064	0,427	-
	Pohlaví*Věk	1,633	0,215	0,163	-	0,911	0,502	0,050	-
Linolová k. C18:2(n-6)	Pohlaví	0,058	0,813	0,050	-	0,394	0,540	0,050	-
	Věk	0,504	0,733	0,050	-	1,074	0,416	0,061	-
	Pohlaví*Věk	1,841	0,170	0,207	-	0,498	0,773	0,050	-

		Zdraví dárci				Diabetici			
	Faktor	F	p	Síla (1-β)	Závěr	F	p	Síla (1-β)	Závěr
9 desaturáza 16:1(n-7)/16:0	Pohlaví	0,041	0,842	0,050	-	0,019	0,892	0,050	-
	Věk	0,401	0,805	0,050	-	2,594	0,073	0,396	-
	Pohlaví*Věk	0,304	0,871	0,050	-	0,902	0,506	0,050	-
Elongáza 18:0/16:0	Pohlaví	0,167	0,688	0,050	-	0,361	0,558	0,050	-
	Věk	1,221	0,341	0,085	-	0,914	0,500	0,050	-
	Pohlaví*Věk	1,829	0,173	0,205	-	0,293	0,909	0,050	-
5 desaturáza 20:4(n-6)/20:3(n-6)	Pohlaví	0,468	0,504	0,050	-	0,126	0,728	0,050	-
	Věk	0,180	0,946	0,050	-	1,006	0,450	0,051	-
	Pohlaví*Věk	0,249	0,906	0,050	-	1,224	0,349	0,087	-
6 desaturáza 20:3(n-6)/18:2(n-6)	Pohlaví	0,633	0,438	0,050	-	0,426	0,524	0,050	-
	Věk	0,428	0,787	0,050	-	1,358	0,289	0,117	-
	Pohlaví*Věk	1,444	0,265	0,126	-	0,337	0,882	0,050	-
SFA	Pohlaví	0,948	0,345	0,050	-	0,673	0,426	0,050	-
	Věk	0,760	0,760	0,050	-	1,179	0,368	0,079	-
	Pohlaví*Věk	1,288	1,288	0,097	-	0,801	0,567	0,050	-

		Zdraví dárci				Diabetici			
	Faktor	F	p	Síla (1-β)	Závěr	F	p	Síla (1-β)	Závěr
MUFA	Pohlaví	0,016	0,901	0,050	-	2,088	0,170	0,154	-
	Věk	1,130	0,376	0,070	-	1,845	0,169	0,216	-
	Pohlaví*Věk	1,544	0,237	0,145	-	1,457	0,265	0,132	-
PUFA	Pohlaví	0,436	0,518	0,050	-	4,546	0,051	0,408	-
	Věk	0,375	0,823	0,050	-	1,197	0,360	0,082	-
	Pohlaví*Věk	2,293	0,104	0,308	-	0,805	0,564	0,050	-
n-3 PUFA	Pohlaví	0,070	0,794	0,050	-	3,410	0,086	0,291	-
	Věk	0,026	0,999	0,050	-	1,511	0,249	0,143	-
	Pohlaví*Věk	1,273	0,321	0,094	-	3,158	0,041	0,527	-
n-6 PUFA	Pohlaví	0,451	0,512	0,050	-	0,653	0,432	0,050	-
	Věk	0,264	0,897	0,050	-	1,156	0,378	0,075	-
	Pohlaví*Věk	2,151	0,121	0,276	-	0,805	0,564	0,050	-
index n6/n3	Pohlaví	0,149	0,705	0,050	-	0,369	0,553	0,050	-
	Věk	0,034	0,997	0,050	-	0,309	0,899	0,050	-
	Pohlaví*Věk	2,855	0,058	0,435	-	0,996	0,455	0,050	-

F test zprostředkoval porovnání v rámci faktoru a mezi faktory navzájem. Hladinia významnosti p určovala jako statisticky významné rozdíly, pokud $p < 0,05$. Síla (1-β) určovala schopnost testu rozeznat rozdíl, pokud skutečně existoval, síla u spolehlivého testu by měla splňovat $(1- \beta) < 0,8$.

Tab. 4.2: Porovnání rozdílů mezi skupinou zdravých dárců a diabetiky druhého typu pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu. Rozdíly hledány u faktoru věku a pohlaví ve frakci TG

		Zdraví dárci				Diabetici			
	Faktor	F	p	Síla (1-β)	Závěr	F	p	Síla (1-β)	Závěr
Palmitová k. C16:0	Pohlaví	0,054	0,820	0,050	-	0,169	0,687	0,050	-
	Věk	0,352	0,839	0,050	-	2,099	0,126	0,276	-
	Pohlaví*Věk	0,507	0,732	0,050	-	2,875	0,054	0,463	-
Stearová k. C18:0	Pohlaví	0,724	0,407	0,050	-	1,230	0,286	0,070	-
	Věk	0,097	0,982	0,050	-	0,868	0,527	0,050	-
	Pohlaví*Věk	1,466	0,259	0,130	-	0,948	0,481	0,050	-
Olejová k. C18:1(n-9)	Pohlaví	1,246	0,281	0,071	-	7,736	0,015	0,679	-
	Věk	1,310	0,308	0,101	-	6,164	0,003	0,923	*Významný*
	Pohlaví*Věk	1,358	0,292	0,110	-	4,957	0,008	0,826	*Významný*
Linolová k. C18:2(n-6)	Pohlaví	0,009	0,924	0,050	-	0,961	0,344	0,050	-
	Věk	0,033	0,998	0,050	-	0,587	0,004	0,905	*Významný*

		Zdraví dárci				Diabetici			
	Faktor	F	p	Síla (1-β)	Závěr	F	p	Síla (1-β)	Závěr
	Pohlaví*Věk	0,456	0,767	0,050	-	2,668	0,068	0,414	-
9 desaturáza 16:1(n-7)/16:0	Pohlaví	0,389	0,541	0,050	-	0,035	0,853	0,050	-
	Věk	1,097	0,391	0,064	-	0,621	0,686	0,050	-
	Pohlaví*Věk	2,674	0,07	0,394	-	0,564	0,726	0,050	-
Elongáza 18:0/16:0	Pohlaví	0,973	0,339	0,050	-	0,406	0,534	0,050	-
	Věk	0,071	0,990	0,050	-	1,032	0,437	0,055	-
	Pohlaví*Věk	0,981	0,445	0,050	-	1,628	0,217	0,168	-
5 desaturáza 20:4(n-6)/20:3(n-6)	Pohlaví	0,351	0,562	0,050	-	0,035	0,854	0,050	-
	Věk	1,298	0,312	0,098	-	0,573	0,720	0,050	-
	Pohlaví*Věk	0,312	0,866	0,050	-	0,633	0,678	0,050	-
6 desaturáza 20:3(n-6)/18:2(n-6)	Pohlaví	0,031	0,863	0,050	-	1,001	0,334	0,050	-
	Věk	0,899	0,488	0,050	-	3,251	0,037	0,547	-
	Pohlaví*Věk	0,262	0,898	0,050	-	1,861	0,165	0,220	-
SFA	Pohlaví	0,013	0,910	0,050	-	0,403	0,536	0,050	-
	Věk	0,204	0,932	0,050	-	2,308	0,100	0,327	-

		Zdraví dárci				Diabetici			
	Faktor	F	p	Síla (1-β)	Závěr	F	p	Síla (1-β)	Závěr
	Pohlaví*Věk	0,710	0,597	0,050	-	2,649	0,069	0,409	-
MUFA	Pohlaví	0,654	0,431	0,050	-	6,603	0,022	0,595	-
	Věk	2,294	0,104	0,308	-	4,918	0,008	0,822	*Významný*
	Pohlaví*Věk	2,105	0,128	0,265	-	3,912	0,020	0,677	-
PUFA	Pohlaví	0,129	0,724	0,050	-	2,962	0,107	0,244	-
	Věk	0,040	0,997	0,050	-	7,997	<0,001	0,981	*Významný*
	Pohlaví*Věk	0,715	0,593	0,050	-	3,857	0,021	0,668	-
n-3 PUFA	Pohlaví	1,117	0,306	0,059	-	2,140	0,166	0,160	-
	Věk	0,472	0,755	0,050	-	4,270	0,014	0,736	-
	Pohlaví*Věk	0,722	0,590	0,050	-	2,737	0,063	0,430	-
n-6 PUFA	Pohlaví	0,035	0,852	0,050	-	1,444	0,249	0,091	-
	Věk	0,070	0,990	0,050	-	6,069	0,003	0,918	*Významný*
	Pohlaví*Věk	0,579	0,682	0,050	-	2,824	0,057	0,057	-
index n6/n3	Pohlaví	6,736	0,020	0,614	-	0,041	0,842	0,050	-
	Věk	2,908	0,055	0,447	-	1,115	0,396	0,068	-

	Zdraví dárci				Diabetici			
Faktor	F	p	Síla (1-β)	Závěr	F	p	Síla (1-β)	Závěr
Pohlaví*Věk	1,939	0,153	0,228	-	1,058	0,424	0,058	-

F test zprostředkoval porovnání v rámci faktoru a mezi faktory navzájem. Hladinia významnosti p určovala jako statisticky významné rozdíly, pokud $p < 0,05$. Síla (1-β) určovala schopnost testu rozeznat rozdíl, pokud skutečně existoval, síla u spolehlivého testu by měla splňovat $(1- \beta) < 0,8$.

.

Následující tabulky 4.3 až 4.6 sledují změny v zastoupení významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů u sledovaných lipidických frakcí PL, VMK, TG a CE. Porovnání bylo provedeno na základě Mann Whitneyho testu.

Tab. 4.3: Obsah významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci PL

Parametr	Zdraví dárci (n=26)			Diabetici (n=26)			p *
Palmitová k.	33.03	±	2.85	31.84	±	2.82	0.083
Stearová k.	13.36	±	1.26	13.51	±	1.77	0.612
Olejová k.	10.65	±	1.99	10.89	±	2.16	0.378
Linolová k.	18.20	±	3.41	16.82	±	3.79	0.016
α-linolenová k	0.12	±	0.16	0.16	±	0.11	0.096
EPA	0.72	±	0.37	0.88	±	0.39	0.369
DHA	2.24	±	1.10	2.69	±	0.89	0.045
9D 16:1(n-7)/16:0	0.010	±	0.008	0.012	±	0.004	0.350
Elongáza 18:0/16:0	0.40	±	0.07	0.43	±	0.08	0.290
5D 20:4(n-6)/20:3(n-6)	4.41	±	3.24	5.15	±	2.80	0.429
6D 20:3(n-6)/18:2(n-6)	0.12	±	0.08	0.12	±	0.09	0.880
SFA	49.72	±	2.55	49.63	±	2.38	0.625
MUFA	13.74	±	2.46	14.61	±	2.38	0.128
PUFA	35.54	±	2.73	34.23	±	2.59	0.033
n-3 PUFA	3.91	±	1.19	4.77	±	1.46	0.089
n-6 PUFA	31.39	±	2.57	29.51	±	3.28	0.006
index n6/n3	7.89	±	2.16	5.95	±	2.07	0.022

Data jsou prezentována jako medián procentického zastoupení mastných kyselin ± IQR. V případě enzymových indexů, tyto jsou vypočteny z koncentrací mastných kyselin v µmol/l. EPA - eicosapentaenoic acid, DHA - docosahexaenoic acid, 9D - 9 desaturáza, 6D - 6 desaturáza, 5D - 5 desaturáza, SFA - saturated fatty acids, MUFA - monounsaturated fatty acids, PUFA - polyunsaturated fatty acids. * - Mann Whitneyův test

Tab. 4.4: Obsah významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci VMK

Parametr	Zdraví dárci (n=26)			Diabetici (n=26)			p *
Palmitová k.	30.83	±	4.80	29.28	±	3.93	0.069
Stearová k.	12.80	±	6.57	8.24	±	2.64	<0.001
Olejová k.	29.51	±	10.75	35.08	±	7.15	<0.001
Linolová k.	9.89	±	2.83	10.55	±	3.46	0.167
α-linolenová k	0.94	±	0.49	1.01	±	0.56	0.301
EPA	0.27	±	0.32	0.11	±	0.05	0.005
DHA	0.47	±	0.47	0.43	±	0.30	0.589

Parametr	Zdraví dárci (n=26)			Diabetici (n=26)			p *
9D 16:1(n-7)/16:0	0.049	±	0.035	0.041	±	0.033	0.310
Elongáza 18:0/16:0	0.45	±	0.17	0.29	±	0.09	<0.001
5D 20:4(n-6)/20:3(n-6)	3.32	±	4.09	2.79	±	1.26	0.293
6D 20:3(n-6)/18:2(n-6)	0.036	±	0.049	0.024	±	0.020	0.058
SFA	46.88	±	10.37	40.81	±	5.04	<0.001
MUFA	32.98	±	10.43	39.53	±	6.82	<0.001
PUFA	13.78	±	4.26	14.10	±	4.33	0.504
n-3 PUFA	2.31	±	0.88	1.96	±	0.83	0.098
n-6 PUFA	11.83	±	3.51	11.95	±	3.09	0.749
index n6/n3	5.16	±	2.90	5.74	±	1.76	0.197

Data jsou prezentována jako medián procentického zastoupení mastných kyselin ± IQR. V případě enzymových indexů, tyto jsou vypočteny z koncentrací mastných kyselin v µmol/l. EPA - eicosapentaenoic acid, DHA - docosahexaenoic acid, 9D - 9 desaturáza, 6D - 6 desaturáza, 5D - 5 desaturáza, SFA - saturated fatty acids, MUFA - monounsaturated fatty acids, PUFA - polyunsaturated fatty acids. * - Mann Whitneyův test

Tab.4.5: Obsah významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci TG

Parametr	Zdraví dárci (n=26)			Diabetici (n=26)			p *
Palmitová k.	31.75	±	4.38	29.50	±	4.79	0.146
Stearová k.	3.57	±	1.30	3.42	±	0.71	0.365
Olejová k.	38.91	±	4.49	38.60	±	3.93	0.805
Linolová k.	12.28	±	4.86	12.92	±	4.86	0.964
α-linolenová k	0.86	±	0.39	0.81	±	0.47	0.964
EPA	0.20	±	0.18	0.20	±	0.12	0.905
DHA	0.39	±	0.30	0.44	±	0.24	0.426
9D 16:1(n-7)/16:0	0.053	±	0.054	0.036	±	0.020	0.094
Elongáza 18:0/16:0	0.11	±	0.03	0.12	±	0.04	0.654
5D 20:4(n-6)/20:3(n-6)	4.93	±	5.10	4.13	±	2.43	0.268
6D 20:3(n-6)/18:2(n-6)	0.016	±	0.011	0.021	±	0.010	0.167
SFA	38.15	±	6.16	36.83	±	4.13	0.126
MUFA	42.34	±	4.95	42.31	±	4.36	0.920
PUFA	16.09	±	6.35	17.43	±	6.40	0.891
n-3 PUFA	2.02	±	0.77	1.84	±	0.77	0.993
n-6 PUFA	13.63	±	5.44	15.52	±	4.25	0.876
index n6/n3	7.96	±	3.94	6.91	±	2.86	0.654

Data jsou prezentována jako medián procentického zastoupení mastných kyselin ± IQR. V případě enzymových indexů, tyto jsou vypočteny z koncentrací mastných kyselin v µmol/l. EPA - eicosapentaenoic acid, DHA - docosahexaenoic acid, 9D - 9 desaturáza, 6D - 6 desaturáza, 5D - 5 desaturáza, SFA - saturated

fatty acids, MUFA - monounsaturated fatty acids, PUFA - polyunsaturated fatty acids. * - Mann Whitneyův test

Tab. 4.6: Obsah významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci CE

Parametr	Zdraví dárci (n=26)			Diabetici (n=26)			p *
Palmitová k.	14.57	±	1.95	14.68	±	1.60	0.922
Stearová k.	1.12	±	0.43	1.08	±	0.70	0.650
Olejová k.	20.07	±	3.57	20.77	±	3.57	0.244
Linolová k.	46.92	±	8.30	42.59	±	7.84	0.029
α-linolenová k	0.45	±	0.27	0.45	±	0.20	0.676
EPA	0.70	±	0.34	0.78	±	0.45	0.274
DHA	0.39	±	0.37	0.38	±	0.20	0.259
9D 16:1(n-7)/16:0	0.11	±	0.10	0.050	±	0.020	0.005
Elongáza 18:0/16:0	0.08	±	0.03	0.073	±	0.057	0.783
5D 20:4(n-6)/20:3(n-6)	14.44	±	23.34	12.66	±	5.77	0.378
6D 20:3(n-6)/18:2(n-6)	0.008	±	0.009	0.013	±	0.008	0.014
SFA	17.32	±	2.08	17.83	±	2.13	0.415
MUFA	23.83	±	3.16	23.03	±	5.08	0.470
PUFA	56.21	±	6.31	53.36	±	7.73	0.038
n-3 PUFA	1.67	±	0.52	1.77	±	0.74	0.470
n-6 PUFA	54.40	±	7.18	51.32	±	8.03	0.030
index n6/n3	33.22	±	15.78	26.92	±	10.64	0.094

Data jsou prezentována jako medián procentického zastoupení mastných kyselin ± IQR. V případě enzymových indexů, tyto jsou vypočteny z koncentrací mastných kyselin v μmol/l. EPA - eicosapentaenoic acid, DHA - docosahexaenoic acid, 9D - 9 desaturáza, 6D - 6 desaturáza, 5D - 5 desaturáza, SFA - saturated fatty acids, MUFA - monounsaturated fatty acids, PUFA - polyunsaturated fatty acids. * - Mann Whitneyův test

Polynenasycené mastné kyseliny

Celková suma PUFA byla signifikantně snížena v PL (p=0,033) i CE (p=0,038) frakci u diabetiků v porovnání s kontrolní skupinou. To bylo způsobeno *down* regulací un-6 PUFA. To potvrzuje významně snížená suma n-6 PUFA u diabetiků v porovnání s kontrolami v PL (p=0,006) a CE (p=0,030) frakci. Tento rozdíl byl dán hlavně poklesem hladiny kyseliny linolové, která byla signifikantně snížena v případě PL (p=0,016) i CE (p=0,029) frakce u diabetiků. Index n6/n3 vykazoval snížení u PL (p=0,022) frakce diabetických pacientů. V případě PUFA nebyly objeveny významné korelace s hladinou glykovaného hemoglobinu.

Nasycené mastné kyseliny

Nižší suma SFA byla nalezena u diabetiků ve frakci VMK ($p<0,001$) v porovnání s kontrolami. Nejsignifikantnější pokles byl pozorován v případě kyseliny stearové ($p<0,001$) a lignocerové ($p<0,001$).

Jak ukazuje obrázek 4.2, glykovaný hemoglobin ve skupině diabetiků pozitivně koreloval s hladinou kyseliny palmitové v PL ($r=0,40$, $p=0,040$) a TG ($r=0,68$, $p<0,001$) frakci.

Mononenasycené mastné kyseliny

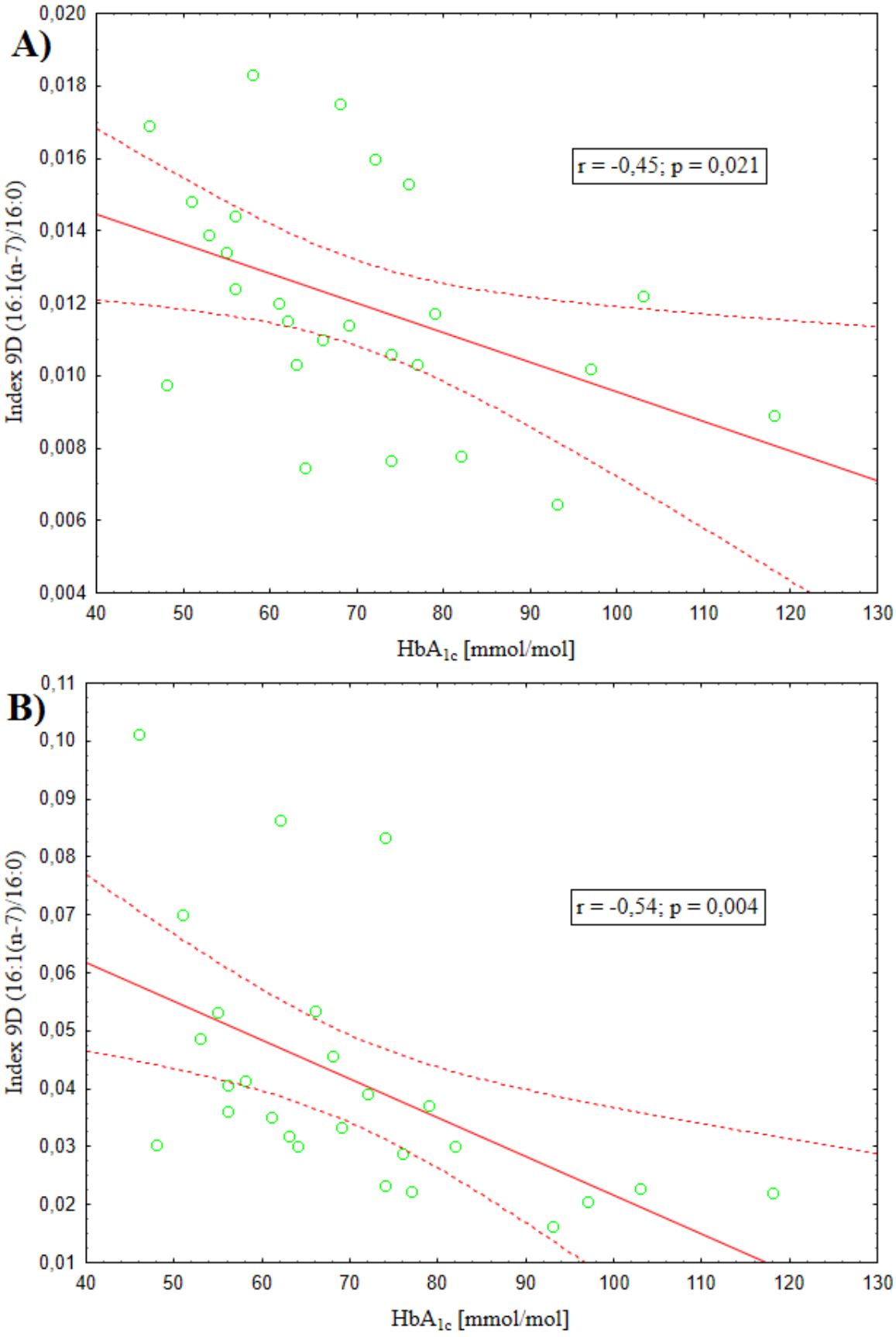
Suma MUFA byla významně vyšší ve skupině diabetických pacientů v porovnání s kontrolami ve frakci VMK ($p<0,001$), čemuž vděčila hlavně hladině kyseliny olejové ($p<0,001$) a vakcenové ($p=0,010$).

V případě MUFA výsledky ukazují negativní korelaci kyseliny olejové ($p<0,001$) s glykovaným hemoglobinem v TG frakci (viz. obrázek 4.3 B)).

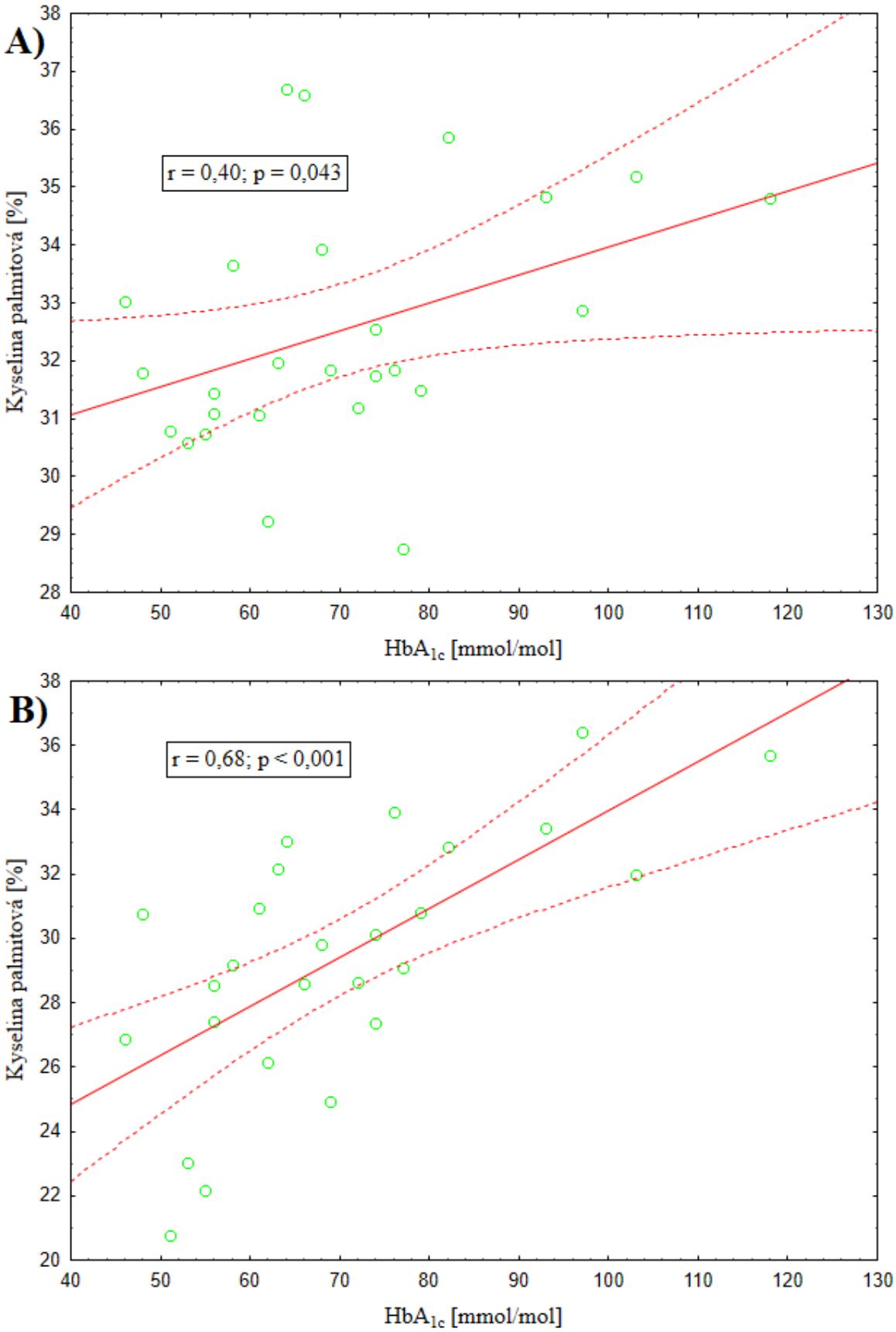
Indexy desaturázové a elongázové aktivity

Aktivita 9 desaturázy, vyjádřená jako poměr 16:1(n-7)/16:0, byla výrazně snížena u diabetiků ($p=0,005$) v porovnání se zdravými dárci ve frakci CE. 6 desaturázová aktivita, vyjádřená jako poměr 20:3(n-6)/18:2(n-6), vykazovala významné zvýšení v případě diabetických pacientů ($p=0,014$) v porovnání s kontrolami. Index elongázové aktivity, vyjádřený poměrem 18:0/16:0, byl ve VMK frakci signifikantně nižší u diabetiků ($p<0,001$) než u kontrolní skupiny. V PL frakci desaturační i elongační indexy doznaly zvýšení u diabetiků, ovšem tento rozdíl nebyl statisticky významný.

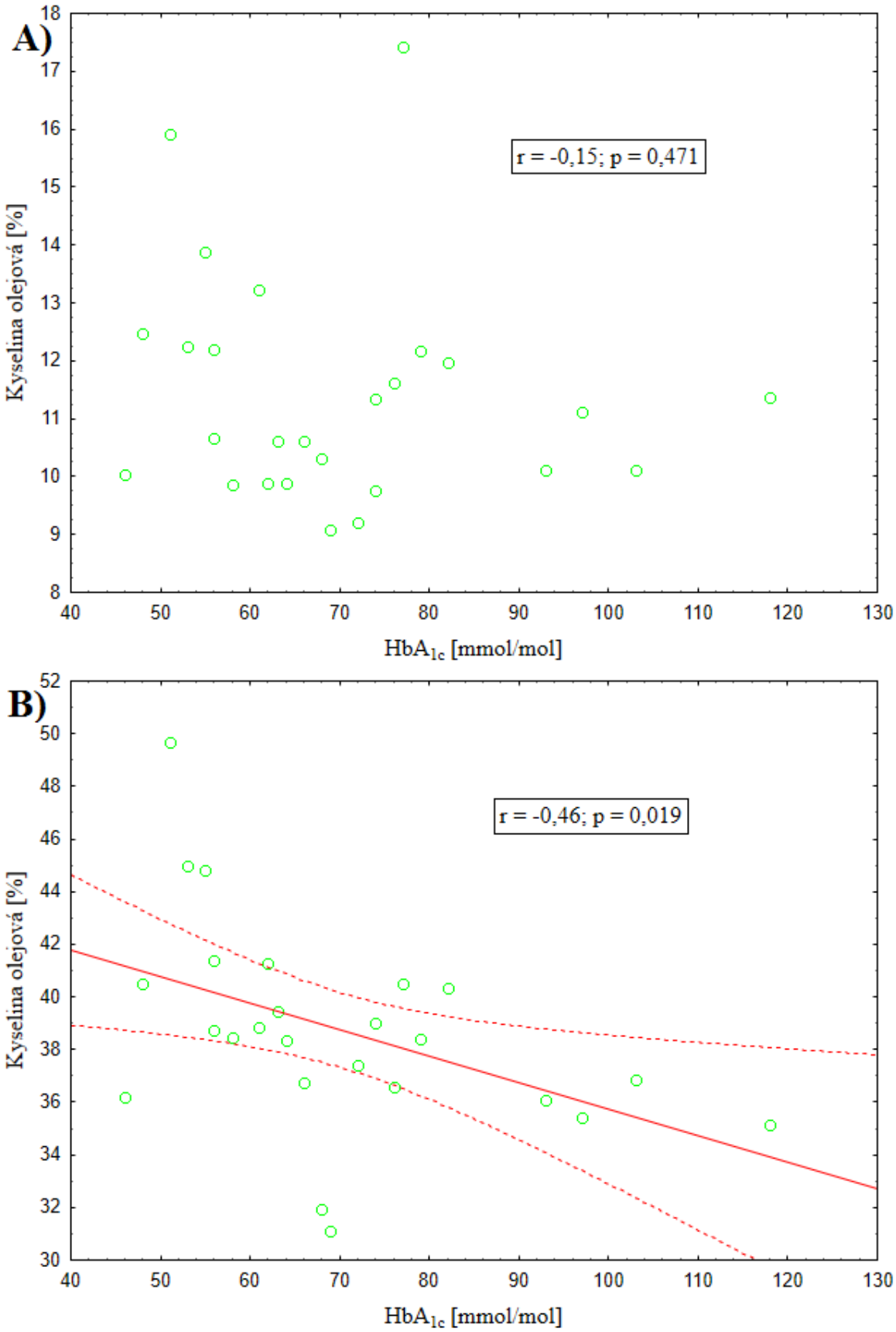
Dále byly zkoumány vztahy mezi aktivitou lipidových enzymů a glykovaným hemoglobinem, jakožto markerem kompenzace diabetu. Byla odhalena negativní korelace 9 desaturázové aktivity v PL ($r=-0,45$, $p=0,020$) frakci a stejně tak i v TG ($r=-0,54$, $p=0,004$) frakci (viz. obrázek 4.1).



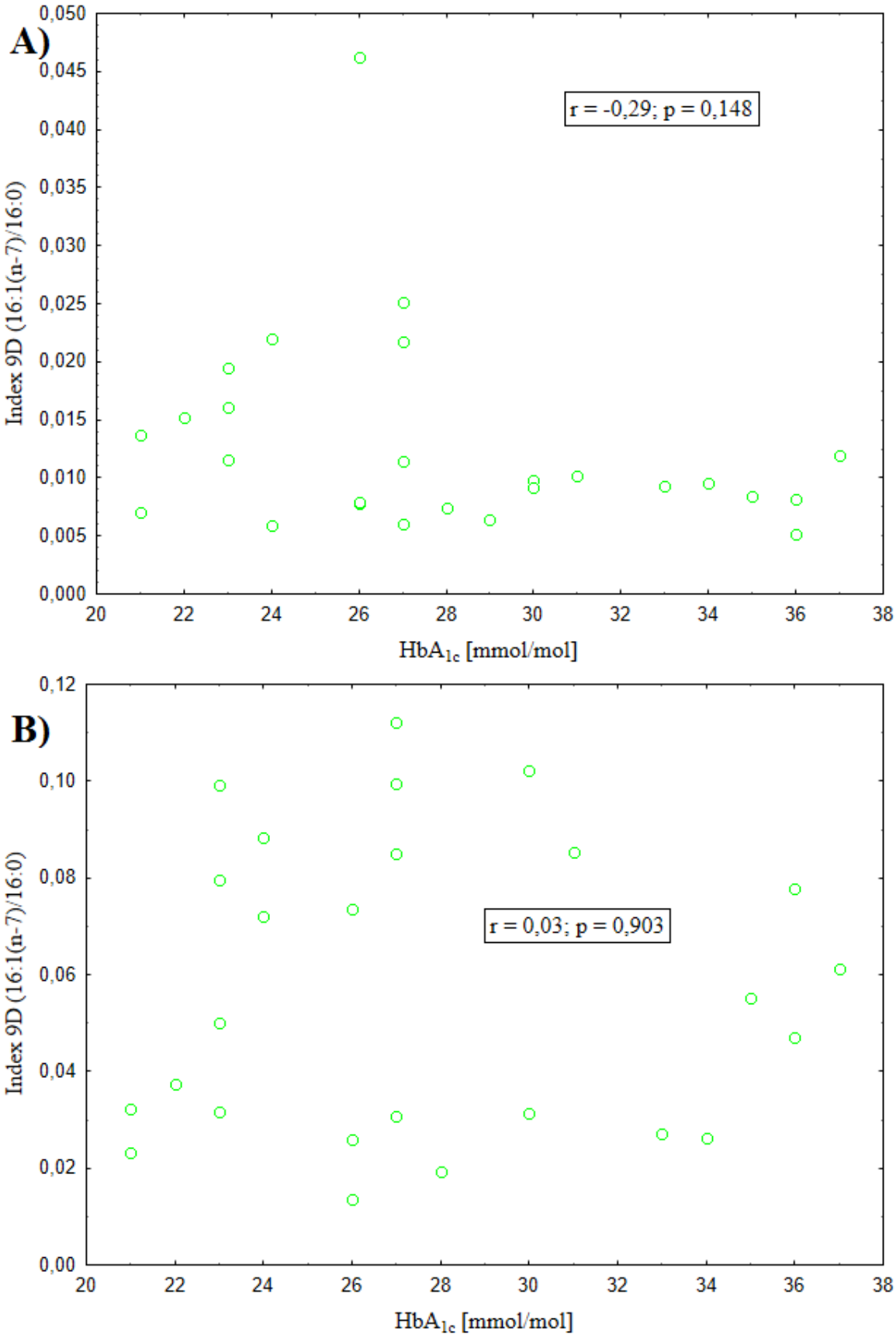
Obr. 4.1: Bodový graf závislosti aktivitního indexu 9 desaturázy na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) TG



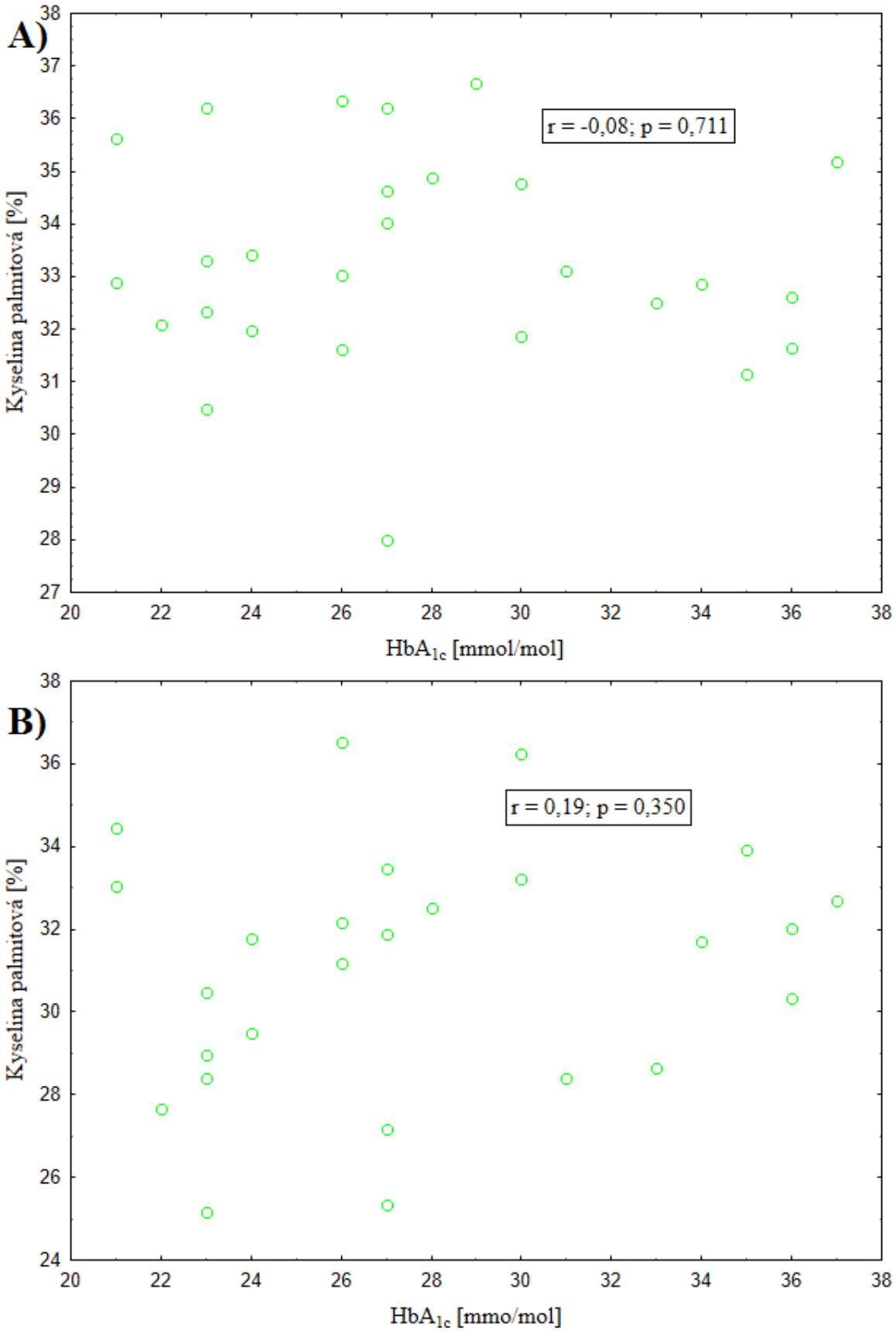
Obr. 4.2: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) TG



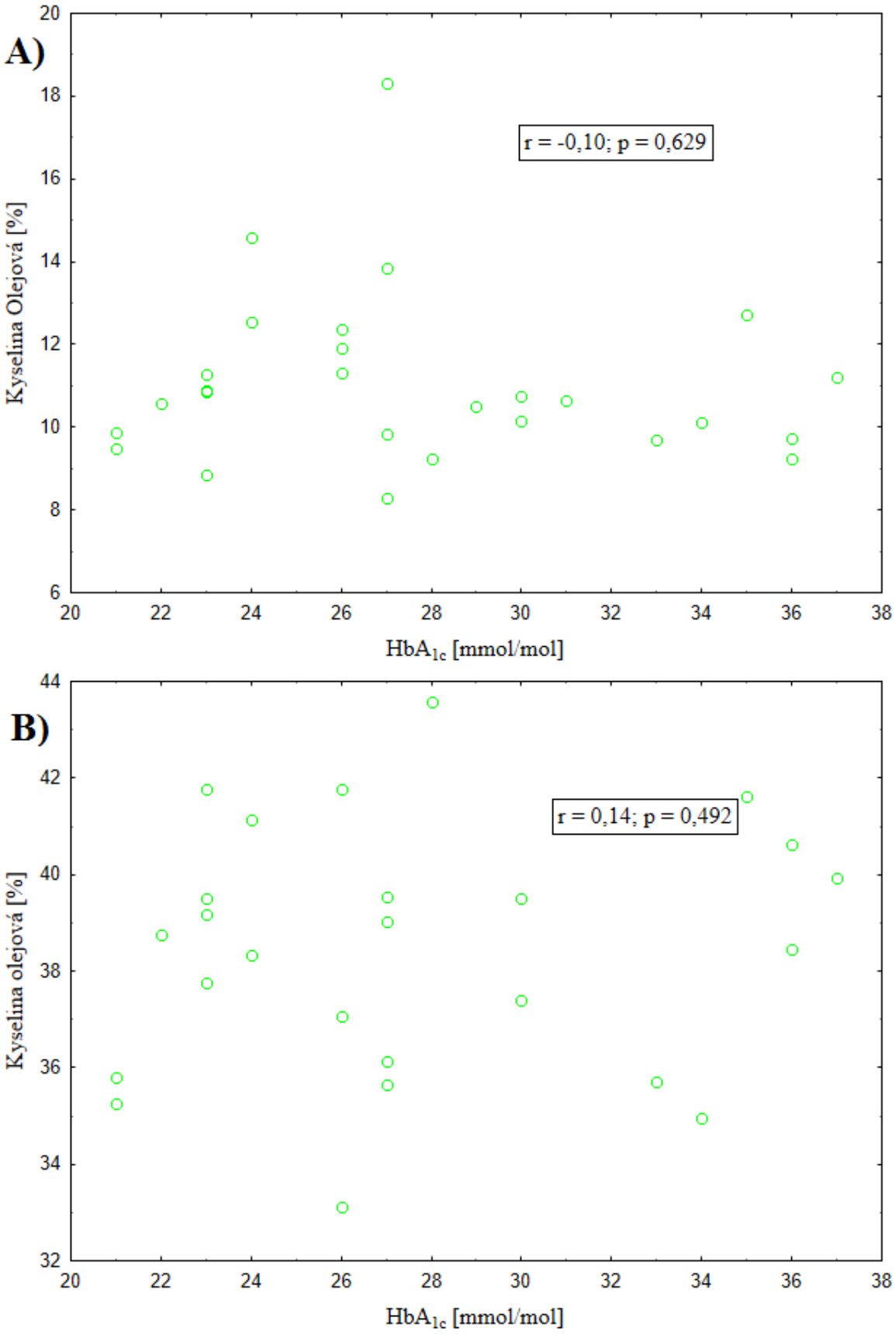
Obr. 4.3: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny olejové na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) TG



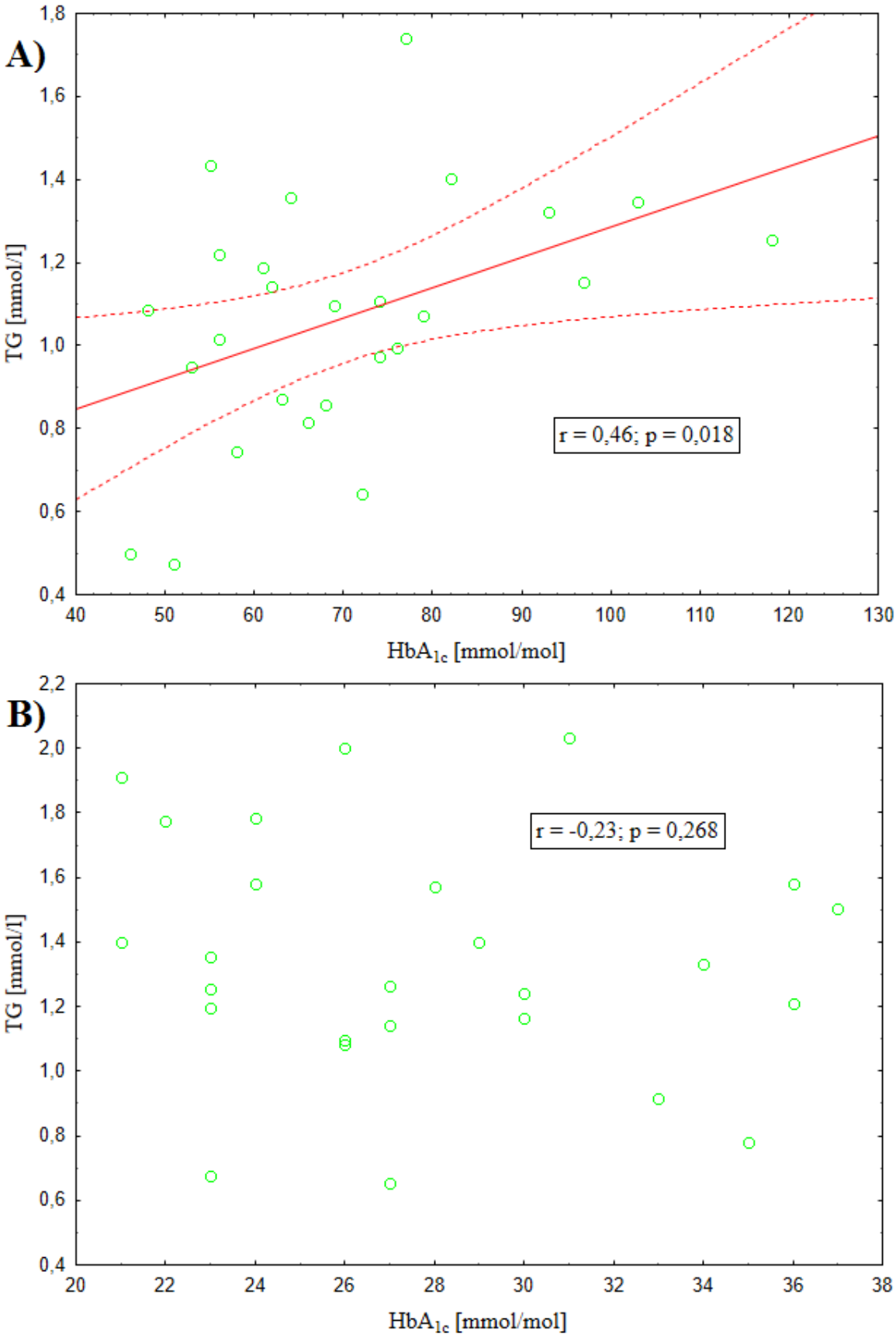
Obr. 4.4: Bodový graf závislosti aktivitního indexu 9 desaturázy na glykovaném hemoglobinu u zdravých dárců ve frakci A) PL a B) TG



Obr. 4.5: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu u zdravých dárců ve frakci A) PL a B) TG



Obr. 4.6: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny olejové na glykovaném hemoglobinu u zdravých dárců ve frakci A) PL a B) TG



Obr. 4.7: Bodový graf závislosti obsahu celkových plazmatických TG na glykovaném hemoglobinu u A) diabetiků typu 2 a B) zdravých dárců

Diskuse dosažených výsledků

Tato část práce byla zaměřena na vyhodnocení rozdílů v profilu mastných kyselin mezi diabetiky 2. typu a zdravou kontrolní skupinou. Cílem bylo osvětlit vztahy mezi hladinou glykovaného hemoglobinu, jako markeru kompenzace diabetu a profilem mastných kyselin a desaturačními a elongačními indexy u diabetiků typu 2.

Diabetes mellitus 2. typu je znám svým spojením s rozvratem profilu MK. Složení MK je ovlivněno aktivitou enzymů lipidového metabolismu, jíž vyjadřujeme desaturačními a elongačními indexy. Bylo nalezeno, že 9D index byl výrazně snížen ve frakci CE diabetických pacientů. Podobně, elongační index byl snížen ve frakci VMK.

Tyto výsledky podporují hypotézu, že tvorba MK z jejich prekurzorů desaturací je narušena za podmínekinzulínové rezistence (Rodriguez a Christophe, 2005). Bylo popsáno, že u zdravých jedinců není aktivita jaterní SCD1 ani *de novo* lipogeneze ovlivněna čtyřtýdenní suplementací glukózy (Silbernagel a spol., 2012), ale u diabetiků typu 2 zde byla objevena asociace mezi indexem pro 9D a glukózovým metabolismem sledovaným pomocí glykovaného Hb v PL a TG frakci.

Cytotoxický efekt většiny SFA na buňky slinivky, jater a svalové buňky je považován za hlavní příčinu vzniku inzulínové rezistence s následným rozvojem diabetes mellitus typu 2 a dalších komplikací, jakou jsou kardiovaskulární choroby, nefropatie a zánět (Fürstová a spol., 2008). Bylo popsáno, že strava bohatá na SFA byla provázena významným poklesem HDL cholesterolu (Králová Lesná a spol., 2008). Tyto závěry se shodují se zde získanými výsledky, která ukazují silnou pozitivní korelaci mezi kyselinou palmitovou a glykovaným hemoglobinem ve frakci PL a TG u diabetiků; naopak u kontrolní skupiny se tento trend nevyskytoval. Porovnáním skupin kontrol a diabetiků byla obecně nalezena snížená suma SFA u diabetických pacientů ve frakcích PL, VMK i TG. Hlavně se jednalo o kyselinu myristovou a stearovou. Toto bylo pravděpodobně zapříčiněno sníženým příjmem SFA ve stravě a kvalitativním složením této stravy u diabetiků.

Nízké hladiny MUFA mohou v organismu vyvolat nepříznivé účinky. Kyselina palmitoolejová například zvyšuje fluiditu membrán a redukuje zánět spojený s diabetem (Wu a spol., 2012). Bylo prokázáno, že kyselina palmitoolejová může působit profylaktivně proti inzulínové rezistenci u myší a predikovat citlivost k inzulínu u lidí nezávisle na věku, pohlaví a adipozitě. Existuje stále více důkazů, že kyselina palmitoolejová hraje důležitou roli v patofyziologii inzulínové rezistence (Peter a spol., 2011). Dále palmitoolejová kyselina stimuluje účinek inzulínu ve svalech a slouží jako

lipokin, čímž potlačuje hepatosteatózu (Cao a spol., 2008). Některé studie naznačují, že na buněčné úrovni může kyselina palmitoolejová zabraňovat apoptóze a snižovat stres endoplazmatického retikula u lidských a myších buněk; dále působí proti indukci těchto procesů cytotoxickým palmitátem (Wu a spol., 2012). Podíl MUFA byl podstatně vyšší ve frakci VMK u diabetických pacientů v porovnání s kontrolní skupinou, což bylo v rozporu s výše diskutovanými tvrzeními. To bylo zřejmě způsobeno antidiabetickou dietou a faktem, že frakce volných mastných kyselin v plazmě je nejsilněji ovlivněna tuky z přijímané stravy. I přes rozdíly mezi kontrolami a diabetiky potvrdily výsledky negativní vztah mezi MUFA a glykovaným hemoglobinem u pacientů s diabetes mellitu typu 2, jak ukazuje na obrázku 4.3 B) konkrétně kyselina olejová ve frakci TG.

Diabetes mellitus 2. typu je znám svým spojením s metabolickým rozvratem n-3 a n-6 PUFA, což má velký dopad na patogenezi zánětlivých onemocnění. N-3 PUFA pomáhají zabraňovat vzniku glukózové intolerance a mají protizánětlivé účinky; dávají také vznik protisrážlivým a vazodilatačním látkám (Doughman a spol., 2013; Nanri a spol., 2011; Wu a spol., 2012). Navíc, eikosanoidy odvozené od kyseliny arachidonové, zvláště prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny, lipoxiny a hydroxy mastné kyseliny způsobují posun fyziologického stavu k protrombotickému a proagregatornímu. Prostaglandiny (PG) odvozené od n-3 PUFA vznikají pomaleji než ty odvozené od n-6 PUFA. Jejich úkolem je mírnit efekt zvýšených PG odvozených od n-6 PUFA. Potlačení produkce eikosanoidů z řady n-6 PUFA těmi z řady n-3 je pravděpodobně způsobeno kompeticí mezi n-3 a n-6 PUFA o enzymy zprostředkující elongaci a desaturaci linolové kyseliny na kyselinu arachidonovou a α-linolenové kyseliny na eikosapentaenovou a dokosahexaenovou kyselinu (Kremmyda a spol., 2011; Poudyal a spol., 2011). Byl předpoklad nalezení vyšší koncentrace n-3 PUFA a naopak nižší koncentrace n-6 PUFA u kontrolní skupiny v porovnání s diabetiky, ale statisticky významné rozdíly v obsahu n-3 PUFA nebyly zaznamenány. Významné snížení hladiny n-6 PUFA bylo zaznamenáno v případě PL ($p=0,006$) a CE ($p=0,03$) frakce skupiny diabetických pacientů. Korelace mezi PUFA a glykovaným hemoglobinem nebyla nalezena. Mastné kyseliny, které nemohou být organismem endogenně syntetizovány jsou nejlepšími biomarkery příjmu mastných kyselin (Aro, 2003; Nanri a spol., 2011; Riserus a spol., 2009). Je zde možnost, že výsledky týkající se PUFA byly ovlivněny kombinací zdravé dietou a nasazené léčby perorálními antidiabetiky.

Data získaná na našem souboru ukazují, že profil mastných kyselin u pacientů s diagnostikovaným diabetes mellitus typu 2 se zdá „pozitivnější“ než profil kontrolní

skupiny zdravých dárců. Vysvětlení bylo léčbě a správných výživových návycích u diabetiků, což vedlo k redukci rozvratu profilu MK; a to i navzdory významně snížené aktivitě 9 desaturázy. Dieta snížila příjem stravy bohaté na SFA a cholesterol ve prospěch rostlinných tuků bohatých na MUFA a stravy bohaté na PUFA. Navíc, zdraví dárci se neřídili žádným striktním dietetickým doporučením a profil MK u této skupiny tak odrážel příjem tuků z potravy a současné špatné stravovací návyky střední a západní Evropy. Mírně významná asociace byla pozorována mezi glykovaným hemoglobinem a sérovým lipidickým profilem (Gopal a spol., 2012; Khan, 2007; Khan a spol., 2007; Petitti a spol., 2007; VinodMahato a spol., 2011), což je v souladu s našimi výsledky (viz. obrázek 4.7 A)), kde byla nalezena významná pozitivní korelace mezi glykovaným hemoglobinem a celkovými TG u diabetiků. Tento vztah se neobjevuje u zdravých jedinců (viz. obrázek 4.7 B)).

V této práci bylo dokázáno, že glykovaný hemoglobin je u diabetiků dobrým markerem složení lipidů v jednotlivých plazmatických frakcích, hlavně pak ve frakci TG a PL (viz. obrázky 4.1 – 4.3). V případě zdravé skupiny nebyla nalezena žádná významná korelace mezi glykovaným hemoglobinem a mastnými kyselinami (viz. obrázky 4.4 – 4.6), a tudíž tento marker u zdravé populace nevyjadřuje stav lipidového metabolismu. Plazmatická frakce TG Se zdá být nejvhodnější pro interpretaci vztahu glykovaného hemoglobinu a lipidového metabolismu.

4.2 Stanovení rozvětvených mastných kyselin

V této části práce byl zkoumán vliv rozvětvených mastných kyselin (BCFA – branched chain fatty acids), potažmo konzumace mléčných výrobků na kompenzaci diabetes mellitus 2. typu. Celkem zde bylo zpracováno a statisticky zhodnoceno 23 diabetiků, rozdělených na skupinu kompenzovaných a dekompenzovaných (viz. tabulka 4.7) a 10 zdravých dárců. Pro přehlednost u tohoto typu dělení uvádím i tabulku s charakteristikou skupiny.

Tab. 4.7: Charakterizace skupiny pro stanovení rozvětvených mastných kyselin, data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka

Skupina	Věk	Glykovaný Hb [mmol/mol]	Pohlaví (muži/ženy)
Zdraví dárci	33,8±2,6	29,6±5,4	5/5
Kompenzovaní diabetici	36,5±3,4	46,0±3,3	5/6
Nekompenzovaní diabetici	37,8±3,3	77,8±14,7	8/4

Plazmatické mastné kyseliny byly i v tomto případě předrozděleny tenkovrstevnou chromatografií na příslušné frakce a následně analyzovány pomocí chromatografie plynové.

Suma BCFA byla v této práci tvořena celkem pěti mastnými kyselinami. Analýzou (viz. tabulka 4.8) bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou mezi BCFA je kyselina 14-metylhexadekanová (průměrně 57 % celkového obsahu BCFA napříč všemi lipidickými frakcemi). Z toho důvodu byla tato kyselina zvolena jako zástupce celkové hladiny BCFA.

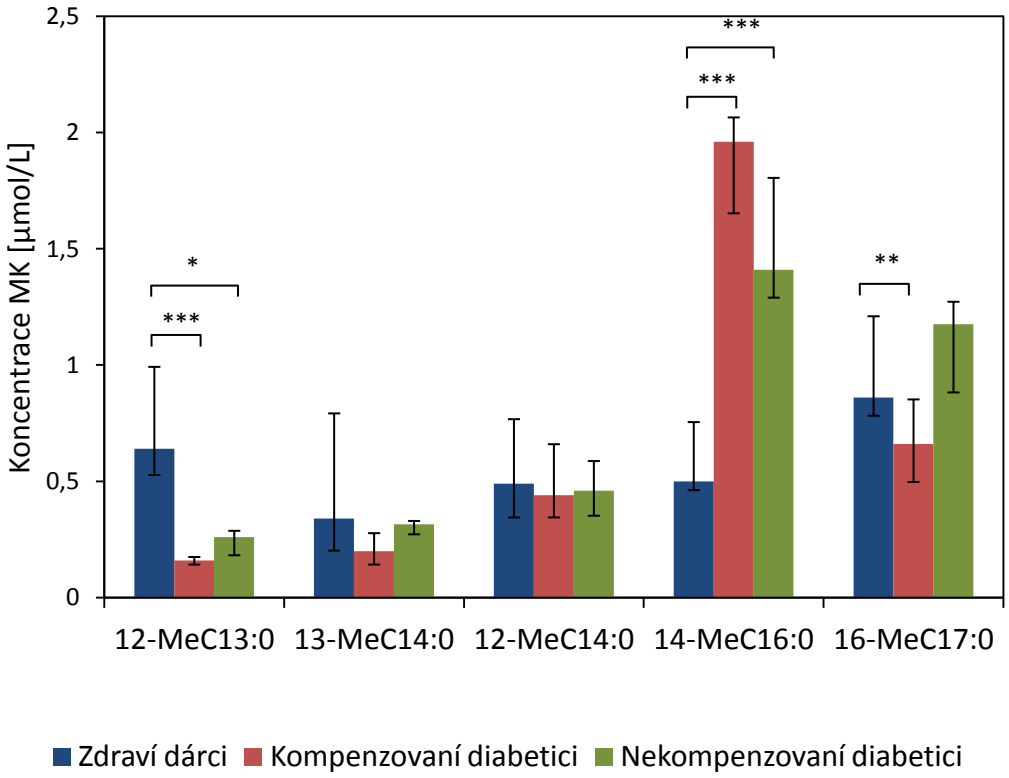
Tab. 4.8: Přesnost metody testovaná ve frakci VMK, n=10

BCFA	Průměr [μmol/l]	Směrodatná odchylka [μmol/l]	Variační koeficient [%]
12-MeC13:0	0,78	0,08	10,67
13-MeC14:0	0,65	0,03	5,27
12-MeC14:0	0,67	0,04	6,58
14-MeC16:0	3,86	0,23	5,87
16-MeC17:0	1,28	0,05	3,95

Statisticky významné zvýšení hladiny kyseliny 14-metylhexadekanové bylo u diabetiků nalezeno ve frakci DG a VMK v porovnání s kontrolami (viz. obrázky4.8 a 4.9).

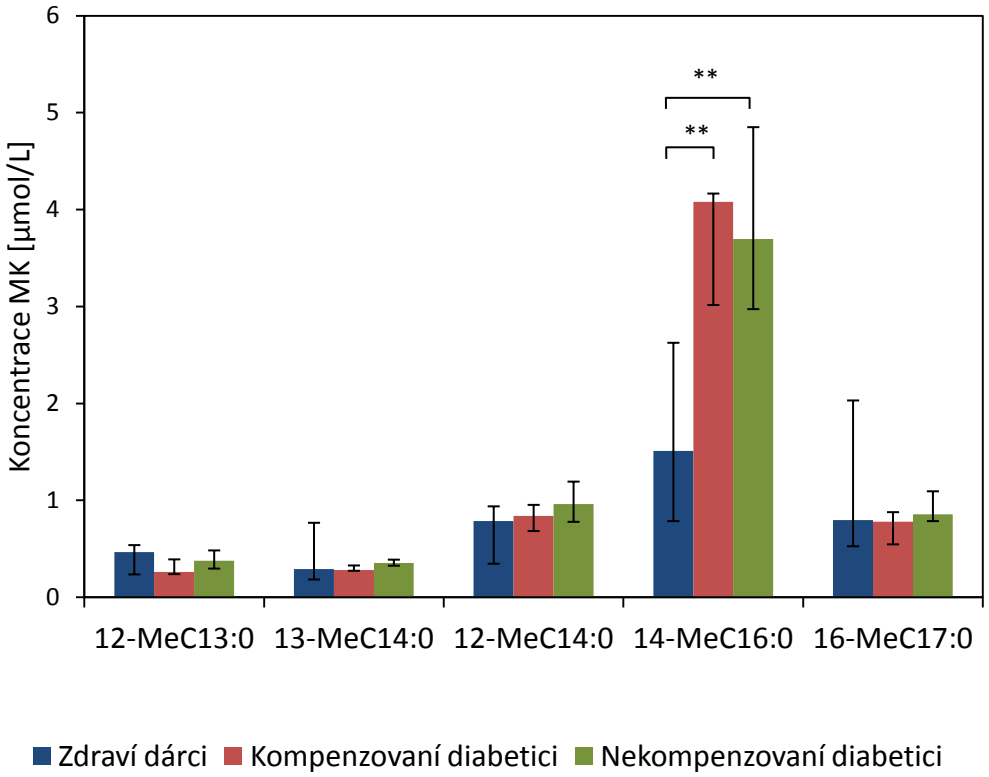
Mediány sum BCFA byly u kontrolní skupiny 3,25 µmol/l v případě DG, 4,53 µmol/l v případě VMK, 19,02 µmol/l u TG a 14,86 µmol/l u CE frakce. Frakce TG a CE se tedy ukázaly jako nejbohatší na obsah BCFA.

Pacienti s diabetes mellitus 2. typu vykazovali v porovnání se zdravými dárci zvýšený obsah BCFA u frakcí DG, VMK a TG (viz. obrázky 48, 4.9 a 4.10). Žádné signifikantní změny nebyly pozorovány ve frakci PL. Významný pokles BCFA byl však zaznamenán ve frakci CE (viz. obrázek 4.11).



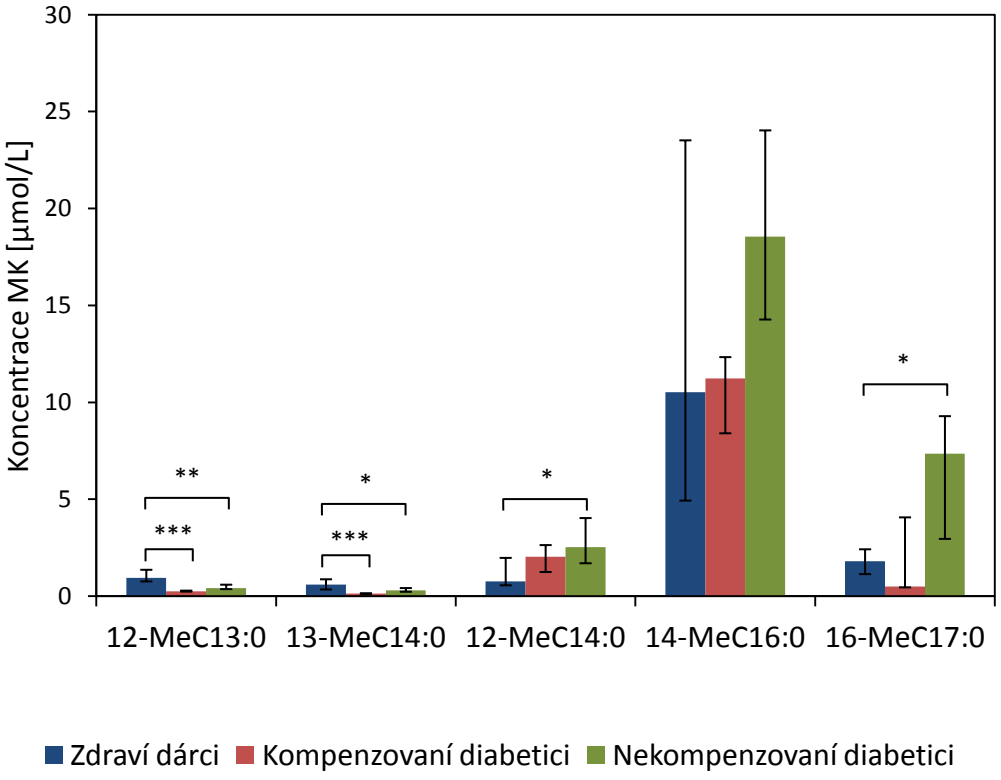
Obr. 4.8: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci DG

Data jsou prezentována jako medián ± IQR; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001



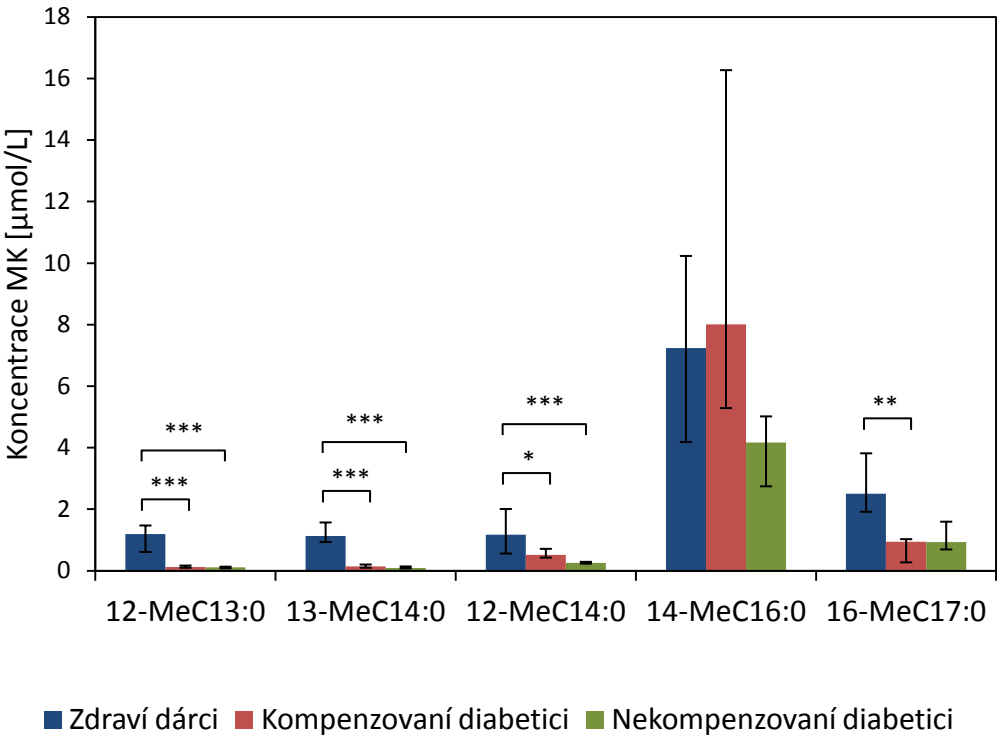
Obr. 4.9: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci VMK

Data jsou prezentována jako medián ± IQR; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001



Obr. 4.10: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci TG

Data jsou prezentována jako medián ± IQR; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001



Obr. 4.11: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci CE

Data jsou prezentována jako medián ± IQR; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001

Tyto poznatky poukazují k faktu, že u diabetiků typu 2 dochází ke snížené aktivaci PPAR receptorů. V důsledku toho se v organismu akumulují BCFA a SFA. Předpokládáme, že celkové zvýšení obsahu BCFA u diabetiků související s inzulínovou rezistencí v tukové tkáni bylo zapříčiněno sníženou aktivací PPAR receptorů. To vedlo ke zvýšenému ukládání TG v játrech a vzniku steatózy jater. Tento fakt je v souladu s našimi zjištěními zvýšeného obsahu BCFA v TG frakci, která vzniká v játrech.

BCFA nejsou u diabetiků oxidovány v jaterních peroxizomech, ale jsou nechtěné součásti inkorporovány do triglyceridů a secernovány ve formě VLDL lipoproteinových částic, jenž jsou primárně určeny jako energetický zdroj pro svalové a další orgánové buňky (Holeček, 2006). Osud BCFA v organismu dosud nebyl detailně prozkoumán, není tedy známo, která tkáň je odpovědná za odstraňování BCFA z krevního oběhu.

Dále byl nalezen snížený obsah BCFA v CE frakci, což by mohlo indikovat jejich oxidaci v peroxizomech svalových buněk. CE frakce je součástí LDL a HDL lipoproteinových částic. U diabetiků 2. typu dochází k nárůstu LDL; a naopak k poklesu HDL (Vijayaraghavan, 2010). Z dosažených výsledků je zřejmé, že obsah BCFA v CE

frakci je obecně snížen. Oxidaci BCFA v extrahepatálních orgánech lze odvozovat od faktu, že tyto MK se nevracejí ve formě esterů cholesterolu zpět do jater a jejich obsah je u dekompenzovaných diabetiků dokonce menší než v případě skupiny zdravých dárců (viz. obrázek 4.11).

Regulace činnosti svalových peroxizomů (obsahujících převážně PPARα a ɣ) cestou PPAR receptorů je méně pravděpodobná než u peroxizomů jaterních. Jednoduše v peroxizomech svalových buněk probíhá oxidace přítomných MK, toto je řízeno jen nedostatkem energie. Je známo, že diabetici mají nadbytek energetických zdrojů, jen buňky tyto zdroje zpracovávají nedostatečně a odlišnými metabolickými dráhami v porovnání se zdravými jedinci. Aktivace receptorů PPARα iniciuje rozklad MK a snižuje tvorbu apoC-III; a tím snižuje sekreci volných MK, triacylglycerolů a v důsledku toho i VLDL lipoproteinových částic do krevního řečiště (Auwerx a spol., 1996; Hřebíček, 2004; Schoonjans a spol, 1996; Staels a spol., 1995).

Další aktivací těchto receptorů se zvyšuje vychytávání MK buňkami; to se děje zvýšením aktivity translokázy mastných kyselin (FATP – fatty acid translocase) a Acyl-CoA syntetázy na transkripční úrovni (Hřebíček, 2004; Mascaró a spol., 1998, Motojima a spol., 1998). Hlavním cílovým orgánem pro FATP a Acyl-CoA syntetázu jsou játra, kde dochází ke spotřebě MK při produkci a následné sekreci zde vznikajících triacylglycerolů, a VLDL lipoproteinových částic (Hřebíček, 2004). Jinak je tomu ovšem v případě PPARɣ. Náš předpoklad převážné oxidace izomerních nasycených mastných kyselin ve svalových peroxizomech potvrzuje analýza bioptických vzorků lidské svalové a tukové tkáně, jenž vypovídá o rozdílné tkáňové distribuci PPARɣ (Loviscach a spol., 2000).

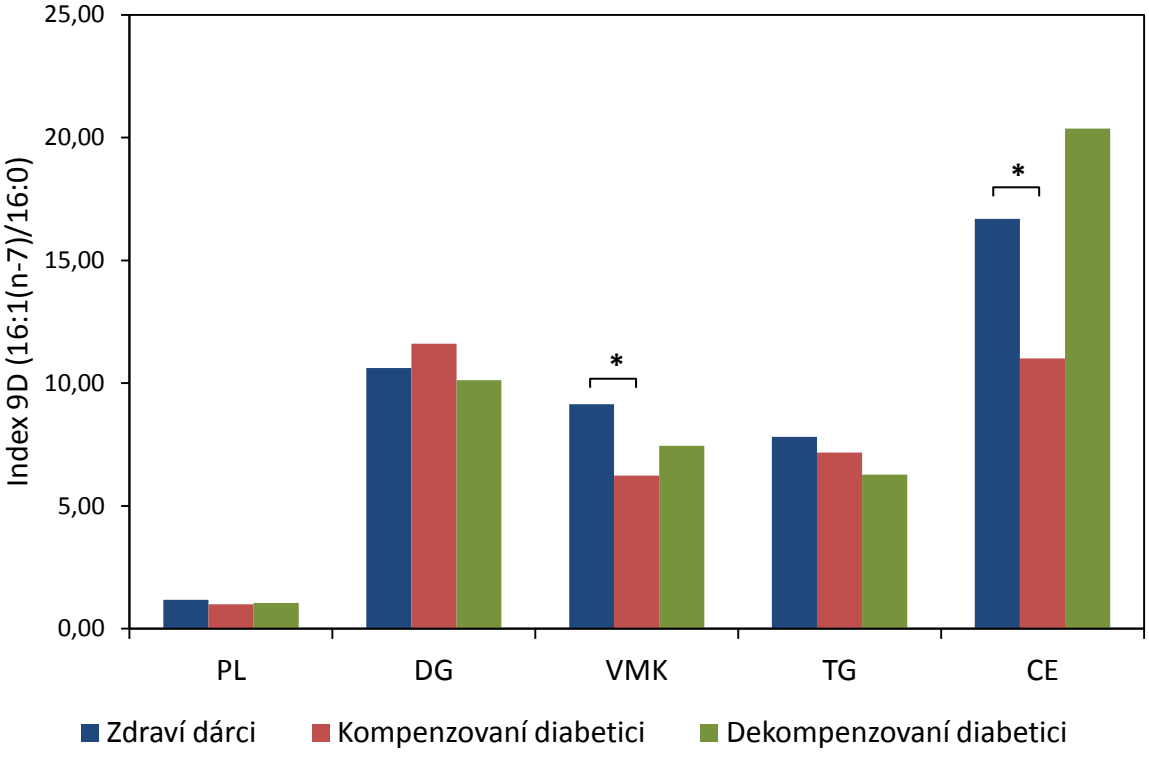
4.3 Stanovení mastných kyselin v HDL lipoproteinech

Dalším zaměřením této práce bylo rozdělit plazmatické lipidy pomocí ultracentrifugace a následně zanalyzovat profil mastných kyselin a zjistit aktivitní indexy lipidických enzymů u HDL lipoproteinů. Pro ultracentrifugaci bylo vybráno 21 anonymizovaných vzorků diabetiků 2. typu a 10 zdravých dárců jako kontrolní skupina. Skupinu blíže charakteristikuje tabulka 4.9.

Tab. 4.9: Charakterizace skupiny pro zkoumání HDL lipoproteinů, data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka

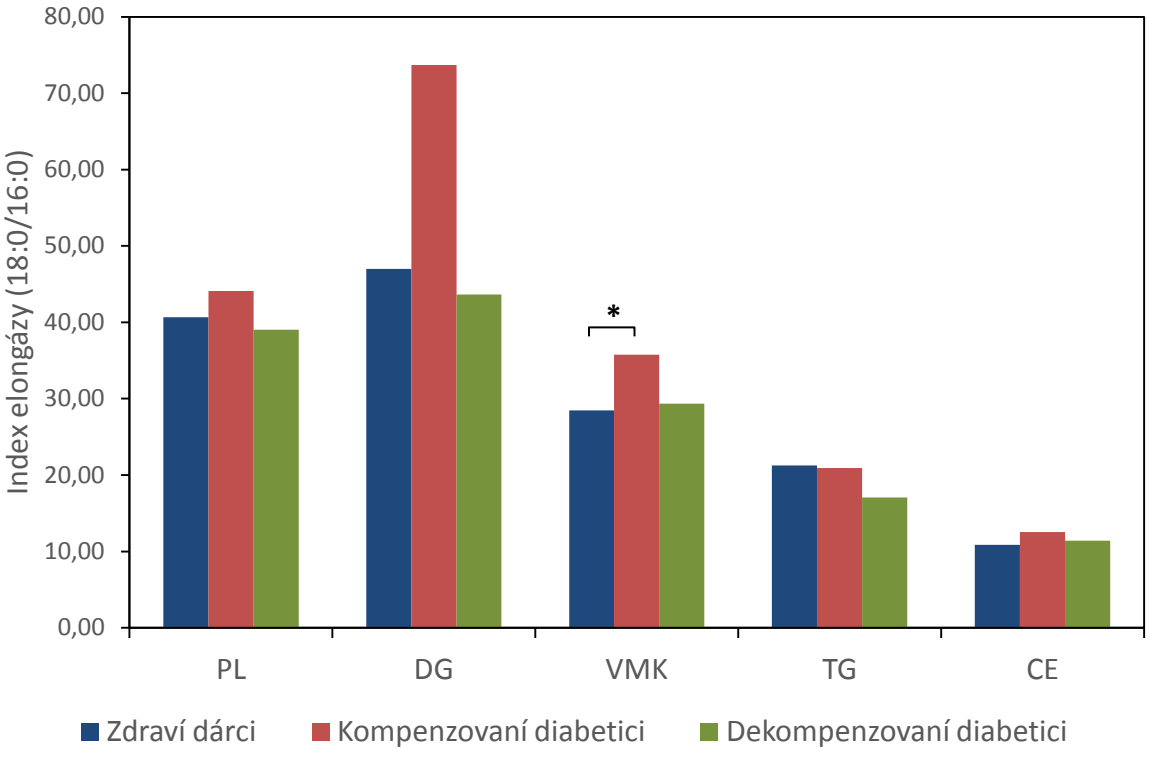
Skupina	Věk	Glykovaný Hb [mmol/mol]	LDL [mmol/l]	HDL [mmol/l]	Pohlaví (muži/ženy)
Zdraví	34,9±3,3	37,1±4,7	7,4±3,2	3,8±1,7	5/5
Kompenzovaní d.	39,2±4,0	63,0±9,5	4,1±1,1	2,1±0,6	7/6
Nekompenzovaní d.	35,4±1,7	90,1±8,2	5,9±2,1	2,4±1,0	5/3

Plazma byla nejprve rozdělena ultracentrifugací, viz. Kapitola 3.4.1 Ultracentrifugace. Tím jsme nejprve oddělili VLDL lipoproteiny a v následném kroku i LDL a HDLlipoproteiny. Mastné kyseliny byly i v tomto případě dále děleny tenkovrstevnou chromatografií na příslušné frakce a následně analyzovány pomocí chromatografie plynové.



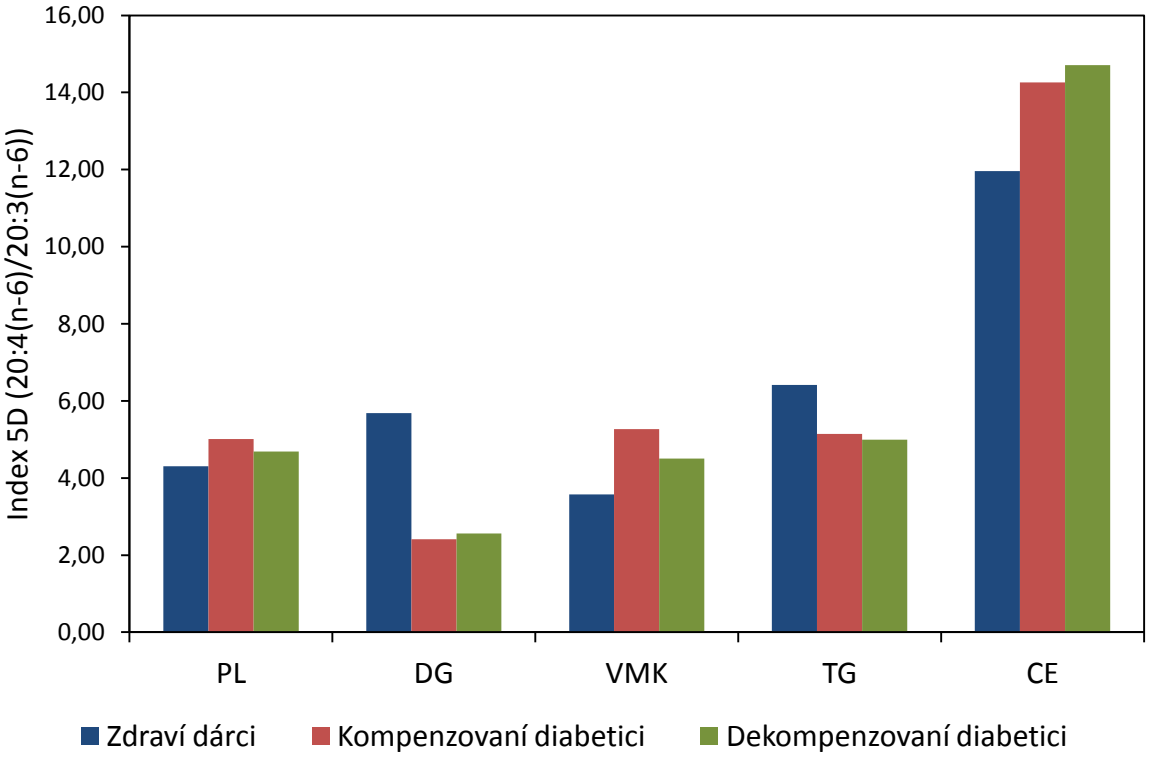
Obr. 4.12: Aktivitní index 9 desaturázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů

Data jsou prezentována jako aritmetický průměr; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001



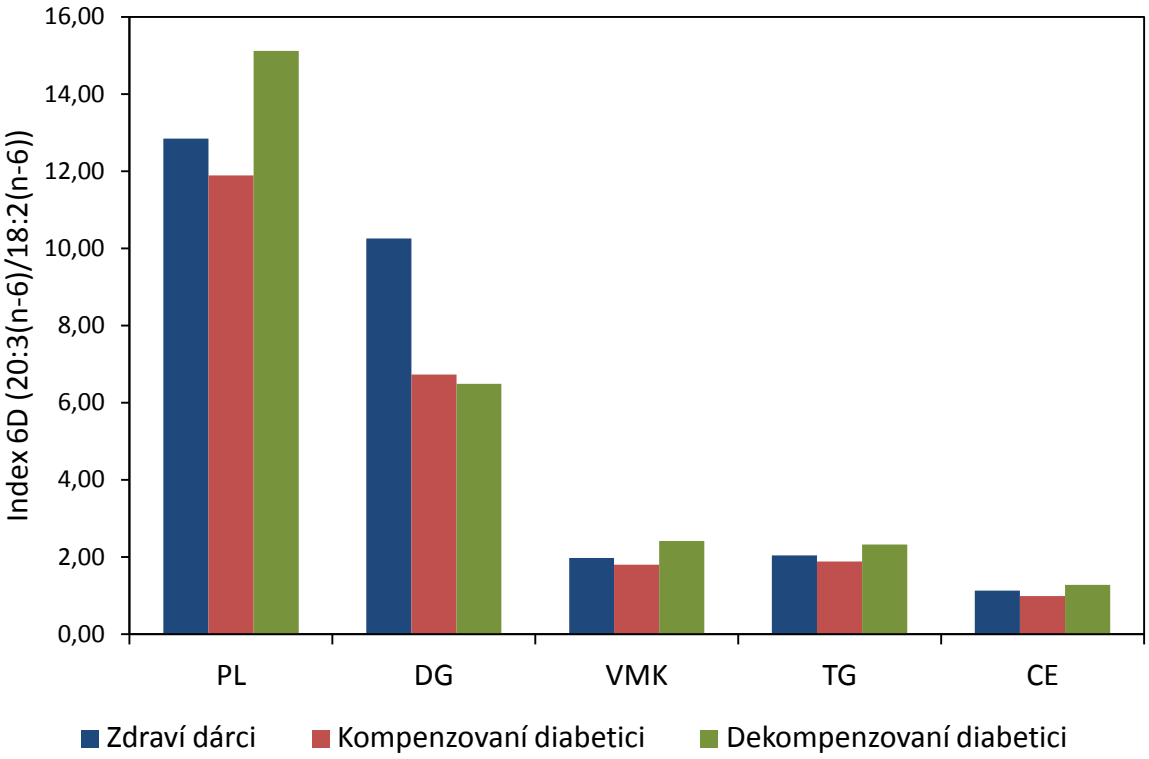
Obr. 4.13: Aktivitní index elongázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů

Data jsou prezentována jako aritmetický průměr; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001



Obr. 4.14: Aktivitní index 5 desaturázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů

Data jsou prezentována jako aritmetický průměr; * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001

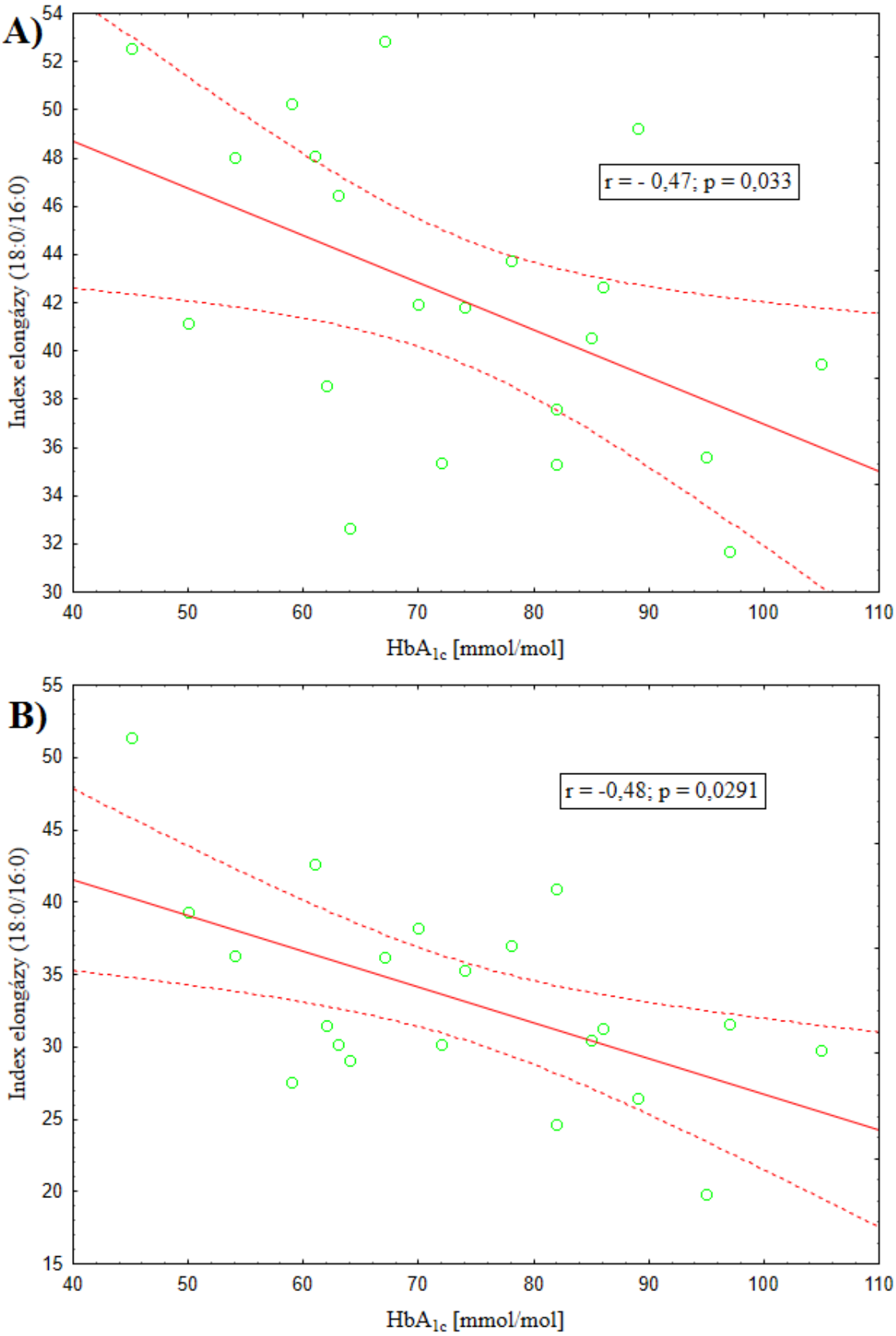


Obr. 4.15: Aktivitní index 6 desaturázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů

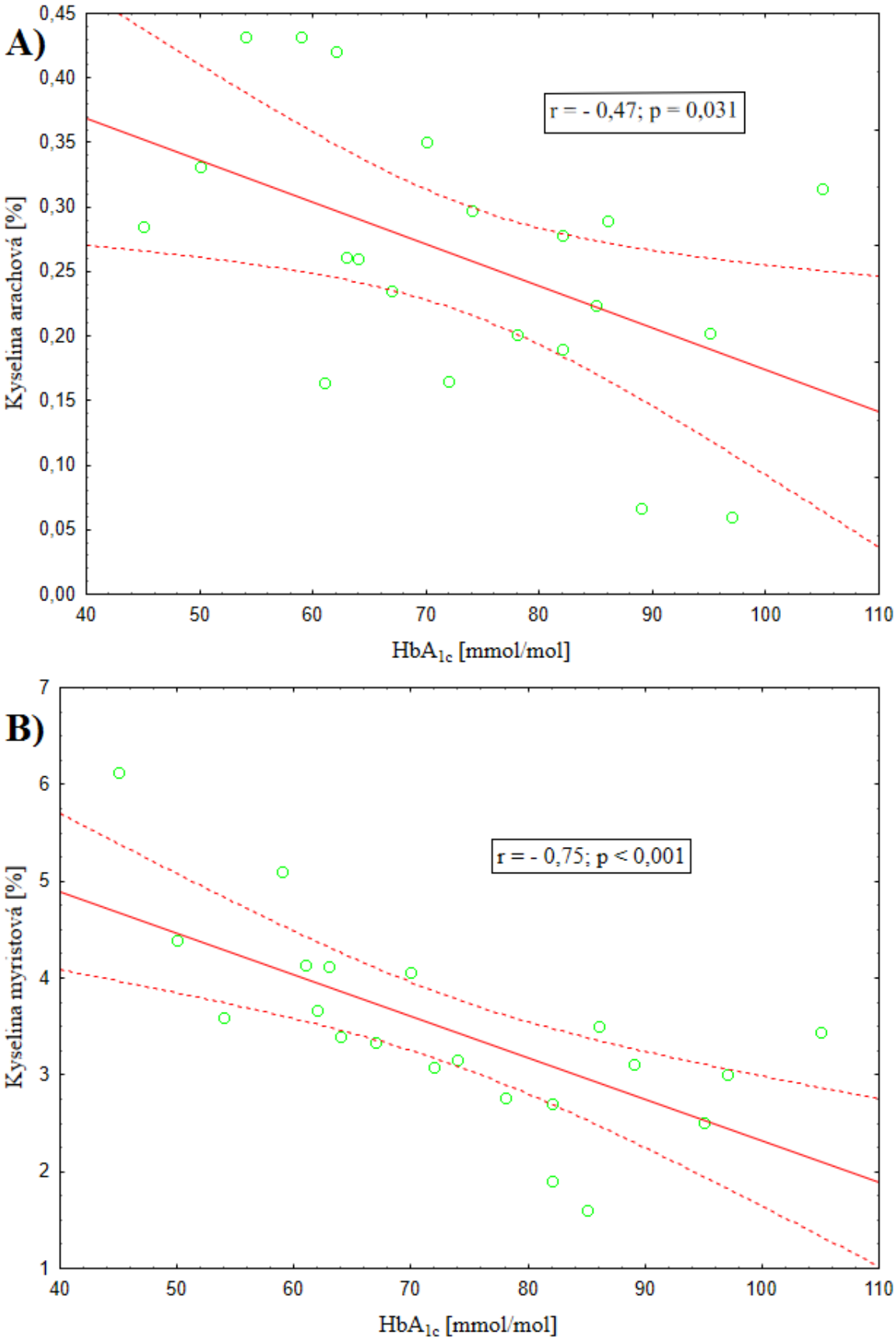
Data jsou prezentována jako aritmetický průměr; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$

Jak můžeme vidět na obrázcích 4.12 až 4.15, statisticky významných rozdílů v aktivitě lipidických enzymů v HDL lipoproteinech není mnoho. Signifikantní snížení bylo nalezeno v případě 9desaturázy u kompenzovaných diabetiků oproti kontrolní skupině ve frakci VMK ($P = 0,047$) a CE ($P = 0,039$). Na zřetel je ovšem nutno dbát, že tento enzym se uplatňuje výhradně při tvorbě TG a CE pro VLDL lipoproteiny (Ntambi, 1999).

Naopak nárůst byl nalezen v případě elongázy ve frakci VMK ($P = 0,014$). Elongáza se jako enzym významně podílí na produkci kyseliny dokosahexaenové a arachidonové. Frakce PL se podílí na struktuře plazmatických membrán a pokles koncentrací těchto kyselin může způsobovat změny jejich fluidity a aktivity transportních proteinů zakotvených v membránách nitrobuněčných organel (Ntambi, 1999). Frakce VMK představuje v játrech substrát pro tvorbu TG (Holeček, 2006). Růst elongázové aktivity u kompenzovaných diabetiků přesně vykresluje účinnost léčby a dodržování dietetických opatření. U dekompenzovaných diabetiků vidíme propad elongázové aktivity až pod průměr zjištěný u zdravých jedinců s neomezeným stravováním. Toto pravděpodobně vede k poškození funkce membrán nitrobuněčných organel a dalšímu zhoršení progrese diabetu.



Obr. 4.16: Bodový graf závislosti aktivitního indexu elongázy na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) VMK HDL lipoproteinů



Obr. 4.17: Bodový graf závislosti obsahu A) k. arachové ve frakci PL a B) k. myristové ve frakci TG na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 v HDL lipoproteinech

Tato práce odhalila statisticky významnou negativní korelaci mezi aktivitním indexem pro elongázu a glykovaným hemoglobinem, jakožto markerem kompenzace diabetu, ve frakcích PL a VMK (viz. obrázek 4.16). Tento klesající trend naznačuje, že palmitová kyselina, která je pro elongázu hlavním substrátem, zůstává v HDL lipoproteinech. Toto může ovlivňovat funkci HDL lipoproteinů v lipidovém metabolismu, konkrétně ve snížení efektivity reverzního transportu cholesterolu. Nízká elongázová aktivita navíc způsobuje porušení produkce kyseliny dokosahexaenové a arachidonové. To má nepříznivý vliv na fluiditu membrán a aktivitu transportních proteinů zakotvených v membránách nitrobuněčných organel (Holeček, 2006; Murakamia a spol., 2008; Ntambi, 1999).

Obrázek 4.17 A) ukazuje negativní korelaci mezi kyselinou arachovou a glykovaným hemoglobinem v PL frakci. Tato závislost doposud nebyla v literatuře popsána a bez dalších klinických studií nelze s jistotou vyvozovat závěry z tohoto zjištění. Naším odhadem je především dopad na intracelulární membrány, jejichž rigiditu i fluiditu přítomnost vyšších nasycených mastných kyselin obvykle zhoršuje.

Na obrázku 4.17 B) můžeme vidět negativní korelaci mezi kyselinou myristovou a glykovaným hemoglobinem. Kyselina myristová má výrazný vliv na zvýšení HDL cholesterolu, tento dosahuje změnami ve vlastnostech membrány endoplazmatického retikula, kde je zakotven enzym 6 desaturáza (Jan a spol., 2004; Loison a spol., 2002; Tholstrup a spol., 2003). Tyto zjištění naše výsledky potvrzují. Efektu zvýšení HDL cholesterolu je však dosaženo za cenu zvýšení hladiny celkového cholesterolu, včetně LDL cholesterolu, pročež je kyselina myristová spojována i s rizikem vzniku ischemické choroby srdeční (Bradbury a spol., 2010; German a Dillard, 2004). Přínos klesajícího trendu kyseliny myristové u diabetiků je tedy diskutabilní.

5 ZÁVĚR

V této práci byly analyzovány rozličné vzorky ať už plazmy nebo plazmatických HDL lipoproteinů se zaměřením na objevování nových poznatků na poli lipidického metabolismu ovlivněného diabetem druhého typu. V průběhu bádání byla původní metoda rozšířena pro stanovení devětatřiceti vyšších mastných kyselin a ukázalo se tak, že i v době vícenásobné hmotnostní spektrometrie může být dnes již jednodušší instrumentace v podobě plynového chromatografu s plamenově ionizační detekcí přínosem.

Na první skupině pacientů jsme prokázali přínos medikace a optimální diety na profil mastných kyselin u diabetiků typu 2. V této studii jsme vyšetřovali vztah mezi glykovaným hemoglobinem (jakožto markerem kompenzace diabetu, užívaným i v reálném sledování pacientů diabetology) a složením mastných kyselin v jednotlivých plazmatických frakcích. Signifikantní asociace byly nalezeny zvláště ve frakci PL a TG. Jako limitující faktor zde byl odhalen věk, obzvláště pro TG frakci. Nově objeveným faktem byla negativní asociace glykovaného hemoglobinu s indexem 9 desaturázy.

Na další skupině jsme se zaměřili na, v profilu mastných kyselin, ne úplně masivně zastoupenou skupinu nastných kyselin s rozvětveným řetězcem. Tyto MK bakteriálního původu dle našich závěrů nejsou pro diabetiky úplně vhodné. BCFA jsou vychytávány játry a dále secernovány jen v podobě triacylglycerolů jako součást VLDL určených ke krytí energetické spotřeby organismu. Tento závěr je podporován faktem, že zvýšená koncentrace BCFA v ostatních jaterních lipidických frakcích (PL a CE) by měla vést k jejich recyklaci a akumulaci v organismu diabetiků. Jelikož se toto neděje, musí být BCFA oxidovány extrahepatálními orgány, hlavně ve svalové tkáni, kde je toto regulováno PPAR receptory méně, než je tomu u jaterní nebo tukové tkáně. Tento poznatek nebyl dosud publikován a zasložil by si další pozornost vědeckých skupin.

Se změnou životního stylu a zdravějším stravováním se k pacientům dostává do jídelníčku více mléčných produktů obsahujících BCFA bakteriálního původu, což vede k akumulaci těchto kyselin v porovnání ke zdravé populaci. Zajímavostí je, že mezi kompenzovanými a dekompenzovanými diabetiky již nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v hladinách BCFA. Závěrem se zdá, že problematika BCFA a diety u diabetických pacientů nebude jen marginální problém a měla by být dále zkoumána.

V poslední skupině jsme se zaměřili na poněkud opomíjené HDL lipoproteiny. Tyto lipoproteiny transportují cholesterol směrem z periferie. Jelikož periferní buňky nemají tak citlivou enzymovou výbavu jako játra, předpokládáme porušení lipidového metabolismu na této úrovni až u akutní fáze diabetu. Hlavní nebezpečí pro diabetiky vidíme v klesajícím trendu elongázové aktivity, s tím spojené snížené produkci kyseliny dokosahexaenové a arachidonové a takto negativně ovlivněné fluiditě membrán a transportních proteinů v nich zakotvených. Uplatnění tohoto mechanismu předpokládáme u dekompenzovaných diabetiků. Podrobnější zkoumání by si zasloužil objevený klesající trend u kyseliny myristové.

6 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Výsledky této disertační práce jsou obsaženy ve 2 publikacích:

- Tomáš Čermák, Petr Laštovička, Vladimíra Mužáková, Martina Líbalová, Lucie Koukalová, Roman Kanďár a Alexander Čegan. *Association of fatty acid profile in plasma lipid fractions with HbA1c in type 2 diabetic patients.* International Journal of Diabetes in Developing Countries, 2016, vol. 36, no. 1, s. 23-33
- Petr Laštovička, Tomáš Čermák, Filip Hájek, Martina Líbalová, Vladimíra Mužáková, Jiří Skalický a Alexander Čegan. *Determination of branched chain fatty acids in plasma of type 2 diabetics.* Scientific Papers of the University of Pardubice Series A 22(2016)

Dále jsem spolupracoval na dalších projektech, které jsou obsaženy ve 2 publikacích:

- Tina Sartorius, Andrea Drescher, Madhura Panse, Petr Laštovička, Andreas Peter, Cora Weigert, Evi Kostenis, Susanne Ullrich, Hans-Ulrich Häring. *Mice Lacking Free Fatty Acid Receptor 1 (GPR40/FFAR1) are Protected Against Conjugated Linoleic Acid-Induced Fatty Liver but Develop Inflammation and Insulin Resistance in the Brain*, Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, vol. 35, no. 6, s. 2272-2284
- Tomáš Čermák, Vladimíra Mužáková, Jan Matějka, Jiří Skalický, Petr Laštovička, Martina Líbalová, Roman Kanďár, Vojtěch Novotný, Alexander Čegan. *Fatty Acid Profile in Erythrocyte Membranes and Plasma Phospholipids Affects Significantly the Extent of Inflammatory Response to Coronary Stent Implantation*, Physiological Research, 2015, sv. 65, číslo 6, s. 941-951

O některých výsledcích jsem referoval na mezinárodních konferencích:

- Petr Laštovička, Lucie Koukalová, Tomáš Čermák, Vladimíra Mužáková, Xenie Štramová, Alexander Čegan, *Determination of activities of desaturases and elongases in type 2 diabetics*, 12th International Nutrition and Dignostics Conference, 27. – 30.8.2012, Praha, Sborník str. 96, ISBN 978-80-7395-456-7
- Petr Laštovička, Lucie Koukalová, Tomáš Čermák, Xenie Štramová, Vladimíra Mužáková, Alexander Čegan, *Plasma fatty acids and lipidomic enzymes levels in diabetic patients*, 3rd European Lipidomic Meeting, 2. – 4. 7. 2013, Pardubice, str. P-28, ISBN 978-80-7395-648-6

- Petr Laštovička, Martina Líbalová, Tomáš Čermák, Vladimíra Mužáková, Alexander Čegan, *Analysis of fatty acids composition in HDL lipoproteins of type 2 diabetic patients*, 14th International Nutrition and Diagnostics Conference, Praha, 2. – 5. 9. 2014, Praha, str. 147, ISBN 978-80-7395-776-6

7 LITERÁRNÍ ZDROJE

- ABDELMAGID, S. A. – CLARKE, S. E. –ROKE, K., et al. Ethnicity, sex, FADS genetic variation, and hormonal contraceptive use influence delta-5-and delta-6-desaturase indices and plasma docosahexaenoic acid concentration in young Canadian adults: a cross-sectional study, *Nutrition & metabolism*, 2015, vol. 12, no. 1, s. 1-12
- ARAYA, J. – RODRIGO, R. – PETTINELLI, P., et al. Decreased Liver Fatty Acid Δ-6 and Δ-5 Desaturase Activity in Obese Patients, *Obesity*, 2010, vol. 18, no. 7, s. 1460-1463
- AUWERX, J. – SCHOONJANS, K. – FRUCHART, J. C., et. al. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR, *Atherosclerosis*, 1996, 124, s. s29-S37
- BOKOR, S. – DUMONT, J. – SPINNEKER, A., et al. Single nucleotide polymorphisms in the FADS gene cluster are associated with delta-5 and delta-6 desaturase activities estimated by serum fatty acid ratios, *Journal of lipid research*, 2010, vol. 51, no. 8, s. 2325-2333
- BRADBURY, K. E. – SKEAFF, C. M. – GREEN, T. J., et al. The serum fatty acids myristic acid and linoleic acid are better predictors of serum cholesterol concentrations when measured as molecular percentages rather than as absolute concentrations, *The American journal of clinical nutrition*, 2010, vol. 91, no. 2, s. 398-405
- CAO, H. – GERHOLD, K. – MAYERS, J.R., et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism, *Cell*, 2008, vol. 134, no. 6, s. 933-944
- CNOP, M – HANNAERT, J. C. – HOORENS, A., et al. Inverse Relationship Between Cytotoxicity of Free Fatty Acids in Pancreatic Islet Cells and Cellular Triglyceride Accumulation, *Diabetes*, 2001, vol. 50, no. 8, s. 1771-1777

- CORMIER, H. – RUDKOWSKA, I. – LEMIEUX, S., et al. Effects of FADS and ELOVL polymorphisms on indexes of desaturase and elongase activities: results from a pre-post fish oil supplementation, *Genes & nutrition*, 2014, vol. 9, no. 6, s. 1-15
- ČEGAN, A. – KORECKÁ, L.*Biochemie pro bakalářské studium chemie a technické chemie*, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2008, 61 s.
- ČIHÁK, R. – GRIM, M.*Anatomie 2*, 2. vydání, Praha: Grada Publishing, 2002, 470 s., ISBN 80-247-0143-X
- DE SOUZA, C. F. – DALZOCHIO, M. B. – DE OLIVEIRA, F. J. A., et al. Glucose tolerance status is a better predictor of diabetes and cardiovascular outcomes than metabolic syndrome: a prospective cohort study, *Diabetology & metabolic syndrome*, 2012, vol. 4, no. 1, s. 1-7
- DEVLIN, T. M.*Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 7. vydání, New Jersey: Wiley, 2010, 1240 s., ISBN 978-047-060-152-5
- DEY, D. – MUKHERJEE, M. – BASU, D., et al. Inhibition of insulin receptor gene expression and insulin signaling by fatty acid: interplay of PKC isoforms therein, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2005, vol. 16, no. 4-6, s. 217-228
- DOBRZYN, A. – NTAMBI, J. M. *The role of stearoyl-CoA desaturase in the control of metabolism*, Prostaglandins, *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2005, vol. 73, no. 1, s. 35-41
- DOSTÁLOVÁ, J.Tuky v potravinách a jejich nutriční hodnocení, *Interní medicína pro praxi*, 2011, ročník 13, číslo 9, s. 347-349
- DOUGHMAN, S.D. – RYAN, A.S. – KRUPANIDHI, S., et al. High DHA dosage from algae oil improves postprandial hypertriglyceridemia and is safe for type-2 diabetics, *International Journal of Diabetes in Developing Countries*, 2013, vol. 23, no. 2, s. 75-82
- EHRMAN, J. – HŮLEK, P., et al.*Hepatologie*, 2. vydání, Praha: Grada Publishing, 2014, 658 s., ISBN 859-404-924-027-2

- FEINGLOS, M. N. – BETHELOVÁ, M. A.*Type 2 Diabetes Mellitus: An Evidence-Based Approach to Practical Management*, 1. vydání, Totowa (New York): Humana Press, 2008, 474 s., ISBN 978-1-58829-794-5
- FERNANDEZ, M. L. – WEST, K. L. Mechanisms by which Dietary Fatty Acids Modulate Plasma Lipids, *The Journal of nutrition*, 2005, vol. 135, no. 9, s. 2075-2078
- FLOWERS, M. T. – NTAMBI, J. M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism, *Current opinion in lipidology*, 2008, vol. 19, no. 3, s. 248-256
- FÜRSTOVÁ, V. – KOPSKÁ, T. – JAMES, R.F., et al. Comparison of the effect of individual saturated and unsaturated fatty acids on cell growth and death induction in the human pancreatic β-cell line NES2Y, *Life Sciences*, 2008, vol. 82, no. 13, s. 684-691
- GERMAN, J. B. – DILLARD, C. J. Saturated fats: what dietary intake?, *The American journal of clinical nutrition*, 2004, vol. 80, no. 3, s. 550-559
- GOPAL, N. – MITRA, A. – SRINIVASAN, A. R., et al. Association of levels of HbA1C with triglycerides/high density lipoprotein ration-an indicator of low density lipoprotein particle size in type 2 diabetes mellitus, *Advance Laboratory Medicine International*, 2012, vol. 2, no. 3, s. 87-95
- GREENSPAN, F. S. – BAXTER, J D. *Základní a klinická endokrinologie*, 1. vydání, Jinočany: Nakladatelství H & H, 2003, 843 s., ISBN 80-86022-56-0
- GUILLOU, H. – ZADRAVEC, D. – MARTIN, P. G. P., et al. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice, *Progress in Lipid Research*, 2010, vol. 49, no. 2, s. 186-199
- GUNDERSON, E. P. – CRITES, Y. – CHIANG, V., et al. Influence of breastfeeding during the postpartum oral glucose tolerance test on plasma glucose and insulin, *Obstetrics and gynecology*, 2012, vol. 120, no. 1, s. 136-143
- HANAS, R. – JOHN, G. 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement, *Diabetes Care*, 2010, vol. 33, no. 8, s. 1903-1904
- HOLEČEK, M.*Regulacemetabolizmu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*, 1. vydání, Praha, Grada Publishing, 2006, 288 s., ISBN 978-80-247-1562-9

- HŘEBÍČEK, J. PPAR: úloha v homeostáze glukózy a lipidů, v inzulínové rezistenci a v ateroskleróze, *Československá fyziologie,* 2004, ročník 53, číslo 1, s. 4–16
- JAN, S. – GUILLOU, H. – D'ANDREA, S., et al. Myristic acid increases Δ6-desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Reproduction Nutrition Development*, 2004, vol. 44, no. 2, s. 131-140
- KAWAGUCHI, K. – SUGIYAMA, T. – HIBASAMI, H., et al. PPAR-γ, TNF-α messenger RNA levels and lipase activity in the pregnant and lactating rat, *Life sciences*, 2003, vol. 72, no. 14, s. 1655-1663
- KHAN, H. A. Clinical significance of HbA1c as a marker of circulating lipids in male and female type 2 diabetic patients, *Acta diabetologica*, 2007, vol. 44, no. 4, s. 193-200
- KHAN, H. A. – SOBKI, S. H. – KHAN, S. A. Association between glycaemic control and serum lipids profile in type 2 diabetic patients: HbA1c predicts dyslipidaemia, *Clinical and experimental medicine*, 2007, vol. 7, no. 1, s. 24-29
- KITTNAR, O., et al.*Lékařská fyziologie*, 1. vydání, Praha: Grada Publishing, 2011, 800 s., ISBN 978-80-247-3068-4
- KLENER, P. *Vnitřní lékařství*, 4. vydání, Praha: Galén, 2011. 1174 s., ISBN 978-807-2627-059
- KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 2. vydání, Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003, 132 s., ISBN 80-86369-07-2
- KLOUDA, P. *Základy biochemie*, 3. vydání, Ostrava: Pavko, 2013, 220 s., ISBN 978-80-86369-16-7
- KOOLMAN, J. – RÖHM, K. H. ***Color*** *Atlas of Biochemistry*, 3. vydání, New York: Thieme Medical Publishers, 2012, 506 s., ISBN 978-3131003737
- KRÁLOVÁ LESNÁ, I. – SUCHÁNEK, P. – KOVÁŘ, J., et al. Replacement of dietary saturated FAs by PUFAs in diet and reverse cholesterol transport. *Journal of lipid research,* 2008, vol. 49, no. 11, s. 2414-2418
- KREMMYDA, L. S. – TVRZICKÁ, E. – STAŇKOVÁ, B., et al. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease-a review. Part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease, *Biomedical Papers*, 2011, vol. 155, no. 3, s. 195-198

- LAGARDE, M. – BERNOUD-HUBAC, N. – CALZADA, C., et al. Lipidomics of essential fatty acids and oxygenated metabolites, *Molecular nutrition & food research*, 2013, volume 57, no. 8, s. 1347-1358
- LATTKA, E. – ILLIG, T. – HEINRICH, J., et al. Do FADS genotypes enhance our knowledge about fatty acid related phenotypes?, *Clinical Nutrition*, 2010, vol. 29, no. 3, s. 277-287
- LEDVINA, M. – STOKLASOVÁ, A. – CERMAN, J., *Biochemie pro studující medicíny: 1. díl*, 1. vydání, Paha: Nakladatelství Karolínum, 2004, 274 s., ISBN 80-246-0849-9
- LOGAN, S. – AGBAGA, M. P. – CHAN, M. D., et al. Endoplasmic reticulum microenvironment and conserved histidines govern ELOVL4 fatty acid elongase activity, *Journal of lipid research*, 2014, vol. 55, no. 4, s. 698-708
- LOISON, C. – MENDY, F. – SÉROUNGE, C., et al. Dietary myristic acid modifies the HDL-cholesterol concentration and liver scavenger receptor BI expression in the hamster. *British Journal of Nutrition*, 2002, vol. 87, no. 3, s. 199-200
- LOVISCACH, M. – REHMAN, N. – CARTER, L., et el. Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action., *Diabetologia*, 2000, vol. 43, no. 3, s. 304-311
- MAEDLER, K. – OBERHOLZER, J. – BUCHER, P., et al. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic β-cell turnover and function, *Diabetes*, 2003, vol. 52, no. 3, s. 726-733
- MAN, W. C. – MIYAZAKI, M. – CHU, K., et al. Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis, *Journal of lipid research*, 2006, vol. 47, no. 9, s. 1928-1939
- MASCARÓ, C. – ACOSTA, E. – ORTIZ, J. A., et. al. Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 15, s. 8560-8563
- MEMON, R. A. – GRUNFELD, C. – FEINGOLD, K. R. TNF-α is not the cause of fatty liver disease in obese diabetic mice. *Nature medicine*, 2001, vol. 7, no. 1, s. 2-3

- MICHALÍK, L. – DESVERGNE, B. – WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors β/δ: emerging roles for a previously neglected third family member, *Current opinion in lipidology*, 2003, vol. 14, no. 2, s. 129-135
- MONTECUCCO, F. – STEFFENS, S. – MACH, F. Insulin resistance: a proinflammatory state mediated by lipid-induced signaling dysfunction and involved in atherosclerotic plaque instability, *Mediators of inflammation, 2008*
- MOTOJIMA, K. – PASSILLY, P. – PETERS, J. M., et al. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α and γ activators in a tissue-and inducer-specific manner, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 27, s. 16710-16714
- MUKHERJI, M. – SCHOFIELD, C. J. – WIERZBICKI, A. S., et al. The chemical biology of branched-chain lipid metabolism. *Progress in lipid research*, 2003, vol. 42, no. 5, s. 359-376
- MURAKAMIA, K. – SASAKIA, S. – TAKAHASHIB, Y., et al.*Lower estimates of δ-5 desaturase and elongase activity are related to adverse profiles for several metabolic risk factors in young Japanese women*, *Nutrition research*, 2008, vol. 28, no. 12, s. 816-824
- MURRAY, R. K. – GRANNER, D. K. – MAYES, P. A., et al. *Harperova biochemie*, 4. Vydání, Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H & H, 2002, 872 s., ISBN 80-7319-013-3
- NANRI, A. – MIZOUE, T. – NODA, M., et al. Fish intake and type 2 diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center–based Prospective Study, *The American journal of clinical nutrition*, 2011, vol. 94, no. 3, s. 884-891
- NTAMBI, J. M. Regulation of stearoyl-CoA desaturase bypolyunsaturated fatty acids and cholesterol, *Journal of Lipid Research*, 1999, vol. 40, no. 9, s. 1549-1558
- OH, J. M. – CHOI, J. M. – LEE, J. Y., et al. Effects of palmitic acid on TNF-α-induced cytotoxicity in SK-Hep-1 cells, *Toxicology in Vitro*, 2012, volume 26, no. 6, s. 783-790
- PATON, CH. M. – NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 2009, vol. 297, no. 1, s. 28-37

- PELIKÁNOVÁ, T., - BARTOŠ, V., et al.*Praktická diabetologie*, 4. vydání, Praha: Maxdorf, 2010, 743 s., ISBN 978-80-7345-216-2
- PELIKÁNOVÁ, T. Syndrom inzulínové rezistence, *Postgraduální medicína*, 2002, ročník 2, číslo 8, s. 7-14
- PERUŠIČOVÁ, J. – ANDĚL, M.*Diabetes mellitus a poruchy metabolismu lipidů*, 1. vydání, Praha: Galén, 2000, 59 s., ISBN 80-7262-050-9
- PERUŠIČOVÁ, J., et al.*Prediabetes, prehypertenze, dyslipidemie a metabolický syndrom*, 1. vydání, Praha: Maxdorf, 2012,315 s., ISBN 978-80-7345-272-8
- PETER, A. – ČEGAN, A. – WAGNER, S., et al.Hepatic lipid composition and stearoyl-coenzyme A desaturase 1 mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios, *Clinical chemistry*, 2009, vol. 55, no. 12, s. 2113-2120
- PETER, A. – ČEGAN, A. – WAGNER, S., et al.Relationships between hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 activity and mRNA expression with liver fat content in humans, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2011, vol. 300, no. 2, s. E321-E326
- PETITTI, D. B. – IMPERATORE, M. – PALLA, S. L., et al. Serum lipids and glucose control: the SEARCH for Diabetes in Youth study, *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 2007, vol. 61, no. 2, s. 159-165
- PISPRASERT, V. – INGRAM, K. H. – LOPEZ-DAVILA, M. F., et al. Limitations in the Use of Indices Using Glucose and Insulin Levels to Predict Insulin Sensitivity Impact of race and gender and superiority of the indices derived from oral glucose tolerance test in African Americans, *Diabetes Care*, 2013, vol. 36, no. 4, s. 845-853
- POUDYAL, H. – PANCHAL, S. K. – DIWAN, V., et al. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action, *Progress in lipid research*, 2011, vol. 50, no. 4, s. 372-387
- RAN-RESSLER, R. R. – DEVAPATLA, S. – LAWRENCE, P., et al. Branched chain fatty acids are constituents of the normal healthy newborn gastrointestinal tract, *Pediatric research*, 2008, vol. 64, no. 6, s. 605-609

- RAN-RESSLER, R. R. – KHAILOVA, L. – ARGANBRIGHT, K. M., et al. Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing enterocolitis and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model, *PloS one*, 2011a, vol. 6, no. 12, s. 1-10
- RAN-RESSLER, R. R. – SIM, D. – O'DONNELL-MEGARO, A. M., et al. Branched chain fatty acid content of United States retail cow's milk and implications for dietary intake, *Lipids*, 2011b, vol. 46, no. 7, s. 569-576
- RACEK, J., et al. *Klinická biochemie*, 2. vydání, Praha: Galén, 2006, 329 s., ISBN 80-7262-324-9
- RICCHI, M. – ODOARDI, M. R. – CARULLI, L., et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes, *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2009, vol. 24, no. 5, s. 830-840
- RODRIGUEZ, Y. – CHRISTOPHE, A. Long-chain omega 6 polyunsaturated fatty acids in erythrocyte phospholipids are associated with insulin resistance in non-obese type 2 diabetics, *Clinica Chimica Acta,* 2005, ročník 354, číslo 1-2, s. 195-199
- RUŠAVÝ, Z. – KREUZBERGOVÁ, J. Inzulínová rezistence, hladina cukru v krvi po jídle a ateroskleróza, *Practicus*, 2003, ročník 2, číslo 8, s. 13-16
- RYBKA, J.*Diabetes mellitus – komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy*, 1. vydání, Praha: Grada Publishing, 2007, 317 s., ISBN 978-80-247-1671-8
- SCHOONJANS, K. – STAELS, B. – AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression, *Journal of lipid research*, 1996, vol. 37, no. 5, s. 907-925
- SILBERNAGEL, G. – KOVÁŘOVÁ, M. – ČEGAN, A., et al. High hepatic SCD1 activity is associated with low liver fat content in healthy subjects under a lipogenic diet, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012, vol. 97, no. 12, s. E2288-E2292

- SINNER, D. I. – KIM, G. J. – HENDERSON, G. C., et al. StearoylCoA desaturase-5: a novel regulator of neuronal cell proliferation and differentiation, *PloS one*, 2012, vol. 7, no. 6, s. 1-12
- SMOLKOVÁ, E. – FELTL, L.*Analýza látek v plynném stavu*, 1. vydání, Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1991, 478 s., ISBN 80-03-00604-X
- SPIEGELMAN, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 1998, vol. 47, no. 4, s. 507-514
- STAELS, B. – VU-DAC, N. G. O. V. – KOSYKH, V. A., et. al. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates, *Journal of Clinical Investigation*, 1995, vol. 95, no. 2, s. 705-712
- STEFAN, N. – KANTARZIS, K. – CELEBI, N., et al.Circulating Palmitoleate Strongly and Independently Predicts Insulin Sensitivity in Humans, *Diabetes Care*, 2010, vol. 33, no. 2, s. 405-407
- STEFAN, N. – PETER, A. – ČEGAN, A., et al. Low hepatic stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans, *Diabetologia*, 2008, vol. 51, no. 4, s. 648-656
- SZABÓ, A. – MÉZES, M. – DALLE ZOTTE, A., et al. Changes of the fatty acid composition and malondialdehyde concentration in rabbit Longissimus dorsi muscle after regular electrical stimulation, *Meat science*, 2004, vol. 67, no. 3, s. 427-432
- ŠMÍDKOVÁ, L.*Modul A: Teoretické základy medicíny I.*, 1. vydání, Praha: Triton, 2003. ISBN 80-725-4362-8
- ŠPITÁLNÍKOVÁ, S. Laboratorní vyšetření při diabetu, *Pacientské listy*, 2010, roč. 2, č. 6, s. 30-32
- ŠTERN, P. – BEZDÍČKOVÁ, D. – BRODSKÁ, H., et al.*Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*, 1. Vydání, Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolínum, 2005, 219 s., ISBN 80-246-1025-6

- THOLSTRUP, T. – VESSBY, B. – SANDSTORM, B. Difference in effect of myristic and stearic acid on plasma HDL cholesterol within 24 h in young men. *European journal of clinical nutrition*, 2003, vol. 57, no. 6, s. 735-742
- TROJAN, S. – LANGMEIER, M., et al.*Lékařská fyziologie*, 4. vydání, Praha: Grada Publishing, 2003, 772 s., ISBN 80-247-0512-5
- TVRZICKÁ, E. – STAŇKOVÁ, B. – VECKA, M., et al. Mastné kyseliny – 1. Výskyt a metabolický význam, *Časopis lékařů českých*, 2009a, ročník 148, číslo 1, s. 16-24
- TVRZICKÁ, E. – STAŇKOVÁ, B. – VECKA, M., et al. Mastné kyseliny – 2. Fyziologický a klinický význam, *Časopis lékařů českých*, 2009b, ročník 148, číslo 3, s. 116-123
- VAN DIJK, S. J. – FESKENS, E. J. – BOS, M. B., et al. A saturated fatty acid–rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome, *The American journal of clinical nutrition*, 2009, vol. 90, no. 6, s. 1656-1664
- VELÍŠEK, J. – HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I.* 3. vydání, Tábor: OSSIS, 2009, 602 s., ISBN 978-80-86659-15-2
- VIJAYARAGHAVAN, K. Treatment of dyslipidemia in patients with type 2 diabetes, *Lipids in health and disease*, 2010, vol. 9, no. 1, s. 1-12
- VINODMAHATO, R. – GYAWALI, P. – RAUT, P. P., et al. Association between glycaemic control and serum lipid profile in type 2 diabetic patients: Glycated haemoglobin as a dual biomarker, *Biomedical Research*, 2011, vol. 22, no. 3, s. 375-380
- VOET, D., VOETOVÁ, J. G.*Biochemie*, 1. vydání, Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s., ISBN 80-85605-44-9
- VOKURKA, M., et al. Patofyziologie pro nelékařské směry, 3. vydání, Praha: Karolinum Press, 2012, 306 s., ISBN 978-80-246-2032-9
- WELTERS, H. J. – DIAKOGIANNAKI, E. – MORDUE, J. M., et al. Differential protective effects of palmitoleic acid and cAMP on caspase activation and cell viability in pancreatic β-cells exposed to palmitate, *Apoptosis*, 2006, vol. 11, no. 7, s. 1231-1238

- WU, J.H. – MICHA, R. – IMAMURA, F., et al. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *British journal of nutrition*, 2012, vol. 107, no. S2, s. S214-S227
- XUE, X. – FENG, C. Y. – HIXSON, S. M., et al. Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (Gadus morhua), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, vol. *175*, s. 9-22
- YAMAGISHI, K. – NETTLETON, J. A. – FOLSOM, A. R. Plasma fatty acid composition and incident heart failure in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *American heart journal*, 2008, vol. 156, no. 5, s. 965-974
- YAO-BORENGASSER, A. – RASSOULI, N. – VARMA, V., et al.Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Gene Expression Increases after Pioglitazone Treatment and Is Associated with Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-γ Responsiveness, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, vol. 93, no. 11, s. 4431-4439

8 PŘÍLOHY

8.1 Data pro stanovení analytických parametrů metody

Budou doplněny tabulky s daty.

Tab. 8.1: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 - 5

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	4,71	4,50	4,97	5,02	4,51
myristová k.	9,04	8,32	8,94	9,81	9,39
13-metylmyristová k.	5,87	6,98	6,72	7,05	7,00
12-metylmyristová k.	7,65	7,19	7,51	8,18	7,79
pentadecylová k.	7,54	7,04	7,95	8,26	7,98
palmitová k.	158,36	154,44	162,41	147,61	178,37
sapienová k.	2,60	2,43	2,79	2,97	2,89
palmitoolejová k. cis	10,39	10,24	10,34	11,41	11,07
14-metylpalmitová k.	2,24	2,19	2,75	2,44	2,37
margarová k.	4,04	4,09	4,35	4,23	4,37
isostearová k.	2,12	2,01	2,07	2,31	2,08
stearová k.	47,94	45,14	48,82	56,17	59,58
vakcenová k. trans	2,24	1,79	2,67	3,14	3,49
olejová k.	93,79	94,25	96,24	98,83	101,20
vakcenová k. cis	8,94	8,23	9,15	10,39	9,59
nonadecylová k.	2,52	2,71	2,85	2,65	2,83
linolová k.	54,79	57,91	60,68	63,43	64,35
ɣ-linolenová k.	2,29	2,76	2,67	2,81	2,86
arachová k.	2,52	2,63	2,82	3,08	3,01
α-linolenová k.	10,78	11,28	11,29	12,14	12,18
stearidonová k.	1,48	1,89	1,65	1,67	1,75
eikosatrienová k.	0,91	1,10	0,91	0,89	0,80
behenová k.	0,17	0,21	0,15	0,21	0,19
arachidonová k.	3,89	4,21	4,46	4,31	4,28
eikosatetraenová k.	0,05	0,05	0,08	0,05	0,08

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
eikosapentaenová k.	22,09	27,42	27,41	24,65	24,99
lignocerová k.	0,50	0,40	0,33	0,60	0,49
dokosatetraenová k.	6,34	3,22	4,26	4,54	5,45
nervonová k.	149,36	145,00	153,11	157,57	155,87
dokosapentaenová k.	1,78	1,74	1,72	1,93	1,25
dokosapentaenová k.	1,03	1,17	1,15	0,94	0,96
dokosahexaenová k.	2,90	3,60	3,00	2,64	2,92
cerotová k.	0,84	1,04	0,60	0,57	0,37
tetrakosatetraenová k.	1,59	1,91	2,22	1,20	1,81
tetrakosapentaenová k.	1,57	1,75	1,86	1,37	1,49
tetrakosapentaenová k.	1,16	1,31	1,40	1,38	0,95
tetrakosahexaenová k.	1,50	1,21	1,64	1,95	1,40

Tab. 8.2: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 – 10

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	4,73	5,52	5,00	4,51	3,59
myristová k.	7,91	8,61	8,18	9,18	6,26
13-metylmyristová k.	5,07	7,09	5,85	5,26	6,29
12-metylmyristová k.	7,56	7,94	7,52	7,48	6,34
pentadecylová k.	7,01	7,01	7,16	8,61	6,06
palmitová k.	157,52	163,43	150,39	146,49	147,71
sapienová k.	2,12	2,36	2,30	3,31	1,84
palmitoolejová k. cis	9,48	10,09	9,04	9,87	8,51
14-metylpalmitová k.	2,05	2,36	2,06	2,13	2,04
margarová k.	4,12	4,30	3,93	3,92	3,96
isostearová k.	2,25	2,15	1,99	1,72	2,07
stearová k.	48,55	50,32	49,43	42,09	49,75
vakcenová k. trans	2,20	2,42	2,77	1,94	2,55
olejová k.	94,74	97,86	91,55	85,15	89,25
vakcenová k. cis	8,99	9,05	8,43	8,06	8,62

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
nonadecylová k.	2,77	2,87	2,81	2,16	2,60
linolová k.	53,91	56,68	51,27	49,08	50,41
ɣ-linolenová k.	2,16	2,10	1,97	1,86	2,06
arachová k.	2,63	2,50	2,50	2,31	2,46
α-linolenová k.	10,97	11,17	9,94	9,67	9,54
stearidonová k.	1,40	1,33	1,25	1,49	1,27
eikosatrienová k.	0,85	0,82	0,80	0,82	0,78
behenová k.	0,15	0,23	0,13	0,18	0,20
arachidonová k.	3,88	4,10	3,66	3,67	3,71
eikosatetraenová k.	0,04	0,06	0,04	0,05	0,04
eikosapentaenová k.	22,36	20,21	24,76	21,34	20,52
lignocerová k.	0,28	0,29	0,44	0,55	0,47
dokosatetraenová k.	5,89	6,63	7,45	8,42	7,83
nervonová k.	154,39	161,54	154,18	133,46	143,54
dokosapentaenová k.	1,94	1,76	2,00	1,14	2,15
dokosapentaenová k.	1,05	1,02	1,07	0,93	0,91
dokosahexaenová k.	2,35	2,83	2,36	2,44	2,16
cerotová k.	0,72	0,53	0,82	0,89	0,64
tetrakosatetraenová k.	1,64	1,51	1,64	1,19	1,55
tetrakosapentaenová k.	1,12	1,44	1,42	1,25	1,50
tetrakosapentaenová k.	1,26	1,32	0,85	0,98	0,88
tetrakosahexaenová k.	1,22	2,23	1,07	1,96	1,23

Tab. 8.3: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 – 5

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	10,17	12,97	12,83	9,98	12,94
myristová k.	14,36	16,24	16,14	14,42	16,29
13-metylmyristová k.	11,56	13,50	13,91	13,31	14,67
12-metylmyristová k.	20,11	22,04	21,94	19,56	21,58
pentadecylová k.	10,06	10,42	10,46	10,14	10,57

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
palmitová k.	375,35	382,98	389,70	375,50	399,42
sapienová k.	4,97	5,20	5,15	4,93	5,19
palmitoolejová k. cis	24,32	25,07	25,10	24,25	24,92
14-metylpalmitová k.	5,98	6,44	6,39	6,11	6,42
margarová k.	11,59	11,52	11,62	11,43	11,70
isostearová k.	5,62	5,83	5,84	5,65	5,88
stearová k.	118,89	128,03	135,17	128,80	142,93
vakcenová k. trans	7,67	7,63	7,50	7,51	7,51
olejová k.	248,09	249,85	246,39	242,51	250,18
vakcenová k. cis	24,08	25,04	24,72	24,23	24,53
nonadecylová k.	8,84	8,97	8,70	8,59	8,83
linolová k.	128,60	130,14	130,90	128,84	130,46
ɣ-linolenová k.	6,13	5,99	6,24	6,25	5,98
arachová k.	6,86	7,05	6,85	6,75	7,31
α-linolenová k.	32,98	32,29	32,67	31,59	31,04
stearidonová k.	3,49	3,31	3,17	3,03	3,30
eikosatrienová k.	2,07	2,19	2,17	2,13	2,09
behenová k.	0,16	0,17	0,14	0,17	0,17
arachidonová k.	9,48	9,15	8,99	9,05	8,95
eikosatetraenová k.	0,19	0,20	0,19	0,17	0,18
eikosapentaenová k.	68,97	67,14	67,51	65,94	64,41
lignocerová k.	0,38	0,33	0,28	0,30	0,38
dokosatetraenová k.	6,74	6,74	6,75	6,38	6,57
nervonová k.	477,59	491,68	479,63	476,16	486,33
dokosapentaenová k.	5,15	4,75	4,34	4,28	4,38
dokosapentaenová k.	3,20	3,12	3,10	3,10	3,16
dokosahexaenová k.	5,82	5,55	5,46	5,69	5,30
cerotová k.	3,98	4,92	3,96	5,03	5,80
tetrakosatetraenová k.	5,12	5,25	5,42	5,33	5,76
tetrakosapentaenová k.	4,56	4,89	4,99	5,26	5,21
tetrakosapentaenová k.	3,75	3,33	3,50	3,32	3,18
tetrakosahexaenová k.	3,56	3,69	3,40	4,16	3,75

Tab. 8.4: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 – 10

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	11,03	10,80	10,32	11,47	9,36
myristová k.	17,09	15,08	11,02	13,11	16,15
13-metylmyristová k.	13,26	13,97	12,44	12,68	12,50
12-metylmyristová k.	20,77	20,38	14,87	15,98	19,14
pentadecylová k.	10,75	10,45	10,02	10,32	9,63
palmitová k.	389,32	376,30	354,44	410,30	371,07
sapienová k.	5,26	5,36	4,62	4,79	5,06
palmitoolejová k. cis	25,51	24,91	22,45	23,44	23,54
14-metylpalmitová k.	6,23	6,33	6,08	6,16	6,11
margarová k.	11,75	11,74	11,38	11,38	11,44
isostearová k.	5,87	5,76	5,69	5,54	5,64
stearová k.	125,26	122,05	120,57	128,47	119,53
vakcenová k. trans	7,75	7,59	7,52	7,29	7,45
olejová k.	255,64	247,83	246,51	275,16	249,07
vakcenová k. cis	25,03	24,22	24,48	25,61	24,69
nonadecylová k.	8,90	8,99	9,08	8,87	9,00
linolová k.	131,50	130,02	127,32	128,10	126,38
ɣ-linolenová k.	6,34	6,07	5,97	6,14	6,00
arachová k.	6,76	6,79	6,75	7,51	6,72
α-linolenová k.	33,23	32,17	31,29	31,95	31,02
stearidonová k.	3,34	3,31	3,50	3,55	3,37
eikosatrienová k.	2,08	2,09	2,17	2,15	2,00
behenová k.	0,19	0,17	0,15	0,20	0,18
arachidonová k.	9,43	9,15	9,14	9,31	8,94
eikosatetraenová k.	0,18	0,17	0,24	0,21	0,22
eikosapentaenová k.	66,50	65,79	63,60	68,79	66,54
lignocerová k.	0,35	0,35	0,39	0,30	0,37
dokosatetraenová k.	6,38	6,44	6,58	6,50	6,37
nervonová k.	489,32	480,14	483,23	499,74	487,85
dokosapentaenová k.	5,03	4,68	4,74	4,95	4,69

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
dokosapentaenová k.	3,20	3,14	3,08	3,39	3,22
dokosahexaenová k.	5,79	5,30	5,46	5,85	5,16
cerotová k.	5,33	4,27	4,87	5,04	4,44
tetrakosatetraenová k.	5,83	5,41	5,58	5,70	5,82
tetrakosapentaenová k.	5,41	4,83	4,50	5,18	4,97
tetrakosapentaenová k.	3,82	3,54	3,56	3,55	3,67
tetrakosahexaenová k.	4,18	3,78	4,13	3,37	4,15

Tab. 8.5: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 – 5

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	4,71	4,72	4,68	4,77	4,79
myristová k.	9,04	8,81	8,84	8,94	8,99
13-metylmyristová k.	5,87	5,81	5,73	5,84	5,91
12-metylmyristová k.	7,65	7,77	7,58	7,51	7,80
pentadecylová k.	7,54	7,48	7,42	7,72	7,75
palmitová k.	158,36	154,30	158,64	156,26	153,92
sapienová k.	2,60	2,55	2,59	2,63	2,64
palmitoolejová k. cis	10,39	10,29	10,31	10,32	10,41
14-metylpalmitová k.	2,24	2,25	2,03	2,29	2,11
margarová k.	4,04	4,12	4,11	4,25	4,22
isostearová k.	2,12	2,06	1,95	2,26	2,25
stearová k.	47,94	47,21	46,85	48,12	48,61
vakcenová k. trans	2,24	1,94	1,87	2,27	2,23
olejová k.	93,79	92,87	92,33	93,13	93,70
vakcenová k. cis	8,94	8,97	8,83	9,43	9,11
nonadecylová k.	2,52	2,47	2,32	2,62	2,57
linolová k.	54,79	54,22	54,37	54,37	56,32
ɣ-linolenová k.	2,29	2,04	1,98	2,22	2,11
arachová k.	2,52	2,31	2,40	2,50	2,40
α-linolenová k.	10,78	10,69	10,35	10,65	11,06

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
stearidonová k.	1,48	1,34	1,21	1,73	1,92
eikosatrienová k.	0,91	0,87	0,88	0,92	0,99
behenová k.	0,17	0,16	0,15	0,18	0,20
arachidonová k.	3,89	3,78	3,78	3,88	4,04
eikosatetraenová k.	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06
eikosapentaenová k.	22,09	21,32	21,62	23,05	19,43
lignocerová k.	0,50	0,41	0,42	0,62	0,55
dokosatetraenová k.	6,34	6,29	6,22	6,22	6,46
nervonová k.	149,36	149,62	147,85	147,15	150,40
dokosapentaenová k.	1,78	1,71	1,74	1,79	1,91
dokosapentaenová k.	1,03	1,05	1,02	1,02	1,02
dokosahexaenová k.	2,90	2,75	2,71	2,88	2,88
cerotová k.	0,84	0,85	0,76	0,84	0,89
tetrakosatetraenová k.	1,59	1,65	1,46	1,64	1,58
tetrakosapentaenová k.	1,57	1,52	1,49	1,52	1,62
tetrakosapentaenová k.	1,16	1,11	1,04	1,17	1,10
tetrakosahexaenová k.	1,50	1,37	1,39	1,26	1,49

Tab. 8.6: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 – 10

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	4,66	5,05	4,75	4,93	5,10
myristová k.	8,86	9,05	9,09	9,21	9,56
13-metylmyristová k.	5,96	6,15	5,94	6,06	6,23
12-metylmyristová k.	7,47	7,70	7,34	7,68	8,19
pentadecylová k.	7,80	7,57	7,86	7,72	7,82
palmitová k.	156,87	154,62	152,67	154,97	158,46
sapienová k.	2,57	2,61	2,56	2,66	2,69
palmitoolejová k. cis	10,41	10,41	10,62	10,59	10,66
14-metylpalmitová k.	2,04	2,08	2,15	2,25	2,23
margarová k.	4,20	4,30	4,32	4,36	4,25

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isostearová k.	2,30	2,42	2,23	2,28	2,32
stearová k.	48,59	47,72	48,49	48,49	48,91
vakcenová k. trans	2,32	2,10	2,01	2,19	2,47
olejová k.	93,46	92,31	93,65	94,23	94,26
vakcenová k. cis	9,02	8,86	9,08	9,27	9,32
nonadecylová k.	2,62	2,59	2,49	2,53	2,68
linolová k.	55,92	55,40	55,93	55,68	55,37
ɣ-linolenová k.	2,36	2,25	2,44	2,42	2,48
arachová k.	2,33	2,42	2,38	2,58	2,45
α-linolenová k.	10,81	10,65	10,84	10,83	10,86
stearidonová k.	1,62	1,46	1,32	1,45	1,73
eikosatrienová k.	0,94	1,02	0,98	1,01	1,05
behenová k.	0,17	0,18	0,16	0,17	0,19
arachidonová k.	3,91	3,93	3,83	3,92	3,95
eikosatetraenová k.	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06
eikosapentaenová k.	23,54	22,51	21,78	23,29	23,90
lignocerová k.	0,45	0,45	0,50	0,54	0,58
dokosatetraenová k.	6,28	6,15	6,49	6,36	6,53
nervonová k.	153,24	147,67	150,26	151,11	153,20
dokosapentaenová k.	1,97	1,81	1,75	1,74	1,86
dokosapentaenová k.	0,94	0,96	0,99	1,00	1,04
dokosahexaenová k.	3,02	3,07	2,93	2,76	2,81
cerotová k.	0,89	1,00	0,86	0,89	0,94
tetrakosatetraenová k.	1,78	1,71	1,72	1,66	1,69
tetrakosapentaenová k.	1,61	1,70	1,76	1,65	1,74
tetrakosapentaenová k.	1,14	1,18	1,23	1,09	1,21
tetrakosahexaenová k.	1,54	1,60	1,54	1,59	1,51

Tab. 8.7: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 – 5

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	10,17	10,20	10,05	10,38	10,25
myristová k.	14,36	14,30	14,48	14,34	14,41
13-metylmyristová k.	11,56	11,64	11,53	11,68	11,48
12-metylmyristová k.	20,11	20,09	20,25	20,52	20,21
pentadecylová k.	10,06	10,11	10,01	10,25	9,98
palmitová k.	375,35	376,15	370,83	377,60	367,88
sapienová k.	4,97	4,87	4,92	4,96	4,97
palmitoolejová k. cis	24,32	24,11	24,46	24,32	24,31
14-metylpalmitová k.	5,98	5,94	6,03	5,98	5,79
margarová k.	11,59	11,41	11,41	11,58	11,41
isostearová k.	5,62	5,57	5,50	5,82	5,51
stearová k.	118,89	118,86	117,72	120,96	115,23
vakcenová k. trans	7,67	7,67	7,60	7,75	7,61
olejová k.	248,09	249,62	244,97	250,24	244,35
vakcenová k. cis	24,08	23,94	24,07	24,77	23,89
nonadecylová k.	8,84	8,84	8,89	9,12	8,90
linolová k.	128,60	128,90	127,22	132,34	125,87
ɣ-linolenová k.	6,13	6,13	6,17	6,19	6,10
arachová k.	6,86	6,85	6,77	6,93	6,74
α-linolenová k.	32,98	32,97	32,40	33,12	33,00
stearidonová k.	3,49	3,39	3,69	3,67	3,79
eikosatrienová k.	2,07	2,05	2,06	2,05	2,12
behenová k.	0,16	0,15	0,16	0,14	0,17
arachidonová k.	9,48	9,49	9,56	9,52	9,51
eikosatetraenová k.	0,19	0,18	0,19	0,18	0,21
eikosapentaenová k.	68,97	68,25	67,49	70,53	69,14
lignocerová k.	0,38	0,37	0,38	0,37	0,39
dokosatetraenová k.	6,74	6,76	6,44	6,89	6,82
nervonová k.	477,59	479,39	472,60	482,07	472,79
dokosapentaenová k.	5,15	5,08	5,10	5,06	5,11
dokosapentaenová k.	3,20	3,17	3,17	3,23	3,16
dokosahexaenová k.	5,82	5,67	5,77	5,80	5,85
cerotová k.	3,98	3,83	4,01	3,93	4,28

Triviální název	1	2	3	4	5
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
tetrakosatetraenová k.	5,12	5,09	5,06	5,12	5,10
tetrakosapentaenová k.	4,56	4,46	4,57	4,61	4,57
tetrakosapentaenová k.	3,75	3,71	3,72	3,70	3,72
tetrakosahexaenová k.	3,56	3,55	3,55	3,47	3,57

Tab. 8.8: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 – 10

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
isomyristová k.	10,34	10,32	9,91	10,10	10,16
myristová k.	14,25	14,76	14,30	14,53	14,40
13-metylmyristová k.	11,55	11,57	11,73	11,55	11,69
12-metylmyristová k.	20,22	20,51	20,31	20,45	20,15
pentadecylová k.	9,92	10,30	10,01	10,24	10,17
palmitová k.	372,14	379,83	375,30	375,67	371,18
sapienová k.	4,84	4,93	5,00	4,93	4,97
palmitoolejová k. cis	24,16	24,27	24,29	24,15	23,96
14-metylpalmitová k.	5,90	6,19	6,01	6,17	6,03
margarová k.	11,50	11,50	11,54	11,31	11,34
isostearová k.	5,48	5,71	5,66	5,52	5,70
stearová k.	116,34	118,59	117,47	118,21	118,44
vakcenová k. trans	7,46	7,58	7,83	7,52	7,50
olejová k.	244,95	248,99	248,17	247,53	244,72
vakcenová k. cis	24,18	23,88	24,23	24,22	23,95
nonadecylová k.	8,90	8,79	8,86	9,02	8,94
linolová k.	128,77	128,91	127,67	127,58	127,42
ɣ-linolenová k.	6,13	6,05	6,10	6,17	6,17
arachová k.	6,82	6,86	6,99	6,92	6,87
α-linolenová k.	33,38	33,07	33,36	33,41	33,03
stearidonová k.	3,44	3,24	3,76	3,61	3,84
eikosatrienová k.	2,08	2,01	2,06	2,14	2,06
behenová k.	0,16	0,15	0,16	0,17	0,17

Triviální název	6	7	8	9	10
	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]	c [µmol/l]
arachidonová k.	9,58	9,68	9,43	9,64	9,56
eikosatetraenová k.	0,21	0,20	0,20	0,21	0,20
eikosapentaenová k.	68,84	69,18	68,65	70,14	68,30
lignocerová k.	0,37	0,35	0,37	0,38	0,38
dokosatetraenová k.	6,65	6,61	6,78	6,85	6,82
nervonová k.	475,31	470,92	477,27	477,25	471,81
dokosapentaenová k.	5,14	4,94	5,12	5,11	5,10
dokosapentaenová k.	3,18	3,17	3,18	3,22	3,15
dokosahexaenová k.	5,89	5,60	5,79	5,85	5,84
cerotová k.	4,26	3,62	4,19	4,07	3,70
tetrakosatetraenová k.	5,15	4,99	5,09	5,08	5,11
tetrakosapentaenová k.	4,50	4,52	4,59	4,53	4,62
tetrakosapentaenová k.	3,79	3,67	3,69	3,73	3,76
tetrakosahexaenová k.	3,45	3,36	3,42	3,47	3,42

8.2 Seznam vyobrazení

- Obr. 2.1: Anatomie jater
- Obr. 2.2: Krevní lipoprotein
- Obr. 2.3: Schéma lipoproteinového metabolismu
- Obr. 2.4: Přehled stanovovaných rozvětvených mastných kyselin
- Obr. 2.5: β-oxidace mastných kyselin
- Obr. 2.6: Úloha desaturáz a elongáz v přeměně mastných kyselin
- Obr. 2.7: Model membránové topologie myší SCD1
- Obr. 2.8: Desaturace a elongace esenciálních mastných kyselin
- Obr. 2.9: Znázornění retenčního faktoru
- Obr. 3.1: Chromatogram původní používané metody (frakce PL)
- Obr. 3.2: Chromatogram nynější používané metody (frakce PL)
- Obr. 4.1: Bodový graf závislosti aktivitního indexu 9 desaturázy na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) TG
- Obr. 4.2: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) TG

- Obr. 4.3: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny olejové na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) TG
- Obr. 4.4: Bodový graf závislosti aktivitního indexu 9 desaturázy na glykovaném hemoglobinu u zdravých dárců ve frakci A) PL a B) TG
- Obr. 4.5: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny palmitové na glykovaném hemoglobinu u zdravých dárců ve frakci A) PL a B) TG
- Obr. 4.6: Bodový graf závislosti obsahu kyseliny olejové na glykovaném hemoglobinu u zdravých dárců ve frakci A) PL a B) TG
- Obr. 4.7: Bodový graf závislosti obsahu celkových plazmatických TG na glykovaném hemoglobinu u A) diabetiků typu 2 a B) zdravých dárců
- Obr. 4.8: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci DG
- Obr. 4.9: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci VMK
- Obr. 4.10: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci TG
- Obr. 4.11: Obsah rozvětvených mastných kyselin ve frakci CE
- Obr. 4.12: Aktivitní index 9 desaturázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů
- Obr. 4.13: Aktivitní index elongázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů
- Obr. 4.14: Aktivitní index 5 desaturázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů
- Obr. 4.15: Aktivitní index 6 desaturázy v jednotlivých frakcích u HDL lipoproteinů
- Obr. 4.16: Bodový graf závislosti aktivitního indexu elongázy na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 ve frakci A) PL a B) VMK HDL lipoproteinů
- Obr. 4.17: Bodový graf závislosti obsahu A) k. arachové ve frakci PL a B) k. myristové ve frakci TG na glykovaném hemoglobinu u diabetiků typu 2 v HDL lipoproteinech

8.3 Seznam tabulek

- Tabulka 3.1: Rozdělení vzorků dle úrovně glykovaného hemoglobinu
- Tabulka 3.2: Přehled názvosloví stanovovaných mastných kyselin
- Tabulka 3.3: Charakteristika opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin
- Tabulka 3.4: Charakteristika opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin
- Tabulka 3.5: Charakteristika reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin

- Tabulka 3.6: Charakteristika reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin
- Tabulka 4.1: Porovnání rozdílů mezi skupinou zdravých dárců a diabetiky druhého typu pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu. Rozdíly hledány u faktoru věku a pohlaví ve frakci PL
- Tabulka 4.2: Porovnání rozdílů mezi skupinou zdravých dárců a diabetiky druhého typu pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu. Rozdíly hledány u faktoru věku a pohlaví ve frakci TG
- Tabulka 4.3: Obsah významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci PL
- Tabulka 4.4: Obsah významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci VMK
- Tabulka 4.5: Obsah významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci TG
- Tabulka 4.6: významných mastných kyselin, jejich skupin a enzymových indexů ve frakci CE
- Tabulka 4.7: Charakterizace skupiny pro stanovení rozvětvených mastných kyselin, data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka
- Tabulka 4.8: Přesnost metody testovaná ve frakci VMK, n=10
- Tabulka 4.9: Charakterizace skupiny pro zkoumání HDL lipoproteinů, data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka
- Tabulka 8.1: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 – 5
- Tabulka 8.2: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 – 10
- Tabulka 8.3: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 – 5
- Tabulka 8.4: Data pro stanovení opakovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 – 10
- Tabulka 8.5: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 – 5
- Tabulka 8.6: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 150 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 – 10

- Tabulka 8.7: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 1 – 5
- Tabulka 8.8: Data pro stanovení reprodukovatelnosti metody odpovídající přídavku 450 µl zásobního roztoku volných mastných kyselin, vzorky 6 - 10